creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

博士學位論文

유전자변형(GM) 식물의 개발과 제초제저항성 GM 들잔디의 환경위해성평가

Development of Genetically Modified (GM) Plant and Ecological Risk Assessment of GM Herbicide-tolerant Zoysia grass (*Zoysia japonica* Steud.)

濟州大學校 大學院

農化學科

裵 泰 雄

2007年 2月

유전자변형(GM) 식물의 개발과 제초제저항성 GM 들잔디의 환경위해성평가

指導敎授 이 효 연

배 태 웅

이 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

2007년 2월

배태웅의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	**Professor Key-Zung Riu** 제주대학교 교수
委 員	**Doctor Ho-Il Kim** 농업생명공학연구원 연구관
委 員	**Professor Yong-Eok Lee** 동국대학교 교수
委 員	**Professor Shin-Young Park** 제주한라대학 교수
委 員	**Professor Hyo-Yeon Lee** 제주대학교 교수

濟州大學校 大學院

2007년 2월

Abbreviations, Definitions and Acronyms

~ .....Approximately
2,4-D.....2,4-dichlorophenoxyacetic acid
3' .....The distal, or growing end, of an mRNA transcript; the end nearest to or containing the polyA sites
5' .....The proximal, or start end, of an mRNA transcript; the end nearest to the promoter
A.....Adenine
BA.....6-benzyladenine
bp.....Nucleotide base pairs
C.....Cytosine
ca.....Approximately
CaMV.....Cauliflower mosaic virus
cDNA.....Complementary DNA
CoA.....Coenzyme A
CTAB.....Cetyltrimethylammonium bromide
DNA.....Deoxyribonucleic acid
dATP.....Deoxyadenosine triphosphate
dCTP .....Deoxycytidine triphosphate
E. coli .....Escherichia coli
EDTA.....Ethylenediaminetetraacetic acid
G.....Guanine
GM.....Genetically modified
GMO.....Genetically modified organism
GUS.....β-glucuronidase
HCl.....Hydrochloric acid
***hmgr.*.....3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase**
***hpt*.....Hygromycin phosphotransferase**
IPCR.....Inverse polymerase chain reaction
Kb.....Nucleotide kilobase pairs
kD.....Kilodalton
L.....Liter
LB.....Left Border
M.....Molar
mg.....Milligram
mL.....Milliliter
mM.....Millimolar

Abbreviations, Definitions and Acronyms1 (continued)

mRNA.....**Messenger RNA**
MS.....**Murashige and Skoog**
MW.....**Molecular weight**
NAA.....***α*-naphthalene acetic acid**
NaCl .....**Sodium chloride**
NaOH.....**Sodium hydroxide**
Na_2HPO_4 .....**Sodium phosphate dibasic**
NOS.....**Nopaline synthase**
***npt*II** .....**Neomycin phosphotransferase II**
OECD.....**Organization for Economic Co-operation and Development**
ori.....**Origin of replication**
***ori*-V**.....**Bacterial origin of replication from RK2 plasmid**
PAGE.....**Polyacrylamide gel electrophoresis**
PCR.....**Polymerase chain reaction**
PEP.....**Phosphoenolpyruvate**
RB .....**Right Border**
RNA.....**Ribonucleic acid**
rpm .....**Revolutions per minute**
RT-PCR.....**Reverse transcriptase polymerase chain reaction**
SDS .....**Sodium dodecyl sulfate**
sp. .....**Species**
spp.....**Sub-species**
SSC.....**Saline-sodium citrate buffer. 20X SSC is 3 M sodium chloride, 0.3 M sodium citrate**
T.....**Thymine**
T-DNA.....**Transferred DNA**
TE buffer.....**Tris-EDTA buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA)**
Tris .....**Tris(hydroxymethyl)aminomethane**
U.S.....**United States**
v/v.....**Volume/volume**
WT.....**Wild-type**
w/v.....**Weight/volume**

목 차

ABSTRACT 1

제 1부. *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 민들레의 형질전환

1. Abstract 4
2. 서 론 5
3. 재료 및 방법 7
   1) 식물재료 7
   2) 잎 절편을 이용한 식물체 재분화 7
   3) *Hmgr* 유전자가 포함된 pCAMBIA1301-KH6 벡터 제작 9
   4) *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 민들레의 형질전환 방법 11
   5) GUS 발현 분석 13
   6) Southern bolt 분석 13
   7) RT-PCR 분석 14
4. 결 과 15
   1) 잎 절편으로부터 민들레 재분화 15
   2) 민들레의 형질전환 효율 20
   3) 형질전환된 민들레의 분자생물학적 분석 21
   4) 2차 재분화된 형질전환식물체의 GUS 발현 확인 23
   5) 형질전환 민들레에서 *hmgr* 유전자의 발현 확인 23
5. 고 찰 25
6. 적 요 26
7. 인용문헌 27

제 2부. 비선택성 제초제저항성 GM 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 개발 및 환경경위해성평가

Ⅰ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 개발 30

1. 서론 30
2. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 개발목적 32
3. 환경위해성평가의 도입 35
4. 인용문헌 38

Ⅱ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 유전적 안전성 검정 41

1. Abstract 41
2. 서 론 42
3. 재료 및 방법 44
   1) 식물재료 44
   2) Genomic DNA 추출 44
   3) PCR 분석을 통한 도입유전자의 확인 45
   4) Southern blot 분석을 통한 도입 유전자의 copy 수 조사 45
   5) 멘델의 유전법칙을 이용한 분리비 검정 45
   6) 제초제 살포를 통한 포장 검정 46
   7) Inverse PCR을 통한 게놈 내의 유전자 삽입 부위 조사 46
   8) 클로닝 및 염기서열 분석 48
4. 결과 및 고찰 49
   1) 분자생물학적 방법에 의한 유전자발현 확인 49
   2) 멘델의 유전법칙에 따른 후대 분리비 검증 50
   3) 비선택성 제초제저항성 유전자의 세대간 안정적 발현 검정 51
   4) Inverse PCR 52
   5) 염기서열 분석결과 53
5. 적 요 55
6. 인용문헌 56

Ⅲ. 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 실질적 동등성 검정

1. Abstract 57
2. 서 론 58
3. 재료 및 방법 60
   1) 공시재료 및 GMO 격리포장의 잔디재배 60
   2) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장의 토양성분 조사 61
   3) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디의 형태적 특성 61
   4) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디의 엽록소 함량 62
   5) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디 잎의 무기성분 조사 63
   6) 종자의 형태 및 종자 발아율 측정 63
   7) 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 피복율 및 포복경 생육조사 64
4. 결과 및 고찰 66
   1) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장의 토양성분 조사 66
   2) 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 생태적 특성 비교 66
   3) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디 잎의 무기성분 비교 69
   4) 들잔디 종자의 형태 및 발아율 비교 71
   5) 영양번식을 통한 들잔디의 피복율과 포복경 생육 73
5. 적 요 75
6. 인용문헌 76

Ⅳ. 야생형 들잔디로 비선택성 제초제저항성 유전자의 이동가능성 검정

1. Abstract 80
2. 서 론 81
3. 재료 및 방법 83
   1) 식물재료 및 시험포장 83
   2) 개화시기의 기상조건 84
   3) 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 교배가능성 조사 85
   4) 근거리 (50 cm) 에서의 교배율 조사 86
   5) 반경 3 m 이내의 야생형 들잔디 구역에서의 교배가능성 조사 88
   6) 반경 3 m 이상 9 m 이내에서 동종 및 근연종과의 교배가능성 조사 89
   7) 42 m 이내의 거리에서 교배가능성 조사 90

8) 반경 3 km 이내의 자연환경에서 유전자이동 가능성 조사 91
9) 비선택성 제초제저항성 실험 및 PCR 검정방법 92
4. 결과 및 고찰 93
1) 비선택성 제초제저항성 들잔디와 야생형 들잔디의 교배가능성 검정 93
2) 1 m 이내의 거리에서 유전자이동성 검정 94
3) 반경 3 m의 야생형 들잔디 구역에서 유전자이동 가능성 검정 95
4) 자연 교배된 야생형 들잔디 후대에서 *bar* 유전자의 검출 97
5) 반경 9 m 및 42 m 이내에서 유전자이동성 검정 97
6) 반경 3 km 이내의 거리에서의 유전자 이동성 101
5. 적 요 103
6. 인용 문헌 104

Ⅴ. 타종 식물로 비선택성 제초제저항성 유전자의 이동가능성 및 잡초화 검정

1. Abstract 106
2. 서 론 107
3. 재료 및 방법 109
1) 공시재료 및 시험포장 109
2) 개화시기 조사 109
3) 잡초와의 교잡가능성 조사 110
4) 띠 (Cogon grass)와의 교잡가능성 조사 111
5) 제초제 살포시험 및 분자생물학적 검정방법 112
6) 잡초와의 경쟁성 조사 113
4. 결과 및 고찰 114
1) 개화기간 조사 114
2) 비선택성 제초제저항성 들잔디와 잡초 간의 교잡가능성 검정 116
3) 제주 자생 띠에 대한 유전자이동 가능성 검정 117
4) 자연환경에서 들잔디의 생육 및 경쟁성 118
5) 들잔디의 잡초화가능성 검정 119
5. 적 요 122
6. 인용 문헌 123

Ⅵ. 비선택성 제초제저항성 들잔디와 비표적생물체 간의 수평적 유전자이동 (Horizontal Gene Transfer) 가능성 검정

1. Abstract 125
2. 서 론 126
3. 재료 및 방법 128
   1) 실험재료 128
   2) DNA의 추출 128
   3) 16S rDNA 염기서열 분석에 의한 풀무치 장내세균의 동정 129
   4) Southern hybridization 130
   5) PCR 분석 131
4. 결과 및 고찰 132
   1) 풀무치 장내 세균상의 동정 132
   2) Southern hybridization에 의한 유전자전달의 검정 134
   3) PCR에 의한 유전자전달의 검정 136
5. 적 요 138
6. 인용문헌 139

Ⅶ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 화분 알레르기 반응성 검토

1. Abstract 142
2. 서 론 143
3. 재료 및 방법 145
   1) 시험대상 145
   2) 잔디의 화분단백질을 이용한 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 145
   3) 알레르기 피부단자시험 146
   4) 도입 유전자의 알레르기 상동성 검색 147
4. 결과 및 고찰 148
   1) SDS-PAGE 분석 148
   2) 알레르기 피부단자시험 149
   3) 도입 유전자의 알레르기 상동성 검정 및 안전성 153
5. 적 요 155
6. 인용문헌 156

Ⅷ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 비의도적 방출에 따른 대처방안

1. Abstract 161
2. 서 론 162
3. 재료 및 방법 163
1) 식물 재료 163
2) 비선택성 제초제저항성 들잔디의 제초제 활성 조사 163
4. 결과 및 고찰 164
1) 비선택성 제초제저항성 들잔디의 제초제 활성평가 164
5. 적 요 166
6. 인용문헌 167

Ⅸ. 요약문 169

List of publications 172

BIOGRAPHICAL SKETCH 176

감사의 글 177

그림 목차

제 1부. *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 민들레의 형질전환

Figure 1. Relationship of biosynthesis to the isoprenoid pathway 6

Figure 2. Schematic diagram of T-DNA region of vector pCAMBIA1301-KH6. 10

Figure 3. Transformation stages of dandelion (*Taraxacum platycarpum* H. Dablstaed) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. 12

Figure 4. Shoot regeneration from leaf explants of dandelion on LCSM medium containing various combinations of BA with NAA. 16

Figure 5. Shoot regeneration from leaf explants of dandelion on LCSM medium containing various combinations of kinetin with NAA. 17

Figure 6. Effect of cefotaxim concentrations on shoot regeneration from cotyledon explants of WT dandelion. 18

Figure 7. Effect of hygromycin concentrations on shoot regeneration from cotyledon explants of WT dandelion. 19

Figure 8. Southern analysis of genomic DNA of transgenic dandelion plants with hph probe. 21

Figure 9. Histochemical GUS staining of primary and secondary transgenic plants. Blue staining indicates GUS expression. 22

Figure 10. RT-PCR analyses of primary and regenerated dandelion transgenic plants. 24

제 2부. 비선택성 제초제저항성 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 개발 및 환경위해성 평가

Ⅰ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 개발

Figure 11. The diagram of bialaphos reaction as herbicide in plants. 33

Figure 12. Breakdown curve for glufosinate-ammonium in a sandy loam soil under aerobic conditions, at field rates, temperature 20℃. 33

Figure 13. Decrease of GM soybean herbicide use in USA. 34

Ⅱ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 유전적 안전성 검정

Figure 14. The Diagram for location of the inserts in plant cells and sequence of flanking region. 47

Figure 15. PCR products amplified with bar gene primer. 49

Figure 16. Southern blot analysis and T-DNA region in GM herbicide-tolerant Zoysia grass. 50

Figure 17. Characteristic of GM herbicide-tolerant Zoysia grass on field. 52

Figure 18. The diagram of inverse PCR and result from herbicide-tolerant Zoysia grass genomic DNA. 53

Figure 19. The results of DNA sequence matching with rice at left border. 54

Figure 20. The results of DNA sequence matching with rice at the right boarder. 55

Ⅲ. 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 실질적 동등성 검정

Figure 21. The ecological risk assessment field for herbicide-tolerant Zoysia grass. 60

Figure 22. The relationship between total chlorophyll contents and SPAD values. 62

Figure 23. Regression analysis of actual percent cover values against valued generated by digital image analysis. 64

Figure 24. Germination of the WT and GM Zoysia grass seed in natural condition. 72

Figure 25. Effects of planting date on coverage of WT and GM Zoysia grass. 74

Ⅳ. 비선택성 제초제저항성 유전자의 야생형 들잔디로 이동가능성 검정

Figure 26. The test fields of gene flow for ecological risk assessment. 83

Figure 27. Weather condition for gene flow test (May 1-May 31, 2005) 84

Figure 28 Assessment of hybridization between WT and GM Zoysia grass at distance in near 0cm. 85

Figure 29. Test for the cross hybridization between WT and GM grass, according to an Alternating Population Combination Design. 86

Figure 30. Schematic illustration for testing the cross hybridization between WT and GM grass according to the completely randomized plot. 87

Figure 31. Test for the gene flow from GM to WT Zoysia grass within 3-m radius. 88

Figure 32. Test for the cross hybridization between GM Zoysia grass and WT Zoysia grass relatives. 89

Figure 33. Assessment of hybridization between WT and GM Zoysia grass from a distance to 42 m. 90

Figure 34. Test for the potential gene flow from GM grass to WT grasses within 3-km radius during two-year period from 2003 to 2005. 91

Figure 35. The result of PCR analysis for gene flow test in field 97

Figure 36. Distance dependence for gene flow from the GM- to WT-Zoysia grass within 3m radius. 98

Figure 37. The result of herbicide trial in 90 site of WT Zoysia grass 101

Figure 38. PCR analysist of the potential gene flow from GM grass to WT grasses within 3-km radius. 102

Ⅴ. 비선택성 제초제저항성 유전자의 타종으로 이동가능성 및 잡초화 검정

Figure 39. Flowering of the Zoysia grass and weeds grown on the GM Zoysia grass field. 110

Figure 40. Test of outcrossing with Cogon grass at the GM Zoysia grass confined and unconfined fields. 111

Figure 41. Test of the potential gene flow from GM grass to Cogon grasses within 2-km radius during two-year period from 2003 to 2005. 112

Figure 42. The 14 cohabitant weed plants within the GM grass test plot facility. 115

Figure 43. PCR analysis for gene flow test of weed plants by bar primer and S8-Actin primer. 116

Figure 44. Comparison of growth characteristic between WT and GM Zoysia grasses at natural condition. 119

Figure 45. Zoysia japonica plants are overcame by dominant weed plants under natural ecological conditions. 120

Ⅵ. 비선택성 제초제저항성 들잔디와 비 표적생물체간의 수평적 유전자이동 (Horizontal Gene Transfer) 검정

Figure 46. Southern hybridization analyses of microbial genomic DNAs digested with HindⅢ and probed with DIG-labeled bar and hpt gene fragments. 135

Figure 47. PCR analyses for detecting bar gene (A) and hpt gene (B) in microbes isolated from WT and GM field . 136

Ⅶ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 화분 알레르기 반응성 검토

Figure 48. The procedure of skin prick test with Common and Zoysia grass pollen allergens. 147

Figure 49. Seperation of WT and herbicide-tolerant Zoysia grass pollen extracts by 10% and 12% SDA-PAGE. 149

Figure 50. The FASTA program of amino acid sequence for search the allergen with PAT protein. 153

Ⅷ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 비의도적 방출에 따른 대처방안

Figure 51. Eliminated the herbicide-tolerant Zoysia grass from trial of herbicide. 165

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

표 목차

제 1부. *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 민들레의 형질전환

Table 1. Summary of media used in the dandelion culture and transformation system. 8

Table 2. Transformation efficiency of Dandelion (*Taraxacum platycarpum* Dablstaed) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. 20

제 2부. 비선택성 제초제저항성 GM 들잔디의 환경위해성평가

Table 3. The Summary of Regulatory Approvals as Crops of integrated PAT 37

Table 4.Sets of oligo nucleotide primers for inverse PCR. 48

Table 5. Segregation of herbicide-tolerant in T_1 progeny of transgenic plants 51

Table 6. Nutrient contents in 0.5kg of soil mixture used to grow the WT and GM Zoysia grass. 67

Table 7. Morphological characteristics of leaves of WT and GM Zoysia grasses 68

Table 8. Mineral contents in leaves of WT and GM zoysia grasses Sample 70

Table 9. The seed characteristics of WT and GM Zoysia grass using seven morphological traits 71

Table 10. Growth characteristics of WT and herbicide-tolerant Zoysia grass using 4 morphological traits 73

Table 11. Test for the potential cross-hybridization between WT and GM Zoysia grass at close proximity (>0 cm). 93

Table 12. Result of the cross hybridization between WT and GM grass, according

to an alternating population combination design at distance in 0.5 m. 94

Table 13. Assessment of hybridization between WT and GM Zoysia grass according to the completely randomized plot at distance in 0.5 m 95

Table 14. Assessment of hybridization between WT and GM Zoysia grass within 3m radius. 96

Table 15. Test for the outcrossing from GM-Zoysia grass to inter- and intra-species within 9m radius 99

Table 16. Test for the potential gene flow from herbicide-tolerant to WT Zoysia grass within 42m. 100

Table 17. The result of gene flow test from GM zoysia grass to Cogon grass. 117

Table 18. Nucleotide sequences of the primers used in this study 130

Table 19. Bacterial species found in the gut of locust captured in the field of WT and herbicide-tolerant Zoysia grass. 133

Table 20. Results from the skin prick tests for common and WT and GM Zoysia grass allergens. 151

Table 21. The Co-sensitization results from the skin prick tests of WT and GM Zoysia grass. 152

Development of Genetically Modified (GM) Plant and Ecological Risk Assessment of GM herbicide-tolerant Zoysia grass (*Zoysia japonica* Steud.)

Tae-Woong Bae

(Supervised by Professor Hyo-Yeon Lee)

Department of Agricultural Chemistry
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

The present study was carried out for the development of genetically modified plant and ecological risk assessment of genetically modified (GM) herbicide-tolerant Zoysia grass (*Zoysia japonica* Steud.) for a formal approval to release the commercial planters. For establishment of ecological risk assessment was understand the full procedure of transformation method, analysis and integrated gene.

The first section showed the development of transgenic dandelion (*Taraxacum platycarpum* H. Dablstaed) by *Agrobacterium*-mediated transformation. The pre-culture period of days were very important factor for the highly efficient transformation to insert the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (*hmgr*) gene by *Agrobacterium*-mediated protocol. Expression of the integrated gene was well stabilized in regenerated transgenic plants. Evidence of efficient transformation obtained by molecular analysis. The GM plant became the raw material for ecological risk assessment.

And the second section was indicated the ecological risk assessment of GM herbicide-tolerant Zoysia grass, as have stable characteristic of integrated gene at the next generation.

The aim of herbicide-tolerant Zoysia grass was to decrease the cost, problem of environmental risks and management of weeds, and have to various functional cultivar. The transformation of Zoysia grass with *bar* gene derived from *streptomyces hygroscopicus* using *Agrobacteroium*-mediated method and characterization of the transgenic plants inculding response to herbicide-tolerance. The ecological risk assessments of GM herbicide-tolerant Zoysia grass were performed to get governmental approval of GM herbicide-tolerant Zoysia grass. Experiments were done according to the guidelines (Notification # 2002-2) of the Ministry of Agriculture and Forestry (MAF). In these assessments, substantial equivalence, cross fertilization, gene flow, occurrence of allergy, remove and studies of non-target biota in confined and unconfined test fields for environmental safety were included between wild-type (WT) and GM herbicide-tolerant Zoysia grass.

The result of southern blot and segregation of T_1 progeny showed that the *bar* transgene was stably integrated into the genome of transgenic plants. T_3 and T_4 progeny of GM herbicide-tolerant Zoysia grass showed herbicide-tolerance at the unconfined field. The integrated gene was stably inserted in chromosome at the plant genome.

For substantial equivalence, there was no difference between WT and GM Zoysia species. To assess cross-fertilization and gene flow, the bialaphos, a non-selective herbicide, was used. The results showed that cross-fertilization and gene flow from GM herbicide-tolerant Zoysia grass was not identified in weed plants but was occurred in WT Zoysia grass (on average, 6% near 0 cm, 1.2% at the distance of 50 cm and 0.12% at a radius of 3 m, and 0 % at the distances over 3m).

The Zoysia grass is not a dominant plant and does not spread into the weeded area easily. In fact, the Zoysia grass field is completely dominated by the weeds within 2-3 years of cohabitation. The effects of dominant weeds on the GM herbicide-tolerant Zoysia grass, showing the dominance of the weeds over the turf grass. This result indicates that the GM herbicide-tolerant Zoysia grass does not have negative impact on microbial flora in the gut of locust, We then investigated whether

the horizontal gene transfer (HGT) occurred from GM herbicide-tolerant Zoysia grass to microbes in soil, rhizosphere and faecal pellets from locusts by utilizing molecular tools such as Southern hybridization and polymerase chain reaction (PCR).

The skin test for allergic reaction using grass pollen extracts are under going six subjects (4.7% of the 127 test subjects) developed a positive allergenic reaction to both WT and GM Zoysia pollens. However, no difference between the two types of pollens were observed. The *bar* and *hpt* genes showed no apparent risks to human and animal health risks in terms of cytogenetic toxicity and allergenic reaction.

The non-selective herbicides without glufosiante were efficiently eliminated the herbicide-tolerant Zoysia grass for the risk management. The herbicide-tolerant Zoysia grass in environment, had difficulty with growth by the dominant weeds and grass pathogens. when glufosiante dose not applied there were no advantage for the herbicide-tolerant Zoysia grass to grew. There for the herbicide-tolerant Zoysia grass did not cause any environment risk.

On the basis of these initial studies, we conclude that the GM herbicide-tolerant Zoysia grass generated in our laboratory and tested in the Nam Jeju County field does not appear to pose a significant risk in its cultivation outside of the test field.

December 17, 2006 *Bae Tae Woong*

제 1부. *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 민들레의 형질전환

1. Abstract

Dandelion plants, the genus *Taraxacum*, are used in herbal medicine owing to their choleretic, diuretic and anti-carcinogenic activities and several medicinal compounds have been isolated from the roots of these plants. Metabolic manipulation of secondary metabolite biosynthesis is a potential strategy to improve the production of high-value secondary metabolites. The enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (*hmgr*) is known to control a key regulatory step in the isoprenoid pathway. We report an efficient transformation protocol for stable introduction of *hmgr* into dandelion plants (*Taraxacum platycarpum* H. Dablstaed), which is essential for the biotechnological approach. The Agrobacterium tumefaciens strain EHA105 containing the binary vector, pCAMBIA1301, with GUS and *hmgr* genes, showed high transformation efficiency after 3–5 weeks hygromycin selection. Southern blotting, GUS staining and RT-PCR analyses demonstrated stable integration of one copy of the *hmgr* gene into the dandelion genome. Expression of the integrated genes was particularly eminent in root tissues of primary transgenic plants. The establishment of an efficient transformation method may facilitate the improvement of medicinal plant in terms of the accumulation levels of secondary metabolites.

2. 서 론

민들레 (*Traxacum platycarpum* H. Dablstaed)는 국화과의 *Taraxacum* 속 (genus) 식물로서 전 세계적으로 약 400여종이 분포되어있다. 국내에는 자생종인 *Traxacum platycarpum*을 비롯한 좀민들레 (*Taraxacum hallaisanensis*), 산민들레 (*Taraxacum ohwianum*), 흰민들레 (*Taraxacum coreanum*), 서양민들레 (*Taraxacum officianale*) 등이 있는 것으로 보고되었다 (Lee et al., 2002). *Taraxacum* 속의 식물체는 담즙분비, 이뇨, 해열, 해독 및 항암효과가 있어서 약용식물로 이용되고 있다 (Ahmad et al., 2000; choi et al., 2002; Yun et al., 2002; Hu and Kitts, 2003). *Taraxacum* 속 식물의 뿌리에서 검출된 의약성분으로는 guaianolide, desacetylmatricarin과 germacranolides, taraxinic acid, β-glucopyranosyl ester와 sonchuside A가 함유되어 있음이 보고되었다 (Ho et al., 1998; Zielinska and Kisiel, 2000). 두개의 guaianolide와 glucoside 유도체, desacetylmatricarin 8-O-β-glucopyranoside와 11β-hydroxyleukodin, 11-O-β-glucopyranoside,는 항 알레르기성이 있는 것으로 확인되었고 (Michalska and Kisiel, 2003), 항암효과가 있는 triterpenoid 유도체들이 발견되었다 (Takasaki et al., 1999). 민들레로부터 추출된 유도물질들은 항산화제, 암예방 및 치료에 활용 가능할 것으로 기대되고 있다 (Lee, 1997; Cho et al., 2000; Ling, 2000).

최근 10년간 생명공학기술을 이용한 2차대사생합성 과정에서 발생하는 대사산물의 촉진은 유용 천연물질들을 대량 생산하기위해 매우 흥미롭게 고려되고 있다. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (*hmgr*) 유전자는 그림 1에서와 같이 식물체 내의 2차대사과정에서 isoprenoid 생합성을 조절하는 효소로 알려졌고 (Chye et al., 1991), 이 *hmgr* 유전자를 담배와 멜론에 도입한 결과 2차대사를 촉진하여 sterol과 solasodine의 함량을 증가시킨다고 보고하였다 (Schaller et al., 1995; Argolo et al., 2000). 식물체에 외래 유전자를 도입하기 위한 형질전환 방법의 개발은 식물의 2차대사산물을 촉진하여 유용한 물질을 형성하는 필수적인 단계가 되었다. 민들레의 재분화계에 대한 연구는 Bowes (1970), Booth 와 Satchuthananthavale (1974), Lee 등 (2002)에 의해서

보고되었지만, 안정적이고 효과적인 민들레의 형질전환 기술은 확립되지 않았다 (Yeo and Roh, 2001).

본 연구에서는 유용성분 함량을 증가시키기 위해 *hmgr* 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens*을 이용하여 도입하였고, 형질전환 효율을 높일 수 있는 몇 가지 요인들을 조사하여 민들레의 효과적인 형질전환 기술을 확립하고자 한다.

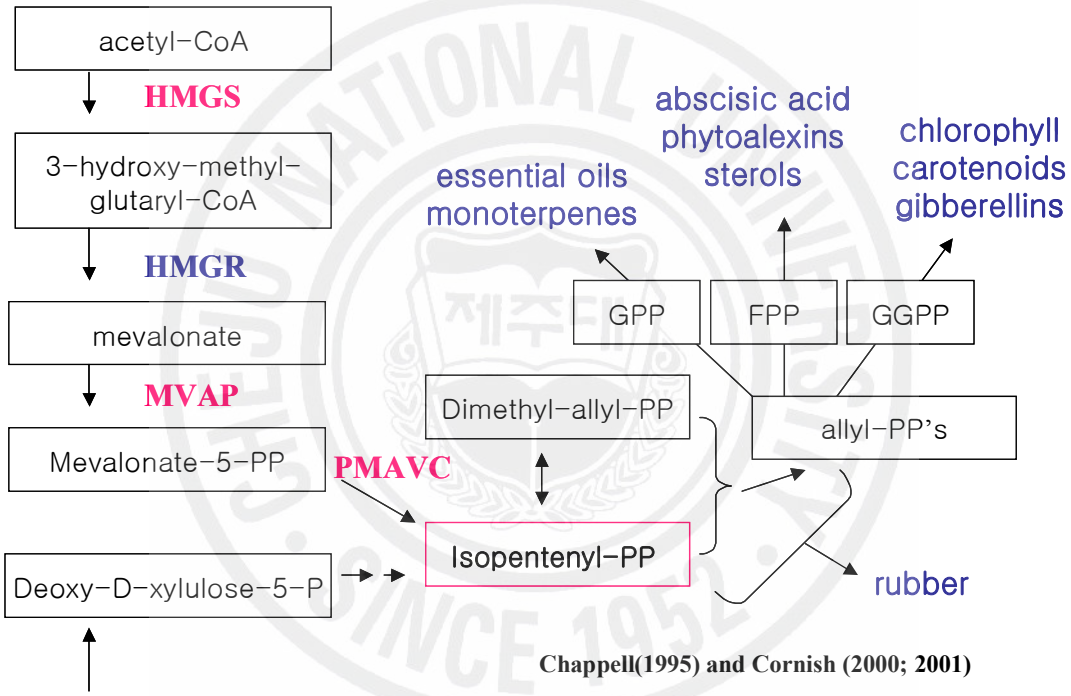


Figure 1. Relationship of biosynthesis to the isoprenoid pathway

3. 재료 및 방법

1) 식물재료

민들레 종자 (*Traxacum platycarpum* H. Dablstaed)는 한국종묘에서 구입하여 사용하였다. 종자는 70% ethanol에 30초 동안 표면살균하고, 1% sodium hyperchlorite solution에 15분 동안 침지한 후 증류수로 3번 이상 세척하였다. 종자파종은 3% (w/v) sucrose와 0.2% (w/v) phytagel이 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 치상하였다. 광도는 40W 형광램프와 적색광 램프를 1:1로 배치하여 20 μmol m^{-2} s^{-1}이었고, 배양조건은 23℃에서 16시간 광주기로 1-2달간 생육시켰다. 본 실험에 사용된 잎 절편 (반경 0.5 cm)은 기내에서 상기의 조건으로 배양된 민들레의 잎을 사용하였다.

2) 잎 절편을 이용한 식물체 재분화

신초 재분화 효과를 조사하기위한 생장조절제는 auxin류의 NAA (0. 0.1, 0.5, 1.0 과 2.0 mg/l)와 cytokinin류의 BA (0, 0.25, 0.5, 1.0 과 2.0 mg/L), kinetin (0, 0.5, 1.0, 2.0 과 3.0 mg/l)을 MS 기본배지에 조합하여 처리하였다. 신초 형성 배지는 MS 기본배지에 생장조절제 (1 혹은 2 mg/L의 BA, 0.1 mg/L NAA), 3% sucrose, 1% maltose 및 0.2% phytagel을 첨가하여 pH 5.8로 조절하였고, 121℃에서 15분간 멸균하여 반경 9 cm의 petri dish에 각각 30 mL씩 분주하여 사용하였다. 잎 절편은 각 petri dish 당 10개씩 치상하여 3반복하였고, 배양조건은 16시간 광주기로 23 ± 1℃에서 배양하였다. 뿌리유도를 위한 배지 (MSRI)는 1/2 MS 배지에 1.5% sucrose, 0.05 mg/l NAA와 0.2% phytagel을 첨가하여 pH를 5.8로 조정하였고, 잎 절편으로부터 형성된 신초를 치상하여 상기의 배양조건에서 뿌리를 유도하였다. 재분화된 식물체의 증식은 생장조절제가 참가되지 않은 1/2 MS 배지에 1.5% sucrose, 0.2% phytagel을 첨가하여 pH 5.8로 조정한 배지에서 생육시켰다. *Agrobacterium*을 제거하기위해

사용한 cefotaxime 농도를 조사였고, 형질전환 식물체의 선발을 위해 hygromycin의 농도를 결정하였다. 본 시험에 사용한 배지와 조성은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Summary of media used in the dandelion culture and transformation system.

Medium	Composition
Basal medium (MS)	MS salts and vitamins with 30 g/L sucrose, 2 g/L phytagel and adjust pH 5.8
Seed germination	MS medium
Shoot induction (LCSM)	MS medium containing 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L BA, 3% (v/w) sucrose + 1% (v/w) maltose, pH 5.8
Root induction (MSRI)	1/2 MS medium containing 0.05 mg/L NAA
Pre-culture	LCSM
***Agrobacterium* culture**	YEP (10 g/L tryptone peptone, 5 g/L bacto-yeast extract, 5 g/L NaCl, 1 g/L D-glucose) with 100 mg/L kanamycin, 100 mg/L rifampicin, pH 5.2
***Agrobacterium* suspension**	MS (without $CaCl_2$) containing 100 mg/L acetosyringone, 20 mg/L pluronic F68 and pH 5.2
Co-culture (LCSaM)	LCSM (without $CaCl_2$) containing 1% (v/w) glucose, 0.1mM acetosyringone, 50mg/L betaine and pH 5.2
Bacteria elimination	1/2 MS medium containing, 0.25g/L ascrobic acid, 250 mg/L cefotaxime and pH 5.8
Elimination medium (LCScM)	LCSaM containing 250 mg/L cefotaxime
Shoot induction and selection	LCSaM medium containing 250 mg/L cefotaxime and 25mg/L hygromycin
Root induction and selection	MSRI containing 250 mg/L cefotaxime and 25mg/L hygromycin
Elongation and selection	1/2 MS medium containing 250 mg/L cefotaxime and 10mg/L hygromycin

MS:Murashige and Skoog, NAA: α-naphthaleneacetic acid, BA: 6-benzyladenine.

3) *Hmgr* 유전자가 포함된 pCAMBIA1301-KH6 벡터 제작

Hmgr 유전자와 GUS (β-glucuronidase) 유전자는 pCAMBIA1301 binary 벡터 (http://www.cambia.org/, CAMBIA, Australia)에 삽입되었고, freez-thaw 방법 (Weigel and Glazebrook, 2002)에 따라서 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 형질전환 하였다. *Hmgr* 유전자 (BT000703)는 *Arabidopsis thaliana* cDNA library로부터 5'*Bam*H Ⅰ (5'-CGG GAT CCT TCC CTC CAA TGG ATC TCC G-3')와 3'*Sac* Ⅰ (5'-CGA GCT CCA AAC GCA TAC GCA CAT GGC-3') primer를 사용하여 PCR 산물을 얻었다. 얻어진 PCR 산물은 pUMB Vector의 *Bam*H Ⅰ- *Sac* Ⅰ 부위에 삽입하였고, CaMV 35S 프로모터에 의해 발현되도록 하였다. pUMB 벡터에서 *hmgr* 유전자와 CaMV 35S 프로모터가 포함된 *Hin*dⅢ-*Eco*R Ⅰ 부위를 절단하여 GUS 유전자가 포함된 pCAMBIA1301의 polyclonal 부위에 삽입하였다. *Hmgr* 유전자와 GUS 유전자가 도입된 pCAMBIA1301은 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 형질전환 하였고, pCAMBIA1301-KH6이라고 표기하였다. pCAMBIA1301-KH6 벡터가 포함된 *Agrobacterium* EHA105 균주는 50mg/L rifampicin과 50mg/L kanamycin이 첨가된 YEP 고체배지에 도말하였다. 선발된 kanamycin 저항성 EHA105 균주는 *hmgr* 특이적 primer를 이용하여 PCR 분석을 통해 도입유전자가 삽입되었음을 확인하였다.

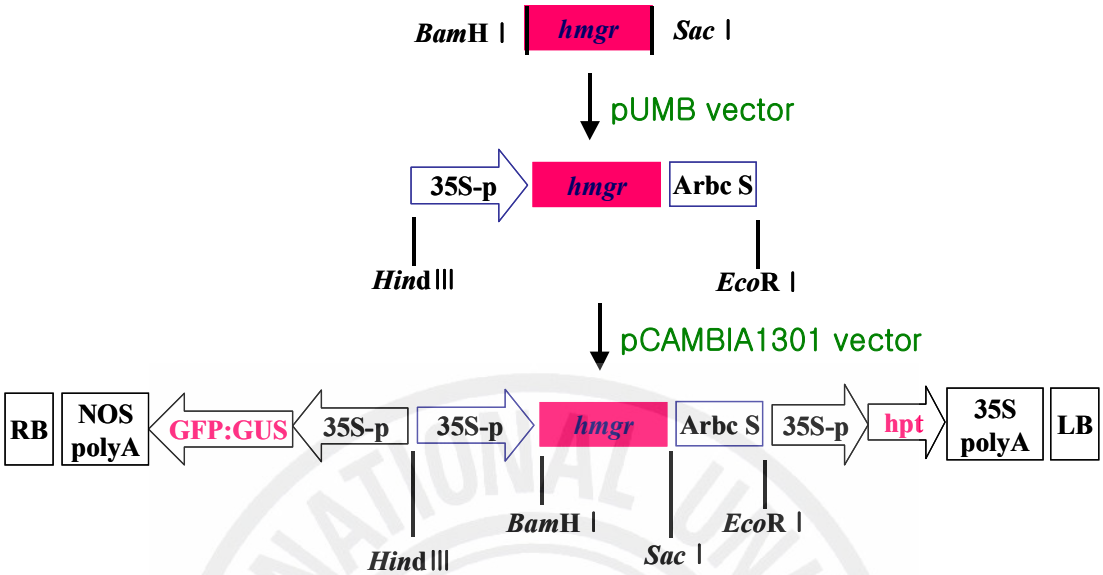


Figure 2. Schematic diagram of T-DNA region of vector pCAMBIA1301-KH6. 35S-P: CaMV 35S promoter of cauliflower mosaic virus, Gfp-gus: gene for green fluorescent protein and β-glucuronidase, ***hmgr***: gene for 3-Hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductase, ***hpt***: gene for hygromycin phosphotransferase, NOS Poly A, Arbc S and 35S-Poly A: terminators.

4) *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 민들레의 형질전환 방법

(1) 민들레 종자를 기내 배양하여 형성된 민들레 잎을 반경 5 mm의 절편체로 만들고, pre-culture배지 (LCSM)에 치상하여 6일 동안 배양하였다 (Figure 3A).

(2) pCAMBIA-KH6 벡터가 삽입된 *Agrobacterium* EHA105 균주는 50mg/L rifampicin과 50mg/L kanamycin이 첨가된 YEP 액체배지에 넣고, 28℃ 배양온도에서 OD_{600nm} 0.6-0.8이 될 때 까지 배양하였다. 증식된 균주는 원심분리를 통해 상층액을 제거하여 균주를 수집하였고, 균주는 50 mL의 현탁배지 (AIM)에서 1시간 동안 pre-culture 하였다.

(3) Pre-culture된 민들레 잎 절편은 균주가 포함된 *Agrobacterium* 현탁 배지에서 15 분간 공동배양 하였다. 공동배양 후, 잎 절편은 멸균된 종이위에서 수분을 제거하였고, 수분이 제거된 절편은 공동배지 (LCSaM)에 치상하여 25℃ 암조건에서 2일 동안 배양하였다.

(4) 공동배양 후, 균주를 멸균수와 bacteria 제거 용액을 사용하여 씻어내고, 항생제가 첨가된 재분화 배지 (LCScM)에 치상하여 1 주일간 16시간 광주기로 배양하였다.

(5) *Agrobacterium* 균주가 제거된 절편체는 25mg/L hygromycin이 첨가된 선발배지 (25HgLCScM)에 치상하고, 신초를 형성시키기 위해서 2-3주 간격으로 새로운 배지로 옮겨 주었다.

(6) 신초가 형성된 절편은 뿌리유도 배지 (25HgMSRI)에서 1-2 주일간 배양하고, 뿌리가 형성된 유식물체는 2차 재분화 과정을 수행하였다 (Figure 3B).

(7) 형질전환된 식물체는 항생제가 첨가된 배지 (25Hg1/2MS)에서 배양하여 증식시켰다 (Figure 3C).

(8) 선발된 식물체는 GUS 발현 및 PCR 검정을 통해 유전자의 발현을 확인하였고, 온실에서 순화시켰다 (Figure 3D-F).

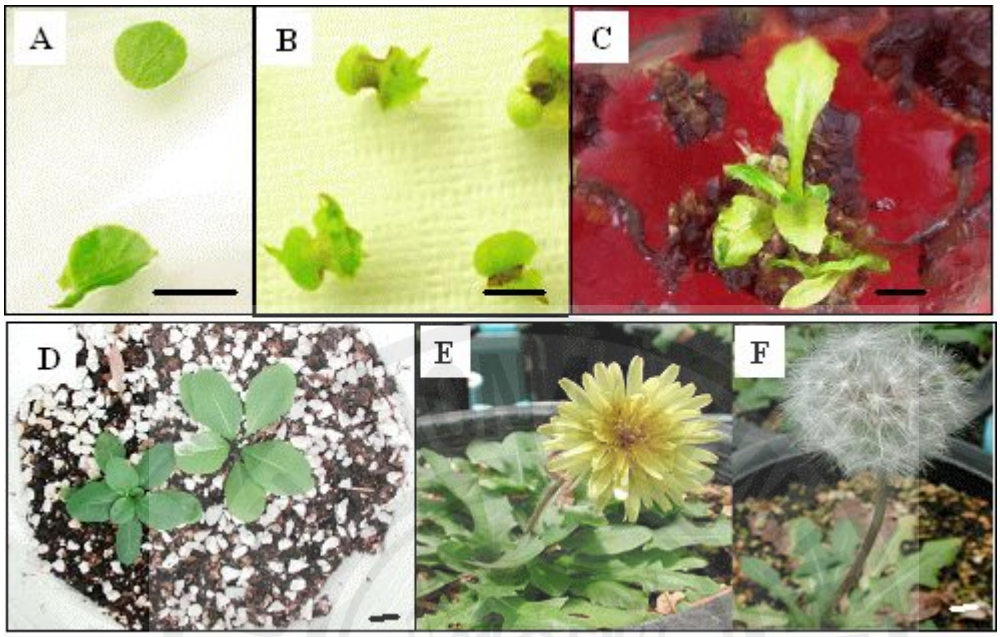


Figure 3. Transformation stages of dandelion (*Taraxacum platycarpum* H. Dablstaed) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. A and B: Pre-cultured leaf and root explants were immersed in LCaSM medium after infected bacterium C: Hygromycin-resistant shoots regenerated from the explants of gene transformation after the Co-culture and bacteria elimination step. D: Acclimation from hygromycin-resistant plants. E: Transgenic plant at flowering stage. F: Seed ripen of transgenic plant.

5) GUS 발현 분석

GUS 발현분석은 Jefferson (1987)의 방법에 따라 시행하였고, 시험 방법은 다음과 같다. 선발된 식물조직을 GUS 염색시약 (40 mM X-gluc, 10 mM EDTA, 0.5 mM $K_3[Fe(CN_6)]$-$3H_2O$)이 첨가된 phosphate 용액 (pH 7.0)에 침지하여 37℃ 암조건에서 12시간 동안 반응시켰다. GUS가 염색된 식물체는 chlorophyll을 제거하기위해 70-100% (v/v) ethanol에 침지시키고, chlorophyll을 추출하여 제거하였다.

6) Southern bolt 분석

식물체의 genomic DNA는 야생형과 hygromycin 저항성 식물체를 사용하여 Dellaporta 등 (1983)의 DNA 추출방법에 따라서 추출, 정제하였다. 정제된 10μg DNA는 *Eco*R Ⅰ 제한효소 (NEB, USA)를 처리하여 단리 시켰고, 전기영동에 의해서 0.8% 아가로스 겔에 분획하였다. DNA가 분획된 아가로스 겔은 Sambrook과 Russell (2000)의 방법에 따라서 나일론 membrane (Amersham Pharmarcia Biotech, UK)에 고정시켰다. Hybridization은 DNA가 고정된 membrane 필터를 ExpressHyb hybridization 용액 (Clontech, USA)과 0.5% SDS가 혼합된 용액에 넣어 65℃에서 2시간 동안 pre-hybridization 하였다. Probe DNA는 pCAMBIA1301의 hygromycin 저항성 유전자 부분을 *Xho* Ⅰ (NEB, USA)제한효소를 처리하여 단리 하였고, [a-^{32}P]dCTP로 방사선표지 하여 65℃에서 10시간 동안 hybridization 하였다. Membrane 필터는 실온에서 2 x SSC 용액으로 30분 간격으로 2번 씻어내고, 2 x SSC /0.05% SDS 용액으로 42℃에서 10분, 1 × SSC /0.05% SDS 용액으로 56℃에서 30분간 세척하였다. Membrane은 X-ray 필름 (Fuji Co., Japan)을 사용하여 -70℃에서 2일간 노출시켜 현상하였다.

7) RT-PCR 분석

야생형과 형질전환된 식물체로부터 RNA 추출은 RNA Isolator (Gibco, USA)를 사용하였고, DNase RQI (Promega, USA)를 처리하여 잔존하는 DNA를 제거하였다. 1차 RT반응을 위한 반응액은 1 μg RNA template, dNTPs와 random primer를 혼합하여 80℃에서 3분간 희석시킨 후 얼음에 보관하였다. 2차 RT 반응은 1차 반응액에 AMV RTase 역전사효소 (Invitrogen, California, USA)를 사용하여 42℃에서 60분간, 95℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하고, -20℃에 보관하였다. GUS 유전자 발현 확인은 특이적 primer인 5‘-GGC ACA GCA CAT CAA AGA GA-3'와 5’-CAA CGA ACT GAA CTG GCA GA-3'을 사용하여 986 bp의 산물을 얻었다. ***Hmgr*** 유전자는 5‘-TGT TAC CGA ATC GCT TCC TGA G-3'와 5’-TAC TGG CAT GAG CGT TGA ATC C-3'의 특이적 primer를 사용하여 870 bp의 PCR 산물을 얻었다. 18S rRNA는 5‘-ATG ATA ACT CGA CGG ATC GC-3'와 5’-CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA-3' primer를 이용하여 303 bp 크기의 PCR 산물을 확인하였다. PCR 조건은 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초로 25반복하였고, 증폭된 산물은 1% 아가로스 겔에서 분획하였다.

4. 결 과

1) 잎 절편으로부터 민들레 재분화

민들레 잎 절편으로부터 유도된 신초의 형성율과 재분화된 잎 형태를 조사한 결과 2.0 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA의 조합처리에서 가장 효과적 이었다 (Figure 4). 또한 1.0 mg/L kinetin과 0.05 mg/L NAA의 조합처리에서도 효과적으로 재분화된 신초를 유도하였다 (Figure 5). 이러한 결과는 Lee 등 (2002)이 보고한 자엽 절편을 2.0 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA에 조합 처리한 경우 신초 형성에 효과적이라는 결과와 유사하게 나타났다. 뿌리의 형성은 0.05 mg/L NAA가 포함된 MS 배지에서 뿌리유도가 효과적이었고, 높은 농도의 NAA에서는 캘러스화 되어 뿌리유도가 되지 않았다.

*Agrobacterium*을 제거하기위한 cefotaxime의 농도를 조사한 결과, 250 mg/L의 cefotaxime과 250 mg/L ascorbic acid에서 균 제거 능력과 shoot 재분화 능력은 다른 농도에서 보다 높게 나타났다. *Agrobacterium*의 제거를 위한 cefotaxime의 농도결정은 균의 제거능력과 식물체의 재분화 능력을 함께 고려해야 한다. 100 mg/L의 cefotaxime에서는 식물체의 재분화 능력은 70% 이었으나, 균의 제거능력이 떨어졌다. 또한 500 mg/L의 cefotaxime의 경우에는 균의 제거능력은 높았으나, 비정상적인 shoot의 형성이 높게 나타나 선발배지로는 적합하지 않았다 (Figure 6).

Hygromycin 선발 농도에 따른 shoot 유도율을 조사한 결과, 형질전환 식물을 선발하기 위해서는 20mg/l 이상의 hygromycin을 첨가하는 것이 효과적이며 본 연구에서는 25mg/l의 hygromycin을 선발농도로 이용하였다. Hygromycin의 농도가 5mg/L일 때 생존한 shoot의 수는 6%였고, hygromycin농도가 증가할수록 shoot의 생존 수는 감소하였으며, 20 mg/L에서 모두 고사하였다 (Figure 7).

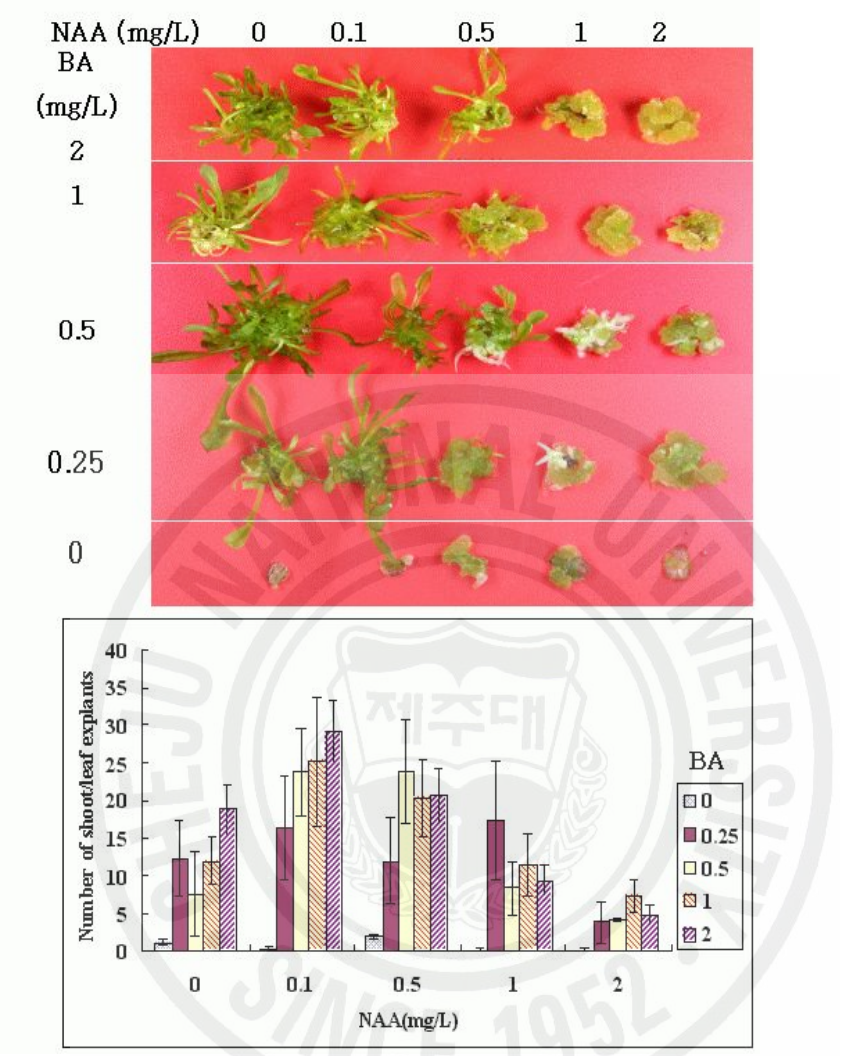


Figure 4. Shoot regeneration from leaf explants of dandelion on LCSM medium containing various combinations of BA with NAA. Columns indicate the mean number of regenerated shoots per explant of three replicates. Bars refer to standard error.

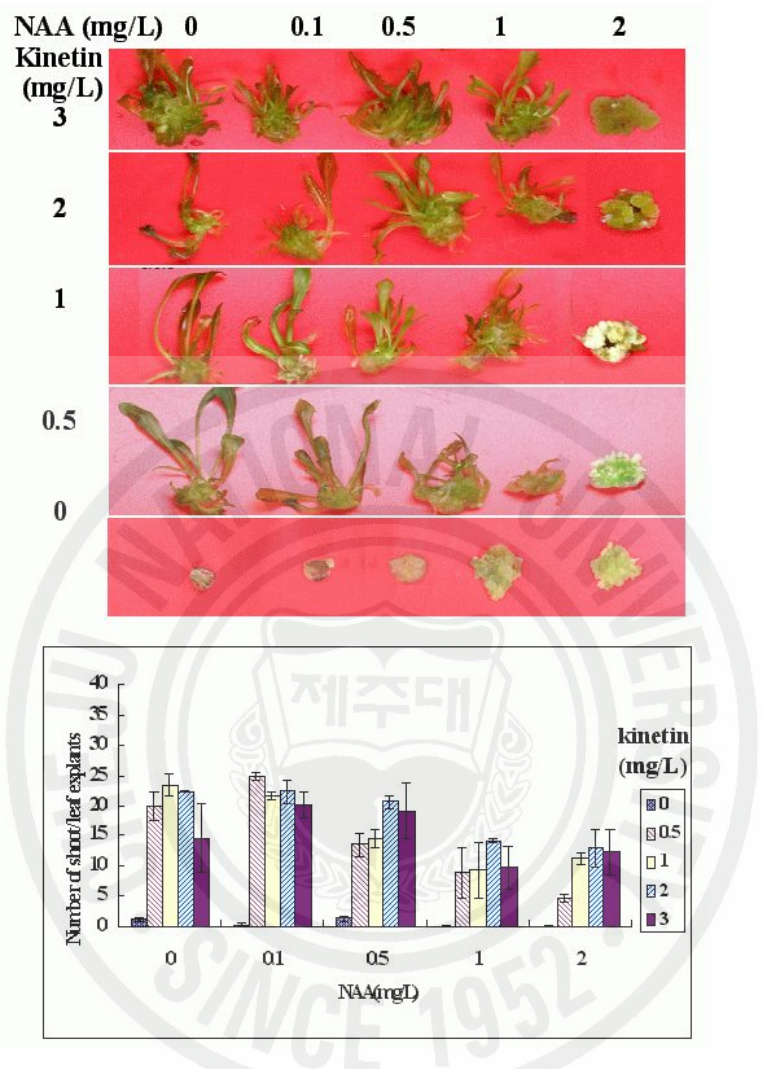


Figure 5. Shoot regeneration from leaf explants of dandelion on LCSM medium containing various combinations of kinetin with NAA. Columns indicate the mean number of regenerated shoots per explant of three replicates. Bars refer to standard error.

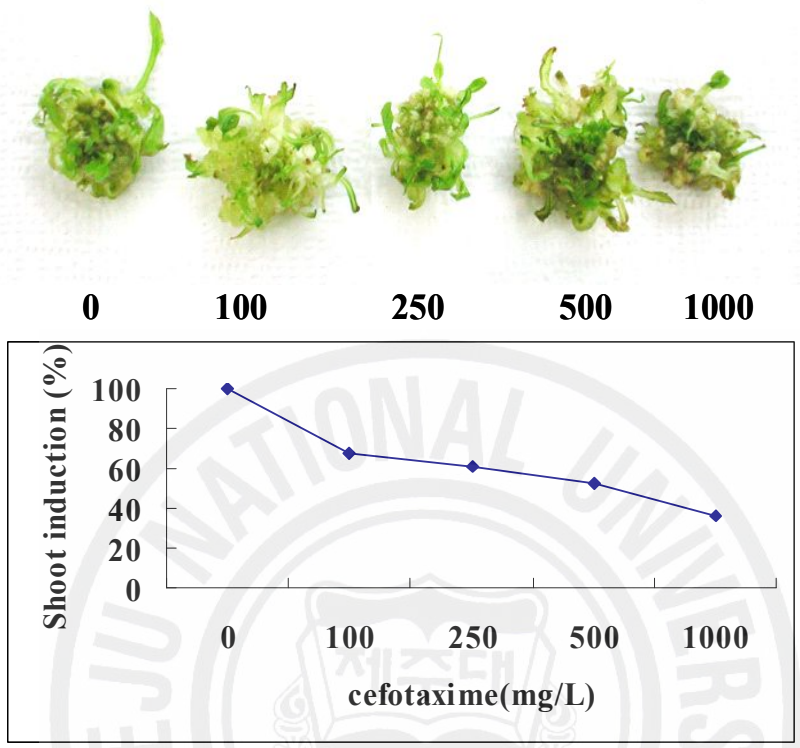


Figure 6. Effect of cefotaxim concentrations on shoot regeneration from cotyledon explants of WT dandelion. Data was collected after 3 weeks of leaf explants culture on medium comprising LCSM medium and various concentrations of cefotaxime.

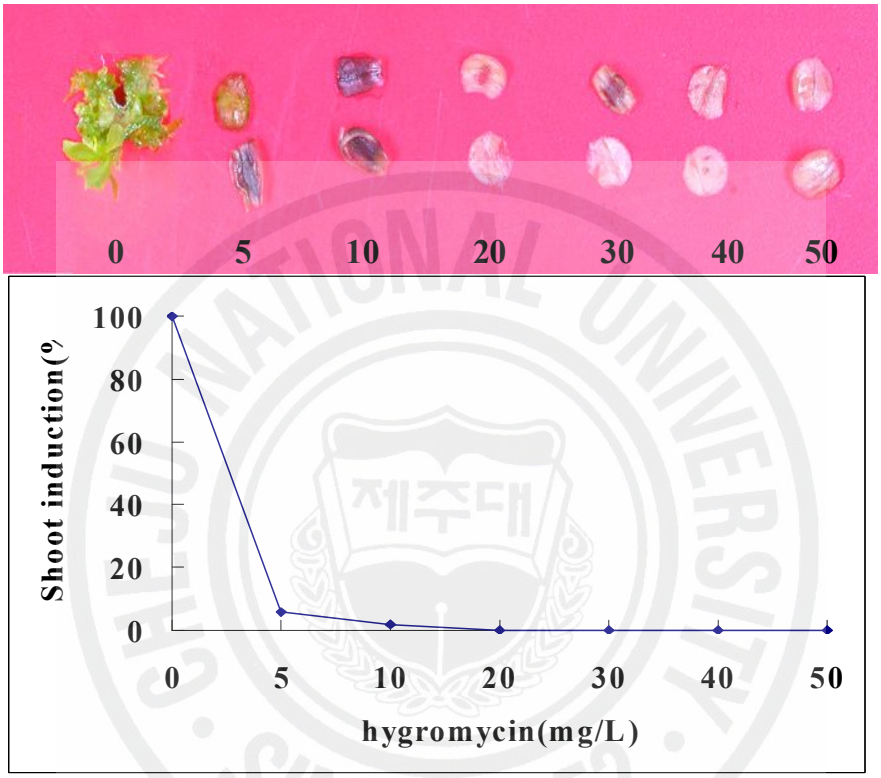


Figure 7. Effect of hygromycin concentrations on shoot regeneration from cotyledon explants of WT dandelion. Data was collected after 2 weeks of cotyledon culture on medium comprising LCSM and various concentrations of hygromycin.

2) 민들레의 형질전환 효율 검정

민들레의 형질전환 효율을 조사하기위해 pre-culture 기간을 조사한 결과, 4일 처리구에서 형질전환 효율이 가장 높게 나타났다. 잎 절편으로부터 hygromycin 저항성 신초의 선발은 3반복 실험한 결과 2-5%의 형질전환 율이 나타났다 (Table 2). 이러한 결과는 binary 벡터 pBI121이 도입된 *Agrobacterium* strain GV3101을 이용한 형질전환에서 나타난 1% 이하의 결과에서 보다 높은 수치를 나타낸다.

잎 절편을 재분화 배지 (LCScM)에서 치상한 결과 절편당 평균 15개의 신초가 형성되었고, 7일 후에 신초가 형성된 절편은 선발배지 (25HgLCScM)에 옮겨 주었다. 3-5주일 후, 유전자가 도입된 1-2개의 신초는 hygromycin에 저항성을 나타내어 신초가 재분화 되었고, 그 밖의 신초는 갈변하였다 (Figure 3C).

재분화된 신초는 뿌리유도배지 (25HgRCIM)에 옮겨 심어주었고, 모든 신초로부터 뿌리를 유도되었다. 뿌리의 형성율은 약 90%이었고, 선발배지 (25Hg1/2MS)에서 식물체 신장과 함께 생육되었다.

Table 2. Transformation efficiency (T.E.) of Dandelion (*Taraxacum platycarpum* H. Dablstaed) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Pre-cultivation period (day)	Number of co-cultivated explants (A)	Produced Hyg^R shoots	Produced Hyg^R plants	Produced Hyg^R plants with GUS activity (B)	T.E. (%)[a]
0	200	0	0	-	0
3	200	84	7	7	3.5
7	200	35	2	2	1

[a]Transformation efficiency was calculated by (B) / (A) * 100

3) 형질전환된 민들레의 분자생물학적 분석

식물체의 DNA는 *Eco*RV 제한효소로 단리 하여 Southern blot 분석한 결과, pCAMBIA1301 벡터의 *hpt* 유전자 부위에 특이적으로 반응하는 단편들을 확인 할 수 있었다. 그림 8에서와 같이 야생형 식물체는 방사성 표지가 나타나지 않았고, 형질전환 식물체 1-5 line에서는 1-2 밴드가 관찰되었다. 특이적 밴드의 크기가 같은 것은 T-DNA 부분에 동일한 위치에 제한효소가 존재 할 것으로 생각된다. 이러한 결과는 형질전환에 의해서 도입된 T-DAN 부분이 식물체 게놈 상에 삽입되었다고 판단할 수 있다.

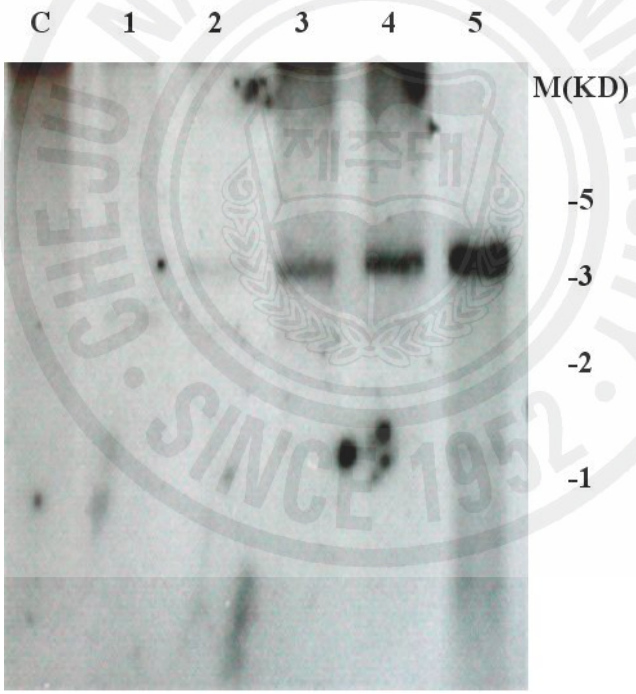


Figure 8. Southern analysis of genomic DNA of transgenic dandelion plants with *hpt* probe. Genomic DNA was digested with *Eco*RV. WT, DNA digest from WT dandelion plant; Lanes 1-5, DNA digests from five independent transgenic lines of dandelion.

GUS 유전자의 발현은 식물체 모든 부위에 염색되지 않고, 부분적으로 나타났다. 특히 식물의 잎에서는 잎맥부분에서 강하게 염색되었고, 뿌리부분에서는 양분의 이동통로인 관다발에서 강하게 염색되었다 (Figure 9). 또한 Hygromycin에 저항성을 나타낸 식물체에 대해서 GUS 유전자를 확인하기위해서 특이적 primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 야생형 식물체에서는 특이적 밴드가 관찰되지 않았고, 1차 형질전환 식물체의 5개 line중 4개가 986 bp 크기의 밴드가 관찰되었다 (Figure 10). Line 2는 hygromycin에 저항성이 나타났으나, GUS 유전자의 특이적 밴드는 관찰되지 않았다. Line 3은 다른 3개의 밴드에서 보다 낮게 발현되어 불완전하게 형질전환이 되었거나 유전자의 발현이 불안정한 것으로 생각된다.

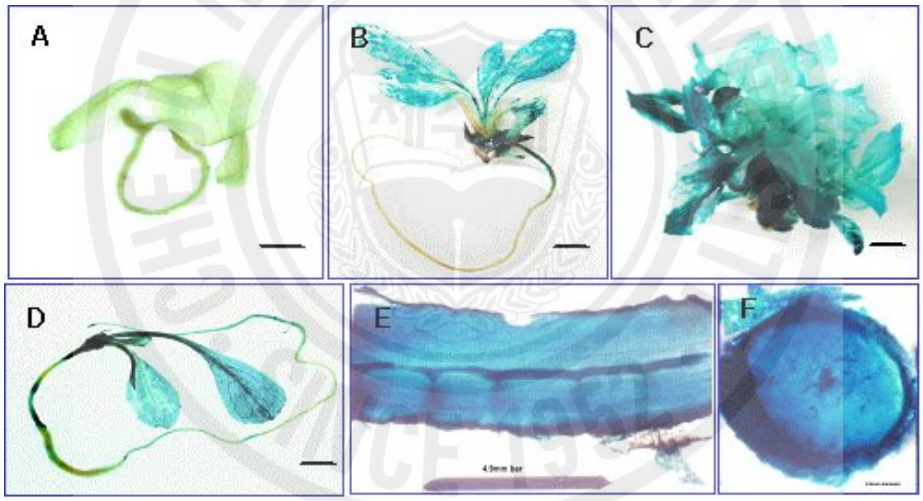


Figure 9. Histochemical GUS staining of primary and secondary transgenic plants. Blue staining indicates GUS expression. A: Uninfected regeneration plant; B: GUS gene expression in putative primary transgenic dandelion); C: regenerated transgenic dandelion shoot and D: plant (2 months old); E and F: GUS staining of longitudinal and horizontal cross-sections of transgenic dandelion root tissues, respectively (3 months old). The black scale are 1 cm and root diameters are about 2.5 mm.

4) 2차 재분화된 형질전환식물체의 GUS 발현 확인

1차 선발된 형질전환 식물체의 잎 절편과 뿌리 절편을 2차 재분화 배지(25HgLCScM)에 치상한 결과, 잎 절편보다 뿌리 절편에서 빠른 재분화력이 나타났다. Browes (1974), Booth와 Satchuthananthavale (1974), Lee 등 (2002)의 연구에서 민들레는 자엽 보다 뿌리를 이용한 재분화가 더 효과적이라는 결과와 일치 하였다. 2차 재분화된 모든 형질전환 식물체들을 GUS 염색한 결과 잎의 전체 부분에서 강하게 발현되었다 (Figure 9). 또한 RT-PCR을 통해서 GUS 유전자의 발현수준을 확인 하였다. 그 결과 재분화된 모든 형질전환 식물체에서 유사하게 유전자의 발현이 관찰되었고, 이러한 결과는 도입유전자의 안정한 발현을 제시하고 있다 (Figure 10).

5) 형질전환 민들레에서 *hmgr* 유전자의 발현 확인

GUS 염색과 RT-PCR 분석을 통해 검토한 GUS 유전자의 발현을 조사한 결과, 형질전환 민들레의 2차 재분화는 도입 유전자를 안정하게 발현 시켰다. *Hmgr* 유전자는 GUS 유전자와 동일한 벡터 내에 삽입되어 있어서 형질전환 식물체에 도입된 *hmgr* 유전자 또한 안정하게 발현 될 것으로 판단된다. 재분화된 형질전환 식물체의 *hmgr* 유전자의 발현을 확인하기위해 RT-PCR한 결과 도입 유전자가 안정하게 발현되는 것을 보여주고 있다. 그림 10은 야생형 민들레를 제외하고, 모든 재분화된 형질전환 민들레에서 *hmgr* 유전자가 안전하게 발현되는 것을 보여 주고 있다. 재분화된 형질전환 신초는 뿌리 유도배지에서 발근되었고, 뿌리가 형성된 식물체는 온실에서 순화 시켰다.

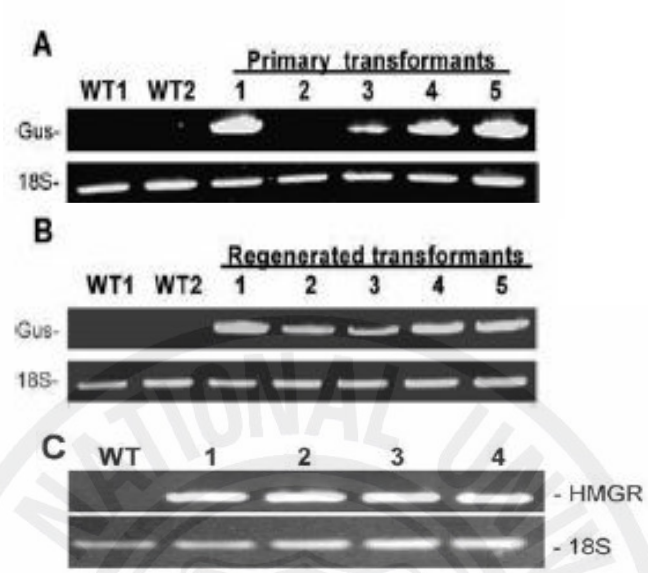


Figure 10. RT-PCR analyses of primary and regenerated dandelion transgenic plants. A: Two wild type (WT) and five independent primary transgenic, B: two WT and five independent regenerated transgenic plants. C: RT-PCR analysis of *hmgr* gene expression in four independent transgenic dandelion plants (WT, wild type; Lanes 1-4, four independent transgenic lines).

5. 고 찰

본 연구에서는 민들레에 *hmgr* 유전자를 안정하게 발현시키는 형질전환 방법을 제시하였고, 형질전환 효율을 높일 수 있는 요인을 찾아내어 효과적인 민들레의 형질전환 기술을 확립하였다. 형질전환 과정은 민들레 잎 절편을 4일간 pre-culture하여 도입 유전자가 포함된 *Agrobacterium* 균에 2일간 공동배양하고, 신초유도, 선발 및 발근유도 배지를 통해 재분화 시켰다. *Agrobacterium*법에 의한 민들레의 형질전환은 Southern bolt, GUS 염색발현, RT-PCR 분석을 통해서 확인하였다. 형질전환된 민들레의 2차 재분화는 도입유전자의 발현을 안정하게 유지시켰다. Acetosyringone이 첨가된 현탁배지는 민들레의 형질전환 효율을 개선하였고, pCAMBIA1301 벡터가 삽입된 *Agrobacterium* EHA105 균주는 pBI121 벡터가 삽입된 *Agrobacterium* GV3101 균주보다 민들레의 형질전환에 효과적이었다. 각각의 형질전환 효율은 EHA105 균주에서 2-5%로 나타났고, GV3101 균주에서는 1% 미만으로 나타났다. 이러한 원인은 *Agrobacterium* 균주와 벡터 내의 선발마커 종류에 따라 다르게 나타날 것으로 생각된다. 민들레의 뿌리를 이용한 형질전환은 형질전환 식물체의 2차 재분화에 효과적이며, 도입 유전자의 발현을 안정하게 유지시켜 주었다. 특히 형질전환된 민들레 뿌리의 증식은 유용성분의 생산을 개선시키기 위한 전략으로서 2차 대사과정에서 대사산물의 함량을 증가 시켜줄 것이다. 따라서 민들레의 효과적인 형질전환 방법의 확립은 2차 대사과정에서 생산되는 약용 및 유용 성분의 함량을 개선하고, 대량생산을 통해서 산업적 이용을 촉진시킬 수 있다.

6. 적 요

민들레 (*Taraxacum platycarpum* H. Dablstaed)는 국화과의 *Taracum* 속으로 전 세계에 400 여종이 분포되어있으며, 담즙분비, 이뇨, 항암효과를 가진 페놀릭 화합물, 터페노이드, 글루코사이드 등의 유용성분을 함유하고 있다. *Hmgr* 유전자는 고무나무의 생합성에 관여하는 유전자로 알려져 있고, 이차 대사산물의 함량을 증가시켰다고 보고되었다. 본 연구에서는 민들레의 유용성분 함량을 증가시키기 위해서 *hmgr* 유전자를 사용하였고, *Agrobacterium* 법에 의한 형질전환 기술을 확립하였다. 민들레의 형질전환 확인방법은 GUS 발현분석, southern blot, RT-PCR을 이용하였고, 민들레의 게놈 내에서 GUS와 *hmgr* 유전자의 발현을 확인하였다. 민들레의 형질전환 효율을 높이기 위해서는 전배양 기간이 중요하였고, 유전자의 안전한 발현을 유도하기 위하여 2단계 선발 시스템이 효과적이었다. 형질전환된 민들레는 뿌리의 대량생산을 통해서 유용성분들을 획득 할 수 있고, 상업적으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

7. 인용문헌

Ahmad VU, Yasmeen S, Ali Z, Khan MA, Choudhary MI, Akhtar F, Miana GA and Zahid M. 2000. Taraxacin, a new guaianolide from *Taraxacum wallichii*. J. Nat. Prod. 63: 1010–1011.

Argoˆlo ACC, Charlwood BV and Pletsch M. 2000. The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of Solanum aviculare. Planta Med. 66: 48–451.

Booth A and Satchuthananthavale R. 1974. Regeneration in root cuttings of *Taraxacum officinale* II. Effects of exogenous hormones on root segments and root callus cultures. New Phytol. 73: 453–460.

Bowes BG. 1970. Preliminary observations on organogenesis in *Taraxacum officinale* tissue cultures. Protoplasma 71: 197–202.

Choi JH, Shin KM, Kim NY, Hong JP, Lee YS, Kim HJ, Park HJ and Lee KT. 2002. Taraxinic acid, a hydrolysate of sesquiterpene lactone glycoside from the Taraxacum coreanum coreanum Nakai, induces the differentiation of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. Biol. Pharm. Bull. 25: 1446–1450

Dellaporta S, Wood J and Hick J. 1983. A plant DNA minipreparation; version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19–21

Ho C, Choi EJ, Yoo GS, Kim K-M and Ryu SY. 1998. Desacetylmatricarin, an anti-allergic component from *Taraxacum platycarpum*. Planta Med. 64: 577–578

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS and Hoekema A. 1993. New *Agrobacterium*

helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Res. 2: 208 – 218

Hu C and Kitts DD. 2003. Antioxidant, prooxidant, and cytotoxic activities of solvent-fractionated dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extracts in vitro. J. Agric. Food Chem. 51: 301 – 310

Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387 – 405

Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Fieldmann KA and Ecker JR. 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. Cell 72: 427 – 441

Koncz C and Schell J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet. 204: 383 – 396

Lee MH, Yoon ES, Jung SJ, Bae KH, Seo JW and Choi YE. 2002. Plant regeneration and effect of auxin and cytokinin on adventitious shoot formation from seedling explant of *Taraxacum platycarpum*. Korean J. Plant Biotech. 29: 111 – 115

Michalska K and Kisiel W. 2003. Sesquiterpene lactones from *Taraxacum obovatum*. Planta Med. 69: 181 – 183

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growild-typeh and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473 – 497

Sambrook J, Russell DW. 2000. Molecular cloning: A laboratory mannual (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schaller H, Grausem B, Benveniste P, Chye ML, Tan CT, Song YH and Chua NH. 1995. Expression of the Hevea brasiliensis (H.B.K.) Mu¨ ll. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction. Plant Physiol. 109: 761–770

Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H, Masuda K, Arai Y, Shiojima K and Ageta H. 1999. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. II. Biol. Pharm. Bull. 22: 606–610

Weigel D and Glazebrook J. 2002. Arabidopsis: A Laboratory Manual (pp. 125–.127). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York Yeo SE and Roh KS. 2001. Transformation of *Taraxacum mongolicum* Hand. by *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 16: 480–485

Yun SI, Cho HR and Choi HS. 2002. Anticoagulant from *Taraxacum platycarpum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 1859–1864

Zielin´ ska K and Kisiel W. 2000. Sesquiterpenoids from roots of *Taraxacum laevigatum* and *Taraxacum disseminatum*. Phytochemistry 54: 791–794

제 2부. 비선택성 제초제저항성 GM 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 개발 및 환경위해성평가

Ⅰ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 개발

1. 서론

들잔디 (*Zoysia jponica* Steud.)는 외떡잎식물에 벼목, 벼과의 여러해살이풀이며, 난지형 잔디로 적응지가 온대에서 열대에 걸쳐 분포되어 전 세계에서 자생하고 있다. *Zoysia* 속은 22종이 있으며, 국내에는 *Zoysia* 속의 *japonica, metrella, sinica, tenuifolia, macrostacya* 종 등이 주로 자생하고 있는 것으로 보고되었다 (Yu et al., 1974; Yang et al., 1995). 들잔디의 생육은 평균 기온이 10℃ 이상에서 생장이 시작되고, 생육적온은 25-35℃ 이며, 10℃ 이하에서는 엽색이 노랗게 변하면서 지상부가 고사되어 휴면기에 들어간다 (Kitamura, 1967; 1997; Kim, 2001).

인류가 들잔디를 생활에 이용한 것은 정원에 잔디를 식재하면서부터 시작되었고, Persia 정원에서부터 시작하여 아라비아, 그리스, 로마로 이어져 왔다. 또한 잔디는 주로 화초와 섞어서 심어지게 되었고, 13세기경에는 Lawn Bowling 장소로 이용될 만큼 인간과 매우 밀접한 식물이다 (Beard, 1973). 오늘날 잔디의 사용은 보다 다양해져서 지표면의 먼지발생의 감소나 스포츠 등의 부상방지를 위해 축구장이나 야구장, 골프장 등에 잔디가 사용되고 있다. 또한 토양침식 방지를 위해 도로 비탈면, 댐, 간척지 등에 잔디를 식재하기도 한다 (Lee et al., 1995). 그 외 문화의 발달과 더불어 정서 생활과 연관이 되는 공원, 정원, 아파트, 학교, 병원 등의 경관 조성용으로 가장 많이 이용될 만큼 우리에게 가장 친숙한 식물이 되었다. 들잔디의 전파는 1890년대에 아시아로부터 미국에 알려져 USDA-ARS와 USGA Green Section 두 기관이 협력하여 들잔디 육종을

시작하였고 (Murray et al., 1985), 1951년 미국에서 잘 적응하는 Meyer를 선발하여 현재까지 이 품종을 가장 많이 재배하고 있다 (Sleper, 1989). 그 후 1982년 USDA의 Murray와 Engelke는 한국, 일본, 태국, 필리핀에서 총 797 계통의 유전자원을 수집하였고 (Murray et al., 1983), 그 중에 엽색, 생육습성, 개화습성, 잎의 질감, 병저항성 등의 형질을 관찰하여 우수하다고 판단되는 품종 Belair를 선발 보급하게 되었다 (Joo et al., 1997) 동시에 USDA의 들잔디 germplasm 중에서 한국에서 채집해간 들잔디 계통에서 생육이 빠르고 세엽 이면서, 내염성이 강한 *Zoysia koreana*를 보고 하였다 (Yu, 1974). 국내의 경우 염도의 등에 의해서 1965년부터 1971년까지 국내에서 많은 들잔디 계통을 수집하여 그 특성을 조사하였고, 종간교배를 통하여 우수한 형질의 들잔디를 선발하였다 (Hong et al, 1985). 이후 잔디의 개발 및 품종육성은 수집된 계통간의 교배육종을 통해서 진행되었고, 최근에는 잔디의 이용 및 기능성이 요구되어 생명공학기술을 이용한 비선택성 제초제저항성 (Toyama et al., 2003), 음지회피성 억제 등의 고품질 잔디가 개발되고 있다.

2. 비선택성 제초제저항성 GM 들잔디의 개발목적

잔디 재배 및 관리 시에 잡초 방제와 병충해 방제를 위해 과다한 농약의 사용은 환경오염의 문제점으로 지적되고 있다 (Choi et al., 1990; Schleicher et al., 1995). 소규모 면적의 잔디밭은 인력에 의해 가능하지만, 골프장, 운동장, 공원 등은 인력으로는 불가능 하여 대부분 선택성 제초제를 사용해서 잡초를 방제하고 있다 (Han, 1987; Gray and Call, 1993). 골프장, 공원 등의 경우 1년간 5회 이상의 제초제를 살포하는 등 최근 제초제의 사용량이 급격히 증가되고 있다 (KCPA, 1995). 이와 같이 잔디밭에 연간 수차례의 선택성 제초제를 살포하는 것은 잔디밭에서 발생되는 잡초의 종류가 다양할 뿐 아니라 발생하는 시기도 서로 다르기 때문에 현재로서는 여러 번 살포할 수밖에 없는 실정이다. 그러나 이러한 노력에도 불구하고 선택성 제초제로 모든 잡초를 제거하기는 불가능하다 (Kim and Kim, 1981; Fry and Upham, 1994; Johnson, 1994). 비선택성 제초제는 효과적으로 잡초를 제거하지만 재배되는 들잔디도 함께 제거되는 단점이 있어서 작물을 파종하기 직전에 살포하는 전처리제로만 사용되었다.

이러한 문제점을 극복하기위해 유전자 변형 기술을 이용한 비선택성 제초제저항성 잔디는 벤트그라스로 널리 알려진 *Agrostis palustris* (Hartman et al., 1994; Asano et al., 1998)에서와 한국 들잔디인 *Zoysia japonica* (Toyama et al., 2003)가 보고되어 있다.

본 비선택성 제초제저항성 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)는 토양의 방선균인 *Sterptomyces hygroscopicus*로부터 유래한 bar 유전자가 도입되어 비선택성 제초제인 바스타 (Glufosiante 성분)에 저항성을 나타낸다. Bar 유전자는 glufosinate-ammonium을 불활성화 시키기 위해 아미노기를 아세틸화 시키는 phosphinothricin-acetyl-transferase (PAT) 효소를 encoding 하여 Glutamine synthetase의 활성을 유지함으로써 비선택성 제초제에 저항성을 나타내게 한다 (Thompson et al., 1987). 바스타의 주성분인 glufosinate-ammonium 은 식물의 glutamine 합성을 억제하여 ammonia를 축적시켜 잡초를 효과적으로 고사시키고 (Bayer et al., 1972; Figure 11), 토양에서 쉽게 분해되어 지하로 침투되지 않아 환경 친화적이라 할 수 있다 (Figure 12).

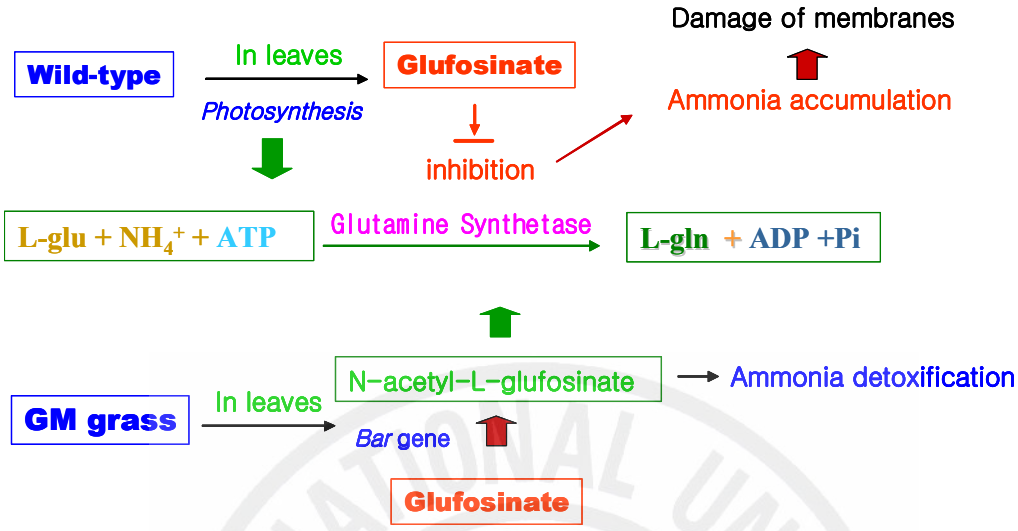
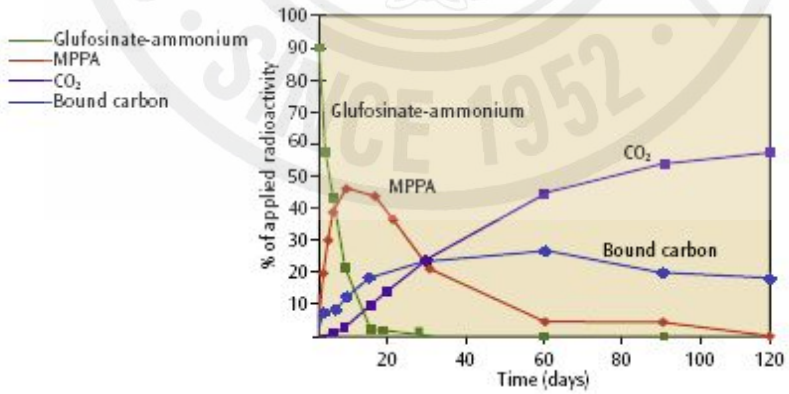


Figure 11. The diagram of bialaphos reaction as herbicide in plants.



(Bayer Cropscience, 2004)

Figure 12. Breakdown curve for glufosinate-ammonium in a sandy loam soil under aerobic conditions, at field rates, temperature 20℃.

또한, 바스타 저항성 유전자는 미국의 Bayer CropScience 사에서 옥수수 T25 (1995), 카놀라 HNC10 (1995), 목화 LLCotton25 (2003), 콩 W62 (1996) 등에 도입되어 환경위해성 평가를 받은 유전자로서 국내에서도 가공용으로 수입되고 있는 작물에 도입된 유전자이다. 제초제저항성 GM 작물은 재배상의 편리함과 함께 농약사용량을 크게 감소시키는 효과도 보인다 (James, 2001). 미국의 경우 각 지역에 3년간 비선택성 제초제저항성 콩을 재배 실험한 결과 기존의 제초제 사용량에 비해 25% 감소시키는 효과를 보였다. 또한 경제적 이득은 1996년에서 1997년에 13%, 1997에서 1998년에 37%, 1998년에서 1999년에 47%로 매년 증가하였다 (James 2001). 이러한 결과는 비선택성 제초제저항성 GM 작물의 재배가 재배경비의 감소 뿐 아니라 제초제의 사용량을 줄임으로써 보다 환경친화적인 작물이 될 수 있음을 보여주었다 (Figure 13).

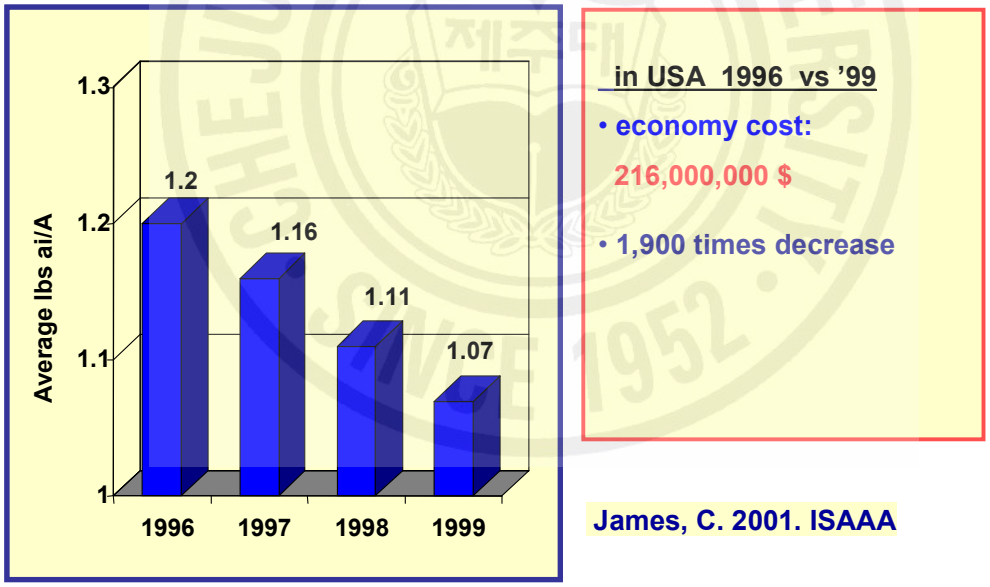


Figure 13. Decrease of GM soybean herbicide use in USA.

3. 환경위해성평가의 도입

GM 작물의 환경위해성 및 안전성 개념의 도입은 1886년 OECD에서 '유전자재조합 DNA의 안전성에 대한 고려사항' 이라는 Blue book이 발간되면서 시작되었다 (OECD, 1986). 1994년 'Flavr saver'라는 잘 무르지 않는 GM 토마토가 처음으로 상업화 되었고, 상업적 GM 작물의 재배가 시작되기 이전부터 안전성평가는 시작되었을 것으로 볼 수 있다 (KRIBB, 2006a). GM 작물의 개발과 재배면적이 증가함에 따라서 GM 작물이 인체 및 환경에 미칠 수 있는 잠재적 위해성에 대한 우려가 높아졌다. 따라서 2000년 생물다양성 협약 당사국 총회에서는 생물다양성 협약 제 19조의 유전자 변형생물체 (LMO)의 수송, 취급, 사용을 위한 사전통보합의 (ALA) 이행을 위한 부속 의정서인 바이오안전성 의정서 (Cartagena Protocol on Biosafety)가 채택되었고, 2003년 9월 바이오의정서가 발효되었다 (KRIBB, 2004). 현재까지 일본, 독일, 영국 등 132개국이 당사국으로의 자격을 획득하였으며, 우리나라의 경우 의정서에 대한 비준으로 농촌진흥청에서 '유전자변형농산물의 환경위해성평가' 심사지침서가 농림부고시 2002-2호로 규정되어 유전자 변형작물의 안전성의 체계를 확보하고 있다 (MAF, 2002).

그 동안 정부가 유전자변형농산물의 안전성 확보를 위해 관련법과 지침 등을 제정하여 추진한 역사를 보면, 국내 생명공학 산업의 기반조성 및 활성화를 위해 1983년에 과학기술부에서 '생명공학육성법'이 처음 제정되었다. 그 후 국내외에서 LMO의 안전성 문제가 새로운 이슈로 나타나자 보건복지부에서는 1997년 4월 '유전자 재조합 실험지침'을 고시하였다. 이 실험지침은 밀폐기준과 방법, 보관, 운반, 양도, 실험 후 처리에 관한사항 등의 주로 병원성 미생물에 대한 내용들 이었다. 1999년 8월 국내에서 처음으로 식품의약품안전청에서 '유전자재조합 식품 및 식품첨가물 안전성 평가자료 심사지침'을 제정하고 식품의약품안전청 지침에 따라 몬산토 코리아에서 신청한 비선택성 제초제저항성 콩인 RRS (Roundup Ready Soybean)에 대하여 8개월간 심사과정을 거쳐 유전자변형 식품으로 안전성을 확인한바 있다. 그 후 2004년 2월 안전성 의무화제도에 따른 개정된 지침에 따라서 2005년 12월 기준으로 콩, 면화,

옥수수, 감자, 유채 등 모두 36개 품목이 식품안전성 심사를 마쳤다. 또한 유전자변형 농산물의 환경위해성평가심사 지침에 따른 심사는 2005년 12월까지 27건이 접수되었고, 16건의 위해성심사가 끝났다 (KRIBB, 2006b). 이상에서처럼 외국에서 개발된 GM작물에 대한 심사는 여러 건이 있었고 안정성이 확인되어 현재 식품으로도 이용되고 있다. 우리나라의 연구기관이나 대학에서도 현재까지 GM작물의 연구개발이 꾸준히 진행되어 왔으나 GM작물에 대한 실용화를 위한 환경위해성평가가 이루어진 작물은 아직 전혀 없는 실정이다.

따라서 국내에서 개발된 GM 작물의 환경위해성평가 및 실용화가 절실하게 요구되었고, 본 연구팀에서 개발된 환경친화적인 비선택성 제초제저항성 들잔디가 환경위해성평가를 통해 실용화 하는 것이 이 연구의 목적이다. 현재까지 PAT 단백질이 발현되어 비선택성 제초제저항성을 나타내는 약 30여 품종이 환경위해성 및 안전성평가가 수행되어졌다 (Agbios GM database; Table 3). 본 연구진에서 개발된 비선택성 제초제저항성 들잔디는 이미 보고된 위해성평가의 자료와 농림부 고시 2002-2호의 환경위해성평가의 틀을 기본으로 하여 위해성평가와 관련된 모든 항목의 연구를 수행하였다. 본 연구를 통해 국내 GM 작물에 대한 위해성 평가의 틀을 마련하고, GM 작물을 개발하고 평가하는 연구자들이 활용할 수 있는 기반의 조성 및 생명공학 기술에 의해 개발된 유용한 GM작물의 실용화를 위한 노력을 가속화 시킬 것이다.

Table 3. The summary of regulatory approvals as crops of integrated PAT

Crops	Event	Country	Environment	Food and/or feed
Beta vulgaris **(Sugar Beet)**	T120-7	United States	1998	1998
Brassica napus **(Argentine Canola)**	HCN10	United States	1995	1995
	PGS1	Canada	1995	1995
	GPS2	Canada	1995	1995
	MS8 x RF3	Canada	1996	1997
	PHY14, PHY35	Japan	1997	1997
	PHY36	Japan	1997	1997
	T45 (HCN28)	Canada	1996	1997
Brassica rapa **(Polish Canola)**	HCR-1	Canada	1998	1998
Chichorium intybus **(Chicory)**	RM3-3, RM3-4, RM3-6	European Union	1996	1996
Glycine max **L. (Soybean)**	A2704-12	United States	1996	1998
	A5547-127	United States	1998	1998
	GU262	United States	1998	1998
	W62, W98	United States	1996	1998
Gossypium hirsutum **L. (Cotton)**	LLCotton25	United States	2003	2003
Oryza sativa **(Rice)**	LLRICE62	United States	1999	2000
	LLRICE601	United States	2006	-
Zea mays **L. (Maize)**	676, 678, 680	United States	1998	1998
	B16 (DLL25)	United States	1995	1996
	BT11	Canada	1996	1996
	CBH-351	United States	1998	1998
	DAS-06275-8	United States	2004	2004
	DBT418	United States	1997	1997
	MS3	Canada	1996	1996
	MS6	United States	1999	2000
	T14, T25	United States	1995	1995
	TC1507	United States	2001	2001
	TC1507 x DAS-59122-7	Japan	2006	2006

4. 인용문헌

Agbios GM database: South Asia Biosafety Program (http://www.agbios.com).

Bayer E, Gugel KH, Hagele K, Hagenmaier H, Jessipow S, Konig SA, and Zahner H. 1972. Phosphinothricin und phosphinothricyl-alanyl-alanin. *Helv. Chim. Acta* 55: 224-239.

Beard BJ. 1973. Turfgrass science and culture. Prentice Hall Inc. Engle Wood and Cliffs NT; 2-3, 142-145.

Choi JS, Fermanian TW, Wehner DJ and Spomer LA. 1990. Effect of temperature, moisture and soil texture on DCPA degradation. Agron. J. 80 (1): 108-113.

Fry JD and Upham WS. 1994. Buffalograss seedling tolerance to postemergence herbicide. Hortscience. 29 (10): 1155-1157.

Gray E and Call NM. 1993. Fertilization and mowing on persistence of indian mockstrawberry and common blue violet in a tall fescue (*Festuca arundinacea*) lawn. Weed Science 41 (4): 548-550.

Han SS. 1987. 잔디밭 잡초방제를 위한 선택성 제초제의 개발에 관한 연구. Kor J. Weed Sci. 7 (2): 186-199.

Hong KH and Yeam DY. 1985. Studies in interspecific hybridization in korean lawngrasses (*Zoysia* spp.). J. Kor. Soc. Hort. Sci 26: 169-178.

James C. 2001. Global review of commercialized transgenic crops: 2000. ISAAA Briefs No. 23: ISAAA, Ithaca, NY. pp 73-88.

Johnson BJ. 1994. Tank-mixed herbicides on large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) and goosegrass (*Eleusine indica*) control in common bermudagrass (*Cynodon dactylon*) turf. Weed Science 42 (2): 216-221.

Joo YK, Kim DH, Lee JP and Mo SY. 1997. Present and future prospect in Zoysia grass breeding. Kor. Turfgrass Sci. 11: 73-85.

KCPA 1995. 농약년보. 문선기획. 농약공업협회.

Kim HK. 2001. Turfgrass science (Ed.). 선진문화사. pp. 19-25.

Kim KU, Kim DU. 1981. Establishment of management practies in Korean turfgrass (Zoysia japonica Steud.). Kor. J. Weed Sci. 1 (1): 78-83.

Kitamura F. 1967. 芝生用植物, 芝生と芝生用植物 (Ed. 1). 東京, 加島喜代志, 45-65.

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology 2004. Biosafety white paper (Ed). 바이오안전성정보센터 84-115.

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology 2006a. Biosafety (Ed). 바이오안전성정보센터 7 (2): 4-46.

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology 2006b. Biosafety white paper (Ed). 바이오안전성정보센터 298-412.

Lee JP, Kim NC, Hong SK. 1995. Studies on seed mixtures for slope revegetation of the road. 韓國造景學會誌 23: 113-123.

Ministry of Agriculture and Forestry 2002. 유전자변형 농산물의 환경위해성평가 지침서. 농림부 고시 2002-2호.

Murray JJ and Engelke MC. 1983. Exploration for Zoysia grass in eastern Asia. USGA Green Section Record 21 (3): 8-12.

Murray JJ. 1985. Potential for breeding new Zoysia grass. 26th Illinos Turfgrass Conference pp. 16-18.

OECD 1986. Recombinant DNA safety considerations. Safety considerations for industrial, agricultural and environmental applications of organisms derived by recombinant DNA techniques(The Blue Book)

Schleicher LC, Shea PJ, Stougaard RN and Tupy DR. 1995. Efficacy of dissipation

of dithopyr and pendimethalin in perennial ryegrass turf. Weed Science 43 (1): 140-148.

Sleper DA, Asay KH and Pedersen JF. 1989. Contrivutions from breeding forage and turfgrass. CSSA Special Publication Number 15 pp. 56-57.

Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M and Bottermann J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO J. 6: 2519-2523.

Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ and Lee HY. 2003. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. Mol. cells 16: 19-27.

Yang GM, Ahn BJ, and Choi JS. 1995. Identification of Native Zoysiagrasses (*Zoysia* spp .) Using Morphological characteristics and Esterase Isozymes. K. J. Soc. Hort. Sic 36: 240-247.

Yu TY, Yeam DY, Kim YJ, and Kim SJ. 1974. Morphological studies on Korean lawn grasses (*Zoysia* spp.). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 15: 79-91.

Ⅱ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 유전적 안전성 검정

1. Abstract

GM herbicide-tolerant Zoysia grass (*Zoysia japonica* Steud.) has been generated successfully through *Agrobacterium*-mediated transformation. We report the GM Zoysia grass with *bar* derived for characteristic of inserted gene and segregation ratio in the T_1 progeny. The GM Zoysia grass survived bialaphos spraying and grew to maturity, while the wild-type (WT) grass and weeds stopped growing and died at the fields. Among the tested GM zoysia grasses, one line gave 15 : 1 segregation ratio in the T_1 progeny of self-pollinated T_0 plants, suggesting two copy integration of the transgene. The result of Southern blot of T_1 progenies showed that the bar gene was stably integrated into genome of GM Zoysia grass. We examined the inverse PCR for searching inserted site in genome as the result of DNA sequence. Unfortunately the genome map of the Zoysia grass was unknown, therefore we searched the same family with known genome map as the rice. The results of sequence were having similarity within the chromosome number 6 in rice. As bar gene was inserted into the Chromosome of genomic DNA, the next generation of the herbicide-tolerant Zoysia grass expressed stably.

2. 서 론

GM 작물의 후세대는 모체의 유전자가 안정하게 발현된다 하더라도 그 후대의 지배형질은 다르게 나타날 수 있다. 환경위해성평가에서는 후 세대에 걸쳐 도입 유전자의 지배형질이 안정적임을 보여주는 증거로서 도입유전자의 세대 간 유전자의 안정성 및 발현 결과가 제시되어야하며 (NIAB, 2005), 도입 유전자의 안정적 발현을 분자생물학적 방법에 따라 입증하여야 한다.

도입유전자의 분석방법으로서 PCR 반응은 식물체의 Genomic DNA를 추출하여 DNA 상에 도입된 유전자를 검출할 수 있고, Southern blot은 유전자의 삽입을 확인함과 동시에 copy 수를 확인 할 수 있다. 그리고 RT-PCR과 Northern blot은 식물체 RNA의 분리 및 cDNA 합성을 통해서 식물체 내에서 도입 유전자의 발현을 확인하고, Western blot을 통해 단백질 상에서 발현하는 양을 측정할 수 있다. 멘델의 유전법칙은 유전자가 삽입된 식물체가 후대에서도 유전적 분리 비를 따르는지 확인 할 수 있고, 순계 교배 또는 이계 교배를 통해 나타나는 후대의 분리 비는 다르게 나타날 수 있다 (NIAB, 2005). 이외에도 GUS 발현분석, 비선택성 제초제저항성 실험을 통해서 도입 유전자의 삽입을 간접적으로 확인할 수 있다.

녹색형광단백질(GFP) 유전자의 경우에 자외선 영역에서 형광을 나타내어 유전자발현을 쉽게 확인할 수 있고, 유전자 이동성을 빠른 시간 내에 관찰할 수 있다. 이러한 기본적인 분석방법을 활용하여 GM 작물의 개발이 확인되었으나, GM 작물의 수입 및 유통에 따른 안전성 검증을 위해 GM 작물을 판별하기 위한 다양한 기술이 필요하게 되었다. 또한 Cartagena 바이오안전성 의정서가 2003년 9월에 발효됨에 따라서 GM 작물의 국가 간 이동에 따른 모니터링 체계 구축이 요구되고 있다 (RDA, 2002). GM 작물의 재배면적이 증가함에 따라서 GM 작물의 안전성 및 위해성이 사회적 이슈가 되고 있다. GM 작물의 논란사례는 NGO 단체 및 소비자로부터 거부감과 막연한 불안감을 높이는 계기가 되었고, GM 작물의 안전성 검증 및 안전관리에 보다 과학적이고 체계적인 실험이 요구되고 있다 (RDA and NIAB, 2005). 특히 GM 옥수수인 BT10과 BT11의 혼입사건은 판매과정의 관리소홀로 인해 안전성평가를 거치지 않은 BT10이

혼입되어 식용으로 판매되었다. 신젠타 사는 혼입된 모든 GM 옥수수를 회수하여 폐기처분하였고, 2006년 현재까지 BT10의 종자혼입은 1% 이하로 발견되었다. GM 작물의 비의도적 종자혼입에 의한 종자오염은 일본의 경우 5%, 한국 3%, EU 0.9%를 허용하고 있다 (KBCH, 2006). BT10과 BT11은 line이 다른 두 개체로서 유전자가 삽입된 부위만 차이가 있어서 구별하기가 쉽지 않다. 이러한 사례를 방지하기위해 GM 작물의 환경모니터링 시스템의 구축이 필요하게 되었고, 도입유전자의 삽입부위와 주변 염기서열을 조사하여 동일한 유전자가 삽입된 GM 작물의 line을 판별할 수 있다.

GM 농산물의 환경위해성평가 지침에서는 유전자의 도입위치와 주변염기서열을 조사할 것을 권고하고 있다 (NIAB, 2005). GM 작물의 T-DNA 주변염기 서열은 사후 모니터링을 위하여 특이적 primer를 설계하는데 매우 중요한 정보를 제공한다. 따라서 T-DNA 주변염기서열은 모니터링에 적합한 정보를 제공할 수 있는 충분한 염기서열을 제공하여야 한다. 식물체 게놈상의 유전자 도입위치를 확인하기위한 방법은 우리가 알고 있는 T-DNA 내부의 염기서열을 이용하여 primer를 설계하고, Inverse Polymerase Chain Reaction (IPCR)을 통해서 유전자가 도입된 부분의 특이적 밴드를 검출 할 수 있다. IPCR이란, 양쪽 방향의 primer를 기준으로 안쪽의 DNA의 염기 서열을 증폭하는 통상적인 PCR (williams, 1989)과 달리, 양쪽 방향의 primer를 기준으로 바깥쪽의 염기 서열을 분석하는 PCR을 말한다 (Michael, 1990). 이러한 IPCR 법을 이용함으로서, 형질 전환 식물체에서 T-DNA가 삽입된 부위의 염기 서열을 분석해 낼 수 있다 (Feullet, 1995).

본 연구에서는 비선택성 제초제저항성 들잔디의 특성 및 유전적 안정성을 확인하기위해 포장시험과 후대 검증을 조사 하였다. 또한 IPCR과 염기서열 상동성 검색을 통해서 비선택성 제초제저항성 들잔디의 게놈상에 도입된 유전자의 위치와 주변염기서열을 조사하였다.

3. 재료 및 방법

1) 식물재료

시험에 사용한 비선택성 제초제저항성 들잔디는 미성잔디 (주)에서 판매한 들잔디 종자를 캘러스화 하였고, *bar* 유전자를 도입하여 형질전환된 비선택성 제초제저항성 들잔디 이다 (Toyama et al., 2003). 본 실험에 사용된 비선택성 제초제저항성 들잔디는 T_1세대를 사용하여 멘델의 유전적 분리비를 검정하였고, 도입 유전자의 특성 검정은 T_3 및 T_4 세대 비선택성 제초제저항성 들잔디를 사용하여 포장시험을 통해서 확인하였다.

2) Genomic DNA 추출

비선택성 제초제저항성 들잔디는 Dellaporta 등 (1983)과 Huff 등 (1993)의 방법을 수정하여 다음과 같이 genomic DNA를 추출하였다. 생육중인 비선택성 제초제저항성 들잔디 잎 약2g을 액체질소와 함께 분쇄하였고, 분쇄한 식물체는 65℃의 genomic DNA 추출용액 [50mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.4M NaCl, 20mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS]를 첨가하였다. Genomic DNA 추출용액에 10mM beta-mercaptoethanol과 2%의 가용성 PVP (polyvinylphyrrolidone) 용액을 첨가하여 잘 혼합하고, 65℃ 항온수조에서 1 시간 정도 가온하였다. 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25: 24 : 1) 용액을 첨가하여 혼합한 후, 4℃에서 6,500rpm으로 15분 동안 원심분리를 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 새로운 tube에 옮겨 동량의 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) 용액을 첨가하여 혼합한 후 원심분리 하였다. 원심분리된 상층액에 1/10 volume의 3M sodium acetate를 첨가하고, 동량의 isopropanol을 넣어서 4℃에서 6,500rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하여 70% ethanol로 DNA pellet을 씻은 후, 건조시킨 DNA를 1 × TE (pH 7.4) 용액으로 녹여 사용하였다.

3) PCR 분석을 통한 도입유전자의 확인

Bar 유전자의 존재를 확인하기위한 PCR 반응은 Takara에서 제공된 방법에 따라서 수행하였다. PCR primer는 Bioneer 사에서 Oligo 합성된 5'-GGT CTG CAC CAT CGT CAA CC-3'와 5'-ATC TCG GTG ACG GGC AGG A-3'을 사용하였다. PCR 반응액은 100ng DNA에 1 pmol의 primer와 Takara Ex Taq polymerase (Takara, Japan)가 포함된 Perfect premix® (Takara, Japan)를 희석하여 사용하였고, PCR의 반응조건은 94℃에서 30초간 denaturation, 61℃에서 30초 annealing, 72℃에서 45초 elongation이 되도록 조건을 설정하여 35 cycle을 수행하였다. PCR 산물은 0.8% 아가로스 (Sigma, USA) 겔에 전기영동 하였고, 마커는 Takara에서 제공된 DNA ladder 마커를 사용하였다.

4) Southern blot 분석을 통한 도입 유전자의 복제 수 조사

Bar 유전자 도입이 확인된 비선택성 제초제저항성 들잔디는 유전자의 copy 수를 조사하기 위해 Southern blot 법 (Southern, 1975)을 다음의 과정을 통해서 수행 하였다. 상기의 방법에 의해 추출된 genomic DNA 25μg에 DNA를 *Hin*dⅢ와 *Bam*HⅠ 제한효소를 처리하였고, 0.8% 아가로스 겔 전기영동을 통해 분획하였다. 단리된 DNA를 Sambrook과 Russell (2000)의 방법에 따라서 나일론 membrane (Amersham Pharmarcia Biotech, UK)에 고정시키고, [α-^{32}P]dCTP로 방사선표지된 *bar* 유전자와 *hpt* 유전자를 probe로 이용하여 hybridization 하였다. 그 후 Membrane은 X-ray 필름 (Fuji Co., Japan)을 사용하여 -70℃에서 2일간 노출시켜 현상하였다.

5) 멘델의 유전법칙을 이용한 분리비 검정

비선택성 제초제저항성 유전자가 후대에서도 안정하게 발현되는 것을 확인하기 위해 비선택성 제초제저항성 들잔디의 T_1 세대의 유전적 분리비를 다음과 같이 조사하였다.

비선택성 제초제저항성 들잔디의 성숙종자를 채종하여 자연광에서 7일간 건조시킨 후, 휴면타파를 위해 7일간 저온처리를 하였다. 종피가 제거된 종자는 70% ethanol에 1분간 침지시키고, 4% sodium hyperchlorite solution에 10분간 소독한 후 증류수로 5번 세척하였다. 종자는 32℃ 광조건에서 수분흡수 및 발아유도를 하였고, 발아된 유식물체는 제초제 살포시험을 통해서 저항성 개체와 민감성 개체의 수를 조사하여 분리비를 확인하였다 .

6) 포장에서의 비선택성 제초제저항성 유전자의 발현 확인

비선택성 제초제저항성 들잔디의 후대검증을 위해 T_1 및 T_3, T_4세대에서도 안정적으로 도입 유전자가 발현되는 지를 조사하기위해 시험포장 내에 각각의 세대를 식재하고, 제초제 살포시험을 시행하였다. 시험포장은 제주대학교 온실, 망실 및 서귀포시의 격리포장과 증식포장을 이용하였고, 제초제 살포시험은 비선택성 제초제인 바스타® (Bayer CropScience, Australia)를 규정농도 (0.1% gulfosinate)로 사용하였다.

7) IPCR을 통한 게놈 내의 유전자 삽입 부위 조사

Genomic DNA는 분광광도계로 흡광도를 측정하였고, 4 ㎍의 genomic DNA를 65℃ heat block에서 15분간 전 처리 하였다. DNA가 포함된 용액의 전체 부피를 100 μL로 하여 제한효소인 *Hin*d Ⅲ로 처리 하였다. 단리된 DNA를 정제하기위해 200 μL의 100% ethanol과 10 μL의 3M sodium acetate를 넣고, -20℃에서 2 시간

정도 방치하여 4℃에서 1,200 rpm으로 20 분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 DNA pellet을 70% ethanol로 씻어서 건조시킨 다음, 1 × TE (pH 7.4)로 DNA를 녹였다. *Bam*HI으로 처리된 0.2 ㎍ DNA에 2 unit의 T4 DNA ligase를 첨가하고, 16℃에서 8~12시간 반응 시켜 상기의 방법과 같이 DNA를 농축 하여 self-ligation 하였다 (Figure 14).

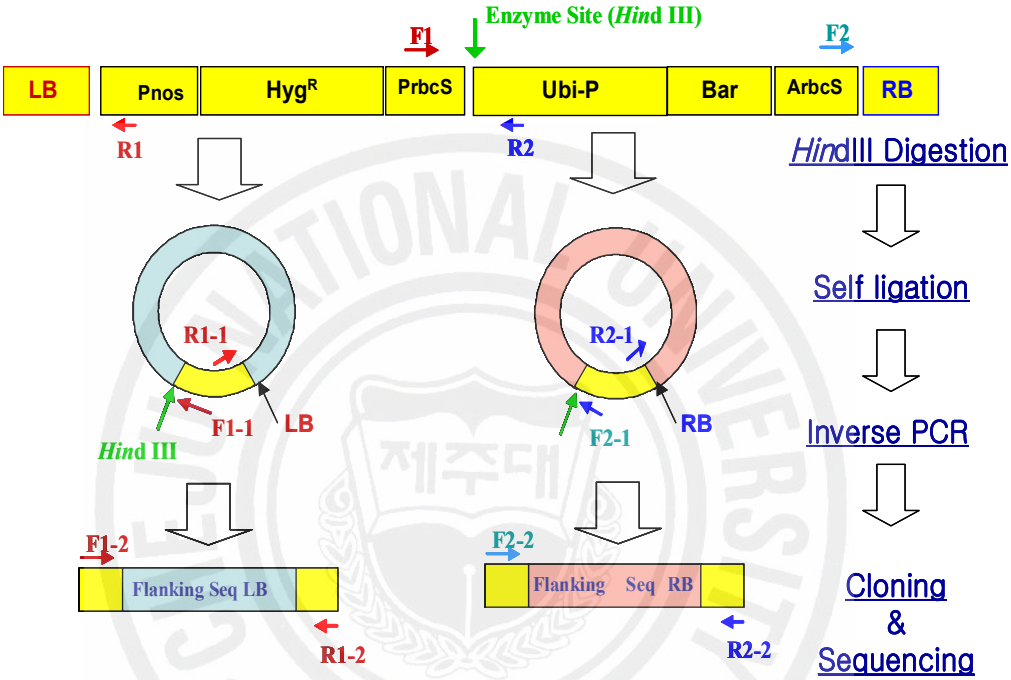


Figure 14. The diagram for location of the inserts in plant cells and sequence of flanking region.

IPCR 반응은 Michael등 (1990)의 방법을 응용하여 다음과 같이 시행하였다. IPCR 반응액은 DNA sample 250ng을 95℃에서 10분간 처리하여 준비하고, 10 pmol의 primer와 LA-Taq (Takara Co. Japan) 효소를 첨가하여 최종 부피를 50 μL가 되도록 조제하였다. PCR에 사용한 primer는 Table 4에 제시된 F1, R1을 사용하였고, PCR의 반응조건은 94℃에서 30초간 denaturation, 62℃에서 30초

annealing, 72℃에서 4분 30초 elongation이 되도록 조건을 설정하여 35 cycle을 수행 하였다. IPCR에서 얻은 산물은 1/10로 희석하여 2차 PCR 분석을 위한 DNA로 사용하였다. PCR 반응액은 10 pmol의 F2-2, R2-2 primer (Table 4)와 EX-Taq (Takara) 효소를 첨가하여 총 반응액의 부피를 50 μL가 되도록 하였다. PCR 반응 조건은 상기에 제시된 조건과 같다.

Table 4. Sets of oligonucleotide primers for IPCR.

Name	Oligonucleotide primers	(bp)	annealing temp. (℃)
F1-1	CCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAG	380	74
F1-2	GATGGAGAAGAGTTAATGAATGATATGGTCC	190	78
R1-1	GGTTTCTGACGTATGTGCTTAGCTC	200	74
R1-2	CTTCTCGACAGACGTCGCGGTGAG	400	78
F2-1	GATGACATAGCCATTGGAGATTTGG	350	72
F2-2	CATAAAGCAAGGATCGACAAAGACTG	210	74
R2-1	CTGTGAAGCTGTTGCATCCACATCG	210	76
R2-2	CACGCTGCACTGCAGTCTACC	350	70

8) 클로닝 및 염기서열 분석

2차 PCR 반응에서 나온 PCR 산물들은 0.8% agarose gel에서 전기영동하고, 특이적 밴드를 gel extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 추출 하였다. 추출된 DNA 단편은 상기에 기술한 DNA 정제방법과 같이 시행하여 DNA를 얻었다. 정제된 DNA 단편은 pGEM-T Easy 벡터에 1/10 volume DNA을 첨가하여 상기에 기술된 ligation 방법과 같이 시행하여 클로닝 하였다. 벡터에 클로닝된 DNA 단편은 T7, SP6 primer를 사용하여 sequencing 하였고, 해석된 염기서열은 NCBI의 blastn을 통해 상동성 검색을 하였다.

4. 결과 및 고찰

1) 분자생물학적 방법에 의한 유전자발현 확인

앞서 선발된 형질전환된 들잔디에서 도입 유전자를 확인하기위해 PCR 분석을 수행한 결과, *bar* 유전자가 도입된 들잔디에서는 0.5 kb에서 특이적 밴드가 관찰되었다. 저 농도에서 선발된 들잔디와 비형질전환 들잔디는 유전자의 특이적 밴드가 발견되지 않았다 (Figure 15).

Figure 15. PCR products amplified with *bar* gene primer. M: DNA marker, WT: wild-type Zoysia grass, Lanes (1-6): putative transgenic Zoysia grasses, but lane 3 was not detected.

비선택성 제초제저항성 들잔디에 도입된 유전자의 copy 수를 확인하기위해 Southern blotting을 한 결과, Figure 15와 같이 2개의 밴드가 관찰되었다 (Toyama et al., 2003). *hpt* 유전자의 경우 0.5 kb와 2 kb에서 각각 나타났고, *bar* 유전자를 이용한 결과에서는 2 kb와 20 kb, 0.5 kb와 4 kb로 각각 2개의 copy 수를 갖는 것으로 확인되었다 (Figure 16).

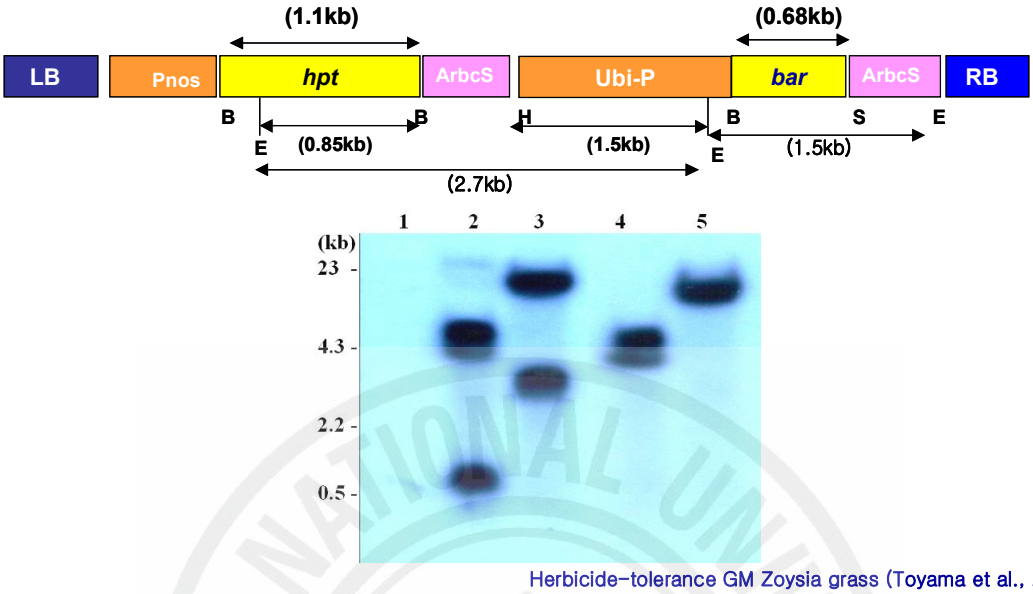


Figure 16. Southern blot analysis and T-DNA region in herbicide-tolerant GM Zoysia grass. DNA gel-blot analysis of transgenic (lane 2-5) and non-transgenic (lane 1) plants of *Zoysia japonica*. Twenty μg of DNA was digested with *Hind*III (lane 2 and 4) or *Bam*HI (lane 3 and 5) and allowed to hybridize with bar (lane 2-3) or hpt (lane 4-5) probe.

2) 멘델의 유전법칙에 따른 후대 분리비 검증

비선택성 제초제저항성 들잔디는 순계교배를 통해서 얻어진 후세대를 제초제 살포 실험을 통해 분리비를 확인한 결과, 제초제 저항성 개체는 멘델의 유전법칙에 따라 분리비가 15 : 1로 나타났다 (Table 5). 이러한 결과는 southern blot 분석의 결과와 일치하였고 (Figure 16), T_1 세대에서도 도입유전자가 안정적으로 발현되었다.

Table 5. Segregation of herbicide-tolerant in T_1 progeny of transgenic plants

Replication	Number of *bar* sensitive	Number of *bar* Resistance	Ratio (R : S)	Expected ratio	χ 2-value	*P-value*
1	5	49	9.8 : 1	15: 1	0.83	0.36
2	0	10	10 : 0	15 : 1	0.67	0.41
3	1	13	13 : 1	15 : 1	0.05	0.89
4	2	29	14.5 : 1	15 : 1	0.01	0.96
5	1	29	29 : 1	15 : 1	0.44	0.51
Total	9	130	14.4 :1	15: 1	0.01	0.96

χ^2-values indicate significant fit to the expected ratio.

3) 비선택성 제초제저항성 유전자의 세대간 안정적 발현 검정

비선택성 제초제저항성 들잔디 유전자의 안정적 발현을 확인하기위해 격리 포장에 식재된 T_3 세대에 제초제 살포시험한 결과 야생형 들잔디와 잡초는 제거되었고, 비선택성 제초제저항성 들잔디만 생존하였다 (Figure 17B). 재배기간 동안 형질전환계통은 제초제 성분인 glufosinate ammonium에 내성을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 T_4 세대의 유전적 안정성을 검증하기위해 보다 광범위한 야외포장에 식재하여 도입유전자의 특성을 검정한 결과, 도입유전자의 형질은 동일하게 유지되었다 (Figure 17D). 비선택성 제초제저항성 들잔디는 T_1세대의 유전적 분리비가 15 : 1 로 나타났고, 도입유전자가 T_1에서 T_4 세대까지 안정적으로 발현되었다.

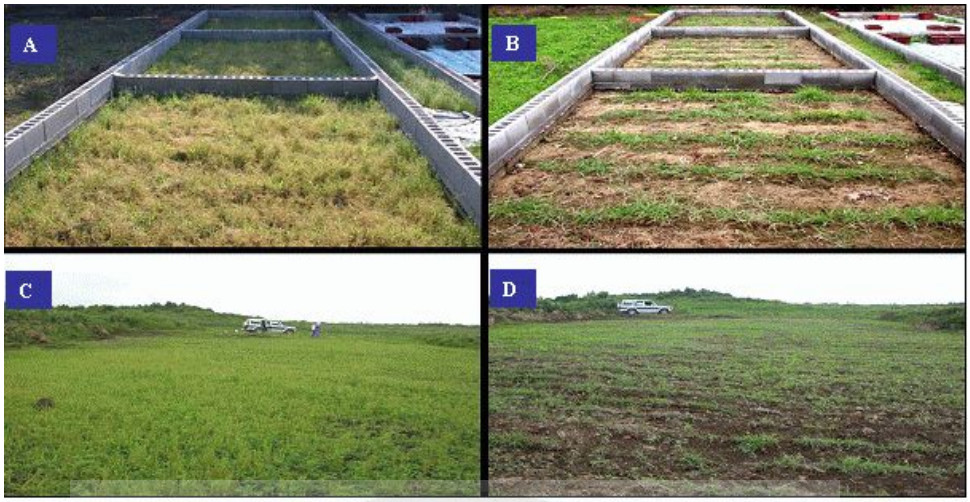


Figure 17. Characteristic of herbicide-tolerant GM Zoysia grasses on field. Weeds and GM Zoysia grasses were grown on confined (A) and unconfined fields (C), After sprayed of 0.1% of glufosinate, only GM Zoysia grass is survived in the each field (B, D).

4) IPCR

비선택성 제초제저항성 들잔디의 게놈내에 존재하는 T-DNA 주변 염기서열을 조사하기위해 IPCR한 결과, left border (Figure 18A)와 right border (Figure 18B)에서 각각 4 개의 밴드를 관찰 할 수 있었다. 각각의 PCR 산물들은 T-DNA의 외부영역을 합성한 것으로 판단되었고, 2차 PCR을 통해 미지영역을 포함하는 DNA 단편들을 증폭시킨 결과 left 와 right border에서 각각 2개의 새로운 밴드가 관찰되었다 (Figure 19 and Figure 20). Toyama 등 (2003)이 보고한 Southern blot 분석 결과 비선택성 제초제저항성 들잔디 내에 2개의 copy 수를 갖는 T-DNA가 있음이 확인되었고, 2차 PCR 분석에서 관찰된 밴드의 수와 일치하였다.

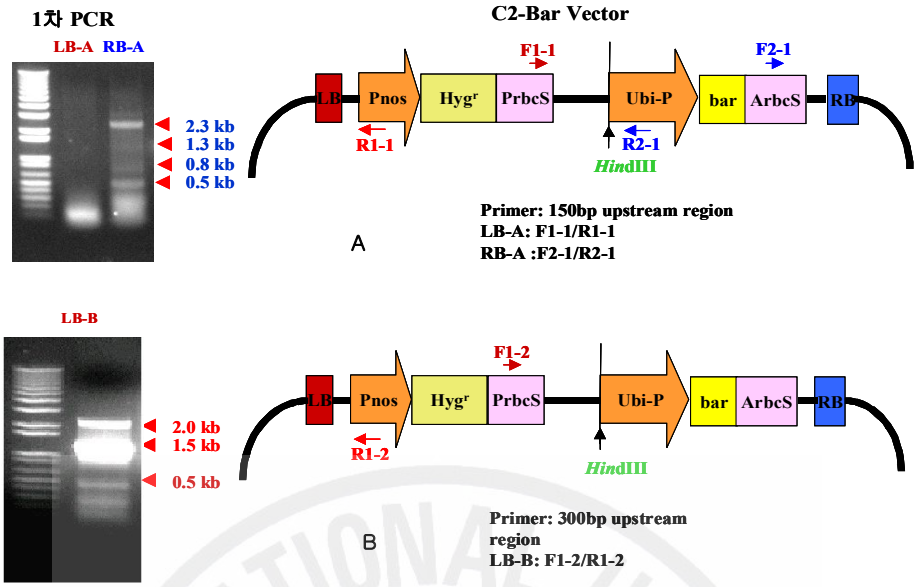


Figure 18. The diagram of IPCR and result from GM Zoysia grass genomic DNA.

5) 염기서열 분석결과

PCR 분석을 통해 얻어진 산물들을 pGEM-T easy vector로 클로닝하여 유전자 염기서열을 분석한 결과, 4개 영역의 염기서열이 나타났다. 들잔디의 유전자지도가 아직까지 밝혀지지 않아서 들잔디와 같은 벼과 식물 중 유전자 지도가 밝혀진 벼와 상동성을 조사하였고, 그 결과 벼의 염색체 6번 (*Oriza sativa* (*japonica* cultivar-group) genomic DNA, chromosome 6)과 높은 상동성을 나타내었다 (Figure 19 and 20).

이러한 결과로부터, 비선택성 제초제저항성 들잔디의 도입유전자의 발현은 후대에서도 안정적으로 유지됨을 알 수 있었다. T_1세대의 분리비가 멘델의 유전법칙을 따르고 있고, 유전자가 게놈내의 염색체에 삽입되어 유전적으로 안정하게 발현되는 것으로 판단된다.

Figure 19. The results of DNA sequence matching with rice at left border.

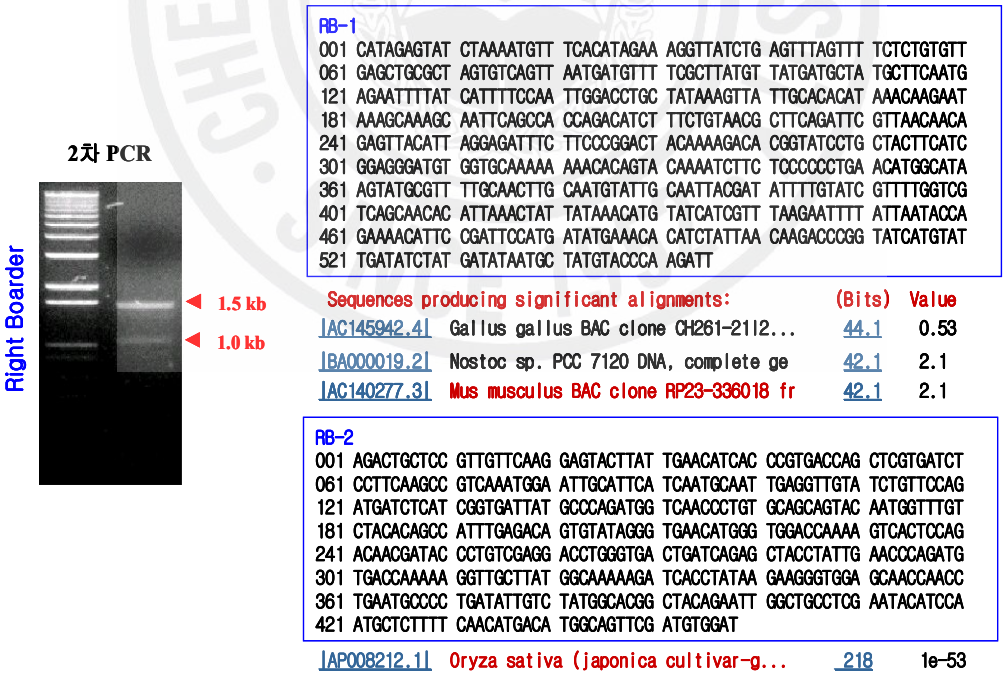


Figure 20. The results of DNA sequence matching with rice at the right border.

5. 적 요

본 연구에서는 비선택성 제초제저항성 들잔디의 도입유전자 특성 및 유전적 안정성을 확인하기위해 포장시험과 후대 검증을 조사 하였고, 게놈내의 유전자 삽입부위를 조사하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디에는 *bar*유전자와 *hpt* 유전자가 삽입되어 있으며, *bar* 유전자에 의해 비선택성 제초제인 바스타에 저항성을 갖는다. Southern blot 분석을 수행한 결과, 도입 유전자가 들잔디 게놈내의 2개 부위에 삽입된 것을 확인하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디 T_1 세대의 유전적 분리비를 조사한 결과 15 : 1에 가까웠으며, 후대에서도 도입유전자가 안정하게 발현되는 것으로 생각된다.

포장에 T_3, T_4세대의 들잔디를 증식시켜 비선택성 제초제저항성을 검정한 결과, 도입된 유전자가 후대에서도 안정적으로 발현된다는 것이 확인되었다. 비선택성 제초제저항성 들잔디 게놈 내의 유전자 삽입부위를 조사하기위해 IPCR을 수행한 후, PCR 산물을 sequencing하였다. 들잔디 유전자 지도의 염기서열이 아직까지 밝혀져 있지 않아 들잔디와 같은 과에 속하는 식물 중 이미 염기서열이 알려진 벼와 비교하였다. 그 결과 벼의 6번 염색체와 높은 상동성이 나타났고, 멘델의 유전적 분리비를 고려하면 도입 유전자가 게놈의 염색체내에 삽입되어 유전적으로 안정하게 발현되는 것으로 판단된다.

6. 인용문헌

Dellapora S, Wood J and Hick J. 1983. A plant DNA mini-preparation; version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.

Feuillet C, Lauvergeat V, Deswarte C, Pilate G, Boudet A, Pettenati JG. 1995. Tissue and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. Plant Mol. Biol. 27: 651-667.

Huff DR, Peakall R and Smouse PE. 1993. RAPD variation among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchlo dactyloides* N. Engelnm.) Theor. Apple. Genet. 86: 927-934.

Korea Biosafety Clearing House 2006. GMO를 둘러싼 안전성 논란과 전망. Biosafety 7 (3): 4-47.

Korea Research Institute Bioscience Biotechnology 2006. 유전자변형 생물체 및 안전성평가: 바이오안전성백서 (ed). 한국생명공학연구원, pp213-232.

Michael AI, Gelfand DH, Sninsky JJ. 1990. PCR Protocols. Academic Press. San Diego. USA, pp 482.

National Institute Agricultural Biotechnology. 2005. 유전자변형작물의 환경위해성 평가 가이드라인. 농촌진흥청 농업생명공학연구원, 광문당, pp 1-76.

Rural Development Administration. 2002. 생명공학안전성에 관한 카르타헤나 의정서. 농촌진흥청 pp 1-114.

RDA and NIAB 2005. GMO 논란 사례 연구. 농촌진흥청 농업생명공학연구원, 상록사, pp 1-147.

Toyama K, Bae CH, Seo MS, Song IJ, Lim YP, Song PS, Lee HY. 2002. Overcoming of barriers to transformation in monocot plants. *J. Plant Biotechnology* 4: 135-141.

Ⅲ. 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 실질적 동등성 검정

1. Abstract

The present study was initiated to compare the growth characteristics between WT and GM herbicide-tolerant Zoysia grasses (*Zoysia japonica Steud.*) as to the substantial equivalence. The WT and GM Zoysia grasses were considered statistically insignificant, with respect to plant height (each 20 cm), leaf length (17-19 cm), leaf width (0.5 cm), the lowest leaf blade (4 cm) and the chlorophyll content (1 mg/g). The morphological characteristics of spike and seeds were investigated. The number of seeds per spike 49, length of flowering culm and rachis (4.8-12 cm), seed length and width (3.1-1.5 cm), weight of 100 grains (58 mg) and then the frequency of germination 3.7-4% in GM as well as wild type Zoysia grasses. The result of total mineral content of N, K, Ca and Mg in leaves showed insignificant at 0.08-1.36% range, but with the case of P content 0.15-0.25% showed significantly different at 0.05 level. Content of Fe, B, Zn, Mn and Cu were insignificant at 5.19-143 mg/kg range. After planting of 3 months, the number of stolons (about 5), stolon length (30.4-33 cm) and internode length (3.2-3.7 cm) indicated there are no significant difference between GM and WT Zoysia grasses. The coverage of grass showed 19.5-20.4% after 3 months, 36.5-39% after 9 months, and 90-94% after 15 months of planting. The results of soil analysis in the fields have no different particularly with electric conductivity, organic matter, exchangeable cation and other chemical properties. The soil of Jeju island was infertility than Korean mainland soil, since that was a volcanic erupted soil. So, as to the substantial equivalence, there was no difference between WT and GM Zoysia grasses.

2. 서 론

들잔디는 주로 공원, 골프장, 축구장 등과 같은 스포츠산업과 도로 비탈면, 댐, 간척지 등의 토양침식방지를 위한 녹화산업에 많이 식재되고 있으며, 이러한 잔디의 이용은 잔디관련 사업규모를 크게 확대 시키고 있다 (Kim, 1991; Lee et al., 1995). 또한, 주거문화의 변화에 따라 사용목적에 따라서 다양한 종류의 잔디가 필요하게 되었다. 들잔디의 주요 육종목표는 초기생육이 빠르고 조성이 쉬운 종자형 잔디의 육성이고, 이러한 신품종 잔디 육성을 통해서 대규모 공사에 이용되고 있다. 또한 들잔디 관리가 용이한 병 저항성, 제초제 저항성, 내음성, 녹색기간 연장 등의 기능성 잔디의 육성과 척박한 토양에 적합한 내염성, 내한성, 내서성 등의 환경스트레스에 강한 품종 육성이 시도되고 있다.

미국의 경우 1905년부터 zoysiagrass에 관심을 갖고 미국 농무성과 대학들에서 zoysiagrass를 연구하여 ‘Emerald', 'Meyer', 'Midwest' 등의 영양번식 품종과 Zenith, J37, J36 등과 같은 종자번식 품종 (Ruemmele and Engelke, 1990; Emmons, 1995)을 육성하였다. 일본의 경우 'Miyako'가 육성되어 1996년의 미국 National Evaluation turfgrass Program (NTEP)의 zoysiagrass 평가시험에 포함된 것을 비롯해 외국에서 20 여종의 한국잔디가 품종화 되었다(Joo et al., 1997; Youn et al., 2005) 그러나 국내의 경우 안양중지, 베네스트 7, 건희 (kim et al., 1999), 세녹 (Choi et al., 2004)등이 있을 뿐 품종개발에 관한 연구는 외국에 비해 대단히 미미한 실정이다. 따라서 생명공학 기술을 포함한 첨단기술의 이용과 우수한 국내 잔디 유전자원을 활용한 새로운 초종, 품종의 개발 및 보급 등이 절실히 요구되고 있다.

이러한 요구에 부응하여 유전자변형기술을 이용한 비선택성 제초제저항성 들잔디가 본 연구진에 의해 개발되었다 (Toyama et al., 2003). 비선택성 제초제저항성 들잔디는 비선택성 제초제인 바스타 (ammonium glufosinate 유도체)에 저항성을 나타내고 있기 때문에 연간 1-2회의 제초제 살포로 모든 잡초를 효과적으로 제거하여 잔디재배 및 관리 시에 발생되는 문제점을 해결할 수 있다. 또한, 사용된 제초제는 토양에서 쉽게 분해되어 지하로 침투되지 않아 농약오염 감소효과가 있어서 비선택성 제초제저항성 들잔디의 사용은

환경친화적이라 할 수 있다(Aventis CropScience). 이러한 기능성을 갖는 신품종 비선택성 제초제저항성 들잔디의 실용화가 절실히 요구되고 있으나 유전자변형 작물에 대한 부정적 정보와 막연한 정서적 우려가 소비자들을 불안하게 하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 과학적이고 실증적인 실험을 통한 환경위해성 평가가 수행되어 비선택성 제초제저항성 들잔디의 안정성이 검정되어야 한다. 들잔디에 대한 선행연구는 자연조건에서 재배된 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 생육 특성 조사 (Honda, 1971; Kitamura et al., 1973), 한반도 내에 분포하고 있는 자생 한국 잔디류의 생태조사 (Yu et al., 1974; Kim et al., 1996; Choi et al., 1997)등이 보고되었다. 또한, 포복경의 생육특성 (Kim et al., 1996; Choi and Yang, 2004)및 피복율 시험 (Lee et al., 1995)등이 선행 연구되었다.

본 연구에서는 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 간의 실질적 동등성을 검정하기위해 선행연구자들의 연구를 토대로 하여 환경위해성평가의 기본 틀을 마련하였다. 주요시험내용은 환경위해성 평가의 기초단계인 2003년부터 2006년까지 GM 격리포장에서 재배한 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 지상부의 생육특성, 종자의 형태와 발아율, 피복율 및 포복경의 생육을 비교하여 실질적 동등성을 검정하였다.

3. 재료 및 방법

1) 공시재료 및 GMO 격리포장의 잔디재배

본 시험에 사용된 야생형 들잔디는 미성잔디 (주)에서 판매한 종자를 이용하여 캘러스를 유도하고, 유도된 캘러스로부터 재분화된 식물체와 종자 파종을 통해 생육된 식물체를 사용하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디는 *bar* 유전자가 삽입된 형질전환 식물체 (Toyama et al., 2003)를 선발하였고, 본 실험에서는 T_3세대의 비선택성 제초제저항성 들잔디를 사용하였다.

비선택성 제초제저항성 들잔디 재배를 위해 남제주군 위미리에 약 3000평 규모의 격리포장 (농림부고시 2002-2호에 규정에 준하여 조성된 포장)을 조성하였다. 격리포장을 2개의 구역으로 분리하여 각각 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 (20 X 10 cm^2)를 30 cm 간격으로 줄떼 식재하여 자연조건에서 재배하였다 (Figure 21).

Figure 21. The ecological risk assessment field for GM Zoysia grass. Field trial was established in unconfined field (A), WT (B), and GM Zoysia grass (C) were showed growing in the fields.

2) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장의 토양성분 조사

각 실험포장의 토양성분 분석을 위한 시료는 1년간 들잔디가 재배된 포장의 들잔디 근권부분 10 cm-20 cm 깊이에서 다섯 점을 무작위로 채취하였다. 채취된 시료는 풍건한 뒤 2 mm 체를 통과시켜 500 g을 준비하여 다음과 같은 방법으로 분석하였다. 토양의 pH와 EC는 pH 측정기 (520A, Orion Co., USA)와 EC 측정기 (CM-14P, TOA Co., Japan)로 측정하였고, 유기물 함량은 Tyurin 법 (Schollen, 1927)을 개량하여 분석하였다. 유효인산 함량은 Lancaster 법으로 분석하였고, 치환성 양이온은 1N Ammonium acetate 용액으로 침출하여 유도결합 플라즈마 원자방출분광계로 측정하였다. 또한 미량원소 Zn, Mn, Fe, Cu, B는 0.1N HCl로 추출하여 유도결합 플라즈마 원자방출분광계를 사용하여 측정하였다 (NIAST, 1988).

3) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디의 형태적 특성

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 형태적 특성은 상기의 GMO 격리포장에 식재된 각각의 들잔디를 16개월간 재배한 후 잔디 주위의 잡초를 제거한 후 다음과 같이 조사하였다. 잎의 형태적 비교는 15개체의 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디를 무작위로 채취하여 초고, 엽장, 엽폭, 엽각, 최하위 엽의 높이를 조사하였다. 엽폭은 잔디잎 중 신초로부터 세 번째 잎을 선택하여 엽신의 기부로부터 1cm 지점을 측정하였고, 엽의 각도는 잔디의 신초로부터 세 번째 잎에 수직 분얼경의 중심축으로부터 벌어진 정도를 제도용 각도기를 이용해 측정하였다. 이러한 잔디의 생육조사는 기존의 연구자 (Younger, 1961; Kitamura , 1973; Yu et al., 1974; Eggens, 1980; Kim et al., 1996; Choi et al., 2004) 들이 측정한 방법에 준하여 조사하였다.

4) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디의 엽록소 함량

들잔디의 엽록소 함량 측정은 휴대용 측정기 SPAD-502 (Minolta, Japan)를 이용하여 신초로부터 3번째 잎을 선택하여 3점법 (5-7cm 부분)으로 측정하였다. 엽록소 함량은 SPAD 값이 20, 25, 30인 들잔디 잎 0.05 g을 각각 3반복하여 Arnon (1949)의 방법에 따라서 측정하였고, Figure 22에서와 같이 회귀식을 구하여 SPAD 값을 환산하였다.

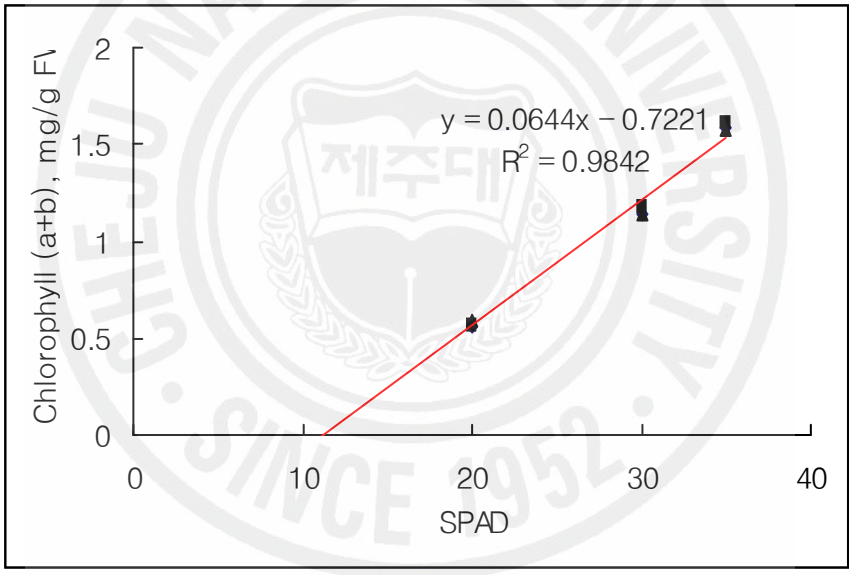


Figure 22. The relationship between the total chlorophyll contents and SPAD values. The SPAD 502 chlorophyll meter instantly measures the amount of chlorophyll content as the SPAD values.

5) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디 잎의 무기성분 조사

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 잎의 무기성분을 조사하기위해 각 시험포장에서 5점의 들잔디 잎 (15 × 15 cm^2)을 무작위로 채취하였고, 채취한 엽 시료는 증류수로 깨끗이 씻은 후 약 80℃ 건조기에서 3일 동안 건조시켰다. 건조된 시료는 삼각플라스크에 0.5 g을 넣고 5 ㎖ H_2SO_4와 3 ㎖ H_2O_2를 가하여 분해시켰다. 분해 액의 일부를 직접 취하여 Kjeldahl 증류방법을 이용하여 총 질소 분석을 하였고 (Bremner, 1982), 나머지 시료는 여과 및 희석을 한 뒤 유도결합 플라즈마 원자방출분광계 (JY panorama, Jobin Yvon Co., France)를 이용하여 P, K, Ca, Mg, B, Mn, Zn, Fe, Cu 함량을 측정하였다 (NIAST, 2000).

6) 종자의 형태 및 종자 발아율 측정

화수와 종자의 형태적 특성 조사를 위해 포장에서 16개월 동안 재배하여 성숙된 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 화수 45개체를 무작위로 채취하였고, 화간 및 화수의 길이, 화수당 종자의 수, 종자의 길이, 넓이 및 종자의 무게를 측정하였다. 종자의 무게는 각 포장에서 수집된 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 종자를 자연 건조시킨 후 각각 100립씩 5반복하여 전자지시저울로 측정하였다.

들잔디 종자의 자연발아율을 조사하기 위해 사용된 종자는 GMO 격리포장에서 재배된 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 성숙종자 및 종자번식이 용이한 Zenith를 사용하였다. 각각의 종자는 GMO 격리포장에 직경 30cm 화분을 매장하고 화분 안을 3등분하여 각 처리구당 100립씩 종자를 파종하였고, 모두 3구역에 3반복으로 실시하였다. 가을에 파종된 종자는 자연 상태에서 겨울을 보냈으며 다음해 5월 종자로부터 발아된 유식물체를 육안관찰을 통해서 개체수를 조사하여 평균값을 기록하였다.

7) 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 피복율 및 포복경 생육조사

들잔디의 피복율 조사를 위해 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역에 1 × 2 m^2의 시험포장을 설정하였고 (Chio and Yang 2004), 들잔디 이식 후 90일, 150일, 420일째에 들잔디의 지면 피복정도는 초기 피복율 2%를 기준으로 하여 측정하였다. 지면 피복율 측정을 위한 이미지는 Nikon coolpix 4500 (NiKon Co., Japan)을 사용하여 피사체를 70° 수직으로 1.5 m 높이에서 촬영하였다. 피복율 측정방법은 1280 x 960 pixel 크기의 JPEG (Joint photographic experts group) 이미지를 활성화시켜 초록색의 잔디부분의 pixels을 계산하였다 (Ewing and Horton, 1999; Purcell, 2000; Richardson et al., 2001). 디지털 이미지와 실물의 상관관계는 들잔디 직경 10 cm plug의 피복율을 기준으로 하였고, 3-15 plugs 범위를 측정하여 Figure 23의 표준곡선으로 나타냈다.

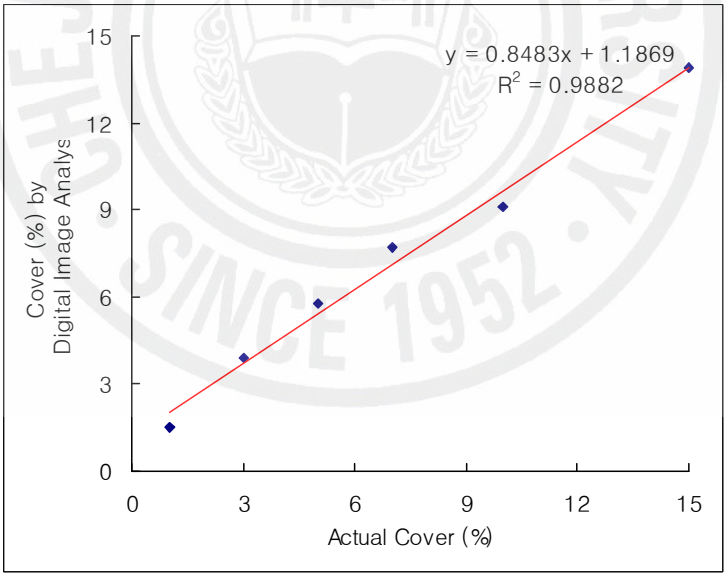


Figure 23. Regression analysis of actual percent cover values against valued generated by digital image analysis. Variable cover rates were producted from a range of Zoysia grass plugs of a defined size area.

들잔디 포장 조성에 따른 포복경의 생육조사는 이식 후 90일에 포복경의 수와 길이, 절간길이를 측정하였다. 포복경의 수와 길이는 5개의 묘 (20 × 10 cm^2)를 무작위로 선별하여 조사하였고, 절간길이는 각각의 마디 길이를 측정하여 평균값을 구하였다. 증식밀도는 6개의 묘 (반경 10 cm)를 각 포장에서 채취하여 직립경의 수를 조사하였다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

4. 결과 및 고찰

1) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장의 토양성분 조사

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역의 토양성분을 분석한 결과 pH는 약 4.9, 전기전도도는 약 0.03 dS/m이었고, 유기물함량은 4.08-4.69%, 가용성 인산은 12.5-14.8 mg/kg으로 조사되었다. 또한 치환성 양이온인 칼륨, 칼슘, 마그네슘의 함량과 0.1N HCl로 추출된 미량원소의 함량도 0.36-1% 범위 내에 있었다. 따라서 야생형과 GM 들잔디 재배포장의 토양성분 간에는 유의차가 없었다 (Table 6). 본 연구에서 사용된 격리포장의 토양성분을 분석한 결과 제주도의 토양이 육지부의 토양과 달리 화산회토이기 때문에 육지부에 비해서 무기성분이 부족하고, 불용성 유기물이 다량 포함되어 유기물 함량이 높게 나타나는 것으로 생각되어진다.

2) 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 생태적 특성 비교

GMO 격리포장에서 재배된 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 생육특성을 관찰한 결과, 초고는 약 20 cm, 엽장은 약 18 cm, 엽폭은 약 5 mm이었고, 최하위 엽까지의 거리는 약 3.9 cm, 엽각은 약 24° 이었다 (Table 7). 들잔디의 초고, 엽장, 엽폭, 엽각, 최하위 엽의 높이, 엽간거리를 조사한 결과 실질적으로 두 잔디간의 유의차가 없었다. 즉 자연 상태와 거의 동일한 격리포장에서 재배된 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 생육특성은 1년간 재배되는 동안 생육에 있어서 거의 차이가 없다는 것을 보여준 것이다. 이러한 형태적 특성의 결과는 한반도 내에 분포하고 있는 자생 한국 잔디류의 생태조사 (Yu et al., 1974; Kim et al., 1996; Choi et al., 1997)의 결과와 유사하게 나타났다. 또한 자연조건에서 재배된 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 생육 특성 조사 (Honda, 1971; Kitamura et al., 1973)의 결과에서 보여준 형태적 특성과도 유사하였다.

Table 6. Nutrient contents in 0.5kg of soil mixture used to grow the WT and GM Zoysia grass (September, 2005)

Sample	pH (1:5)	EC[a] (dS/m)	OM[b] (%)	Available P_2O_5 (mg/kg)	Exchangeable cation ----- (cmol+/kg) ------			0.1 N HCl Extractable ---------- (mg/kg) ----------				
					K	Ca	Mg	Fe	B	Zn	Mn	Cu
wild- type	4.97±0.06[c]	0.036±0.00	4.08±0.06	14.8±2.34	1.00±0.40	0.55±0.07	0.43±0.05	21.5±1.20	0.65±0.21	1.69±0.23	29.0±0.98	1.29±0.66
GM	4.86±0.17	0.032±0.00	4.69±0.68	13.5±2.57	0.78±0.13	0.45±0.14	0.36±0.13	19.1±2.08	0.85±0.13	1.58±0.32	27.8±1.39	0.83± 0.07
LSD[d] 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

[a] EC means electric conductivity, [b] OM was organic matter. [c] Standard deviation. [d] Last significant difference, NS means Not significantly different at 0.05 level. The chemical properties of the soil were determined by RDA standard analytical method.

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 엽록소 함량은 엽의 SPAD 값을 측정하여 Figure 22에 나타낸 회귀식을 이용하여 함량을 분석한 결과, 각각 1.04-1.06 mg/g FW 으로 두 잔디 간에 유의차가 없었다(Table 7). 일반적으로 들잔디의 엽록소 함량은 비료시비량에 따라서 0.7-2.8 mg/g 범위 내에 있음이 보고되었고 (Kim, 1990; kim, 1991; Lee, 2001), 본 연구에서 조사된 엽록소 함량과 유사하게 나타났다.

Table 7. Morphological characteristics of leaves of WT and GM Zoysia grasses

Plants	Plant height (cm)	Leaf length (cm)[a]	Leaf width (mm)[a]	First leaf height (cm)[b]	Leaf angle (A°)[a]	SPAD[c]	Chlorophyll contents (mg/g FW)[d]	Leaf Weight (mg)
WT	19.9±3.9[e]	17.8±3.3	5.5±0.8	3.8±0.7	24.5±5.1	26.7±2.9	1.04±0.19	0.20±0.09
GM	20.4±2.5	19.7±3.5	5.4±0.6	4.0±0.7	24.9±6.4	26.9±2.7	1.06±0.17	0.20±0.05
t-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

[a] Values measured from the third leaf, [b] Length from ground to first leaf blade, [c] The value of chlorophyll contents measured by SPAD-502 Chlorophyll meter (MINOLTA Co., Japan), [d] Total chlorophyll contents measured by UV spectrophotometer, [e] Standard error. NS: considered statistically insignificant at 0.05 level by t-test.

3) 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디 잎의 무기성분 비교

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 잎의 무기성분 함량을 조사한 결과는 Table 8에 나타내었다. 총질소, 칼륨, 칼슘, 마그네슘의 함량은 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디에서 0.08-1.39% 범위 내에서 두 들잔디 간의 유의차가 없었다. 또한 미량원소인 철, 붕소, 아연, 망간, 구리는 5.19-143 mg/kg 범위 안에서 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 간에 유의차가 없었다. 인산의 경우 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디에서 0.15%와 0.25%로 95% 유의수준에서 유의적 차이가 나타났다 (Table 8). 이러한 원인은 잡초제거를 위해서 비선택성 제초제저항성 들잔디에는 제초제 살포가 가능하지만, 야생형 들잔디에는 제초제 살포가 불가능하다. 따라서 비선택성 제초제저항성 들잔디에 살포된 제초제에 기인하여 인산의 함량이 높게 나타난 것으로 생각된다. 일반적으로 잔디 건물량 중에 질소, 인, 칼륨, 칼슘, 마그네슘의 함량은 0.1-6%로 보고되었고, 미량원소인 철, 망간, 아연, 구리의 함량은 0.1-140 ppm으로 보고되었다 (Kitamura et al., 1997). 본 연구에서 조사된 들잔디의 무기 영양성분 함량은 기존의 연구보고에서 보다 비교적 낮게 나타났다.

Table 8. Mineral contents in leaves of WT and GM zoysia grasses

Sample	T-N	P	K	Ca	Mg	Fe	B	Zn	Mn	Cu
	----------(%) ----------					----------(mg/kg) ----------				
Wild - type	0.92± 0.09[a]	0.15± 0.02	1.39± 0.21	0.13± 0.01	0.09± 0.01	134± 8.50	11.4± 0.60	23.9± 2.23	108± 17.3	6.59± 0.95
GM	1.07± 0.01	0.25± 0.02	1.36± 0.10	0.11± 0.01	0.08± 0.01	143± 44.6	15.1± 6.99	28.7± 3.97	78.7± 9.96	5.19± 0.83
t-test	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Concentrations of P, K, Ca, Mg, Fe, B, Zn, Mn, and Cu were determined by ICP atomic emission spectrometer (JY Panorama, Jobin Yvon, France), total N was analyzed by the method of Kjeldahl digestion and titrimetric determination (Bremner and Mulvaney, 1982). [a] Standard deviation, *Last significant difference at 0.05 level.

4) 들잔디 종자의 형태 및 발아율 비교

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 종자의 형태적 특성을 조사한 결과 화수에서 수확된 종자는 각각 49립 이었고, 화간의 길이는 약 12 cm, 화수의 길이는 약 4.8 cm로 관찰되었다. 또한 종자의 길이와 넓이는 약 3.1 cm 및 1.4 cm이었고, 100립중은 약 58 mg으로서 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 간에 유의차는 나타나지 않았다 (Table 9).

Table 9. The seed characteristics of WT and GM Zoysia grass using 7 morphological traits

Plants	Number of seeds per spike	Length of rachis (cm)	Length of flowering culm (cm)	Seed length (mm)	Seed width (mm)	SL/SW ratio	Weight of 100 grains (mg)
WT	49.1±7.3[a]	4.9±0.6	11.7±2.7	3.1±0.3	1.4±0.2	2.2±0.3	58.4±2.8
GM	49.4±7.6	4.8±0.6	12.1±2.4	3.2±0.3	1.5±0.2	2.2±0.2	57.8±2.5
t-test	NS[b]	NS	NS	NS	NS	NS	NS

[a] Standard deviation of the fifteen replicates, [b] considered statistically insignificant at 0.05 level by t-test. SL/SW ratio means the seed length/seed width ratio.

이러한 연구결과는 Honda (1963), Kitamura (1967) 및 Choi 등 (1997)이 보고한 잔디종자의 형태적 특성과 유사하게 나타났다.

격리포장에서 종자의 자연발아는 야생형 들잔디 종자에서 4%, 비선택성

제초제저항성 들잔디에서 3.7%이었고, Zenith 종자에서는 40%의 발아율이 관찰되었다 (Figure 24). 이러한 결과를 보면 종자에 인위적 처리를 하여 파종한 Zenith 품종을 제외하고는 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 종자의 자연발아율에는 유의적 차이가 관찰되지 않았다. 일반적으로 들잔디 종자를 실온에서 자연발아 시킬 경우 1% 미만의 발아율을 보인다고 보고되었고 (Yeam et al., 1985), 35℃에서 발아 시킬 경우 0.4%이었으며, 노지에서 자연 발아시킬 경우 약 4%의 발아율을 보인다고 보고되었다 (Kitamura, 1967). 따라서 본 연구에서 조사한 야생형 및 비선택성 제초제저항성 들잔디 종자의 발아율과 기존의 들잔디의 발아율의 연구결과와 매우 유사한 것으로 판명되었다.

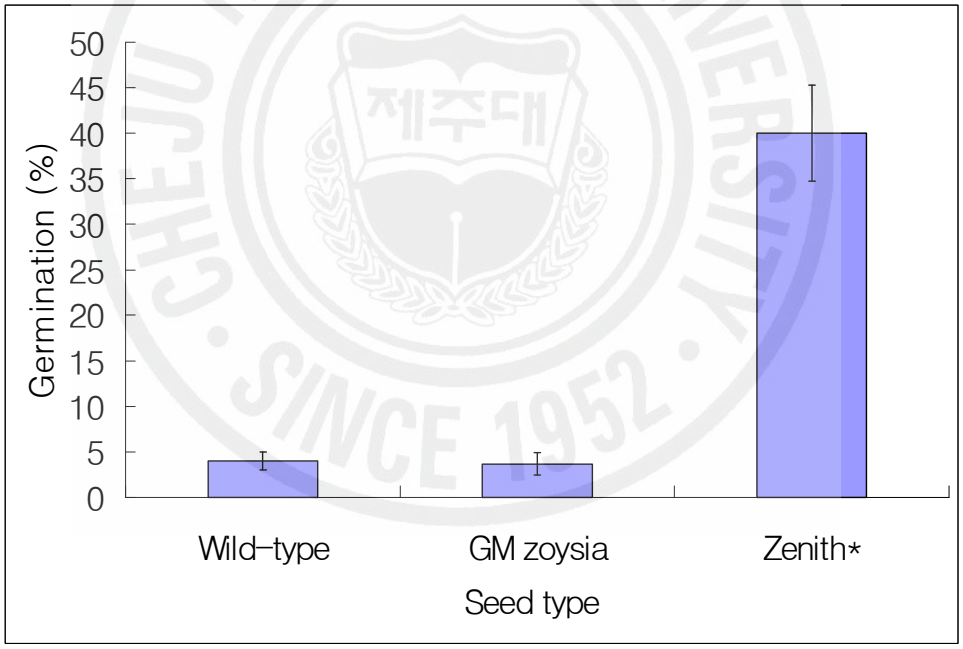


Figure 24. Germination of the WT and GM Zoysia grass seed in natural condition.

* Zenith was one of *Zoysia japonica* cultivar

5) 영양번식을 통한 들잔디의 피복율과 포복경 생육

본 시험에서 공시된 들잔디를 이식 후 90일에 포복경의 생육을 조사한 결과 이식 개체 당 포복경 수는 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디에서 약 5개로 나타났다. 포복경의 생장 길이는 30.4-33 cm이었고, 절간길이는 3.2-3.7 cm로 관찰되어 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 증식에 따른 포복경의 생육에는 유의차가 없었다 (Table 10). 본 연구에서 조사된 포복경의 생육특성은 한국자생 잔디류 91계통에 대한 생육특성조사 (Kim et al., 1996)와 한국잔디의 형태적 특성조사 (Kim et al., 1996; Choi and Yang, 2004)에서 포복경의 생육특성 결과가 유사하게 나타났다.

Table 10. Growth characteristics of WT and GM Zoysia grass using four morphological traits

Plants	Stolon number (90 days)	Stolon length (cm)	Internode length (cm)	Density[a] (No./cm^2)
WT	5.4±1.1	30.4±6.8	3.2±0.7	0.57±0.07
GM	5.2±0.8	33.0±7.4	3.7±0.9	0.55±0.04
t-test	NS	NS	NS	NS

[a] Density was number of tiller / cm^2, NS: considered statistically insignificant at 0.05 level by t-test. Each value indicates the mean ± S.E. of five replicates.

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 생육기간에 따른 피복율 변화는 Figure 25에서 보여준 것과 같이, 재배 90일 후 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디가 약 20%이었고, 150일 후에는 약 38%로 조사 되었다. 이후 들잔디는 휴면기에 들어가 증식이 거의 없었고, 이식 후 420일에 야생형과 비선택성

제초제저항성 들잔디는 90% 이상의 피복율이 관찰되었다. 따라서 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 재배기간에 따른 피복율 변화에는 큰 차이가 없는 것으로 생각되며, 또한 이러한 연구결과는 기존의 한국잔디의 피복율 시험 보고 (Lee et al., 1995)와 유사한 것을 알 수 있었다.

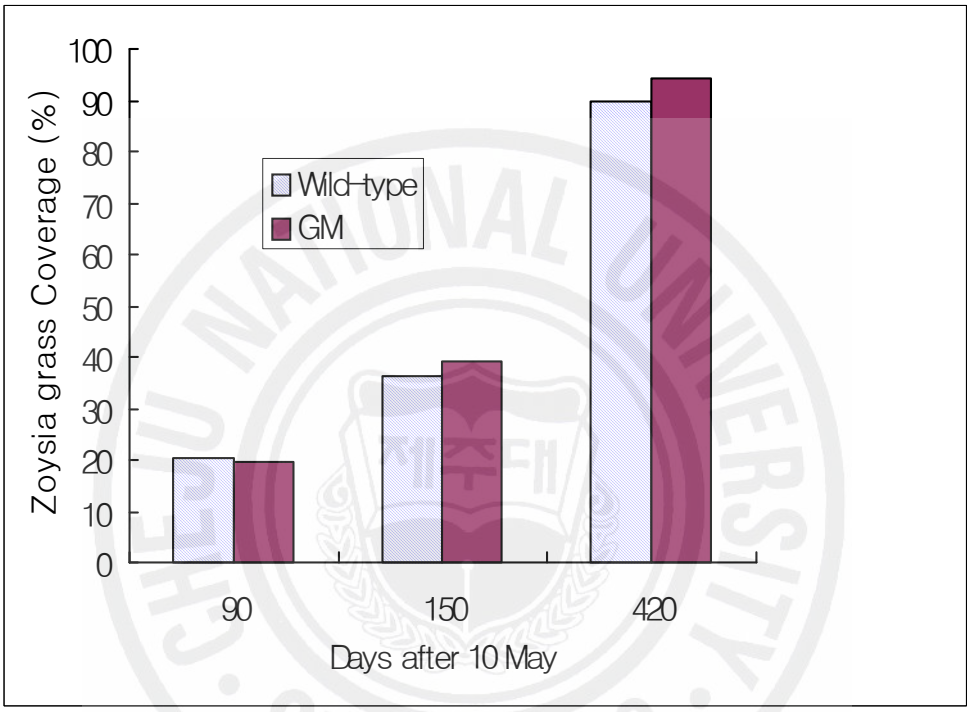


Figure 25. Effects of planting date on coverage of WT and GM Zoysia grasses.

이상의 결과를 종합해보면 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 생육과정에서 두 잔디의 생육상태에는 특별한 차이점이 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구진이 개발한 비선택성 제초제저항성 들잔디는 야생형 들잔디와 실질적 동등성이 있다고 생각되며 향후 포장 및 정원에서 재배할 경우에도 기존의 잔디재배와 동일한 방법으로 재배가 가능하리라 생각된다.

5. 적 요

본 연구에서는 비선택성 제초제저항성 들잔디와 오랜 세월 동안 안전하게 이용해온 야생형 들잔디의 실질적 동등성을 검토하기위해 생육특성을 비교하였다. 먼저 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 재배 포장에서 채취한 토양의 성분을 분석한 결과 유기물함량, 치환성 양이온 및 미량원소의 함량에서도 유의차가 없었으나 토양 비옥도가 낮게 나타났다. 일반적으로 제주도의 토양은 전반적으로 육지부의 토양과는 달리 화산회토이기 때문에 육지부의 토양에 비해서 낮은 비옥도를 나타낸다.

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 잎의 생육특성을 조사한 결과 초고 (약 20 cm), 엽장 (17-19 cm), 엽폭 (약 5 mm), 엽각 (약 25°), 최하위 엽의 높이 (약 4 cm), 엽록소 함량 (약 1 mg/g)에는 유의차가 없었다. 잎의 무기성분을 분석한 결과 총질소, 칼륨, 칼슘, 마그네슘의 함량과 미량원소들의 함량에는 유의차가 없었으나 인산의 경우 신뢰수준 95% 에서 유의차가 나타났다. 이는 비선택성 제초제저항성 들잔디에만 제초제를 살포하여 발생한 유의차로 생각된다.

들잔디의 화서 및 종자의 특성을 조사한 결과 화서당 종자수는 약 49개, 화간과 화수의 길이 4.8 cm와 12 cm, 종자의 길이와 넓이는 3.1 cm 와 1.5 cm, 100립중은 58 mg과 종자의 발아율 (약 4%)에서 두 잔디 간에 유의차가 없었다. 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디를 이식 후 90일, 150일, 420일에 조사한 피복율 변화는 큰 차이가 없었고, 90일에 조사한 포복경의 생육특성에서 두 잔디간의 유의차가 없었다. 이상의 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 생육특성 비교 결과를 살펴볼 때, 두 들잔디 간에는 실질적 동등성이 인정되었다.

6. 인용문헌

Arnon, DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol-oxidase in *Betula vulgaris*. Plant physiology 24: 1-15.

Aventis CropScience: For non-residual control of broadleaf and grass weeds in various situations. Basta technical guide(**I**nternet: www.aventis.com.au**)**.

Bremner JM and Mulvaney CS. 1982. Total nitrogen, In: A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeny, (eds), Methods of Soil Analysis, Ed 2, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, pp 595-624.

Choi JS, Ahn BJ, Yang GM. 1997. Distribution of native Zoysia grass (*Zoysia* spp.) in the south and west coastal regions of Korea and classification using morphological characteristics. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38 (4): 399-407.

Choi JS and Yang GM. 2004. Development of new hybrid cultivar 'Senock' in Zoysia grass. Kor. Turfgeass Sci. 18: 1-12.

Eggens JL. 1980. Use od the third youngest leaf to estimate leaf area in kentucky bluegrass. Agron. J. 72: 1061-1063.

Emmons RD. 1995. Turfgrass science and management. Delmar Publishers. pp. 40-41.

Ewing RP and Horton R. 1999. Quantitative color image analysis of agronomic images. Agron. J. 91: 148-153.

Honda M. 1971. Comparative morphological studies of representative three species Zoysia lawn grasses. The transactions of faculty of horticulture, Chiba Univ. No.5.

Honda M, Kono M. 1963. 芝の形態並びに解剖學的研究. 特に日本芝 *Zoysia*

japonica Steud. について. 千葉大園藝學部學術報告 (11): 1-22.

Hong KH and Yeam DY. 1985. Studies in interspecific hybridization in korean lawngrasses (*Zoysia* spp.). J. Kor. Soc. Hort. Sci 26: 169-178.

Joo YK, Kim DH, Lee JP and Mo SY. 1997. Present and future prospect in Zoysia grass breeding. Kor. Turfgrass Sci. 11: 73-85.

Kitamura F. 1967. 芝生と芝生用植物, 加島喜代志, 東京, pp 45-65.

Kitamura F and Akashi A. 1973. Morphological studies on local variations of wild japanese lawn grass (*Zoysia japonica* Steud.). J. of Japan Turfgrass Research Association. 1 (1): 27-32.

Kitamura F, Maki Y, Yanaki H, Ookubo S, Yutaka N. 1997. 芝草 芝地 ハンドブック, Ed 1, 博友社, 東京, pp 99-148.

Kim HK. 1990. Physiological and ecological studies (2) on prolongation of the green leaf color period in Korean lawn, *Zoysia japonica* Steud. Kor. Turfgrass Sci. 4 (1): 5-11.

Kim HK, Kim KS, Joo YK, Hong KH, Kim KN, Lee JP, Mo SY and Kim DH. 1996. Variation of the morphological characteristics in the accessions of *Zoysia* species and their hybrid lines. Kor. Turfgrass Sci. 10 (1): 1-11.

Kim JS, Kwack BH. 1991. Effects of paclobutrazol on growild-typeh, chlorophyll content and tolerances to drought and rust in Korean lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 32 (1): 111-116.

Kim SH, Lee JP, Kim JB and Mo SY. 1999. Development of narrow leaf type cultivar Konhee in zoysiagrass. Kor. Turfgrass Sci. 13: 147-152.

Lee JP, Kim NC, Hong SK. 1995. Studies on seed mixtures for slope revegetation of the road. J. Kor. Ins. Landscape Arch. 23 (2): 113-123.

Lee JW, Lee HJ. 2001. Effect of Fertilizer and straw mulching on winter discoloration and spring regrowth of lawn grasses. Kor. J. Crop Sci. 46 (2): 134-138.

NIAST 1988. In soil chemical analysis method. pp. 78-79. 농업과학기술원.

NIAST 2000. In soil and plant analysis method. pp. 103-147. 농업과학기술원.

Patton AJ, Hardebeck GA, Williams DW, Reicher Z. 2004. Establishment of Bermuda grass and Zoysia grass by seed. Crop Sci. 44: 2160-2167.

Purcell LC. 2000. Soyben canopy coverage and light interception measurements using digital imagery. Crop Sci. 40: 834-837.

Richardson MD, Karcher DE and Purcell LC. 2001. Quantifying Turfgrass cover using digital image analysis. Crop Sci. 41: 1884-1888.

Ruemmele BA and Engelke MC. 1990. Zoysiagrass cultivars. Grounds Maintenance. April. pp. 92-126.

Schollen, berger, CJ. 1927. A rapid approximation method for determining soil organic matter. Soil Sci. 24 : 65~68.

Yeam DY, Murray JJ, Portz HL, and Joo YK. 1985. Optimum seed coat scarification and light treatment for the germination of Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) seed. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 26: 179-185.

Youn JH, Lee JP, Kim DH. 2005. 국내외 잔디 특허기술 및 품종 특허의 현황Ⅰ. Kor. Turfgrass sci. 19(2): 141-149.

Youngner, VB. 1961. Growth and flowering of Zoysia species in response to temperatures, photoperiods, and light intensities. Crop Sci. 1: 91-93.

Yu TY, Yeam DY, Kim YJ, and Kim SJ. 1974. Morphological studies on Korean lawn grasses (*Zoysia* spp.). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 15: 79-91.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY
제주대
SINCE 1952

Ⅳ. 비선택성 제초제저항성 유전자의 야생형 들잔디로 이동가능성 검정

1. Abstract

We also examined the cross pollination of GM Zoysia grass with WT Zoysia grass. To assess the cross-pollination and gene flow, a non-selective herbicide, bialaphos, was used. Results showed that cross-pollination and gene flow from GM Zoysia grass were observed in WT Zoysia grass. The cross-pollination was minimum 3% and maximum 9 %, with an average of 6%, at the nearest distance (0 cm). At 50 cm distances in both randomized and completely randomized block designs, cross-pollination was ca. 1.2%, which reduced to 0.12% within 3-m radius, and to 0% at >3-m. Potential gene flow from 936-m^2 GM grass field to WT Zoysia grasses in the surrounding wilderness (88 *Zoysia japonica* and 2 *Zoysia cinica* sampling sites) within 3-km radius was tested based on basta screening and PCR analysis, however, no evidence of gene flow to WT Zoysia grass at out side of GM field was found. Therefore we concluded that the GM herbicide-resistant Zoysia grass generated in our laboratory and tested in the Nam Jeju County field does not appear to pose a significant risk in its cultivation outside of the test field.

2. 서 론

들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)는 난지형 잔디로 *Zoysia* 속 (genus)의 22종 (species) 잔디 중에서 하나이다. 들잔디의 종간 교배친화성 및 유전양식에 대해 조사한 결과 *Zoysia* 속간의 교배가 가능하다고 보고되었다 (Hong et al., 1985; Joo et al., 1997; Choi and Yang 2004). 종간 교배에 의한 들잔디의 형태적 특징 및 생육특성은 F_1형질이 양친의 중간형을 보이며, 생육속도에 있어서는 잡종강세를 보인다고 하였다. 자생지인 들과 해안의 잔디는 교배에 의해서 논뚝과 같은 중간형의 잔디가 형성되는 것으로 보아서 이러한 잡종형은 오랜 세월 동안에 형성되어서 안정화되어진 것이라 할 수 있다 (Hong et al., 1985). 근연종 및 이종간의 교배가능성은 유전자변형 작물에 환경위해성평가에서 가장 중요한 부분이다. GM 작물에 도입된 외래유전자가 재배포장을 벗어나 자연 생태계의 동종, 근연종 및 이종 식물체로의 유전자가 유입되어 환경문제를 유발할 수 있기 때문이다. 따라서 유전자변형 작물의 환경위해성평가 시에 GM 작물이 교배될 수 있는 동종 및 근연종의 분포를 조사하고, 교배 가능한 거리 내에 있을 경우 이를 제거하여 외부로 유출되지 않도록 하여야한다고 규정하고 있다 (MFA, 2002). 일반적으로 GM 작물의 도입유전자가 외부로 유출되는 경우는 작물의 화분비산이나 곤충에 의해서 일어나고, 재배면적, 개화시기, 화분의 활력이 유지되는 시간, 풍속, 곤충활동 반경 등의 요인에 따라서 재배포장 밖의 동종 식물과 교배가 일어날 수 있다 (Kim, 2006). 최근에는 GM 작물에 삽입된 외래 유전자가 생태계 다양성에 미치는 부정적인 영향에 대한 우려가 높아지고 있다.

옥수수의 경우에 원산지인 멕시코 오아하카 지방에서 재배중인 재래종 옥수수에 유전자변형 옥수수의 유전자가 유입 되었다고 보고되었다 (Quist et al., 2001). 또한 수분형태가 자가수분인 콩의 경우에 개화시기를 유사하게 조절하여 야생형 콩을 50 cm 간격으로 배치한 결과, 평균 5.89%의 자연교배가 관찰되었다고 보고하였다 (Nakayama and Yamaguchi, 2002). 비선택성 제초제저항성 벼 (Pons et al., 2000)의 경우에 1 m 의 거리에서 0.19%, 2 m 거리에서 0.05%, 5 m와 10 m 거리에서 0.01%로 타가수분이 낮은 빈도 (Messeguer et al., 2004)를 나타내지만 재배되고 있는 벼 (*Oryza sativa*)로부터 약

40m 거리까지의 야생 벼 (*Oriza rufipogon*)와 자연교배가 가능하다고 보고되었다 (Song et al., 2003). GM 벤트그라스 (Hartman et al., 1994; Lee et al., 1996)의 경우에 반경 3 m 거리에서 약 2%의 교배율이 나타났고, 반경 6 m 거리에서 약 1.3%, 반경 9 m 거리에서 약 0.7%로 나타났다 (Belanger et al., 2003). 최근 보고에 의하면 GM 벤트그라스의 화분비산 거리가 21 km의 먼 거리 까지 확산되는 것이 보고되었다 (Watrud et al., 2004). GM 작물에 도입된 외래 유전자의 비의도적 방출은 자연서식지의 동종 및 근연종의 오염을 초래하고 있다. 따라서 환경위해성평가에서는 GM 작물과 야생형의 교배가능성 및 비산거리를 측정하고, GM 작물의 격리거리를 설정하여 유전자의 이동을 억제해야 한다.

본 연구는 비선택성 제초제저항성 들잔디의 환경위해성평가에서 유전자 이동가능성에 대해서 조사하였다. 먼저 비선택성 제초제저항성 들잔디와 야생형 들잔디의 교배가능성을 검정하였고, 종간의 교배친화성을 이용하여 화분비산 거리를 조사 하였다.

3. 재료 및 방법

1) 식물재료 및 시험포장

본 시험에 사용된 야생형 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)는 제주잔디 (주)에서 판매한 야생형 들잔디를 사용하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디는 *bar (*bialaphos resistant) 유전자가 삽입된 형질전환 식물체 (Toyama et al., 2003)를 선발하였고, 본 실험에서는 T_3세대의 비선택성 제초제저항성 들잔디를 사용하였다. *Zoysia* 속의 금잔디 (*Zoysia matrella*)도 제주잔디 (주)에서 구입하여 식재하였고, 갯잔디 (*Zoysia cinica*)는 제주도 월정리와 하귀리 해안에서 자생하는 것을 채취하여 사용하였다. 한지형잔디인 페레니얼라이그라스 (*Lolium perenne* L.)와 포장 법면보호를 위한 톨페스큐 개량품종인 Kentucky 31은 덕창농축산 (주)에서 종자를 구입하여 파종하였다. 시험포장은 제주대학교 내의 망실포장과 서귀포시 위미리의 GMO 격리포장을 이용하였고, 망실포장은 화분, 종자, 곤충 등의 출입이 최대한 차단될 수 있도록 직경 5 mm의 방충망을 제주대학내의 포장 (약 21평)에 설치하였다 (Figure 26). GMO 격리포장은 남제주군 위미리에 위치한 약 3000평 규모의 격리포장 (농림부고시 2002-2호에 규정에 준하여 조성된 포장)으로서 6개의 독립된 시험구역을 조성하였다 (Figure 26C).

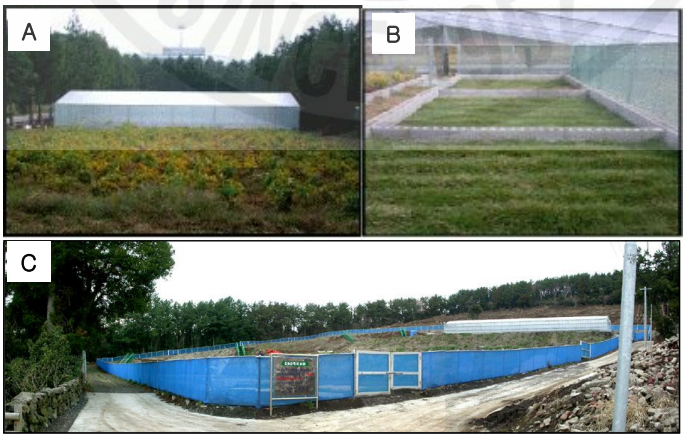


Figure 26. The test fields of gene flow for ecological risk assessment. A and B: Net house for intra-species hybridization, C: unconfined field for gene flow test.

2) 개화시기의 기상조건

서귀포시 위미리의 GMO 격리포장에서 들잔디의 개화는 4월말에 시작하였고, 비선택성 제초제저항성 들잔디의 개화는 5-7일 후에 관찰되었다. 최적의 화분수정시기인 5월1일에서 5월30일까지의 기상조건은 Figure 27과 같이, 평균온도 17.3℃, 강수량 119 mm, 평균 풍속 5 m/s이었고, 풍향은 동풍 39%, 남서풍 20%, 북풍 16%, 남풍 13%, 서풍과 남동풍이 각각 6% 이었다. 2005년 5월 육지부의 평균풍속이 2.8 m/s인 것에 비하면 GMO 격리포장의 평균풍속은 약 2배정도 강하였다. 본 기상자료는 제주지방기상청 자료 중 악기상 감시용으로 측정된 위미리 지역의 기상자료를 제공받아 기록하였다.

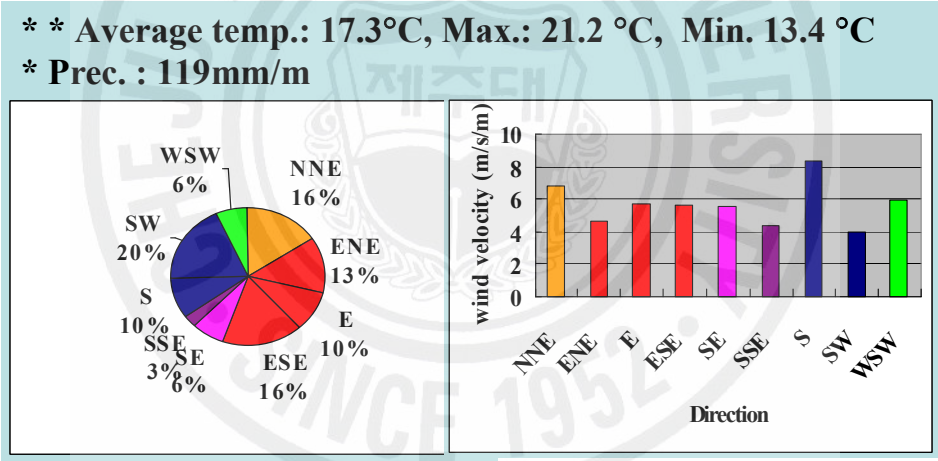


Figure 27. Weather condition around gene flow test fields (May 1-May 31, 2005)

3) 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 교배가능성 조사

비선택성 제초제저항성 들잔디의 외래유전자가 화분비산을 통해서 근접하고 있는 야생형 들잔디에 유입될 가능성을 확인하기위해 다음과 같은 방법으로 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역에 야생형 들잔디를 배치하였다. 망실포장 내에 2개의 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역에 야생형 들잔디 (반경 25cm 화분)를 각각 3개씩 배치하고, 1개 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역에 5개의 야생형 들잔디를 배치하였다 (Figure 28).

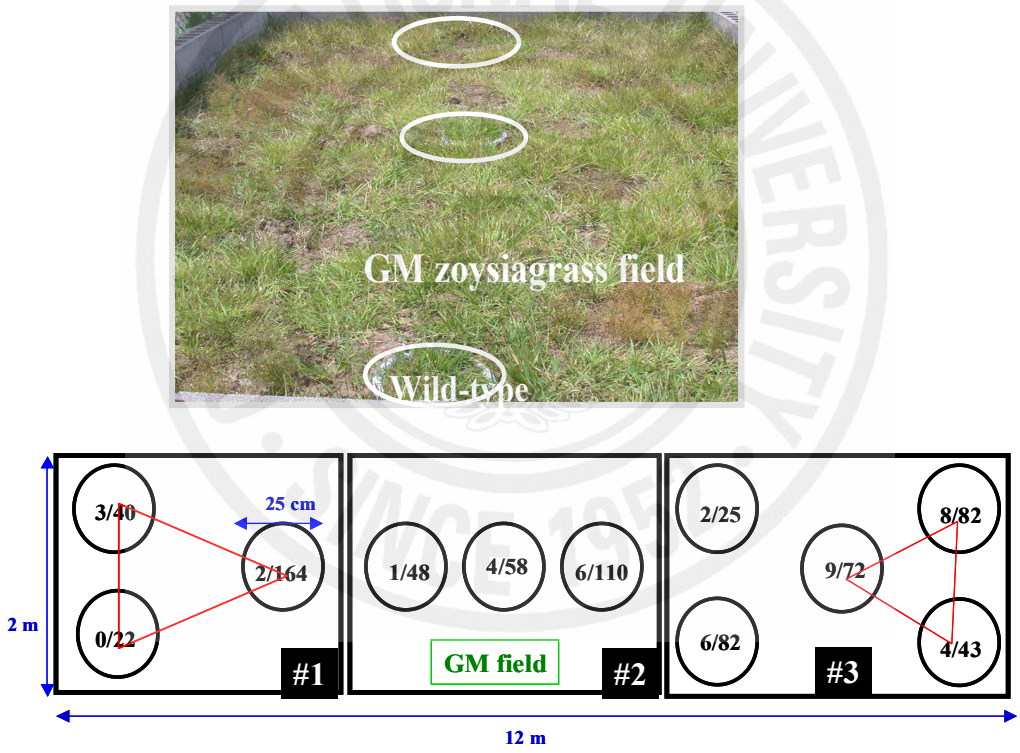


Figure 28. Assessment of hybridization between WT and GM Zoysia grass at no distance.

4) 근거리 (50 cm) 에서의 교배율 조사

비선택성 제초제저항성 들잔디가 화분비산을 통해서 50 cm 거리의 야생형 들잔디 와의 교배가능성 및 교배율을 조사하기위해 GMO 격리포장에서 임의배치법과 난괴법으로 야생형 들잔디와 GM 들잔디를 배치하였다. 난괴법은 비선택성 제초제저항성 들잔디 5개 블록 (1 × 12 m^2) 과 야생형 들잔디 4개 블록 (반경 25 cm 화분 4개)을 교차배열 하였다 (Figure 29). 임의배치법은 비선택성 제초제저항성 들잔디가 식재된 구역에 야생형 들잔디 화분 (반경 25 cm)을 50 cm 간격으로 무작위로 18개를 배열하였다 (Figure 30).

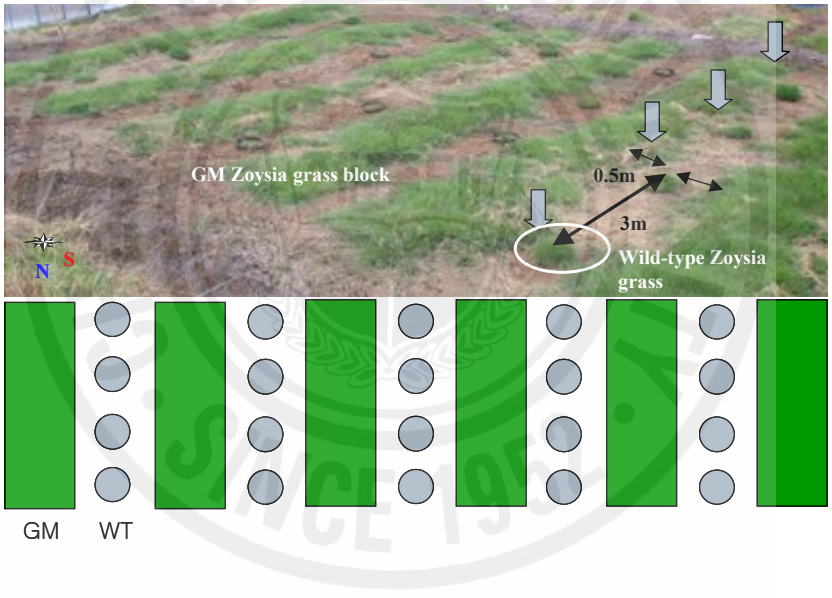


Figure 29. Test for the cross hybridization between WT and GM grass, according to an Alternating Population Combination Design.

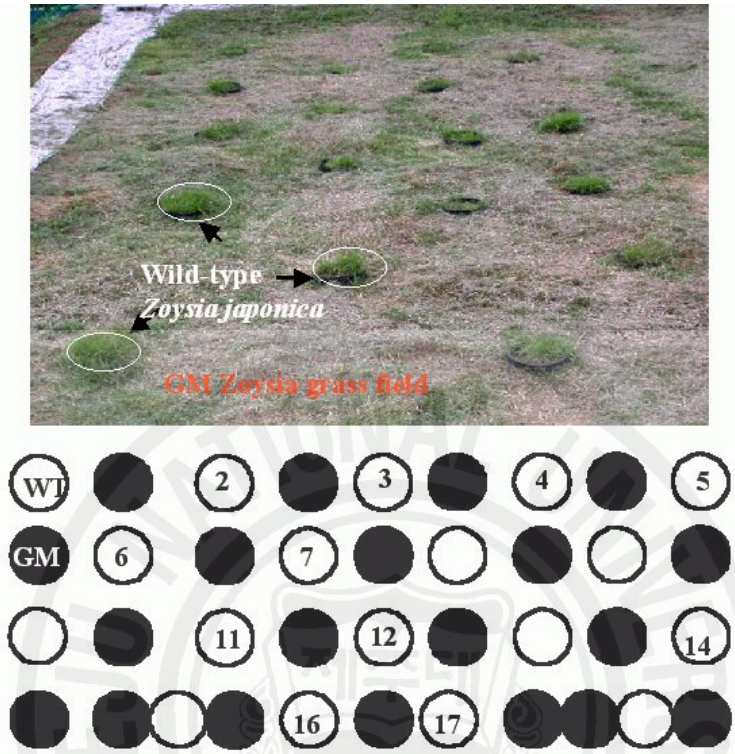
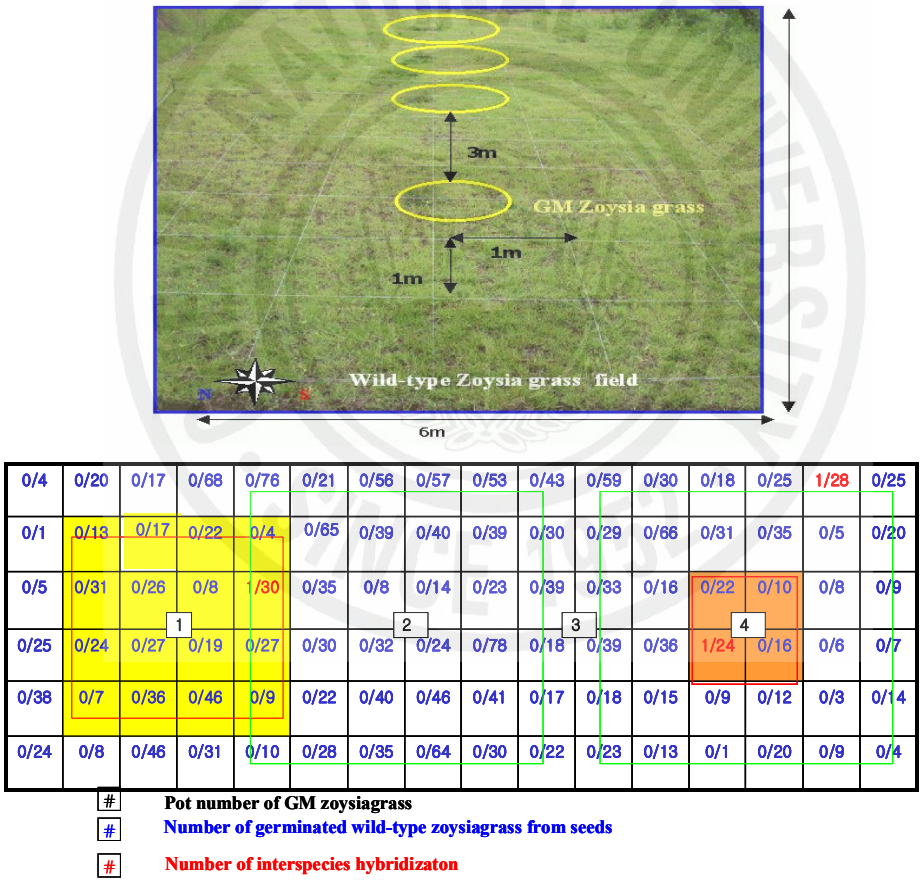


Figure 30. Schematic illustration for testing the cross hybridization between WT and GM grass according to the completely randomized plot.

5) 반경 3 m 이내의 야생형 들잔디 구역에서의 교배가능성 조사

비선택성 제초제저항성 들잔디로 부터 반경 3 m 내의 야생형 들잔디와 교배가능성을 검정하기위해 야생형 들잔디 포장 (6 × 16 m^2)을 이용하였다. 야생형 들잔디포장 내에 3 m 간격으로 비선택성 제초제저항성 들잔디 (반경 25 cm)를 4개 배치하였다 (Figure 31). 성숙종자의 수집을 위해 각 배치된 비선택성 제초제저항성 들잔디 묘를 중심으로 반경 1 m 씩으로 96개의 들잔디 블록 (1 × 1m^2)을 분획하였다.



0/4	0/20	0/17	0/68	0/76	0/21	0/56	0/57	0/53	0/43	0/59	0/30	0/18	0/25	1/28	0/25
0/1	0/13	0/17	0/22	0/4	0/65	0/39	0/40	0/39	0/30	0/29	0/66	0/31	0/35	0/5	0/20
0/5	0/31	0/26	0/8	1/30	0/35	0/8	0/14	0/23	0/39	0/33	0/16	0/22	0/10	0/8	0/9
0/25	0/24	0/27	0/19	0/27	0/30	0/32	0/24	0/78	0/18	0/39	0/36	1/24	0/16	0/6	0/7
0/38	0/7	0/36	0/46	0/9	0/22	0/40	0/46	0/41	0/17	0/18	0/15	0/9	0/12	0/3	0/14
0/24	0/8	0/46	0/31	0/10	0/28	0/35	0/64	0/30	0/22	0/23	0/13	0/1	0/20	0/9	0/4

Figure 31. Test for the gene flow from GM to WT Zoysia grass within 3-m radius.

6) 반경 3 m 이상 9 m 이내에서 동종 및 근연종과의 교배가능성 조사

비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 반경 9 m 이내의 야생형 들잔디 및 근연종과의 교배가능성을 조사하기위해 Figure 32과 같이 시험포장을 조성하였다. GMO 격리포장 내에서 반경 9 m 정육각형 구역의 중심에 비선택성 제초제저항성 들잔디 (반경 2 m)를 식재하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디를 중심으로 3 m, 6 m, 9 m 거리에서 총 36개의 시험처리 구를 배치하였다. 각 시험처리 구에는 3종의 *Zoysia* 속인 들잔디, 금잔디, 갯잔디와 2종의 한지형 잔디인 페레니얼 라이그라스, 켄터키블루 그라스가 식재되었다.

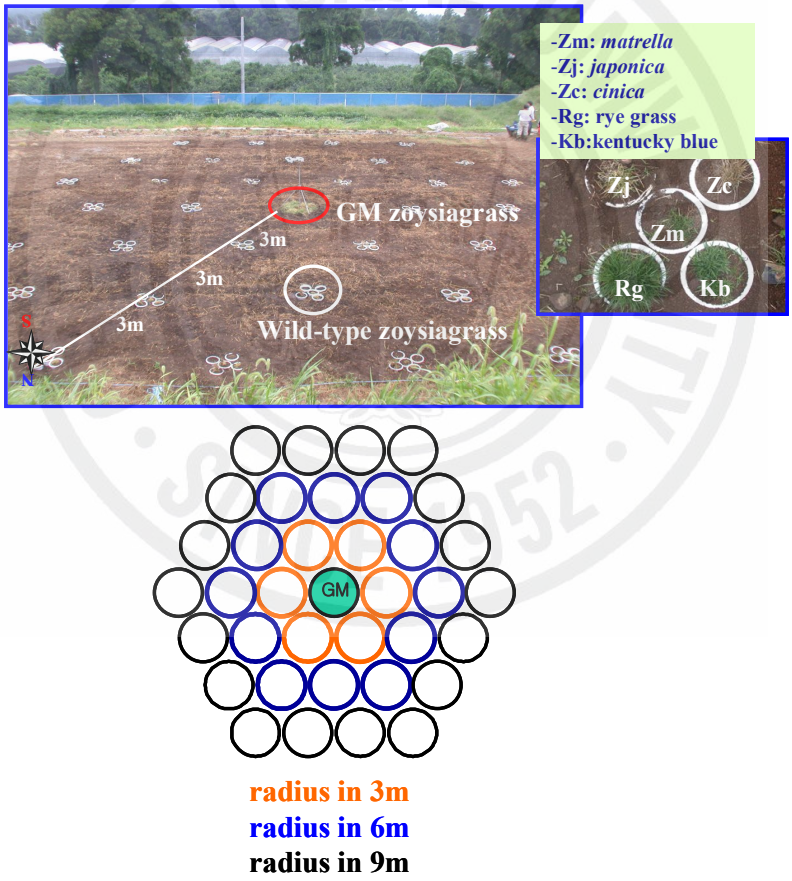


Figure 32. Test for the cross hybridization between GM Zoysia grass and WT Zoysia grass relatives.

7) 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 42 m 이내의 거리에서 교배가능성 조사

비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 42 m 이내의 야생형 들잔디와 교배가능성을 조사하기위해 격리포장 내에 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역 (3 × 12 m^2)을 조성하였고, 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 3 m 간격으로 야생형 들잔디 (반경 25 cm)를 식재하여 42 m 거리 까지 배치하였다. 각 3 m 마다 배치된 블록에는 5개의 야생형 들잔디 묘를 식재하였고, 42 m 거리 까지 14개의 블록을 배치하였다 (Figure 33).

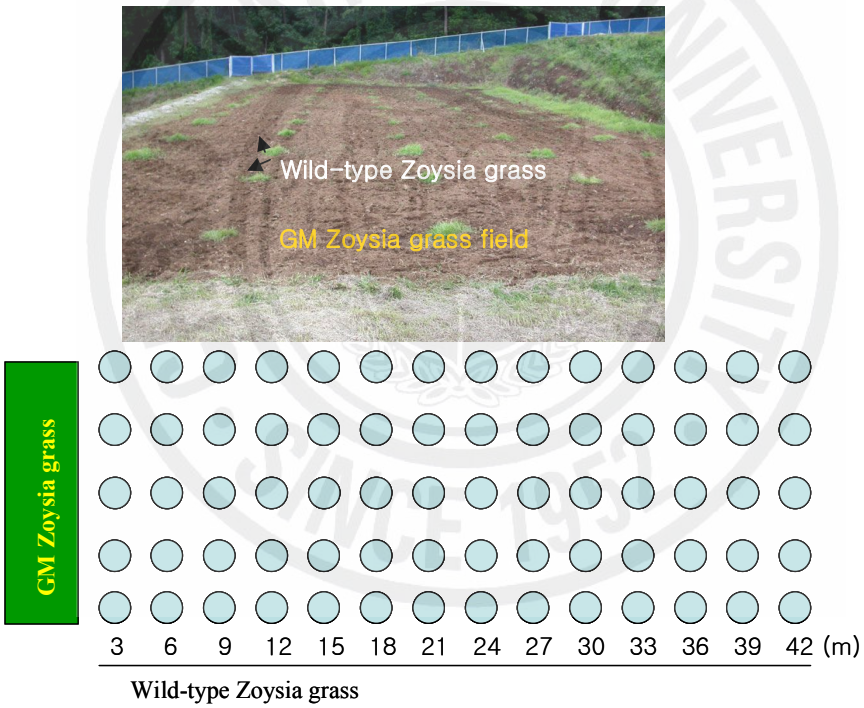


Figure 33. Assessment of hybridization between WT and GM Zoysia grass within a distance of 42 m.

8) 반경 3 km 이내의 자연환경에서 유전자 이동 가능성 조사

비선택성 제초제저항성 들잔디의 유전자가 화분비산을 통해서 격리포장 밖의 자연서식지에서 자생 및 식재된 야생형 들잔디로의 유전자 유입을 검정하기 위해서 제초제 살포 실험 및 PCR 분석을 시행하였다. 시험 구역은 비선택성 제초제저항성 들잔디 (약 900 m^2)가 식재된 격리포장으로부터 반경 3 km 내의 야생형 들잔디 90개 지점을 선택하였다. 총 90개중 85개 지점은 제초제 살포 시험을 하였고, 15개 지점은 들잔디 잎에서 DNA를 추출하여 PCR 분석을 하였다 (Figure 34).

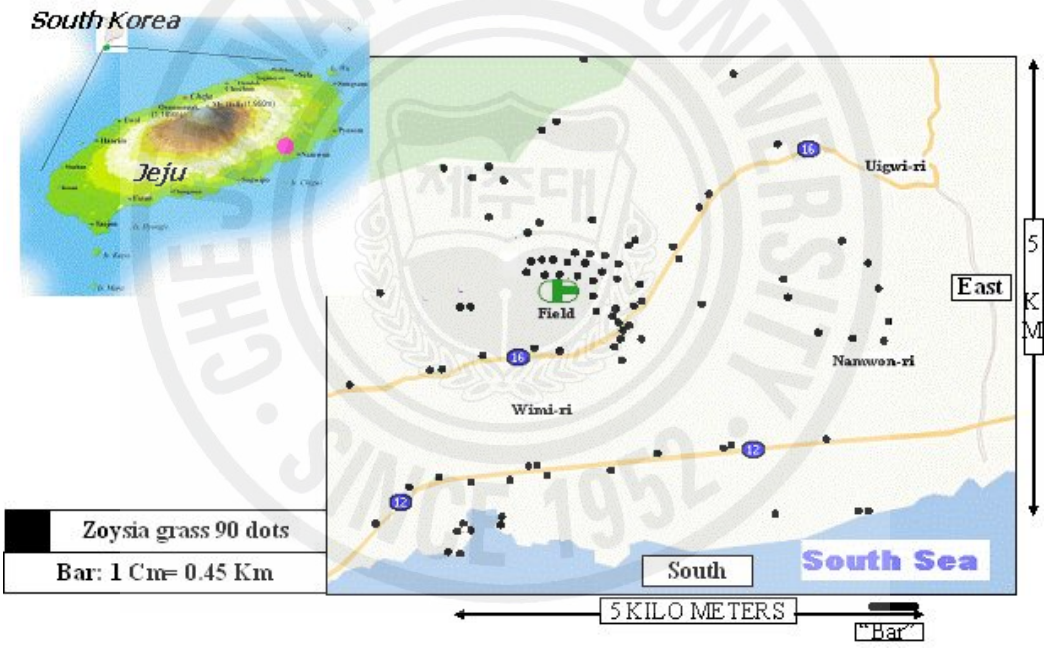


Figure 34. Test for the potential gene flow from GM grass to WT grasses within 3-km radius during two-year period from 2003 to 2005. The GM grass field is centrally located at the Wimi-Ri test field in South Jeju. The sampling sites shown were randomly chosen where Zoysia grasses grew. The sampling site distribution is biased in the north eastern direction from the GM grass site, whereas the other directions are less favorable for grass growth geo-topographically (volcanic rocks, bushy jungles, forest, etc).

9) 비선택성 제초제저항성 실험 및 PCR 검정방법

본 실험에서 사용한 유전자 이동가능성에 대한 검정방법은 비선택성 제초제저항성 개체의 존재 및 PCR을 이용한 *bar* 유전자의 존재여부를 확인하였다. 종자의 전처리는 성숙된 종자를 채종하여 일주일간 자연광에서 건조시킨 후, 30% KOH 용액에 25 분간 종피 연화처리를 하였다. 전처리된 종자는 증류수에 5번 씻어서 광 조건하에서 발아시켰고, 발아적온은 33 ±2℃로 10시간 이상 유지하였다. 비선택성 제초제저항성 시험은 시판용 바스타 (Bayer CropScience Co., Korea)를 규정된 사용량 내에서 최종농도를 0.1% (glufosinate) 농도로 희석하여 발아된 유식물체 및 시험구역에 살포하였다. 또한 비선택성 제초제저항성 개체 및 시험구역에서 채취한 식물체의 DNA는 AccuPrep Genomic DNA extraction kit (Bioneer Co., Korea)를 사용하여 추출하였다. *Bar* 유전자의 존재를 확인하기위한 PCR primer는 5’-GGTCTGCACCATCGTCAACC -3'와 5’-ATCTCGGTGACGGGCAGGA-3'을 사용 하였고, 들잔디에서 발현되는 Z-A2 Actin primer는 5'-GTCAACCCT GTGCAGCAGTA-3'와 5’-ATTCAGGTTGGTT GCTCCAC-3'을 사용 하였다. PCR 증폭을 위한 반응액은 100ng DNA에 10 pmol의 primer와 TaKaRa Ex Taq^{TM} polymerase (Takara Co., Korea)가 포함된 Perfect premix® (Takara Co., Korea)를 희석하여 사용하였고, PCR 조건은 denaturation 온도 94℃에서 30초, annealing 온도 61℃에서 30초, elongation 온도 72℃에서 45초로 설정하여 35 cycle 하였다. PCR 산물은 0.8% 아가로스 (Sigma, USA) 겔에 전기영동 하였고, 마커는 Takara에서 제공된 DNA ladder 마커를 사용하였다.

4. 결과 및 고찰

1) 비선택성 제초제저항성 들잔디와 야생형 들잔디의 교배가능성 검정

비선택성 제초제저항성 들잔디 포장에서 근접하게 (>0 m) 배치된 야생형 들잔디와 교배가능성을 조사한 결과, 야생형 들잔디 3개의 실험구역에서 각각 3%, 4.5%, 9%의 교배율이 나타났으며, 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장 내에서 평균 교배율은 6%이었다 (Table 11). 들잔디의 교배율은 개화시기와 일조시간에 따라서 차이가 발생하고, 수정수분시기에 습도와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

Table 11. Test for the potential cross-hybidization between WT and GM Zoysia grass at close proximity (>0 cm).

	Block 1			Block 2			Block 3					Total
Number of plants	40	22	164	48	58	110	25	82	72	82	43	746
Number of resistant plants	3	0	2	1	4	6	2	6	9	8	4	45
% of resistant plants	8	0	1	2	7	5	8	7	12	10	9	6
Average	3%			4.7%			9%					6

The data presented are from the WT parents only.

들잔디의 개화는 암술부터 시작하고, 암술의 개화 5~7일 후에 수술이 성숙하기 시작하여 14-17일이 지나면 화분이 소멸된다. 들잔디는 암술과 수술이 동일한 포영에서 시간적 차이를 두고 일어나 자가수정이 27%이루어지고, 수술이 바람에 의해서 다른 개체의 암술로 전이되어 타가수정이 34% 일어난다고 보고되어있다 (Kitamura, 1967). 자가수정의 조건에서도 타가수정이 일어나는 것은 암술과

수술의 성숙시기의 차이 때문으로 판단된다. 그러나 비선택성 제초제저항성 들잔디의 개화시기는 야생형 들잔디 보다 약 5-7일 정도 늦어서 Kitamura (1967)가 보고한 타가수정에 의한 교배율 보다 낮은 결과를 나타낸 것으로 생각된다. 들잔디 수술의 출현은 일반적으로 일출 후 1시간에서 시작하고, 화분의 유출은 오전 11-12시에서 시작하여 오후 13시-14시에 완료되는 것으로 보고되었다 (Kitamura, 1967). 3개의 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역은 각각 오전에 음지가 형성되는 구역, 일반적인 광 조사 구역, 오후에 음지가 형성되는 구역으로 나눌 수 있으며, 오전에 음지가 형성된 구역에서는 평균 3%, 일반적인 광 조사구역에서는 평균 4.5%, 오후에 음지가 형성되는 구역에서 9%의 교배율이 나타났다. 이러한 조사결과는 화분 출아 시기가 온도와 광주기에 따라서 달라지고, 고온 조건에서는 화분건조로 인해 교배율이 낮게 나타나는 것으로 생각된다.

2) 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 1 m 이내의 거리에서 유전자이동 가능성 검정

격리포장에서 0.5 m 간격에 야생형 들잔디와 비선택성 제초제저항성 들잔디의 유전자 이동성을 검정한 결과 각 배치법에 따라서 각각 평균 1.24%, 1.22%의 비선택성 제초제저항성 식물체가 얻어졌다 (Table 12-13).

Table 12. Result of the cross hybridization between WT and GM grass, according to an alternating population combination design at 0.5 m distance .

	Block 1	Block 2	Block 3	Block 4	Total
Number of plants	346	199	258	164	967
Number of resistant plants	5	2	2	3	12
% of resistant plants	1.45	1.01	0.78	1.83	1.24

난괴법으로 배치한 구역에서는 최대 1.83%, 최소 0.78%, 평균 1.24%의 교배율이 나타났고(Table 12), 임의배치법에서는 최대 4.2%, 최소 0%, 평균 1.22%의 교배율이 나타났다(Table 13). block 내의 교배율은 편차가 적었고, plot 간의 교배율에서는 편차가 높게 나타났으나 두 배치법에서의 평균 교배율은 유사하게 나타났다. 이러한 결과는 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역의 0에 근접한 거리에서의 교배율과 비교하면 1/6 로 감소한 결과이다.

Table 13. Assessment of hybridization between WT and GM Zoysia grass according to the completely randomized plot at 0.5m distance .

Plots	2	3	4	5	6	7	11	12	14	16	17	Total
Number of plants	22	44	34	85	45	72	28	24	40	33	64	491
Number of resistant plants	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	2	6
% of resistant plants	0	0	2.9	0	2.2	0	0	4.2	0	3.0	3.1	1.22

3) 반경 3 m 이내 거리의 야생형 들잔디 구역에서 유전자이동 가능성 검정

비선택성 제초제저항성 들잔디를 중심으로 반경 3m 이내 거리에서의 유전자 이동가능성을 조사한 결과 Table 14와 같이 나타났다. 반경 1 m 이내의 거리에서 교배율은 약 1.4%이었고, 2 m 이내의 거리에서 교배율은 0.3% 이었으며, 3 m 이내의 거리에서 교배율은 0.12%로 나타났다. 따라서 들잔디의 교배가능성 및 교배율은 거리에 따라서 상당한 차이가 있을 것으로 추측된다.

제초제저항성 벼 (Pons et al., 2000)의 경우에 1 m 의 거리에서 0.19%, 2 m 거리에서 0.05%, 5 m와 10 m 거리에서 0.01%로 타가수분이 낮은 빈도 (Messeguer et al., 2004)로 관측되었다. 야생 벼 (*Oryza rufipogon*)의 경우에 재배품종인 Minghui-63으로부터 0.5 m 거리의 난괴법에서 2.19%, 반경 1.2 m 거리에서 2.75%가 유전자 이동에 의해서 교잡되었다고 하였다 (Song et al., 2003). 야생 벼 및 잡초성 벼의 월동 후 자연발아는 품종에 따라서 30-85%의 발아율을 나타내어 (Hong et al., 1998) 유전자가 유입된 야생 벼의 후세대 확산은 클 것으로 생각된다. 반면에, 들잔디의 경우에는 0.5 m 거리에서 1.2%, 반경 3 m 거리에서 0.12%로서 교배율이 유사하지만 후대의 발아율은 1-4% (Yeam et al., 1985; Kitamura, 1967)로 낮아서 자연환경에서 확산될 가능성이 매우 낮다. 또한 자연환경에서 우점잡초로 인해 생육이 억제되고, 관리되지 않을 시에는 소멸하여 자연환경에 악영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

Table 14. Assessment of hybridization between WT and GM Zoysia grass within 3m radius.

Radius (m)	1m	2m	3m
Number of plants	72	660	2536
Number of resistant plants	1	2	3
% of resistant plants	1.39	0.3	0.12

4) 자연 교배된 야생형 들잔디 후대에서 *bar* 유전자의 검출

자연교배에 의해서 비선택성 제초제저항성이 나타난 식물체는 PCR 반응 결과 그림 35와 같이 약 0.5 kb 크기의 *bar* 특이적 밴드가 확인되었다. 따라서 제초제에 저항성을 나타내는 개체들은 형질전환 들잔디에 삽입된 *bar* 유전자가 화분비산에 의해서 전이된 것으로 판단된다.

Figure 35. The result of PCR analysis for gene flow test in field. M: molecular marker, Lane 1: WT Zoysia grass, Lane 2-5: Herbicide-tolerant plants after gene flow test, P: positive control.

5) 반경 9 m 및 42 m 이내에서 유전자이동성 검정

반경 3 m 이상의 시험모형에서 들잔디 654 개체, 금잔디 137 개체, 갯잔디 338 개체, 라이그라스 358 개체에 대해서 교배가능성을 조사한 결과 비선택성 제초제저항성 개체는 관찰되지 않았다 (Table 15). 들잔디는 종간 교배친화성이 나타나는 것으로 보고 (Hong et al., 1985)되었으나, 본 시험구역인 반경 3 m이상의 거리에서는 관찰되지 않았다.

GMO 격리포장내의 42 m 거리까지 유전자이동 가능성을 검정한 결과 14개 블록 (3 m 간격)의 야생형 들잔디 178 개체에서 비선택성 제초제저항성 개체는 관찰되지 않았다 (Table 16). 또한 시험포장 내에서 발생한 톨페스큐 (ky-31) 1492

개체에 대해서 교배 가능성을 검정한 결과 자연교배에 의한 비선택성 제초제저항성 개체는 관찰되지 않았다. 따라서 Figure 36에 나타낸 그래프 결과를 미루어 본다면 3 m 이상의 거리에서 화분비산에 따른 유전자 이동가능성은 매우 낮을 것으로 생각된다.

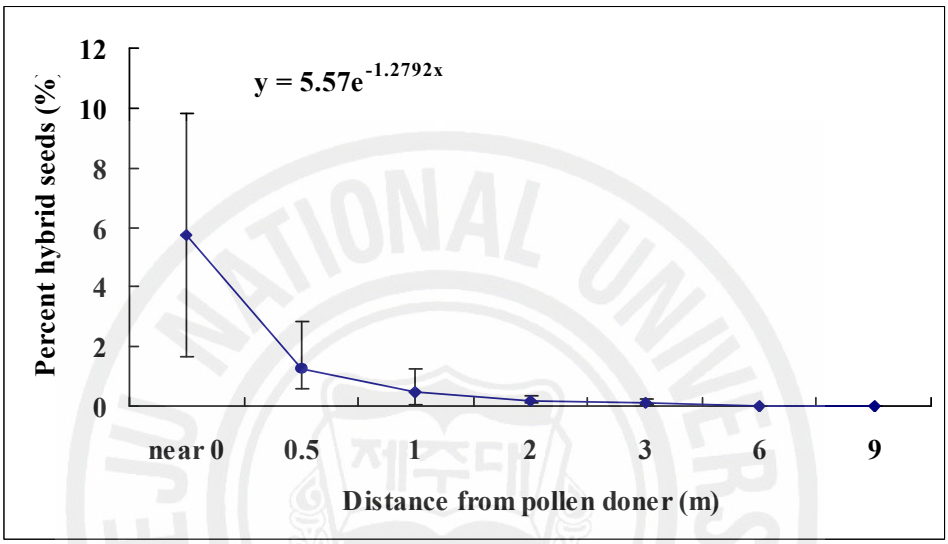


Figure 36. Distance dependence for gene flow from the GM to WT Zoysia grass within 3m radius. The observed data can be best fit by an exponential equation as indicated in red line. (Near 0: The nearest are never distance Zero)

Table 15. Test for the outcrossing of GM Zoysia grass with inter- and intra-species within 9m radius

Distance	*Zoysia japonica*		*Zoysia matrella*		*Zoysia cinica*		*Lolium perenne*	
	Number of Plants	Number of resistant plants	Number of Plants	Number of resistant plants	Number of Plants	Number of resistant plants	Number of Plants	Number of resistant plants
3 m	231	0	0	-	83	0	89	0
6 m	209	0	79	0	151	0	176	0
9 m	214	0	58	0	104	0	93	0

Table 16. Test for the potential gene flow from GM to WT Zoysia grass within 42 m.

Distance (m)	Zoysia grass		Tall fescue ky-31	
	Number of plants	Number of resistant plants	Number of plants	Number of resistant plants
3	11	0	76	0
6	2	0	47	0
9	13	0	89	0
12	2	0	112	0
15	12	0	70	0
18	0	-	121	0
21	2	0	68	0
24	11	0	121	0
27	36	0	166	0
30	13	0	103	0
33	21	0	166	0
36	29	0	179	0
39	0	-	68	0
42	28	0	106	0

6) 반경 3 km 이내의 거리에서의 유전자 이동성

GMO 격리포장 주변 자연서식지에 대해서 화분비산에 의한 유전자이동 가능성을 검정한 결과, 85개의 지점에서 비선택성 제초제저항성 개체는 발견되지 않았다 (Figure 37). 또한 15개 지점에서 채취한 식물체의 DNA를 추출하여 *bar* primer를 이용한 PCR 분석을 시행한 결과 *bar* 특이적 밴드는 관찰되지 않았다 (Figure 38). 이러한 결과는 들잔디의 화분비산 거리가 짧아 교배가능성이 낮고, 비선택성 제초제저항성 들잔디의 유전자가 유입 되었다고 해도 노지에서 자연 발아율이 1-4% 미만 (Kitamura, 1967) 으로 낮아서 *bar* 유전자의 이동성이 관찰되지 않은 것으로 생각된다.

Figure 37. The results of herbicide trial in 90 sites of WT Zoysia grass

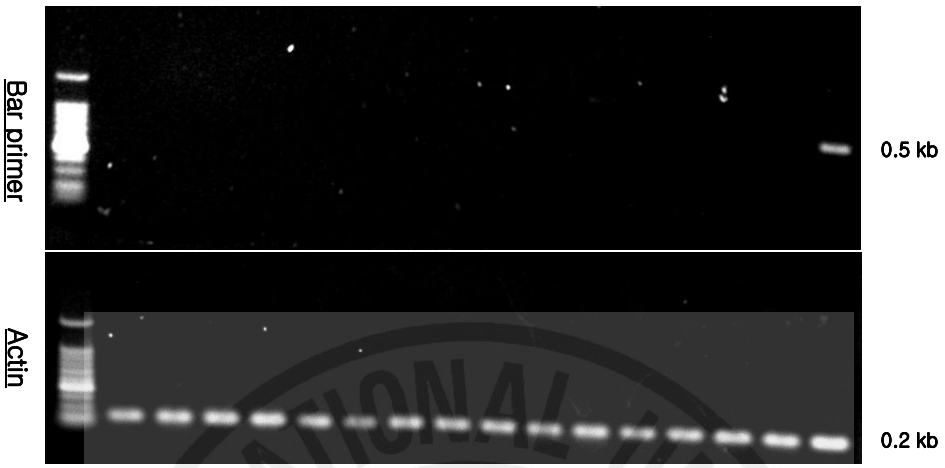


Figure 38. PCR analysist of the potential gene flow from GM grass to WT grasses within 3 km radius. Lane 1: DNA maker, lane 2-16: tested site of WT Zoysia grass, Lane 17: GM Zoysia grass.

이상의 결과를 종합해 보면, 비선택성 제초제저항성 들잔디는 근거리에서 야생형 들잔디와 교배친화성에 관찰되었으나, 3 m 이상의 거리에서는 교배 가능성이 매우 낮은 것으로 생각된다. 비선택성 제초제저항성 들잔디 시험포장으로부터 반경 3 km이내의 자연환경에 대해서 유전자이동 가능성을 검정한 결과 도입 유전자의 검출은 관찰되지 않았다. 또한 비선택성 제초제저항성 들잔디는 발아율이 낮아서 자연환경에 확산될 가능성이 낮고, 우점잡초에 의해 생육이 억제되어 위해성이 없을 것으로 생각된다.

5. 적 요

본 연구에서는 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 야생형 들잔디로의 유전자 이동가능성을 조사하였다. 교배가능성 검정은 비선택성 제초제인 바스타 살포시험과 PCR 검정을 통해서 확인하였다. 그 결과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 동종관계인 야생형 들잔디와 교배친화성이 확인되었고, 각 거리에 따른 교배율을 조사하였다. 근접거리 (>0 m)에서의 교배율은 각 블록에서 각각 4.5%, 6%, 9%로 나타났고, 평균 6%의 교배율이 관찰되었다. 두 들잔디 간의 0.5 m 거리에서 난괴법과 임의배치법으로 교배가능성을 검정한 결과, 각각 1.24%, 1.22%의 교배율이 관찰되었다. 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 반경 3 m 이내의 야생형 들잔디와 교배가능성을 조사한 결과 1m 이내에서 1.3%, 2 m 이내에서 0.3%, 3 m 이내에서 0.12%의 교배율이 관찰되었고, 3 m 이상의 거리에서는 자연 교배된 식물체가 관찰되지 않았다. GM 격리포장 내의 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장 (936-m^2)으로부터 반경 3 km 이내의 자연환경에서 교배가능성을 조사한 결과, 자연교배에 의해서 저항성을 나타내거나 *bar* 특이적 밴드를 나타내는 구역은 관찰되지 않았다. 따라서 비선택성 제초제저항성 들잔디의 유전자이동 가능성은 반경 3 m 이상의 거리에서 매우 낮을 것으로 생각된다. 또한 화분비산 및 종자 유출에 의한 *bar* 유전자의 이동이 낮은 빈도로 발생 하더라도 매우 낮은 자연발아율과 비우점성으로 인해 자연환경에서 생육이 억제되어 점차로 소멸하여 위해성이 없을 것으로 생각된다.

6. 인용 문헌

Belanger FC., Megaher T.R, Day PR, Plumley KA, Meyer WA. 2003. Interspecific hybridization between *Agrostis stolonifera* and related *Agrostis* species under field conditions. Crop Sci. 43: 240-246.

Belanger FC, Plumley KA, Day PR, Meyer WA. 2003. Interspecific hybridization as a potential method for improvement of *Agrostis* species. Crop Sci. 43: 2172-2176.

Choi JS and Yang GM. 2004. Development of new hybrid cultivar 'Senock' in Zoysia grass. Kor. Turfgeass Sci. 18: 1-12.

Hartman C, Lee L, Day P and Tumer N. 1994. Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. Bio/Technology 12: 919-923.

Hong KH and Yeam DY. 1985. Studies in interspecific hybridization in korean lawngrasses (*Zoysia* spp.). J. Kor. Soc. Hort. Sci 26: 169-178.

Hong YK, Song YJ, Choi YK, Na JS. 1998. 토성과 메몰 깊이에 따른 잡초성 벼의 월동성. J. Kor. Weed Sci. 18: 21-22.

Joo YK, Kim DH, Lee JP and Mo SY. 1997. Prosent and future prospect in Zoysia grass breeding. Kor. Turfgrass Sci. 11: 73-85.

Kitamura F. 1967. 芝生と芝生用植物, 加島喜代志, 東京, pp 45-65.

Messeguer J, Marfa V, Catala MM, Guiderdoni E and Mele E. 2004. A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. Molecular Breeding 13: 103-112.

Nakata Y, Yamaguchi H. 2002. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max ssp. soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max ssp. max*) in a

designed population. Weed Biology and Management 2: 25-30.

Pons MJ, Marfa` V, Mele' E and Messeguer J. 2000. Regeneration and genetic transformation of spanish rice cultivars using mature embryos. Euphytica 114: 117-122.

Song ZP, Lu BR, Zhu YG, Chen JK. 2003. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. New Phytol. 157: 657-665.

Watrud LS, Henry Lee E, Fairbrother A, Burdick C, Reichman JR, BollmanM, Storm M, King G, Van de Water PK. 2004. Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with *CP4 EPSPS* as a marker. PNAS 101: 14533-14538.

Ⅴ. 비선택성 제초제저항성 유전자의 타종 식물체로 이동가능성 및 잡초화 검정

1. Abstract

We examined the gene flow from GM herbicide-tolerant Zoysia to weeds. The herbicide-tolerant Zoysia grass and the native weeds grew within the same designated test field. The inter-species hybridization was then examined on the plants having identical flowering times by means of PCR method and treatment of herbicide. No PCR evidence was obtained to indicate the *bar*-gene flow from the GM plant's pollen to those neighboring weed plants during the 2003-2005 study. Potential gene flow from the 936-m^2 GM grass field to Cogon grass in the surrounding wilderness (25 Cogon grass sites) within 2-km radius was tested based on basta screening. But no evidence of gene flow to Cogon grass outside of GM field. The Zoysia grass propagates both sexually and vegetatively. The weight of the seeds is 0.58~0.59 mg per 100 seeds. Even if wind carries the seeds over some distances, the germination rate is less than 4% under natural conditions. Thus, compared to germination, Zoysia can spread itself more effectively through vegetative propagation. However, the Zoysia grass is not a dominant plant and does not spread over the weeded area easily. In fact, the Zoysia grass field is completely dominated by the weeds within 2-3 years of cohabitation. The effects of dominant weeds on the GM Zoysia grass, showing the dominance of the weeds over the turf grass.

2. 서 론

잡초란 재배되고 있는 작물의 경작지에서 불필요하게 발생되는 다른 식물체를 말하며, 작물 재배지역이나 기타 지역에 쉽게 확산되는 특성을 갖고 있다. 잡초는 일반 재배작물에 비해서 비연속적인 발아, 긴 종자 수명, 다량의 종자 생산성, 빠른 생장 등의 특성을 갖는다 (Kim, 2005). 작물의 재배 시에 잡초방제 문제를 해결하고자 생명공학기술을 이용하여 제초제저항성 유채 (바이엘크롭사이언스, 몬산토), 사탕수수 (노바티스, 몬산토, 바이엘크롭사이언스), 옥수수 (몬산토, 신젠타, 듀퐁, 바이엘크롭사이언스, 파이오니아), 콩 (몬산토, 바이엘크롭사이언스) 등의 GM 작물이 개발되었고, 환경위해성평가를 거쳐서 상업화 되었다 (KRIBB, 2006). 제초제 저항성 GM 작물의 재배는 생산효율을 증대시키고 환경친화적인 효과를 갖는 반면, 화분비산에 따른 재배지역 외부의 타종으로 유전자 전이에 따른 야생종의 변형 및 잡초화 가능성이 제기되고 있다. 특히 제초제저항성 GM 벤트그라스의 경우에는 재배포장으로부터 약 3.8 km 정도 떨어진 자연서식지의 근연종에서 제초제저항성 개체가 발견되어 동종이외의 타종간에도 유전자 이동가능성이 확인되었고 (Reichman et al., 2006; Baack, 2006), 제초제저항성 벤트그라스가 환경에 방출될 경우 타종과 교잡을 통해서 제초제저항성 잡초로 확산될 수 있음을 지적하고 있다. 또한 유채의 경우 타가수정 식물로서 화분비산 및 곤충에 의해서 재배지 외부로 유전자 이동성이 조사되었고, 두 종류 이상의 유전자가 교잡되어 슈퍼잡초의 논란이 되고 있다. 케나다 및 영국에서 GM 유채로부터 야생근연종으로 유전자 이동성을 조사한 결과, 글루포시네이트와 그리포세이트 등의 두 가지 이상 제초제에 저항성을 갖는 야생 유채가 발견되었다 (Rieger et al., 2003; Daniels et al., 2005). 일반적으로 재배 작물을 비롯하여 GM 작물은 잡초성이 없기 때문에 관리되지 않은 상태로 계속적으로 포장 및 자연환경에서 생존 가능성이 거의 없다. 또한 2,4-D 및 다른 제초제에 의해서 쉽게 제거가 가능하기 때문에 통제가 불가능할 위험성은 없는 것으로 나타났다. 유채, 감자, 옥수수, 사탕수수 4종류의 GM 작물을 자연서식지에서 10년간 방치하여 조사한 결과 관행적인 작물보다 환경에 잘 적응하는 경우는 발견되지 않았다 (Brown et al., 2001). 자연생태계에서

인간의 필요에 의해 인위적으로 육종한 작물들은 타 식물체와의 경쟁에 의해 살아남을 수 있는 가능성이 거의 없고, 잡초성을 가지지 않기 때문에 생존 가능성이 없다 (Kim, 2005). GM 작물의 포장시험에서 제초제저항성 잡초 문제를 대처하기위해 격리포장 주변의 근연종 및 타종 식물의 분포를 조사하고, 유전자 이동성 가능성이 있는 잡초에 대해서는 제거할 것을 권고하고 있다 (MFA, 2002)

따라서 본 시험에서는 격리포장 내의 근연종 및 타종식물의 분포를 조사하고, 유전자 이동가능성을 조사하기위해 제초제살포시험과 분자생물학적 검정을 시행하였다. 또한 비선택성 제초제저항성 들잔디의 비의도적 방출에 따른 자연환경에서 생육을 조사하기 위해 3년간 방치하여 관찰하였다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

3. 재료 및 방법

1) 공시재료 및 시험포장

시험재료는 *bar* 유전자가 삽입된 비선택성 제초제저항성 들잔디 T_3세대를 망실포장에서 증식시켜 사용하였고, 시험에 이용된 잡초는 포장 내에서 발생한 잡초 중에서 동일한 개화시기를 갖는 식물체를 대상으로 하였다.

망실포장은 제주대학교 농장 내에 망실을 조성하여 3개의 구역 (2 × 3 m^2)에 비선택성 제초제저항성 들잔디를 식재하고, 16개월 후 포장 내에 자연 발생한 잡초 종을 실험재료로 사용하였다. 또한, 격리 시험포장 (약 3000 평) 내에서 조사된 근연종 및 타종 잡초는 포장조성 후 3년 동안 발생된 식물체 중에서 들잔디와 개화시기가 유사한 잡초 종에 대해서 조사하였다. 띠 (Cogon grass)는 제주도에서 묘지, 공원 등에서 흔히 볼 수 있는 식물체로 들잔디와 교배가능성 검정을 위해 서귀포시 남원읍에서 채집하여 식재하였다. 잡초의 학명과 종명은 제주자생식물도감 (Lee et al., 2001)과 국가생물종지식정보 시스템을 활용 하였다 (http://www.nature.go.kr/).

2) 개화시기 조사

망실포장 내에 식재된 비선택성 제초제저항성 들잔디의 생육을 관찰하여 들잔디의 개화시기를 조사하였다. 포장 내에서 들잔디와 개화시기가 유사한 잡초 종을 대상으로 개화시기와 교배 가능성이 높은 시기를 조사하였다 (**Figure 39).**

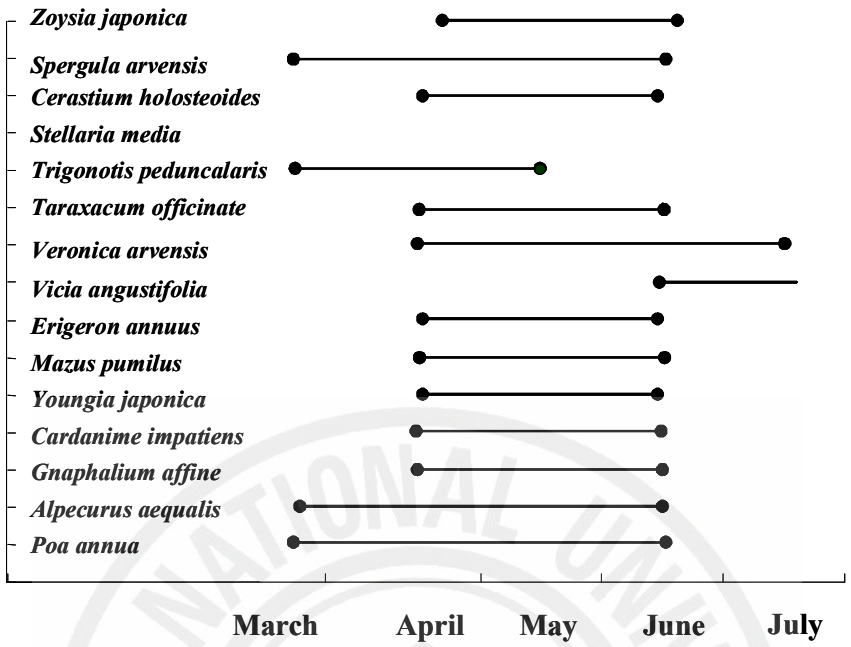


Figure 39. Flowering times of the Zoysia grass and weeds grown on the GM Zoysia grass field.

3) 잡초와의 교배가능성 조사

망실포장 시설 내에서 발생한 잡초는 1년 이상 비선택성 제초제저항성 들잔디와 함께 생육되었다. 교배에 의한 비선택성 제초제저항성 잡초의 출현을 검정하기위해 제초제살포시험과 분자생물학적 방법을 시행하였다. 제초제 살포시험은 망실포장 내부와 포장으로부터 반경 3 m까지 살포하였고, 교배에 의한 비선택성 제초제저항성 잡초의 발생을 조사하였다. 분자생물학적 검정을 위해 개화시기가 유사한 잡초종의 꽃을 채취하였고, 꽃의 Genomic DNA를 추출하여 *bar* primer를 이용한 PCR 분석을 수행 하였다.

4) 띠 (Cogon grass)와의 교배가능성 조사

띠와의 교배 가능성을 조사하기위해 제주대학교 망실포장의 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역 (2 × 3 m^2)에 제주도 자생 띠를 3개의 블록에 3반복하여 총 9개의 화분 (반경 20 cm)을 배치하였다 (Figure 40). 또한 격리포장에서는 50 cm 간격의 임의배치법 구역에 10개의 띠를 3반복하여 이식하여 배치하였다. 성숙된 종자는 수집하여 발아시켰고, 제초제 살포시험과 PCR 분석에 의해 비선택성 제초제저항성 들잔디와 교배 가능성을 조사하였다. 또한 격리포장으로부터 반경 2 km 이내의 자연서식지에 존재하는 띠에 대해서 제초제 살포시험을 통해 교배가능성을 검정 하였다 (Figure 41).

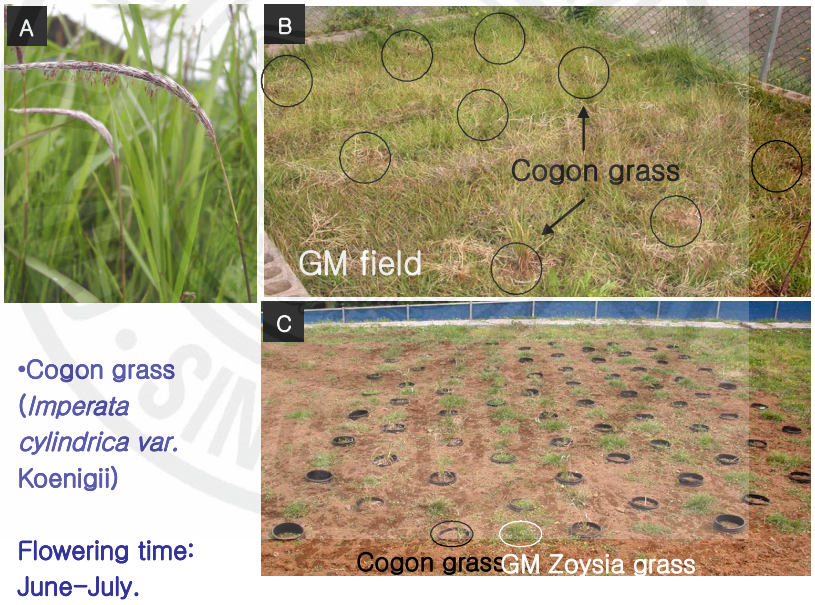


Figure 40. Test of outcrossing with Cogon grass at the GM Zoysia grass confined and unconfined fields. A: The flowering time of Cogon grass, B-C: gene flow test at the fields.

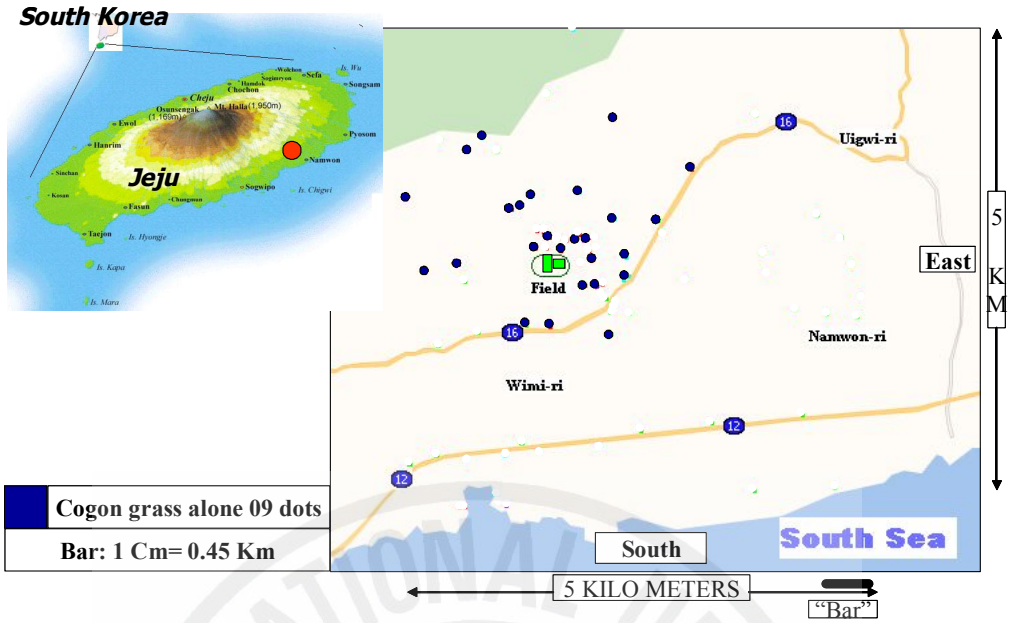


Figure 41. Test of the potential gene flow from GM grass to Cogon grasses within 2-km radius during two-year period from 2003 to 2005.

5) 제초제 살포시험 및 분자생물학적 검정방법

본 시험에서 비선택성 제초제저항성 잡초의 출현을 조사하기 위한 제초제 살포시험은 비선택성 제초제인 바스타 (Bayer CropScinece, Korea)를 규정농도 내에서 순수 glufosinate 농도가 0.1% (w/v)로 되도록 희석하여 살포하였다.

수집된 잡초 종자는 4℃에서 7일간 저온 처리하여 70% ethanol에 1분간 침지시키고, 30% KOH에 10분간 교반시켜 증류수로 5번 세척하였다. 종자는 600-700nm의 적색광에 30분간 처리하고, 반경 9 cm의 petri dish에 침지시켜 광조건 하에서 수분흡수를 위해 10시간 동안 방치하였다. 발아를 위한 배양조건은 16시간 광주기, 배양온도는 23±3℃ 이었고, 발아된 유식물체는 glufosinate 0.1% 용액에서 비선택성 제초제저항성 시험을 하였다.

분자생물학적 방법에 의한 비선택성 제초제저항성 잡초의 검정은 PCR 분석법을 이용하였고, *bar* 유전자의 검출 여부를 확인하였다. PCR 분석에 사용한

primer는 5’-GGT CTG CAC CAT CGT CAA CC-3'와 5’-ATC TCG GTG ACG GGC AGG A-3'을 사용 하였고, 모든 잡초에서 발현되는 S8 Actin primer는 5'-ATG ATA ACT CGA CGG ATC GC-3'와 5’-CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA-3'을 사용 하였다. PCR 증폭을 위한 반응액은 100ng DNA에 1 pmol의 primer와 Ex Taq^{TM} polymerase (Takara Co., Korea)가 포함된 Perfect premix® (Takara Co., Korea)를 희석하여 사용하였고, PCR 조건은 denaturation 온도 94℃에서 30초, annealing 온도 61℃에서 30초, elongation 온도 72℃에서 45초로 설정하여 35 cycle 하였다. PCR 산물은 0.8% 아가로스 (Sigma, U.S.A.) 겔에 전기영동 하였고, 마커는 Takara에서 제공된 DNA 1 kb ladder 마커를 사용하였다.

6) 자연환경에서 잡초와의 경쟁성 조사

잡초로 인한 잔디의 생육에 미치는 영향을 조사하기위해 야생형 잔디와 비선택성 제초제저항성 들잔디 묘 (반경 25 cm)를 시험포장에 식재하고, 일정기간 동안 잡초가 자라도록 방치하여 들잔디의 생육 특성을 관찰하였다. 또한 자연생태계에서 잡초와 경쟁상태를 조사하기위해 들잔디가 관리되고 있는 구역과 방치되어있는 구역을 관찰하였다.

4. 결과 및 고찰

1) 개화기간 조사

들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 개화시기를 관찰한 결과, 4월 말에 화서가 추대되었고, 6월 말에 화분이 소멸하여 종자형성이 관찰되었다. 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장에서 유사한 개화시기를 갖는 잡초는 국화과 4종으로 개망초 (*Erigeron annuus*), 민들레 (*Taraxacum officinate*), 뽀리뱅이 (*Youngia japonica*), 떡쑥 (*Gnaphalium affine*)이 관찰되었고, 벼과 2종으로 독새풀 (*Alopecurus aequalis*), 포아 (*Poa annua*)이 관찰되었다. 콩과식물로는 1종으로 살갈퀴 (*Vicia Angustifolia*)가 있었으며, 석죽과 3종으로 들개미자리 (*Spergula arvensis*), 점나도나물 (*Cerastium holosteoides*), 별꽃 (*Stellaria media*)이 관찰되었다. 또한 지치과 1종으로 꽃마리 (*Trigonotis peduncalaris*)가 있었고, 현삼과 2종 으로 선개불알풀 (*Veronica arvensis*), 주름잎 (*Maxus pumilus*)이 있으며, 배추과 1종으로 논냉이 (*Cardanime impatiens*)가 관찰되었다 (Figure 42). 본 실험에서 조사한 우점잡초는, 별꽃과 점나도나물, 들개미자리가, 떡쑥 등이 밀도가 가장 높게 관찰되어 Ko 등 (1999)이 조사한 결과와 유사하게 나타났다. 제주도의 농경지의 우점잡초에 대한 보고에서 광엽 잡초가 81%, 화본과 16%, 사초과 2%로가 우점하고 있는 것으로 나타났고, 봄철 우점 잡초는 광엽잡초가 대부분으로 나타났다 (Ko et al., 1999).

Figure 42. The 14 cohabitant weed plants in the GM grass test plot facility.

2) 비선택성 제초제저항성 들잔디와 잡초 간의 교배가능성 검정

비선택성 제초제저항성 들잔디와 잡초간의 교잡가능성을 조사한 결과 격리포장시설 내에서 비선택성 제초제저항성 잡초는 발견되지 않았고, 시설 외의 반경 5 m 거리에서도 저항성개체는 관찰되지 않았다. 개화시기가 유사한 잡초 14 종 중에서 13종은 들잔디와 유사한 시기에 꽃이 형성되었고, 개망초의 경우 들잔디보다 개화시기가 늦게 관찰되었다. 개화시기가 유사한 12종의 잡초에 대해서 DNA를 추출하여 PCR분석한 결과 *bar* 유전자의 특이적 밴드는 검출되지 않았다 (Figure 43). 제초제 살포시험 결과 단자엽 식물 중인 포아풀과 둑새풀에서 비선택성 제초제저항성을 나타내지 않았고, 동일 개화시기의 쌍자엽 식물에서도 비선택성 제초제저항성 개체는 없었다. 본 실험을 통해 비선택성 제초제저항성 들잔디가 화분비산을 통해 포장내의 잡초로 유전자가 이동하였다는 증거가 없으며, 잡초와의 교배가능성이 없는 것으로 판단된다.

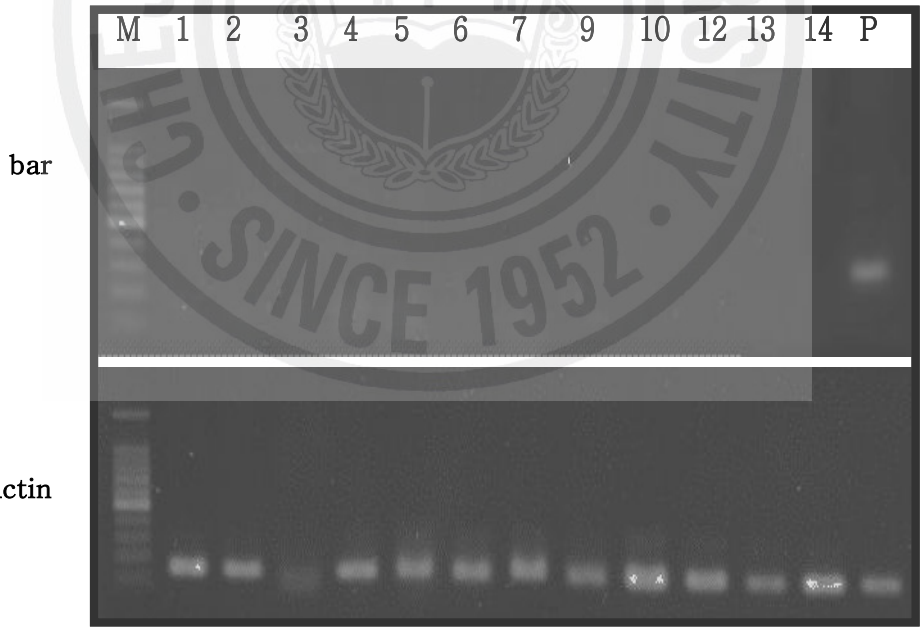


Figure 43. PCR analysis for gene flow test of weed plants by bar primer and S8-Actin primer. M: marker, lane (1~14): weed plants, P: positive control.

3) 제주 자생 띠에 대한 유전자이동 가능성 검정

망실포장과 격리포장에서 띠 (Cogon grass)와의 교잡가능성을 조사한 결과 비선택성 제초제저항성 들잔디와 교잡에 의한 제초제저항성 개체는 관찰되지 않았다. 띠는 들잔디 보다 개화시기가 20-30일 정도 늦어서 교잡 가능성이 매우 낮았고, 수집된 종자를 발아시켜 제초제 살포시험을 한 결과 제초제 저항성 개체는 관찰되지 않았다 (Table 17). 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장 (약 900 m^2)을 중심으로 반경 2 km 내의 25개 구역에서 제초제 살포시험을 한 결과 제초제 저항성 개체는 발견되지 않았고, 비선택성 제초제저항성 들잔디에서 띠로의 유전자가 이동 할 수 있다는 결정적 증거는 없다.

띠는 제주지역에서 억새 이외에 묘지나 목초지, 과수원 등에 흔히 발생하는 잡초로서 다른 잡초 보다 번식력 및 우점도가 높아 문제가 되고 있다. 따라서 비선택성 제초제저항성 들잔디의 사용은 묘지나 공원 등에서 띠의 번식을 억제할 수 있는 이점이 있으나, 제초제저항성 띠의 출현은 슈퍼잡초의 문제로 지적될 수 있어서 띠로의 유전자 이동성 검정은 지역적 특성에 기인하여 포장 내외부로 시행하였다. 그러나 띠와의 교잡가능성은 개화시기의 차이로 인해 매우 희박하였고, 비선택성 제초제저항성 띠의 출현이 관찰되지 않아 두 식물체 간의 교잡가능성은 없을 것으로 생각되며, 비선택성 제초제저항성 들잔디의 이용은 매우 유용할 것으로 기대된다.

Table 17. The result of gene flow test from GM zoysia grass to Cogon grass.

Cogon grass	Block 1[a]	Block 2	Block 3	Block 4
No. of Seeding	192	340	307	335
No. of resistant plants	0	0	0	0

[a]Block 1 was examined at confined filed, block 2-4 were examined at unconfined field.

4) 자연환경에서 들잔디의 생육 및 경쟁성

자연환경에서 잡초와 함께 생육된 들잔디의 증식량을 조사한 결과 초기 이식량에 비해서 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디는 각각 0.3배 증식되었다 (Figure 44). 일반적으로 관리되는 잔디의 증식량이 6개월에 3배, 16개월에 13배가 증식되는 것에 비하면 잔디의 생육이 억제되었다고 할 수 있다. 그 이유는 잔디의 생육초기에는 봄철 잡초 (들개미자리, 별꽃, 점도나물, 냉이, 개망초 등)가 왕성하게 자라서 새로운 포복경의 증식을 억제하였고, 들잔디의 왕성한 생육시기에는 여름철 잡초 (바랭이, 금강아지, 쇠비름, 방동사니 등)가 잔디의 표면을 덮어 생육을 저해한 것으로 판단된다. 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디는 잡초에 의해서 생육이 억제 되었고, 두 들잔디는 생육에 있어서 차이가 없었다.

자연환경에서 생육된 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 형태적 특성을 조사한 결과 초고는 평균 24 cm이었고, 엽신의 길이는 평균 8 cm이었다. 들잔디의 엽폭은 평균 0.45 cm 이었고, 엽각은 28-35범위로서 일반 들잔디보다 작게 나타났다. 이러한 이유는 잡초에 의해서 햇빛을 차단되어 음지회피성이 나타나기 때문이다. 음지회피성은 잔디의 초장이 현저하게 증가되고, 엽폭이 짧아지며, 직립경, 포복경 및 뿌리의 생장이 감소하여 들잔디의 생육을 현저하게 억제 시킨다 (Yu and Yeam, 1970; Nam et al., 1993). 이러한 이유로 자연환경에서 비선택성 제초제저항성 들잔디는 우점잡초에 의해서 생육이 억제되고, 예초 및 관리가 되지 않으면 병해에 의해서 소멸되기 때문에 자연환경에 위해하지 않을 것으로 생각 된다.

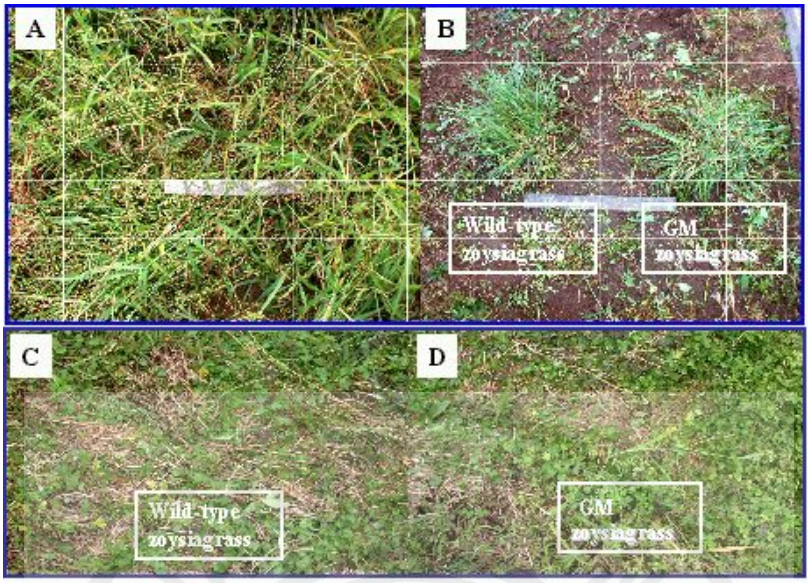


Figure 44. Comparison of growth characteristic between WT and GM Zoysia grasses under natural condition. A: The grasses were grown with weeds, B: After removing the weeds, C and D: The grasses were decreased by dominated weeds and diseases after 3 years.

5) 잔디의 잡초화가능성 검정

잔디는 초기에 주기적으로 관리되지 않으면 잡초와의 경쟁에서 우점도가 낮기 때문에 생육이 억제되고, 한번 잡초가 발생하면 그곳에 계속해서 잡초가 발생하게 된다 (Figure 45). 들잔디는 잡초의 특성을 나타내지 않고, 계절에 따라 발생하는 잡초에 의해서 생육이 억제되는 것이 확인되었다. 봄철에는 봄철잡초인 들개미자리, 벼룩나물, 별꽃, 쇠비름이 번성하여 잔디의 새로운 증식을 억제하고, 여름철에는 바랭이, 강아지풀등에 의해서 일조량이 부족하여 생육이 억제되거나 병해를 입어 고사한다. 겨울이 되면 잔디는 휴면상태에 이르고, 겨울철 잡초인 포아풀 등에 의해서 영역이 점차로 감소하여 잔디를 심고 적절한 관리 없이

방치하면 잔디는 2-3년 내에 완전히 소멸하여 잡초 밭이 되어버린다 (Lee, 1988). 이러한 형상은 도로주변이나 묘지 등에서 쉽게 볼 수 있듯이 잔디밭에서 잡초발생 상황은 잔디조성 당시 일년생 잡초가 발생하는 것이 관찰되었다. 초장이 짧은 다년생 잡초에서 대형 다년생 잡초로 초종이 변하고, 이 사이에 성장과 도태가 행해져서 잔디는 식재 초기단계에서 생육이 억제된다 (戶刈, 1960; Oh et al., 2000). 잔디밭에서 발생한 잡초를 분석한 결과 잡초발생 시기는 4-5월과 9-10월에 각각 39% 이며, 들잔디와 유사한 개화시기의 잡초는 5-6월달로 30% 이었다 (Kim et al., 1989).

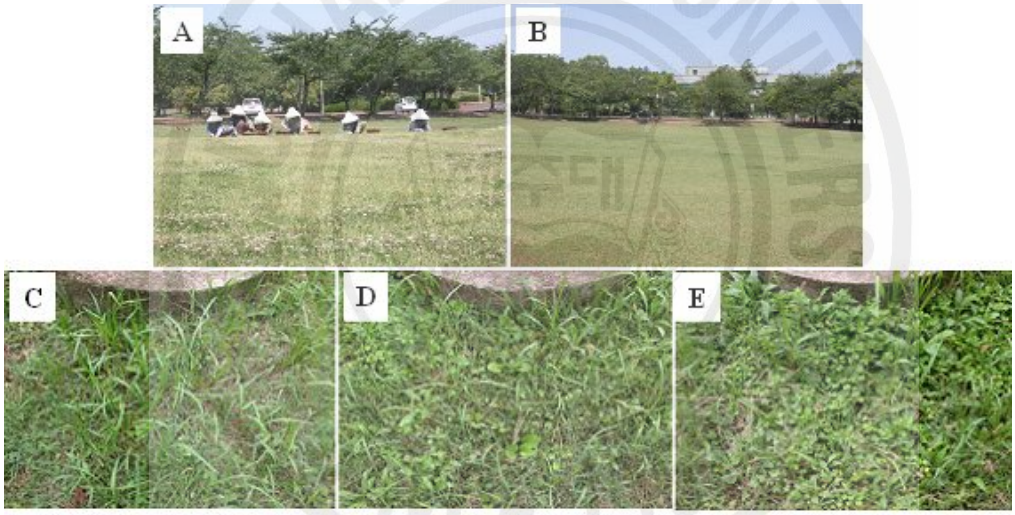


Figure 45. Zoysia japonica plants are overcome by dominant weed plants under natural ecological conditions. A: Clover and other weeds in the *Zoysia* grown lawn. B: the *Zoysia* lawn after weeds are removed. The Zoysia lawn after removing weeds. C: Weeds begining to overtake the *Zoysia* grass, D: The grass lawn without weed control after 1 year (C) and 2 years respectively (E).

들잔디의 잡초화 가능성은 종자의 유출에 따른 작물의 재배지로의 유입 및 화분비산을 통한 유전자의 이동성에 있다. 들잔디의 종자를 인공적으로 처리하지 않고 파종할 경우, 자연발아율은 실온조건에서 1% 미만이고 (Yeam et al., 1985), 노지에서 4% 미만으로 나타냈다. 따라서 비선택성 제초제저항성 들잔디의 종자가 작물의 재배지 및 자연생태계에 떨어졌을 경우 자연발아율은 낮다. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 비의도적 방출에 따른 제거 방법은 2,4-D 혹은 근사미, 그라목손으로 쉽게 제거할 수 있어 불필요 증식을 억제할 수 있다. 들잔디의 화분을 통한 *Zoysia* 속의 종간 교배친화성 (Hong and Yeam, 1985)이 보고되었지만 잡초와의 교잡가능성은 관찰되지 않아 비선택성 제초제저항성 잡초의 발생 가능성은 없는 것으로 생각된다.

결론적으로 비선택성 제초제저항성 들잔디는 잡초와 교잡가능성이 없고, 잡초로서의 특성이 없어서 잡초에 비해 비우점성을 갖는다. 또한 비의도적 방출이 되더라도 자연발아율이 낮아서 제초저저항성 들잔디의 출현 가능성이 매우 낮고, 잡초에 의한 생육억제로 자연환경에 위해성이 없으며, 타 제초제에 의해서 쉽게 제거 될 수 있는 작물이다 .

5. 적 요

본 연구에서는 비선택성 제초제저항성 들잔디에서 잡초로의 유전자이동 가능성을 조사하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장에서 2003부터 2005년까지 발생한 잡초 중에서 들잔디와 개화시기가 유사한 잡초는 14종 이었다. 제초제 살포시험과 PCR 검정 방법을 통해서 확인한 결과, 비선택성 제초제저항성 잡초의 출현은 관찰되지 않았고, 잡초와의 교잡 가능성은 없는 것으로 생각된다.

비선택성 제초제저항성 들잔디 포장 (936-m^2)으로부터 반경 2 km 이내의 자연환경에서 근연종인 띠와의 교잡가능성을 25개 구역에서 검정한 결과, 비선택성 제초제저항성 개체는 관찰되지 않아 교잡 가능성이 없는 것으로 생각된다. 비선택성 제초제저항성 들잔디 종자는 100립 당 약 58 mg으로 바람에 의해서 유실될 가능성이 낮다. 뿐만 아니라 비선택성 제초제저항성 들잔디는 노지에서 자연 발아율이 약 1-4%로서 비의도적 방출에 의해서 자연 발생할 확률은 매우 낮다. 또한 3년간 들잔디를 자연환경에 방치하여 생육특성을 관찰한 결과, 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 생육은 거의 없었고, 잡초에 비해서 비우점성 작물로서 잡초와 병해에 의해서 들잔디의 영역이 서서히 감소하였다. 따라서 비선택성 제초제저항성 들잔디는 야생형 들잔디와 같이 자연환경에서 비우점성 이고, 잡초로의 특성이 없기 때문에 주기적으로 관리되지 않을 경우는 다른 우점잡초와의 경쟁에 의해서 소멸되어 환경에 위해성이 없을 것으로 생각된다.

6. 인용 문헌

Brown MJ, Hail WS, Kohn RS and Ree M. 2001. Transgenic crops in natural habitats. Crawley Nature 209: 682-683.

Culpepper AS (2006) Glyphosate-induced wwd shifts. Weed Technology 20: 277-281.

Daniels R, Boffey C, Mogg R, Bond J, Clarke R (2005) The potential for dispersal of herbicide tolerance genes from genetically-modified, herbicide-tolerant oilseed rape crops to wild relatives. Contract reference EPG 1/5/151. Final report to DEFRA. CEH Dorset, Dorchester.

Kim CG (2006) GMO를 둘러싼 환경위해성 논란. Biosafety 7: 24-39.

Kim KH (2005) 수퍼잡초-Canola. GMO논란 사례 연구. 상록사, Korea. pp 16-27.

Kim KW, Shin DH, Kwon TS, Park SJ, Lee SJ (1989) 제주도 농경지 및 그 주변에 발생하는 잡초종. J. Kor. Weed Science 9: 201-213.

Ko YW, Che JC, Pyen JY (1999) 제주도의 농경지별 우점잡초. J. Kor. Weed Science 19: 149-155.

Korea Forest Service (국가생물종지식정보시스템 http://www.nature.go.kr/)

Ku JH, Yun BH (1999) 발아불량 환경조건에서의 GA_3 침지처리에 의한 들잔디의 종자발아촉진. Kor. Turfgrass Sci 13: 21-28.

Lee MS (1988) 잔디 밭 잡초의 분류학적 특성에 관한 연구. Kor. Turfgrass Sci 2: 59-64.

Lee YN, Lee KS, Shin YM (2001) 제주자생식물도감 (Ed.). 제주관광식물원

여미지, 제주도 서귀포시.

Moon YH, Kim YH, Kim YS, Yang HC (1996) 잔디밭의 효과적인 잡초 방제와 토양 환경 조사. Kor. Turfgrass Sci 10: 177-186.

Nakata Y, Yamaguchi H (2002) Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max ssp. soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max ssp. max*) in a designed population. Weed Biology and Management 2: 25-30.

Nandula VK, Reddy KN, Duke SO, Poston DH (2005) Glyphosate-resistant weeds: Current status and future outlook. Outlooks on Pest Management 16: 183-187.

Richman JR, Watrud LS, Lee EH, Burdick CA, Bollman MA, Storm MJ, King GA and Malllory-Smith C (2006) Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in onoagronomic habitats. Molecular Ecology (in press).

Rieger MA, Lamond M, Preston C, Powles SB, Roush RT (2002) Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. Science 296: 2386-2388.

戶刈義次 (1960) 雜草防除의 新技術, 日本富民協會, pp 13-18.

Yeam DY, Hong KH (1985) 한국잔디 종자의 발아를 위한 최적 종피약화처리와 광처리. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 26: 179-185.

Ⅵ. 비선택성 제초제저항성 들잔디와 비 표적생물체 간의 수평적 유전자이동 (Horizontal Gene Transfer) 가능성 검정

1. Abstract

The release of GMOs into the environment has the potential risks regarding the possibility of gene transfer from GMOs to natural organisms and this needs to be evaluated. This study was conducted to monitor the possible horizontal gene transfer from herbicide-resistant Zoysia grass (*Zoysia japonica* Steud.) to indigenous microorganisms. We have first examined the effect of field-released GM Zoysia grass on the microbial flora in the gut of locust (*Locusta migratoria*). The microbial flora was analyzed through determining the 16S rDNA sequences of microorganisms. The comparison of the microbial flora in the gut of locusts that were captured at the field of GM Zoysia grass and of WT revealed that there is no noticeable difference between these two groups. This result indicates that the GM Zoysia grass does not have negative impact on microbial flora in the gut of locust, We then investigated whether the horizontal gene transfer occurred from GM Zoysia grass to microbes in soil, rhizosphere and faecal pellets from locusts by utilizing molecular tools such as Southern hybridization and polymerase chain reaction (PCR). When the total DNAs isolated from microbes in GM and in WT Zoysia grass fields were hybridized with *bar* or *hpt* transgene, no hybridization signal was detected from both field isolates, while the genes were hybridized in the positive control. Absence of these genes in the DNAs of soil microorganisms as well as microbes in the gut of locust was further confirmed by PCR. Taken together, our data showed that horizontal gene transfer did not occur in this system. These results further indicate that frequencies of transfer of engineered plant DNA to bacteria are likely to be negligible.

2. 서 론

농업 생산성을 효율적으로 증가시키기 위한 방법의 일환으로 유전자변형 (Genetically modified , GM)작물의 개발이 최근 10여 년간 급속히 증가되어왔고, 일부 품종 (콩, 옥수수, 유채, 면화 등)은 상품화 되어서 자국 및 외국에서 판매되고 있다. GM 식물을 상품화하기 위해서는 자연환경에 방출하여 재배하는 것이 필수 조건이다. 그러나 GM 식물을 환경에 방출하는 과정에서 많은 사람들이 갖고 있는 가장 큰 우려 중의 하나는 GM 식물의 제조에 사용된 선택표지유전자 (selection marker), 예를 들어 항생제 내성유전자와 같이 잠재적으로 유해한 유전자가 오랜 기간을 걸쳐 비표적 생물로 전이되어 자연생태계를 위협할 가능성이다 (de Vries and Wackernagel, 2004; Nap et al., 1992). 비록 명확한 증거는 없지만 GM식물은 독성을 나타내거나 알레르기성 질환을 일으킬 가능성 때문에 인류의 건강을 위협할 수도 있다. 그러나 이러한 부정적인 우려에도 불구하고, GM 식물의 개발과 재배되는 품종의 수는 계속 늘고 있다. 따라서 GM 식물을 환경에 방출하기 전에 환경에 어떠한 영향을 미치는지 면밀히 분석하고 평가할 필요가 있다.

생명공학기술을 이용한 GM 식물은 자연계에 현존하는 미생물의 유전자를 이용하거나 다른 식물체의 유전자를 이용하고 있다. 본 연구에서 사용된 비선택성 제초제저항성 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)에도 토양미생물인 *Streptomyces hygroscopicus*로부터 유래된 bialaphos 내성유전자인 *basta resistance* (*bar*) 유전자 (Thompson et al., 1987)와 hygromycin 내성유전자인 *hygromycin phosphotransferase (hpt*) 유전자 (Zalacain 1986)가 포함되어 있다 (Toyama et al., 2003). 토양에는 GM 식물을 포함한 다양한 식물로부터 방출된 DNA가 지속적으로 남아있다 (Widmer et al., 1996; Gebhard and Smalla, 1999; Lorenz and Wackernagel, 1994). 토양에서 자연형질전환 (natural transformation)이 일어날 수 있다는 것은 이미 알려진 사실이다 (Nielsen et al., 1997; Lorenz and Wackernagel, 1994). 만일 토양미생물이 토양에 방출된 GM 식물의 DNA와 가까이 접촉된다면 형질전환에 의한 유전자전달 (gene transfer)이 일어날 가능성이 있다 (Williamson, 1992; Bertolla and Simonet, 1999). 그러나 자연환경에서 형질전환을 통한

유전자전달은 생물학적, 물리적 장벽에 의해 강하게 제약을 받는 것으로 보고된바 있다 (Smith et al., 1981; Bertolla and Simonet, 1999). 따라서 GM 식물로부터 토양미생물로의 자연형질전환을 통한 유전자전달은 만일 일어나더라도 탐지범위 아래의 극히 낮은 빈도로 일어날 것이라는 것이 일반적인 견해이다 (Hoffmann et al., 1994; Schlüter et al., 1995). 그러나 예상하지 못한 유전자전달이 일어날 가능성은 배제될 수 없다.

지금까지 대부분의 수평유전자전달 (Horizontal Gene Transfer, HGT)에 대한 연구는 실험실내에서 이루어져왔기 때문에 그 결과에 대한 논란이 많았던 것이 사실이다. 보다 정확한 연구를 위해서는 자연환경에 가까운 조건을 갖춘 포장(field)에서의 실험을 통해 GM 식물로부터 비표적생물로 HGT가 일어났는지를 조사하는 것이 바람직하다. 따라서 본 연구에서는 유전자변형 비선택성 제초제저항성 들잔디의 환경영향평가를 위한 기초기술을 확립하기 위한 방안의 일환으로 비선택성 제초제저항성 들잔디가 비표적생물체인 풀무치의 장내 미생물상에 미치는 영향과 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 근권 세균을 포함한 토양미생물 및 풀무치의 장내 미생물로의 유전자전달 여부를 분자생물학적 방법을 이용해 조사하였다.

3. 재료 및 방법

1) 실험재료

본 실험에 사용된 야생형 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)와 비선택성 제초제저항성 들잔디 (*bar* 유전자 도입)는 제주도 남제주군 위미리 소재 GMO 격리포장에서 3년 동안 재배 중인 시료로부터 채취하였다. 먼저 비표적 생물체의 장내 세균을 동정하기 위해 상기의 포장에서 가장 많이 관찰되는 메뚜기목 메뚜기과인 풀무치 (*Locusta migratoria*)를 격리된 비선택성 제초제저항성 들잔디와 대조구인 야생형 들잔디 포장에서 각각 채집하였다. 또한 풀무치의 장내 미생물은 풀무치의 배설물 (faecal pellet)로부터 분리하였다. 토양미생물과 근권미생물을 분리하기위해 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장과 야생형 들잔디 포장에서 들잔디의 뿌리를 각각 5개의 구역에서 3 × 3cm^2 면적으로 토양과 함께 채취하였다.

중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)에 사용된 oligonucleotide primer는 Bioneer (Cheongwon, Korea)에서 주문 제작하였고, primer의 염기서열은 Table 17에 나타내었다. 제한효소, Taq polymerase, T4 DNA ligase와 pGEM-T Easy vector는 Promega (Madison, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였고, 기타 시약은 Sigma 사(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다.

2) DNA의 추출

풀무치의 장내 세균 DNA를 추출하기 위해 격리된 비선택성 제초제저항성 잔디구역과 대조구인 야생형 잔디구역에서 각각 채집된 풀무치에서 분리한 장을 액체질소를 사용하여 곱게 마쇄하였다. 풀무치 장내 세균의 total genomic DNA는 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 방법 (Jones and Walker, 1963)으로 추출하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 유전자가 토양, 근권, 메뚜기의 장내 미생물에 전이가 되었는지를 검정하기 위해 각각 DNA를 추출하였다.

추출방법은 비선택성 제초제저항성 잔디구역과 야생형 잔디구역에서 토양과 잔디뿌리 주위의 근권토양 및 풀무치 배설물을 각각 1g씩 채취하여 멸균된 생리식염수 9 mL에 현탁시킨 후 각 현탁액 1 mL을 각각의 nutrient broth 100 mL에 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 원심분리로 세포를 회수한 후 G-Spin Genomic DNA Extraction Kit for Bacteria (iNtRON Biotechnology, Inc. Korea)를 사용하여 미생물로부터의 total chromosomal DNA를 추출하였다. Southern hybridization과 PCR 실험에 *bar*와 *hpt* 유전자의 positive control로 사용된 pGPTV-HB DNA (Lee et al., 1998)는 이 플라스미드를 가지고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101로부터 분리하였다.

3) 16S rDNA 염기서열 분석에 의한 풀무치 장내세균의 동정

풀무치의 장내 세균들을 동정하기 위해 풀무치의 장에서 추출된 DNA로부터 전체 16S rRNA 유전자를 박테리아에 특이적인 primer인 16S-F와 16S-R (Table 18)을 이용해 PCR로 증폭하여 클로닝하였다. PCR 반응은 94℃에서 5분간 DNA를 변성시킨 후, 94℃에서 25초, 54℃에서 25초, 72℃에서 45초의 단계를 35회 반복하여 실시하고 72℃에서 7분간 최종 증폭하였다. PCR로 증폭된 16S rRNA 유전자 단편들은 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다. 증폭된 PCR산물들은 GENEALL PCR Purification Kit (generalbiosystem, Korea)를 사용하여 정제한 후 pGEM-T Easy vector (Promega)에 삽입시켜 *E. coli* DH5α에 형질전환하였다. 클로닝된 16S rDNA의 염기서열은 dye terminator sequencing 방법으로 automatic sequencing 장비를 사용하여 결정하였다. 결정된 16S rRNA 유전자의 염기서열은 BLAST 프로그램 (Altschul et al., 1990)을 이용하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 database에 있는 알려진 염기서열들과 비교하여 종 (species) 수준의 분류를 시행하였다.

Table 18. Nucleotide sequences of the primers used in this study.

Name	Sequences (5'→3')	Characteristics
16S-F	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT	**forward primer for 16S rDNA fragment**
16S-R	AGGAGGTGATCCAACCGC	**reverse primer for 16S rDNA fragment**
Bar-F	CATCGAGACAAGCACGGTCAACTTC	**forward primer for *bar* gene fragment**
Bar-R	TCCGAGCGCCTCGTGCATGCG	**reverse primer for *bar* gene fragment**
Hpt-F	GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTC	**forward primer for *hpt* gene fragment**
Hpt-R	CTTCTACACAGCCATCGGTCCAGA	**reverse primer for *hpt* gene fragment**

4) PCR 분석

토양미생물, 근권미생물 및 풀무치 배설물에 존재하는 미생물로부터 추출된 DNA에 대한 *bar*와 *hpt* 유전자의 PCR 검정은 *bar* 유전자 및 *hpt* 유전자에 특이적으로 결합하는 primer (Table 17)를 이용하여 시행하였다. *bar* 유전자의 증폭을 위한 PCR 반응은 95℃에서 3분간 DNA를 변성시킨 후, 95℃에서 40초간, 65℃에서 35초간, 72℃에서 50초간의 단계를 30회 반복하여 실시하고 72℃에서 5분간 최종 증폭하였다. *hpt* 유전자의 증폭을 위해서는 95℃에서 3분간 DNA를 변성시킨 후, 94℃에서 1분간, 59℃에서 1분간, 72℃에서 1분간의 단계를 30회 반복하여 실시하고 72℃에서 5분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR산물은 1.3% agarose gel로 전기영동 하여 확인하였다.

5) Southern hybridization

Southern blot 방법 (Southern, 1975)을 이용해 유전자전달 여부를 검정하기 위해서 비선택성 제초제저항성 잔디구역과 야생형 잔디구역의 토양, 근권토양 및 풀무치 배설물에서 분리된 미생물의 전체 DNA를 제한효소인 *Hin*dⅢ로 절단하여 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후 capillary transfer방법 (Sambrook et al., 1989)으로 nylon membrane (Hybond-N, Amersham, England)으로 옮겼다. 탐침(probe)으로는 pGPTV-HB DNA로부터 PCR로 증폭된 *bar*와 *hpt* 유전자 조각을 각각 사용하였다. 탐침의 표지 및 탐색은 비동위원소인 digoxigenin (DIG)를 이용한 DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 protocol에 따라 수행하였다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

4. 결과 및 고찰

1) 풀무치 장내 세균상의 동정

미생물의 동정은 16S rRNA 유전자 분석에 크게 의존하고 있다. 세균의 경우 수많은 균주에 대해서 16S rRNA 유전자의 염기서열이 분석되어 데이터화 되어있기 때문에 이를 비교하면 종 (species) 수준의 동정이 가능하다. 현재 16S rDNA의 지문영역의 염기서열의 유사도가 97% 이상일 때 동종으로 간주하고 있다. 본 연구에 사용된 시료를 채취한 GM 포장은 비선택성 제초제저항성 들잔디와 대조군으로 야생형 들잔디를 식재한 후 격리된 상태로 3년이 지난 곳이다. 채집된 풀무치 또한 포장 내에서 격리된 상태로 잔디를 먹이로 자연 증식된 곤충이다. 풀무치는 자라는 환경, 특히 먹이식물의 엽면 생물상 (phylloplane biota)에서 흔히 접하는 종들로 구성된 다양한 장내 미생물상을 가지고 있다 (Hunt and Charnley, 1981). 비선택성 제초제저항성 들잔디가 풀무치의 장내 미생물상에 어떤 변화를 가져왔는지를 조사하기 위해 비선택성 제초제저항성 들잔디와 야생형 들잔디에서 채집한 풀무치의 장내 세균들의 16S rDNA 염기서열을 분석하여 이들의 장내 세균들을 동정하여 비교하였다 (Table 19). 야생형 구역에서 자란 풀무치에서 확인된 장내 세균은 총 22종으로 그 중에서 4종이 야생형에서만 발견된 종이고 나머지 18종은 비선택성 제초제저항성 들잔디구역에서 채집된 풀무치에서 발견된 세균들과 동일하거나 유사하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디구역에서 자란 풀무치의 장에서는 총 24종의 세균이 발견되었고, 이들 중에서 6종이 비선택성 제초제저항성 들잔디 구역의 풀무치에서만 발견되었으며, 18종은 야생형 들잔디 구역에서와 동일하였다. 이것은 개체간의 습성과 환경에 따라 발생할 수 있는 차이로서 비선택성 제초제저항성 들잔디로 인해 특이한 세균은 발생되지 않았으며, 두 포장의 풀무치 장내 세균상에는 큰 차이가 없는 것으로 생각된다. 따라서 비선택성 제초제저항성 들잔디가 풀무치의 장내 세균상 변화에는 별다른 영향을 미치지 않은 것으로 보인다.

Table 19. Bacterial species found in the gut of locust captured in the field of GM and WT Zoysia grasses*

GM Zoysia grass	WT Zoysia grass
Acetanaerobacterium elongatum	***Acinetobacter sp.***
Actinomyces sp.	*Bacillus sp.*
Bacillus sp.	*Burkholderia sp.*
Burkholderia sp.	*Erwinia sp.*
Erwinia sp.	*Escherichia albertii*
Escherichia albertii	*Enterobacter sp.*
Escherichia coli	*Enterobacter sakazakii*
Enterobacter sp.	*Enterococcus sp.*
Enterobacter sakazakii	*Lactococcus garvieae*
Enterococcus sp.	*Lactococcus lactis*
Lactobacillus sp.	***Methylomonas methanica***
Lactococcus garvieae	***Novosphingobium sp.***
Lactococcus lactis	*Photorhabdus luminescens*
Photorhabdus luminescens	*Pseudomonas fluorescens*
Pseudomonas fluorescens	*Rhizobium sp.*
Rhizobium sp.	***Salmonella bovis***
Salmonella enterica	*Salmonella enterica*
Serratia marcescens	*Serratia marcescens*
Shigella boydii	*Shigella boydii*
Stenotrophomonas maltophilia	*Thiomicrospira crunogena*
Thiomicrospira crunogena	*Wolbachia pipientis*
Wolbachia pipientis	*Xenorhabdus sp.*
Xanthomoas sp.	
Xenorhabdus sp.	

* Species in bold represent the species found only in each group. The **Bold** words are different bacteria.

2) Southern hybridization에 의한 유전자전달의 검정

서로 연관된 혹은 관련이 없는 비 표적생물로의 수평유전자전달 (HGT)에 대한 논란은 최근 활발히 연구되고 있는 분야 중 하나이다. HGT는 진화적인 측면에서뿐만 아니라 비의도적으로 환경 방출된 유전자변형 (GM) 식물의 환경영향평가를 위해서도 매우 중요하다. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 개발에 사용된 *bar* 유전자의 산물은 독성을 나타내지 않았고, 다른 비표적생물 및 생태계에 대한 부정적인 영향이 아직까지 보고되지 않았으나 Jorgensen과 Anderson (1994)은 비선택성 제초제저항성 유전자가 인근지역의 야생잡초로 자연전이 될 수 있는 가능성을 제시하였다. 형질전환식물을 만들기 위해 선택표지유전자로 사용된 *hpt* 유전자는 항생제인 hygromycin B에 저항성을 나타내는 유전자로서 만일 병원균으로의 수평유전자전달이 일어난다면 내성균의 확산을 일으킬 수도 있다. 본 연구에서는 *bar*와 *hpt* 유전자를 이용해 격리포장에서 HGT가 일어났는지를 알아보았다. 비표적생물체인 풀무치 및 토양미생물로의 유전자전달을 검정하기 위하여 비선택성 제초제저항성 들잔디구역과 야생형 잔디구역의 토양과 근권토양 및 풀무치 배설물로부터 분리된 미생물들의 total genomic DNA를 제한효소 *Hin*dⅢ로 절단한 뒤 전기영동하여 nylon membrane으로 옮겼다. DIG로 표지된 *bar* 유전자와 *hpt* 유전자를 각각 탐침으로 사용하여 Southern hybridization 실험을 진행한 결과 두 탐침 모두 positive control로 사용된 pGPTV-HB DNA에만 결합하였고 시료들로부터 추출된 다른 DNA에서는 결합된 band가 나타나지 않았다 (Figure 46). 이 결과로만 보면 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 토착미생물로의 HGT는 일어나지 않은 것으로 보인다. 다만 실험에 사용된 control DNA와는 달리 미생물들의 전체 DNA는 수많은 미생물들의 DNA가 섞여있는 것이므로 개별 미생물의 DNA 양은 상대적으로 아주 적을 것이다. 따라서 특정 미생물에 실제로 유전자전달이 일어났다고 하더라도 그 미생물의 수가 적으면 DNA의 양이 적어 탐지되지 않을 수도 있다. 이 문제를 해결하기 위해서는 미생물들을 개별 콜로니 형태로 분리배양하여 colony hybridization을 하는 것이 바람직하나 이 또한 배양되지 않는 미생물에는 적용할 수 없는 단점이 있다.

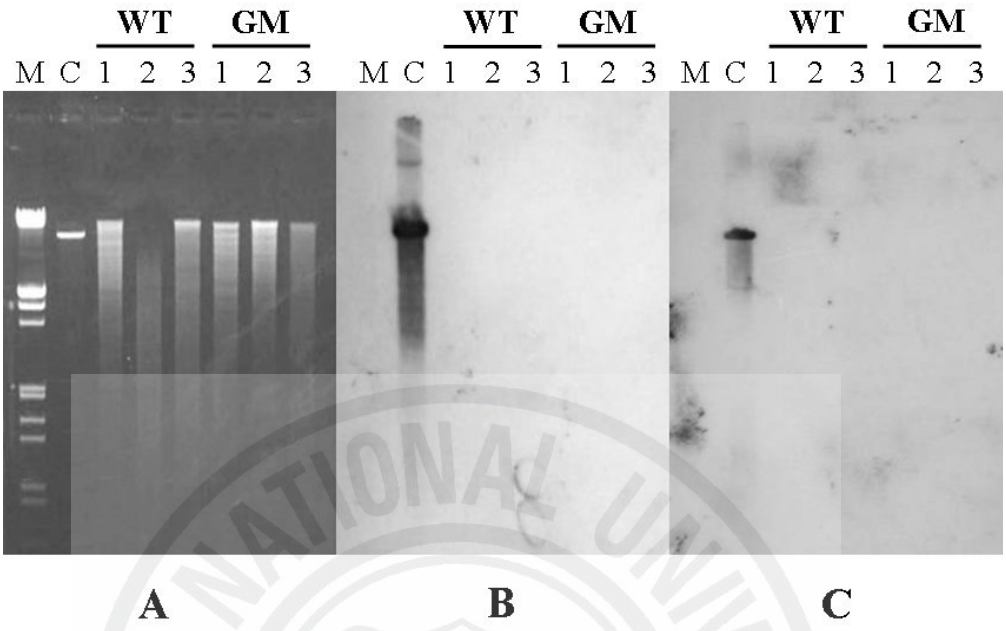


Figure 46. Southern hybridization analyses of microbial genomic DNAs digested with *Hin*dⅢ and probed with DIG-labeled *bar* and *hpt* gene fragments. A: Ethidium bromide-stained agarose gel. B: Southern blot hybridized with *bar* probe. C: Southern blot hybridized with *hpt* probe. WT: samples from wild-type field, GM: samples from GM field, lane M: size marker (λ DNA digested with *Hin*dⅢ+*Eco*RⅠ), lane C: positive control (pGPTV-HB DNA), lane 1: DNA from soil microbes, lane 2: DNA from rhizosphere microbes, lane 3: DNA from microbes in faecal pellets from locusts.

3) PCR에 의한 유전자전달의 검정

PCR은 특정 DNA 부위를 특이적으로 반복 합성하여 시험관내에서 원하는 DNA 분자를 증폭시키는 방법으로서, 아주 적은 양의 DNA로도 특정 유전자의 증폭이 가능하므로 유전자전달을 연구하는데 적합하다 (Gachet et al., 1999). 토착미생물로의 HGT를 보다 정밀하게 검정하기 위하여 비선택성 제초제저항성 들잔디구역과 야생형 들잔디구역의 토양, 근권토양 및 풀무치의 배설물로부터 분리된 미생물들의 genomic DNA를 주형으로 하여 *bar*와 *hpt* 유전자에 각각 특이적인 primer (Table 17)를 사용하여 PCR 증폭을 실시하였다. *bar* 유전자에 대한 PCR 결과 positive control로 사용된 pGPTV-HB DNA에서만 340 bp 크기의 DNA가 증폭되었고, 비선택성 제초제저항성과 야생형 잔디그룹에서 채집된 시료의 DNA들로부터는 증폭된 band가 나타나지 않았다 (Figure 47A). *hpt* 유전자에 대한 PCR 결과도 *bar* 유전자와 미찬가지로 positive control (pGPTV-HB DNA)에서만 850 bp 크기의 DNA band가 증폭되었다 (Figure 47B). 따라서 토양미생물, 근권미생물 및 풀무치의 장내 미생물들로부터 추출된 DNA에는 *bar*와 *hpt* 유전자가 존재하지 않는 것으로 나타났다.

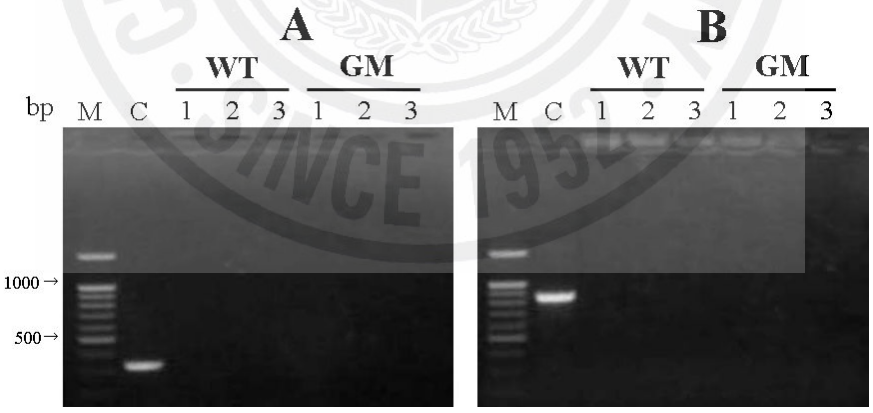


Figure 47. PCR analyses for detecting *bar* gene (A) and *hpt* gene (B) in microbes isolated from WT and GM field. Lane M: size marker (100 bp ladder), Lane C: positive control (pGPTV-HB DNA), lane 1: DNA from soil microbes, lane 2: DNA from rhizosphere microbes, lane 3: DNA from microbes in faecal pellets from locusts.

본 연구로부터 얻어진 결과를 토대로 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 토양미생물이나 비표적생물인 풀무치의 장내 세균으로의 HGT는 일어나지 않았음을 알 수 있었다. 만일 HGT가 일어났다고 하더라도 그 빈도는 PCR로도 탐지되지 않는 아주 낮은 수준일 것이다. 이러한 결과는 기존의 HGT에 대한 가능성 여부를 조사한 기존 논문들의 결과와 일치한다 (Hoffmann et al., 1994; Schlüter et al., 1995; Kim et al., 2004). 그러나 본 실험의 결과는 한정된 규모로부터 얻어진 분석결과이기 때문에 아직 속단하기는 어렵지만, 본 연구결과 자연조건하에서 GM 들잔디로부터 토착미생물로 HGT가 일어난다는 명확한 증거는 없다. 따라서 GM 들잔디가 환경에 위해하다는 증거는 관찰되지 않았으며, GM 작물로 인한 막연한 사회적인 불안감을 다소 해소할 수 있을 것으로 생각된다.

5. 적 요

GM 작물이 환경으로 방출될 경우 GM 작물로부터 자연 생물들로 유전자전달이 일어날 수 있는 잠재적 위험이 있기 때문에 이에 대한 환경위해성평가가 필요하다. 본 연구는 제초제 저항성 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)로부터 비표적미생물로의 수평유전자전달 가능성을 검토하기위해 수행되었다. 먼저 포장에 방출된 유전자변형 잔디가 풀무치 (*Locusta migratoria*)의 장내 미생물상에 미치는 영향을 관찰하였다. 미생물상은 미생물들의 16S rDNA 서열의 결정을 통해 분석되었다. 비선택성 제초제저항성 들잔디와 대조구인 야생형 들잔디 포장에서 채집된 풀무치의 장내 미생물상을 비교한 결과, 이들 두 집단사이에는 별다른 차이가 없었다. 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 토양 미생물, 근권 미생물 및 풀무치의 장내 미생물로 수평유전자전달이 일어났는지의 여부를 Southern hybridization과 PCR과 같은 분자생물학적 도구를 이용하여 조사하였다. 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장에 있는 미생물들로부터 분리된 전체 DNA를 형질전환유전자인 *bar*또는 *hpt*로 혼성화 했을 때 양쪽 포장에서 분리된 시료들에는 혼성화 신호가 탐지되지 않았다. 반면 이들 유전자들은 positive control에는 혼성화가 되었다. 토양미생물과 풀무치의 장내미생물의 DNA에 이들 유전자가 존재하지 않음은 PCR로 재차 확인되었다. 이러한 결과를 토대로 종합해 볼 때, 수평적 유전자전달은 일어나지 않았음을 알 수 있었다. 이들 결과는 또한 식물로 형질전환된 외래 DNA가 세균으로 전달되는 빈도는 무시할 정도라는 것을 나타낸다.

6. 인용문헌

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

Bertolla F and Simonet P (1999) Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. Res. Microbiol. 150: 375-384.

de Vries J and Wackernagel W (2004) Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. Plant and Soil 266: 91-104.

Gachet E, Martin GG, Vigneau F and Meyer G (1999) Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. Trends Food Sci. Technol. 9: 380-388.

Gebhard F and Smalla K (1999) Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. FEMS Microbiol. Ecol. 28: 261-272.

Hoffmann T, Golz C, Schieder O (1994) Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. Curr. Genet. 27: 70-76.

Hunt J and Charnley AK (1981) Abundance and distribution of the gut flora of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. J. Invert. Pathol. 38: 378-385.

Jones AS and Walker RT (1963) Isolation and analysis of the deoxyribonucleic acid of *Mycoplasma mycoides* var. capri. Nature 198: 588-589.

Jorgensen RB and Anderson B (1994) Spontaneous hybridization between oilseed rape

(*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (*Brassicaceae*): A risk of growing genetically modified oilseed rape. Amer. J. Botany 81: 7973.

Kin YT, Park BK, Hwang EI, Yim NH, Kim NR, Kang TH, Lee SH and Kim SU. 2004. Investigation of possible gene transfer to soil microorganisms for environmental risk assessment of genetically modified organisms. J. Microbiol. Biotechnol. 14: 498-502.

Lee HY, Lee CH, Kim HI, Han WD, Choi JE, KIm JH and Lim YP. 1998. Development of bialaphos-resistant transgenic rice using *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J. Plant Tissue Culture 25: 283-288.

Lorenz MG and Wackernagel W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol. Rev. 58: 563-602.

Nap JP, Bijvoet J and Stiekema WJ. 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. Transgenic Res. 1: 239-249.

Nielsen KM, van Weerelt M, Berg TN, Bones AM, Hagler AN and van Elsas JD. 1997. Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1945-1952.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schlüter K, Fütterer J and Potrykus I. 1995. "Horizontal' gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs-if at all-at an extremely low frequency. Bio/Technology 13: 1094-1098.

Smith HO, Danner DB and Deich RA. 1981. Genetic transformation. Annu. Rev. Biochem. 50: 41-68.

Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M and Bottermann J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO J. 6: 2519-2523.

Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS and Lee HY. 2003. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium* transformation. Mol. Cells 16: 19-27.

Widmer F, Seidler RJ and Watrud LS. 1996. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. Mol. Ecol. 5: 603-613.

Williamson M. 1992. Environmental risks from the release of genetically modified microorganisms (GMOs)-the need for molecular ecology. Mol. Ecol. 1: 3-8.

Zalacain M, Gonzales A, Guererro MC, Mattaliano RJ, Malpartida F and Jimenez A. 1986. Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. Nucleic Acids Res. 14: 1565-1581.

Ⅶ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 화분 알레르기 반응성 검토

1. Abstract

About 5% of the allergic respiratory patients show positive skin reaction to the extracts of Zoysia grass pollen (Kim et al., 1987). In this experiment, the allergic reactions were checked to verify whether pollen of the herbicide-resistant Zyosia grass has more serious reaction than that of the wild type (WT). Skin prick test was performed to 127 chronic allergic patients and healthy volunteers from Cheju National University Hospital from Oct. 2005 to Apr. 2006. Fifty five were male and seventy two were female with average age 38.1 ±17.6. For skin test, twenty allergens (4 mg/mL), pollen extracts of WT and GM grass, and histamine (1 mg/mL) as a positive control were used. Of the 127 subjects 87 individuals showed positive skin reactions to various kinds of allergic reagents. Of those, each six person positively reacted to the WT and GM pollen extracts (4.7%). Three subjects were revealed as atopy patients. Three persons showed co-sensitization to pollen of GM and WT simultaneously. There was, however, no difference between the two types of pollen. Moreover, those positive to pollens of GM and WT showed co-sensitization to at least 1 to 11 other allergens. For homology test, more than 80 amino acid-composed sequences of the enzyme showed less than 35% homology when the amino acid sequence homology of PAT was matched against known allergenic amino acid sequences using FASTA program. There was no match between the protein sequences and the 8-amino acid sequence allergen epitopes. The *bar* and *hpt* genes showed no apparent risks to human and animal health risks in terms of cytogenetic toxicity and allergenic reaction.

It can be concluded that no more allergic or harmful reactions was found in the pollen of the GM Zyosia grass compared with that of the WT Zoysia grass.

2. 서 론

꽃가루가 유발항원이 되어 발생하는 계절성 알레르기 질환을 일명 화분증(pollinosis)이라 하는데 주로 천식, 비염 및 결막염의 형태로 발병한다. 이 질환은 16세기경부터 서양에서는 건초를 모을 때 코 속에서 작열감이 발생한다고 하여 고초열 (hay fever)이라고 불리어 온 질환이다. 1920년 Prausnitz와 Kustner 등에 의해 화분증과 같은 즉시형 과민반응을 일으키는 특수인자인 리아진항체(reagin)가 증명되었고(Robert, 1982), Ishizaka(1967)와 Johansson (1968)에 의해 reagin이 Immunoglobulin E (IgE)로 명명된 이후 IgE에 관한 연구는 알레르기 질환의 진단에 크게 기여하였다. 화분증은 화분에 포함된 단백질에 인체가 반복적으로 노출됨으로써 인체 내에서 화분 단백질 항원에 대한 특이항체 IgE가 생성된다. 생성된 IgE는 비만세포 수용체 (mast cell receptor)를 지니므로 쉽게 비만세포와 결합하는데 이를 감작 (sensitization)이라 한다. 감작상태에서 동일한 항원에 재차 노출되면 비만세포 내 화학물질이 작용하게 되어 기관지 수축 및 염증, 코막힘, 콧물, 재채기, 가려움, 눈물 등의 알레르기 증상이 일어나게 된다. 구미 각국에서는 화분증이 매우 흔하여 유병율이 전 인구의 약 6.6%로 보고된 바 있으나 (Booth HB, 1985) 한국에서는 약 2%로 비교적 낮게 보고되어 있다 (Joo et al., 1965). 그러나 최근에 잔디 이용량의 증가와 함께 잔디화분증에 대한 중요성이 부각되어 지면서 잔디에 의한 알레르기 반응과 잔디 화분 내 알레르겐 성분의 규명에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

흡입 알레르겐에 의하여 유발되는 알레르기 질환의 원인을 찾아내기 위해서는 환자의 병력 및 각종 유발검사, 특이 IgE 항체 측정 방법을 이용한다. 이중 알레르겐을 이용한 피부반응검사는 검사의 용이성, 안전성 및 알레르기 질환의 중등도와의 연관성, 혈청내 특이 IgE와의 연관성 등이 높아 임상적으로 중요한 진단 기법이며, 1860년대 이후 Blackley (1873), Charlie와 Harrison (1950)에 의해 고초열 환자에서 화분으로 피부반응검사를 시행한 이래로 알레르기 질환을 진단함에 있어서 체내의 피부감작항체를 증명하는 표준방법으로 널리 시행되고 있다 (Johansson et al., 1978). 알레르기 피부반응검사는 크게 피내반응검사 (Intra-cutaneous or intradermal test)와 표피반응검사 (Cutaneous or epicutaneous

method)로 나누어져 있다. 표피반응 검사는 긁은 자국검사 (scratch test) 및 단자시험 (prick test)등이 있고 이중 단자시험이 여러 가지 검사들 중 가장 값싸고 손쉽게 시행 할 수 있어 널리 이용된다.

들잔디에 대한 알레르기 반응성은 호흡기 알레르기 환자의 5%가 들잔디의 화분에 의해서 감작되었다고 보도되었다 (Kim et al., 1987). 또한 기관지 조기 수축반응을 보인 예가 있어서 들잔디의 화분으로부터 화분증 유발 가능성을 제시하고 있다 (Hong et al., 1988). 실제로 기인성 항원을 찾기 위한 피부반응 검사결과, 잔디화분에 대한 감작율은 5-13%로 나타났다 (Yun et al., 1989; Hong et al., 1988). 잔디화분의 알레르겐 검출에 관한 연구에서 37%의 높은 양성율을 보였는데 (Lee et al., 1991) 이는 모두 잔디에 대한 반응 보다는 다른 목초화분간에 존재하는 상호교차 항원에 대한 반응을 함께 포함하고 있는 것으로 판단된다.

본 연구는 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분이 야생형 들잔디화분에 비하여 상대적으로 더 심각한 알레르겐으로 작용할 가능성 여부를 검증하기 위해 알레르기 반응성을 조사하였다. 또한 비선택성 제초제저항성 들잔디에 도입된 유전자에 의한 알레르기 유발 가능성을 검토하였다.

3. 재료 및 방법

1) 시험대상

피부단자시험은 2005년 10월부터 2006년 6월 사이에 알레르기질환으로 인해 제주대학교병원 호흡기알레르기 내과에 내원 환자 및 제주대학교 내 자원자들을 대상으로 시행하였다. 피시험자는 127명이었으며, 남자 55명, 여자 72명이었고, 평균나이는 38.1 이며, 표준편차는 ±17.6 이었다.

2) 잔디의 화분단백질을 이용한 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

들잔디의 화분단백질 추출은 다음과 같은 과정을 통해서 수행하였다. 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분 500 mg을 액체 질소에서 분쇄한 뒤 sodium phosphate buffer (0.2M NaH_2PO_4, 0.2M Na_2HPO_4, pH 7.0) 1 mL과 혼합하여 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 4℃에서 증류수로 5시간 투석시킨 (Spectra/Por 6-8,000) 후 동결 건조한 분말을 실험에 이용하였다. 동결 건조된 단백질의 농도측정은 Bradford method를 이용하여 시행하였다.

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 간의 단백질 변화 양상을 조사하기위해 Laemmli (1970)의 방법을 적용하여 SDS (Sodium dodecyl sulfate)-PAGE 분석을 행하였다. 시료는 tracking dye에 혼합하여 끓는 물에서 5분간 열처리하고, 10%, 12% acrylamide gel에서 40 mA로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Coomassie brilliant blue R-250을 사용하여 염색하였다.

3) 알레르기 피부단자시험

야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분 단백질은 피부단자시험에 사용하기위해서 다음과 같이 처리하였다. 추출된 들잔디 화분 단백질은 0.9% (w/v) NaCl에 녹이고, 0.04% (v/v) phenol과 50% glycerol을 첨가하여 최종 단백질 농도가 10 mg/mL가 되게 하였다. 공통 흡입항원은 Allergopharma (Sweden) 및 Hollister-Stier 사(USA)에서 피부단자시험용 시약 상품을 구입하여 사용하였다. 흡입항원에 포함된 알레르겐 물질은 집먼지 진드기 (*Dermatophagoides farinae, Dermatophagoides pteronysinus*), 독일바퀴, 미국바퀴, 동물털 (햄스터, 개, 토끼, 고양이, 기니픽, 말, 소, 양, 돼지, 염소, 닭, 오리, 거위), 나무 꽃가루 (오리나무, 개암나무, 포플러, 느릅나무, 버드나무, 자작나무, 너도밤나무, 참나무, 플라타너스, 일본삼나무, 미국삼나무), 잔디/곡식 (*Holcus lanatus*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense, Poa pratensis, Festula pratensis, Hordeum vulgare, Avena sativa, Secale cereale, triticum sativum*), 잡초, 화초 (국화, 과꽃, 달리아, 데이지), 실내 및 실외 곰팡이류가 들어있다.
피부단자 시험방법은 그림 48과 같이 시행하였다. 시험대상자의 상박을 알콜솜으로 닦은 후, 흡입항원 및 피부단자시험용 들잔디 시약 과 양성/음성 대조시약 (histamine 1mg/mL, 0.9% normal saline)을 소량 도포한 후 22G 주사바늘을 이용해 단자 (skin prick)를 시행하였다. 20분 후 팽진 (wheal)의 크기를 측정하여 mm 단위로 표시하였다. 팽진의 크기가 3 mm이상인 경우를 양성으로 판정하였으며, 양성대조군이 3 mm 이상이고 음성대조군에서 팽진을 관찰 할 수 없을 때 유효한 피부단자검사로 간주하였다. 흔한 흡입항원에서 1가지 이상 양성으로 보인 경우를 아토피 (atopy)로 정의하였다.

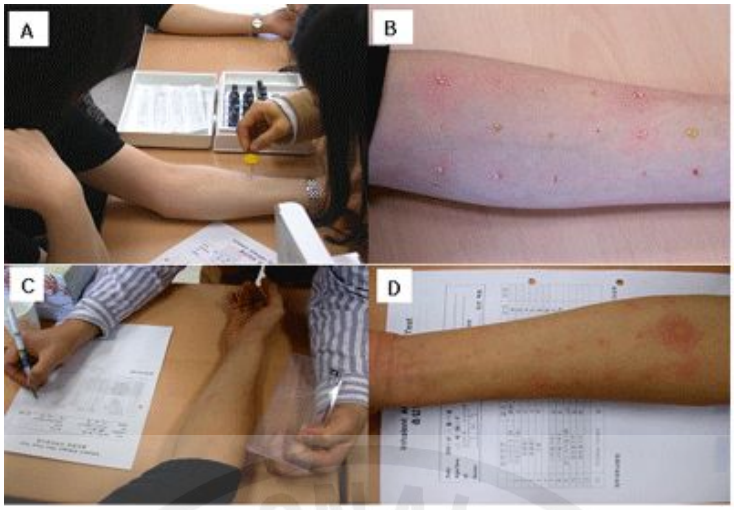


Figure 48. The procedure of skin prick test with Common and Zoysia grass pollen allergens. A and B: Inhalent of standard and grass allergen sample, C and D: after 20min. Check the Scale of expansion skin.

4) 도입 유전자의 알레르기 상동성 검색

비선택성 제초제저항성 들잔디에는 bialaphos resistance (*bar)* 유전자 (Thompson et al., 1987)와 hygromycin 내성유전자인 hygromycin phosphotransferase (*hpt*) 유전자가 삽입되어 있다. *Bar* 와 *hpt* 유전자의 PAT, HPH 단백질과 알레르겐 아미노산 서열 상동성 분석은 FDA, FAO/WHO (2001)의 프로토콜에 따라서 시행하였다. 상동성 분석을 위한 검색 데이터베이스는 translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF의 데이터를 포함하고 있는 NCBI의 BLAST 2.2.15 (2006. 10) 프로그램을 이용하여 알레르겐 4,181,744개의 염기서열과 상동성을 검정 하였다. 또한 FARRP는 American Academy of Allergy, Asthma and Immunology society, European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Food Allergy and Anaphylaxis의 1537 데이터베이스를 포함하고 있으며, FASTA (2006, Ver 6.) 프로그램을 이용하여 알레르겐 염기서열과 상동성을 검정 하였다. 또한 문헌 조사법으로 비선택성 제초제저항성 들잔디에 삽입된 유전자의 독성평가 결과를 조사하였다.

4. 결과 및 고찰

1) SDS-PAGE 분석결과

비선택성 제초제저항성 들잔디와 야생형 들잔디 화분 조항원의 단백질 성분을 분석하기 위해 10%, 12% SDS-PAGE를 시행한 후, coomassie brilliant blue 염색하였다. 그 결과 분자량이 66 KD 이상에서는 5개의 밴드가 나타났으며, 66-14 KD 사이에서 20개 이상의 밴드가 관찰되어 총 25개의 밴드가 나타났다. 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분 단백질간의 밴드 차이는 12% SDS-PAGE 상의 비선택성 제초제저항성 들잔디 부분에서 20-24 KD의 강한 밴드가 관찰되었다. 일반적으로 PAT 단백질의 분자량은 21-23 KD로 알려져 있어서 비선택성 제초제저항성 들잔디에 도입된 *bar* 유전자의 발현 단백질로 생각된다 (Figure 49). Lee 등 (1991)이 보고한 야생형 들잔디의 알레르겐 분획의 분자량을 살펴보면, 표지단백질의 상대적 이동에 따라 산출한 결과 79-80 KD와 17-18 KD 분획에서 시험자의 50%가 알레르기 감작을 나타났다. 그리고 92-93 KD와 47-48 KD 분획에서 40%, 57-58 KD 분획에서 30%의 감작율이 관찰되었다. 본 시험의 SDS-PAGE 분석결과에서 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분단백질상의 차이가 없고, 앞서 보고된 단백질의 분획들에서 알레르기 반응성을 나타낼 것으로 생각된다.

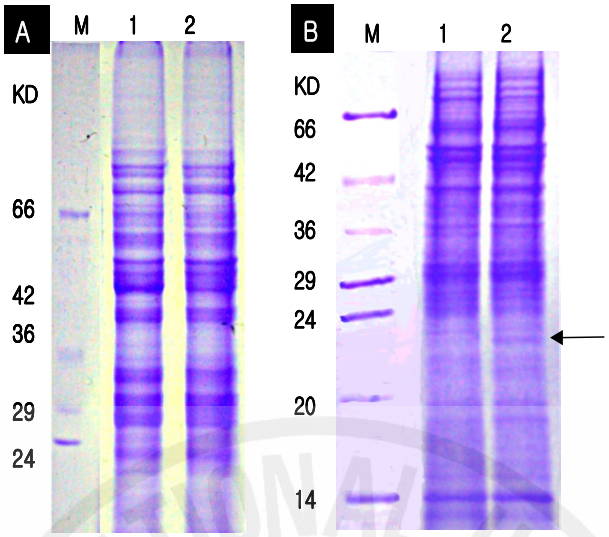


Figure 49. Seperation of WT and GM Zoysia grass pollen extracts by 10% and 12% SDS-PAGE. A: 10% acrylamide gel, B: 12% acrylamide gel, M: marker protein, lane 1: wild-type, lane 2: GM Zoysia grass.

2) 알레르기 피부단자시험

비선택성 제초제저항성과 야생형 들잔디 화분을 이용한 피부단자 시험을 127명을 대상으로 시행한 결과, 유효한 알레르기 반응을 보인 피시험자는 87명이었다. 알레르겐 감작율은 미국진드기 (81.6%)가 가장 높게 나타났고, 유럽진드기 (67.8%), 미국바퀴 (42.5%), 독일바퀴 (39.1%) 순으로 감작율이 나타났다. 또한 깃털 (3.4%), 나무 (2.3~6.9%), 곰팡이 (6.9~8.0%) 등에 대해서는 상대적으로 낮은 감작율을 보였다 (Table 20). 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디에서는 각각 6명이 감작되었고, 전체 시험군의 4.7%에 해당되며, 알레르겐 감작을 나타내는 아토피군 중의 6.9%이었다. 야생형 들잔디 혹은 비선택성 제초제저항성 들잔디에 감작된 경우, 최소 1가지에서 최대 11가지의 공통항원

알레르겐에 대해 양성반응을 보였다. 야생형 들잔디 혹은 비선택성 제초제저항성 들잔디에 각각 3명이 감작되었으나, 단독으로 감작된 경우는 없었다 (Table 21). 각 들잔디에 감작된 3명은 개인 마다 형질이 다른 특성에 의해서 공통항원 반응에 차이를 보이지만, 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분단백질의 감작율은 동일하게 나타났으며, 두 들잔디에서의 알레르겐은 유사할 것으로 생각된다. 들잔디 화분단백질을 사용한 피부단자시험 결과는 이미 보고된 들잔디 화분에 대한 감작율 (5-13%) 범위에서 나타났고, 타 알레르겐과의 교차반응에 의한 양성반응도 일부 포함되었을 것으로 생각된다. 실제로 들잔디와 목초화분 간의 알레르기 피부반응검사 결과 버뮤다그라스, Cocksfoot, Meadow 페스큐, 라이그라스, 티모시와 통계적으로 상관관계가 높아 공통항원 교차반응의 가능성을 제시한 바 있다 (Lee et al., 1999). 또한 목초, 잡초 화분과 식품알레르기의 연관성에 관한 연구에서도 교차항원이 나타났으며, 면역학적 기전은 이들이 공통구조를 가진 항원을 공유함으로써 교차항원을 나타낸다는 사실을 규명하였다 (Park et al., 1990; Lee et al., 2002). 이러한 연구결과를 토대로 야생형 들잔디와 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분의 감작율에서 차이를 보이지 않는 것은 두 항원간의 교차항원이 존재하기 때문으로 판단된다 (Table 21).

Table 20. Results from the skin prick tests for common and WT and GM Zoysia grass allergens

Allergen	No. of patients	Positive rate (%)
Positive control (1mg/㎖ 히스타민)	127	100
Negative control	0	0
D. farinae (미국 진드기)	72	56.7
D. Pteronyssinu (유럽 진드기)	60	47.2
American cockroach (미국 바퀴)	36	28.3
German Cockroach (독일 바퀴)	39	30.7
Cat and Dog hair (동물털1[a])	18	14.2
Horse and cattle hair (동물털2[b])	4	3.2
Flag or Down (깃털)	3	2.4
Broadleaf tree (조기개화)	2	1.6
Acicular tre (후기개화)	6	4.7
Japanese cedar (일본삼나무)	5	3.9
American cedar (미국삼나무)	6	4.7
House dust-fungi (실내 곰팡이)	8	6.3
Outdoor fungi (실외 곰팡이)	6	4.7
Flowers (화초)	12	9.4
Weeds (잡초)	14	11.0
Crops (작물)	10	7.9
GM Zoysia grass (제초제저항성 들잔디)	6	4.7
WT Zoysia grass (야생형 들잔디)	6	4.7

[a] Animal hair 1 were hair of hamster, dog, cat and rabbit, [b] animal 2 were hair of horse, cattle, pig and goat.

Table 21. The Co-sensitization results from the skin prick tests of WT and GM Zoysia grass.

Case no.	sex/age	Sensitization		Co-sensitization
		Wild type	GM	
1	M/33	O	O	잡초, 실내곰팡이, 실외곰팡이
2	F/25	O	O	미국진드기, 유럽진드기, 잔디/곡류, 잡초, 화초, 실내곰팡이, 실외곰팡이, 독일바퀴, 미국바퀴
3	F/20	O	O	독일바퀴
4	M/25	O		미국진드기, 유럽진드기, 잔디/곡류, 잡초, 화초, 실내곰팡이, 일본삼나무, 미국삼나무, 독일바퀴, 미국바퀴
5	M/37	O		미국진드기, 유럽진드기, 잔디/곡류, 화초, 미국바퀴
6	M/23	O		미국진드기, 유럽진드기, 잡초, 독일바퀴, 미국바퀴
7	M/30		O	미국진드기, 유럽진드기, 동물털, 실외곰팡이, 일본삼나무, 미국삼나무, 독일바퀴, 미국바퀴
8	F/48		O	미국진드기, 유럽진드기, 동물털, 독일바퀴, 미국바퀴
9	F/35		O	미국진드기, 유럽진드기, 동물털, 미국바퀴

3) 도입 유전자의 알레르기 상동성 검정 및 안전성

Bar 와 *pat* 유전자는 상동성을 갖는 PAT 단백질을 생산하고, Western blot 결과 21-23 kDa로 서로 일치하여 두 유전자가 동등하다고 보고하였다 (Wehrmann et al., 1996; Herouet et al., 2005). *bar* 유전자의 PAT 단백질과 알레르겐 아미노산 서열 상동성 분석 결과, PAT 단백질 염기서열의 80개 단위에 대해 35% 이하의 상동성이 나타났고, 알레르겐 아미노산 염기서열과 상동성이 없으며 (**Figure 50)**, 연속된 8개의 epitope에 일치하지 않았다.

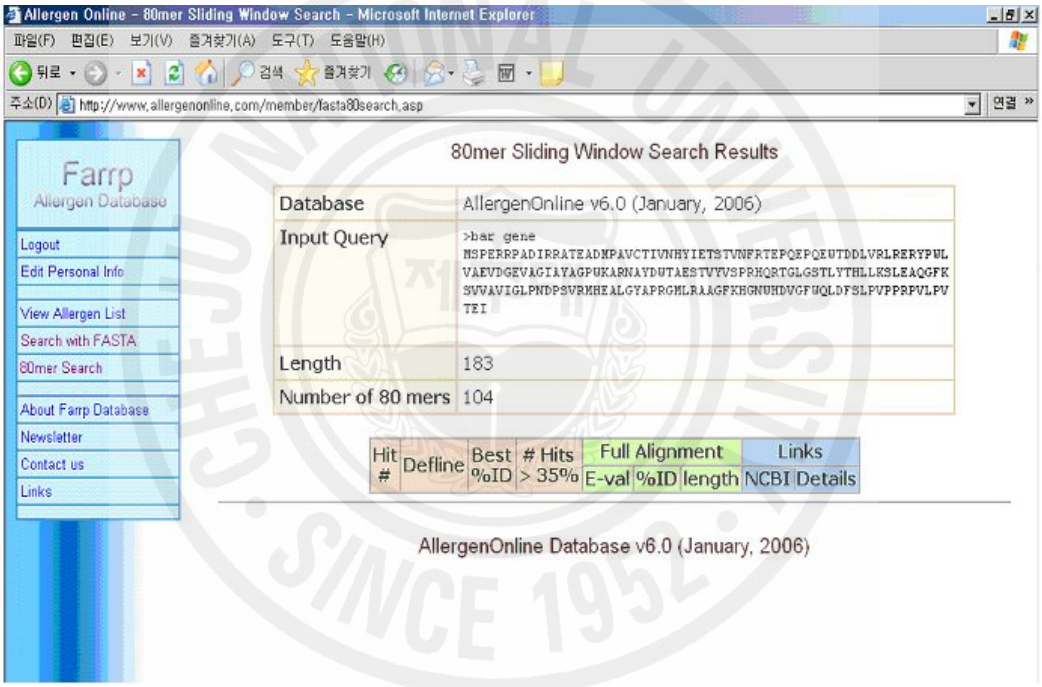


Figure 50. The FASTA program of amino acid sequence for search the allergen with PAT protein.

비선택성 제초제저항성 들잔디에 도입된 *bar* 유전자는 토양 방선균인 *Streptomyces hygroscopicus*에서 발견되었고, *Streptomyces viridochromogenes*에서 발견된 *pat* 유전자 (183 amino acid)와는 84%의 상동성을 보이며 (Wehrmann et al., 1996), 두 유전자 모두 PAT 단백질을 생성한다.

PAT 단백질에 대한 안전성은 비선택성 제초제저항성 유전자 정보 (OECD, 1999)와 비선택성 제초제저항성 옥수수 T14, T25 (Bayer CropScience, 1995), 벼 LLRICE62 (Bayer CropScience, 1999); LLRICE601 (AgrEvo, 2006), 면화 LLCotton25 (AgrEvo, 2003), 콩 W62, W98 (Bayer CropScience, 1996) 등의 환경위해성평가 제출서 내용에 기술되어 있다. *Bar*와 *pat* 유전자에서 생산된 PAT 단백질의 불활성 시험 결과, pH 4이하에서 30분 이상 처리하거나 75℃ 이상에서 30분 가열시 불활성화 되는 것으로 알려졌다 (CFSAN, 1995; Wehrmann et al., 1996; ANZFA, 2001, Herouet et al., 2005). 동물의 위장액을 이용한 실험 (AgrEVO, 1994; Thomas et al., 2004)에서도 PAT 단백질이 쉽게 분해되는 것이 밝혀졌고, 쥐를 이용한 급성독성 실험 (Jones and Maryanski, 1991; Sjoblad et al., 1992; Schmidt, 1994; WHO, 1998; Mossinger and Dietrich, 1998; OECD, 2001; USDA-ERS, 2002) 결과에서 동물이나 인체에 유해하다는 증거는 발견할 수 없었다.

토양 방선균인 *Streptomyces hygroscopicus*에서 발견된 *hpt* 유전자가 발현하는 HPH4 단백질은 42 kDa의 분자량을 가지고 있으며, PAT 단백질과 같이 알레르겐 염기서열과 상동성이 없었다. 특히, 신젠타 사의 비선택성 제초제저항성 면화 COT102에 도입된 *hpt* 유전자의 물리화학적 안전성을 실험한 결과 인공위액과 장액에서 쉽게 분해되고, 인간에게 알려진 독성이 없는 것으로 보고되었다 (Sjoblad et al., 1992; EPA, 2003).

본 연구결과를 종합해보면 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분단백질의 알레르겐은 야생형 들잔디 화분 단백질의 알레르겐과 유사할 것으로 생각되고, 들잔디에 도입된 유전자에 의한 알레르기 유발성 가능성 및 위해성은 없는 것으로 판단된다.

5. 적 요

야생형 들잔디 화분단백질을 이용한 알레르기 반응성은 호흡기 알레르기 환자의 경우 약 5%의 감작율이 보고되었다 (Kim et al., 1987). 본 연구에서는 야생형 들잔디와 비선택성 제초제저항성 들잔디의 알레르기 반응성을 조사하기 위해 2005년 10월에서 2006년 6월 까지 제주대학교 알레르기 내과에 내원환자와 지원자를 대상으로 피부반응검사를 시행하였다. 피부반응검사는 20개의 공통항원을 포함하여 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분단백질을 사용하였고, 총 127명중 남자 55명, 여자 72명이었으며, 나이는 평균 38.1±17.6 이었다. 127명중 87명에게서 유효한 알레르기 반응이 나타났고, 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디에서 각각 6명 (4.7%)이 감작되었다. 개인 마다 형질이 다른 특성에 의해서 공통항원 반응에는 차이를 보이지만, 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분단백질의 감작율은 동일하게 나타나 두 들잔디 화분의 알레르겐은 유사할 것으로 생각된다. 비선택성 제초제저항성 들잔디에 도입된 *bar*와 *hpt* 유전자의 발현단백질을 알려진 알레르겐 염기서열과 상동성을 검색한 결과 35% 이하의 상동성이 나타났으며, 연속된 8개의 아미노산 서열에서도 일치하지 않았다. 또한 이미 보고된 자료에서도 *bar*와 *hpt* 유전자는 인체에 유해성이 없으며, 도입 유전자에 의해서 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분단백질에서 더 많은 알레르기가 유발 한다는 증거는 없다.

6. 인용문헌

Australia New Zealand Food Authority 2001. Final assessment report (inquiry-section 17)-Application A375: Food derived from glufosinate ammonium-tolerant corn line T25. Report No. Full assessment - Application A375, Food Standards Australia New Zealand, Canberra, Australia.

Blackely CH. 1873. Experimental reserches on the cause and nature of catarrhus aestives. London, Baileiere, Tindall and Cox.

Booth HB. 1985. Diagnosis of immediate hypersensitivity. In patterson R. (eds.) Allergic diseases. Diagnosis and management. 3rd ed. Philadelphia, Lippincott pp. 102.

Center for Food Safety and Applied Nutrition 1995. Biotechnology consultation note to the file BNF No. 000029: Glufosiante tolerant corn. CFSAN/Office of Premarket Approval.

CFSAN 1998. Biotechnology consultation BNF No. 000055 note to the file. Glufosiante tolerant Soybean. CFSAN/Office of Premarket Approval.

Codex Alimentarius Commission 2003. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization. Codex principles and guidelines on foods derived from biotechnology. 26th session, Rome, Italy. 30 June.7 July, 2003. Report on the 4th session of the Codex ad hoc intergovernmental task force on foods derived from biotechnology. Yokohama, Japan, 11.14 March, 2003, ALINORM 03/34A, pp. 1.56.

Environmental Protection Agency 1997. Phosphinothricin acetyltransferase and the genetic material necessary for its production in all plants. Exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities. Federal Register, 70, pp. 17717-17720.

Food and Agriculture Origanization if the United nations 2001. Evaluation of the

allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. Rome, Italy.

Harris MC and Shure N. 1950. Sudden death due to allergy tests. J. Allergy 21:208-216.

Herouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K,van der Klis R, Rouan D. 2005. Safety evaluation of th phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. Regulatory Toxicology and Pharmacology 41: 134-149.

Hong CS, Park HS. 1988. Bronchial asthma induced by Korean pollen extracts. J. Kor Soc Allergology 8; 193-198.

Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook M. 1967. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. J. immunol. 97: 75.

Institute of Science in Society 2003. Animals avoid GM food, for good reasons: Novotny E (2002) Report for the Chardon LL hearing. Non-suitability of genetically engineered feed for animals. ISIS Press Release 13/12/03.

Johansson SGO, Bennich H and Wide L. 1968. Anew class of immunoglobulin in human serum. J. Immunol. 14: 265.

Johansson SGO and Fouchard T. 1978. IgE in immunity and disease. In middleton. Allergy. Principles and paractice, St. Louis, Mosby, pp 551-562.

Jones DD, Maryanski JH. 1991. Safety considerations in the evaluation of transgenic plants for human foods. In: Levin MA, Strauss HS (Eds.), Risk Assessment in Genetic Engineering. McGraw-Hill, New York, pp. 64-82.

Joo YJ. 1965. 화분증에 관한 연구 제 1편: 서울에서의 공중 화분. 대한

이비인후과학회지 8:11.

Kang SO, Park HS, Hong CS. 1988. 피부단자시험 판정기준별 RAST성적의 비교 관찰. Allergy 8; 225-235.

Kang SY, Choi BH, Mhon HB, Min KY, Kim YY. 1984. 한국인 호흡기 알레르기 환자에 있어서 피부시험성적에 관한연구. Allergy 4; 49.

Kim YL, Lee SK, Oh SH. 1987. A study of allergy skin tests with Korean pollen extracts. Yonsei Medical Journal 28; 112-118.

Laemmil UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lee MK, Hong CS. 1991. 잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)화분의 알레르겐 검출에 관한 연구. Allergy 11; 14-29.

Lee YM, Suh YJ, Lee SK, Nahm DH, Park HS. 2002. Are there any links between mugwort pollen and food allergens such as celery and carrot based upon allergy skin prick tests? 천식 및 알레르기 22; 410-417.

Lim SB, Park IY, Lee KY, Hong CS. 1988. 아토피성 알레르기 환자의 감감작 항원에 관한 연구. Allergy 8; 139-149.

Mossinger H, Dietrich W. 1998. Activation of hemostasis during cardiopulmonary bypass and pediatric aprotinin dosage. Ann. Thorac. Surg. 65: 45-50.

Organization for Economic Co-operation and Development. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on harmonization of regulatory oversight of biotechnology, number 11. June 1, 1999, pp. 1-26.

OECD 2001. Test No. 420: Acute oral toxicity. Fixed dose procedure. OECD

Guidelines for the testing of chemicals. 17 December, 2001, pp. 1-14.

OECD 2002. Module II: Herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in glufosinate-ammonium (phosphinothricin)-tolerant transgenic plants. OECD

Park HS, Kang SO, Hong CS. 1988. *Tyrophagus putrescentiae* (긴털가루진드기)에 대한 피부반응도 및 RAST에 관한 연구. Allergy 8; 118-124.

Park HS, Hong CS, Kim JW. 1990. 쌀겨와 주요 화분간의 알레르겐 성분의 관련성에 관한 연구. Allergy 10; 104-110.

Robert JD. 1982. Using the RAST and RIST with an overview of clinical significance. Ann. Allergy 49: 1.

Schmidt JO. 1994. Toxinology of venoms from the honeybee genus apis. Toxicon 33: 917-927.

Seo HS, Park YO, Meng BJ, Lee YC. 1988. 경인지역 소아 호흡기 알레르기 환자에서의 피부시험 성적. Allergy 8; 271-278.

Sjoblad R, McClintock JT, Engler R. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. Regul. Toxicol. Pharmacol. 15: 3-9.

Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, Fu TJ, Glatt CM, HadWeld N, Hatzos C, HeXe SL, Heylings JR, Goodman RE, Henry B, Herouet C, Holsapple M, Ladics GS, Landry TD, MacIntosh SC, Rice EA, Privalle LS, Steiner HY, Teshima R, Thomas K, van Ree R, Woolhiser M, Zawodny J. 2004. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. Regul. Toxicol. Pharmacol. 39: 87-98.

U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service 2002. AgroEvo petition for determination of non-regulated status for glufosiante resistant

corn transformation events T14 and T25.

USDA-ERS 2002. USDA Economic Research Service Data: Food consumption (per capita) data system-standard from website. Available from: <http://www.ers.usda.gov/data/foodconsumption/spreadsheeets.asp>.

Wehrmann A, Van Vliet A, Opsomer C, Botterman J, Schulz A. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. Nat. Biotechnol. 14: 1274-1278.

Word Health Organization 1998. Food Safety Department, GEMS (Global environmental monitoring system. Food contamination monitoring and management system)/food regional diets. Regional per capita consumption of raw and semiprocessed agricultural commodities.

Yun YW, Lee MK, Park HS, Park SS, Hong CS. 1989. 알레르기 환자에서 시행한 피부단자시험과 혈청 IgE검사 성적. Allergy 9; 385-398.

Ⅷ. 비선택성 제초제저항성 들잔디의 비의도적 방출에 따른 대처방안

1. Abstract

The present study was also investigated the elimination and inactivation for un-intented escape GM herbicide-tolerant Zoysia grass. The non-selective herbicides (glufosate and paraquat) without glufosiante were efficiently eliminated the herbicide-tolerant Zoysia. Because the GM herbicide-tolerant Zoysia grass was only show resistance to glufosnate. The herbicide-tolerant Zoysia grass in environment had difficulty with growth by the dominant weeds and grass pathogens (*Rhizoctonia* spp., *Curvularia* sp., *Pythium* spp., *Colletotrichum* sp.). When glufosiante was not tried, there were no advantage for the herbicide-tolerant Zoysia grass to grew in environment. Therefor the herbicide-tolerant Zoysia grass did not cause any environment risk.

2. 서 론

최근 외부 유용유전자 도입에 따른 형질전환 식물체 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이미 제초제 저항성 콩 (Zhang et al., 1999), 옥수수 (Spencer et al., 1990), 해충저항성 면화 (Perlak et al., 1993) 등의 형질전환 식물체가 개발되어 상품화 되고 있는 실정이다. 이러한 형질전환 식물체를 상품화시키기 위해서는 형질전환 식물체가 인체 및 환경에 대한 위해성이 없다고 판단되어야한다. 특히 환경위해성 평가기준 중에 형질전환 식물체의 화분비산 및 유실에 따른 생태계의 영향은 대단히 중요한 문제로 부각되고 있다 (Watrud et al., 2004). 비선택성 제초제저항성 유채의 경우에 화분비산 및 유통과정 등의 요인으로 몇 가지 제초제에도 저항성을 갖는 개체가 발생하고 있다 (Daniels et al., 2005). 일본의 경우에도 가공용으로 수입되는 유채의 주요 수입항인 이바라키현 카시마항을 중심으로 반경 5 km 범위의 48개 구역에서 GM 유채의 유출 가능성을 2002년에서 2004년까지 조사하였다. 그 결과 48개 구역에서 최소한 6점 이상의 GM 유채가 발견되었고(MAFF, 2004), 2004년 시민연대운동에서 주요항을 중심으로 조사한 결과에서도 GM 유채가 발견되어 사회적 이슈가 되었다(Greenpeace, 2005). 이와 같이 GM 작물의 비의도적 방출은 작물의 화분비산 거리와 상관없이 운송 및 경작에 의해서 나타나고 있다. 이러한 환경문제를 해결하기위한 방법으로 재배지 밖에서 발생한 GM 작물은 도입 유전자와 상관없는 제초제를 사용하여 제거 할 수 있다.

본 연구에서는 비선택성 제초제저항성 들잔디가 glufosiante가 아닌 다른 제초제에 의해서 제거 될 수 있는지를 조사하여 비의도적 환경방출시 대처방안을 검토하였다.

3. 재료 및 방법

1) 식물 재료

제초제 살포시험을 위한 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 (Toyama et al., 2003)는 2004년 10월에 종자를 파종 하였고, 생육된 T_4세대 식물체는 화분 (20 cm)에 옮겨 심어서 2005년 7월에 제초제를 처리하기 전 까지 생육시켜 켰다.

2) 비선택성 제초제저항성 들잔디의 제초제 활성 조사

살포시험에 사용된 제초제는 시판용으로서, 제초제의 일반명과 처리량 (상품명/회사 및 함량)은 다음과 같다. Glufosinate (바스타/바이엘크롭스, 28%)의 최종 희석농도는 0.1% (w/v)이었고, glyphosate는 (근사미/동부정밀, 41%) 0.2% (w/v)이었으며, paraquat는 (그라목손/신젠타, 24.5%) 0.1% (w/v)로 희석하여 사용하였다. 비선택성 제초제인 바스타는 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디가 포함된 화분 (pot)에 살포하여 비선택성 제초제저항성 들잔디를 선별하는데 사용하였다. 그 후 선발된 비선택성 제초제저항성 들잔디는 근사미와 그라목손을 각각 처리하여 제초제 활성을 관찰하였다.

4. 결과 및 고찰

1) 비선택성 제초제저항성 들잔디의 제초제 활성평가

비선택성 제초제저항성 들잔디를 선별하기위해 바스타를 처리한 결과 2주 후에 야생형 들잔디는 고사하였고, 비선택성 제초제저항성 들잔디만 생존하였다 (Figure 51A). 선별된 비선택성 제초제저항성 들잔디는 근사미 (glyphosate)를 처리한 결과 1주일이 경과하면서 붉은 색을 띠며 제초효과는 50%이었고, 2주 후에는 약 75%의 제초효과를 나타나면서 붉은 색과 녹색, 황백색을 관찰할 수 있었다. 3주후에는 약 95% 이상 제초효과를 나타내었다. 그라목손 (paraquat)의 경우에는 1일주일 이내에 제초효과가 약 99% 이상으로 아주 빨랐으며, 비선택성 제초제저항성 들잔디를 고사시키는 제초제로써 효과적 이었다 (Figure 51B). 본 연구에서 개발된 비선택성 제초제저항성 들잔디는 비선택성 제초제인 바스타에만 저항성을 나타내지만 그라목손, 근사미와 같은 비선택성 제초제에는 저항성이 없기 때문에 야생형 들잔디와 동일하게 고사 하였다.

스코츠사의 GM 벤트그라스의 경우에도 *EPSPS* 유전자가 도입되어 글리포세이트 저항성을 나타내지만 글리포세이트가 아닌 다른 제초제를 사용하여 제거 할 수 있다고 주장하였다 (Frelich et al., 2003). 또한 Roudup, Liberty, Pursuit 3종의 제초제에 저항성을 나타내어 슈퍼잡초라고 주장하는 유채의 경우에도 2,4-D에 의해서 쉽게 제거 될 수 있었다 (Kim, 2005). 영국의 Centre for ecology and hydrology (CEH) 연구자 들은 제초제를 처리하지 않은 상황에서는 환경에 방출된 제초제저항성 작물들이 선택적 이득을 얻지 못해 큰 문제가 되지 않을 것으로 판단하고 있다 (Kim, 2006).

따라서 비선택성 제초제저항성 들잔디는 glufosiante가 아닌 다른 제초제에 의해서 쉽게 제거될 수 있다. 자연환경에서 제초제에 대한 선택적 이득이 없을 경우에는 우점잡초에 의해서 생육이 저해되고, 병해에 의해서 소멸될 것으로 판단된다.

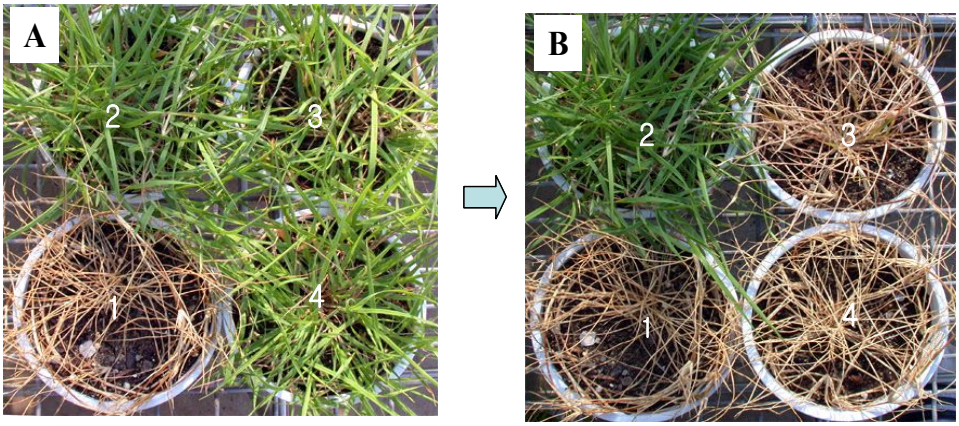


Figure 51. Eliminated the GM Zoysia grass from trial of herbicide. A: Trial of Basta for selection of GM Zoysia grass, B: The GM zoysia grasses were died after sprayed the glufosate and paraquat.

5. 적 요

본 연구에서는 비의도적으로 방출된 비선택성 제초제저항성 들잔디의 대처방안으로서 들잔디의 제거 방법을 조사한 결과 glufosiante가 아닌 근사미 (glufosate), 그라목손 (paraquart) 등의 비선택성 제초제로 쉽게 제거할 수 있었다. *bar* 유전자가 도입된 비선택성 제초제저항성 들잔디는 glufosiante에만 저항성을 나타내지만 그 밖의 비선택성 제초제에서는 고사되었다. 또한 비선택성 제초제저항성 들잔디는 자연환경에서 우점잡초에 의해서 생육이 저해되고, 병해에 의해서 도태되기 때문에 glufosinate를 처리하지 않을 시에는 선택적 이득을 얻지 못하므로 자연환경에 위해성이 없을 것으로 판단된다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

6. 인용문헌

Daniels R, Boffey C, Mogg R, Bond J, Clarke R. 2005. The potential for dispersal of herbicide tolerance genes from genetically-modified, herbicide-tolerant oilseed rape crops to wild relatives. Contract reference EPG 1/5/151. Final report to DEFRA. CEH Dorset, Dorchester.

Frelich J, Huber S, Nelson E, and Stone T. 2003. Petition for determination of non-regulated status for roundup ready Creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera L.)* event ASR368 (USDA petition #03-104-01p). USDA-APHIS.

Greenpeace 2005. Genetically engineered canola contamination confirmed across Japan-Canadian GE canola the culprit: Canola contamination Japan report. Greenpeace international.

Kim KH. 2005. 수퍼잡초-canola.: GMO 논란 사례 연구. 농업생명공학연구원. pp. 16-27.

Kim CG. 2006. GMO를 둘러싼 환경위해성 논란. Biosafety 7(3) 24-39.

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries 2004. Regarding the survey on seeds spillage of imported genetically modified western oilseed rape (canola) for raw material. 29th June 2004.(http://www.s.affrc.go.jp/docs/press/2004/0629/honbun.htm)

Perlak FJ, Deaton RW, Armatrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA. 1990. Insect resistant cotton plants. Bio/Technology 8: 939-943

Spencer TM, Gordon-Kamm WJ, Daines RJ, Start WG, Lemaux PG. 1990. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. Theor Appl G 79: 625-631

Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, Lee HY. 2003. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated

transformation Mol Cells. 16: 19-27

Watrud LS, Henry Lee E, Fairbrother A, Burdick C, Reichman JR, BollmanM, Storm M, King G, Van de Water PK. 2004. Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with *CP4 EPSPS* as a marker. PNAS 101: 14533-14538.

Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. Plant Cell Tiss Org Cult 56: 37-46

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

Ⅸ. 요약문

GM 작물의 환경위해성평가를 수행하기위해서는 GM 작물의 개발에 따른 전반적인 내용을 파악해야한다. 따라서 제 1부에서는 *Agrobacterium* 법에 의한 형질전환 민들레의 개발에 대해서 살펴보았다. *Agrobacterium* 법을 이용하여 민들레에 *hmgr* 유전자를 도입하기위해 전배양 기간은 형질전환 효율을 높일 수 있는 중요한 요인이었다. 또한 2단계 재분화 시스템은 유전자 발현을 안정하게 유도하였고, 형질전환된 식물체는 분자생물학적 방법에 의해 확인되었다. 이러한 일련의 과정들을 통해 개발된 유전자변형 작물은 환경위해성평가를 위한 기본적인 재료가 되는 것이다.

제 2부에서는 이미 개발된 GM 작물 중에서 안정하게 세대가 유지된 비선택성 제초제저항성 들잔디에 대한 환경위해성평가를 수행하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디는 재배에 따른 관리비용, 잡초방제, 환경오염문제 등을 감소시킬 수 있고, 다양한 기능성을 보유한 품종의 확보를 목적으로 개발하였다. 비선택성 제초제저항성 들잔디는 *Agrobacterium* 법을 이용하여 제초제에 저항성을 갖도록 *bar* 유전자가 도입되었고, 분자생물학적 방법과 포장시험을 통해서 도입유전자가 안정하게 발현되는 것을 확인하였다. 이러한 환경친화적인 비선택성 제초제저항성 들잔디가 이용되기 위해서는 환경위해성평가 검정이 되어야 한다.

환경위해성평가 검정은 농림부고시 2002-2호에 제시된 "유전자변형 농산물의 환경위해성평가" 심사지침에 따라서 제주대학교 환경위해성평가 기관에서 시행하였다. 본 연구에서 시행한 환경위해성평가 시험에서는 다음과 같이 비선택성 제초제저항성 들잔디의 유전적 안정성, 실질적 동등성, 화분비산 거리측정, 근연종 및 타 작물과의 교배가능성, 잡초화 가능성, 비 표적생물체에 대한 영향과 비선택성 제초제저항성 들잔디의 화분으로부터 알레르기 반응성을 검정하였고, 비의도적 방출에 따른 비선택성 제초제저항성 들잔디의 관리방법을 조사하였다.

비선택성 제초제저항성 들잔디의 도입 유전자 특성 및 유전적 안전성을 검정한 결과, 포장시험을 통해서 T_3, T_4세대에서도 비선택성 제초제저항성이 유지되었고, 후대에서도 멘델의 유전분리비에 따라 유전자가 안정적으로 발현되었다. 또한 들잔디의 게놈 상에 도입된 유전자의 삽입 부위를 조사한 결과, 들잔디의 염색체 내에 삽입되어 유전형질이 후대에서도 안정하게 유지되는 것으로 판단된다.

실질적 동등성 조사는 비선택성 제초제저항성 들잔디 지상부에 잎과 종자의 형태적 특성, 종자의 자연발아율, 피복율, 포복경의 생육 특성 등을 지금까지 안전하게 이용되어온 야생형 들잔디와 비교하였다. 그 결과 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 간의 유의차가 나타나지 않아 실질적 동등성이 인정되었다.

들잔디의 화분비산 거리측정은 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 간의 교배 친화성을 이용하여 화분비산거리를 측정 하였다. 그 결과 근접 거리 (>0 m)에서는 평균 6%의 교배율이 발생하였고, 1 m 와 3 m 이내의 거리에서는 각각 1.3%와 0.12%의 교배율이 나타났다. 그러나 3m 이상 (9m and 42m)의 거리에서는 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 간의 교배 친화성이 관찰되지 않았고, 비선택성 제초제저항성 들잔디 포장으로부터 반경 5 km 이내의 거리에서도 제초제에 저항성을 나타내는 야생형 들잔디는 발견되지 않았다.

근연종으로 유전자이동 가능성 검정은 유사한 개화시기를 갖는 라이그라스, 켄터키블루그라스, 톨페스큐, 귀리, 띠 (Cogon grass)를 이용한 포장시험 결과 비선택성 제초제저항성을 나타내는 개체는 관찰되지 않았다. 이종으로 유전자이동 가능성 검정은 2003-2005년 까지 격리포장 내에서 개화시기가 유사한 잡초를 대상으로 제초제 살포 및 PCR 분석을 시행한 결과, 비선택성 제초제저항성을 보이는 개체는 관찰되지 않아 이종간의 교잡가능성은 없는 것으로 생각된다. 비선택성 제초제저항성 들잔디를 자연환경에서 3년간 방치하여 증식 및 우점성을 조사한 결과, 우점잡초와 병해에 의해서 생육억제 및 개체 감소가 관찰되어 자연환경에서 잡초화 가능성은 없을 것으로 생각된다.

비표적생물체에 대한 영향은 자연생태계의 미생물로 수평적 유전자이동 (HGT) 가능성을 조사하였고, Southern blot와 PCR 수행한 결과 비선택성 제초제저항성 들잔디로부터 토양, 근권 및 곤충의 장내 미생물로의 HGT는 확인되지 않았다.

들잔디 화분으로부터 알레르기 반응성을 조사하기 위해서 총 127명 (남자 55명, 여자 72명, 평균나이 38.1세)에게 공통항원 알레르겐, 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분 단백질을 이용하여 피부단자 시험을 시행하였다. 그 결과, 야생형과 비선택성 제초제저항성 들잔디 화분 단백질의 알레르기 감작율은 전체 시험군에서 각각 4.7%로 나타났다. 개인의 특이적 기질에 의한 공통항원에는 차이를 보이지만 들잔디의 알레르기 반응에는 차이가 없었다. 비선택성 제초제저항성 들잔디에 도입된 *bar*와 *hpt* 유전자의 독성 및 알레르기 유발성은 FAO/WHO, OECD, EPA, ILSI 등에 이미 제출된 보고서에서와 같이 인체 및 동물에 미치는 위해성은 없는 것 나타났고, 비선택성 제초제저항성 들잔디의 알레르기 반응성은 도입 유전자에 의한 알레르기 반응성은 없는 것으로 판단된다.

비의도적 방출에 따른 관리방법은 비선택성 제초제저항성 들잔디를 불활성 시키는 것이며, glufosiante가 아닌 glufosate 또는 paraquart 성분의 비선택성 제초제 살포를 통해서 쉽게 제거 할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해보면 비선택성 제초제저항성 들잔디의 환경위해성평가 결과, 일반적으로 재배되고 있는 야생형 들잔디와 실질적 동등성이 인정되었다. 동종간의 교배 가능성은 있으나 3 m 이상의 거리에서는 매우 낮을 것으로 생각되며, 근연종 및 이종으로 유전자이동 가능성은 관찰되지 않았다. 비선택성 제초제저항성 들잔디는 잡초의 특성이 없고, 관리되지 않을 경우에는 자연환경에서 서서히 소멸하기 때문에 환경에 위해가능성은 없다. 또한, 들잔디 화분단백질에 의한 알레르기 유발가능성은 있으나 도입 유전자에 의한 알레르기 유발 가능성은 없는 것으로 판단된다. 따라서 비선택성 제초제저항성 들잔디는 기존에 사용되어온 들잔디와 유사하고, 환경친화적인 특성을 나타내기 때문에 매우 유용할 것으로 기대된다.

List of publications

SCI 급 학술지:

Tae Woong Bae, Hae Ryoung Park, Youn Sig Kwak, Hyo Yeon Lee, Stephen B. Ryu (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a medicinal plant *Taraxacum platycarpum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 51-57.

Enkhchimeg Vanjildorj, **Tae-Woong Bae,** Key-Zung Riu, Soo-Young Kim, and Hyo-Yeon Lee (2005) Overexpression of Arabidopsis ABF3 gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 83: 41-50.

Enkhchimeg Vanjildorj, **Tae-Woong Bae,** Key-Zung Riu, Pil-Yong Yun, Shin-Young Park, Soo-Young Kim, and Hyo-Yeon Lee (2006) Enhanced tolerance to heat stress under water deficit in transgenic *Agrostis mongolica* Roshev. overexpressing ABF3 gene. Plant Cell Tissue Organ Culture 87: 109-120.

국내 학술지 및 저널:

이효연, **배태웅** (2005) 비선택성 제초제저항성 GM 들잔디 개발 및 환경위해성평가. Biosafety 6 (3): 4-13.

학술회의:

Enkhchimeg Vanjildorj, **Tae-Woong Bae,** Chang-Hyu Bae, Key-Zung Riu, Soo-Young Kim, Hyo-Yeon Lee (2004.5.7~5.8) Drought and cold tolerant enhanced by transformation of ABF3 gene in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). Symposium of Korean Society of Plant Biotechnology. pp: 58.

Nishiguchi, Kyoung-In Jang, **Tae-Woong Bae**, Key-Zung Riu, Jeong-Il Kim, Pill-Soon Song, Chang-Hyu Bae and Hyo-Yeon Lee (2004.5.7~5.8) Production of Zoysia grass with shade-avoidance through *Agrobacterium*-mediated transformation. Symposium of Korean Society of Plant Biotechnology. pp. 61.

Enkhchimeg Vanjildorj, **Tae-Woong Bae**, Chang-Hyu Bae, Key-Zung Riu, Soo-Young Kim, Hyo-Yeon Lee. (2004.10.22~10.23) Arabidopsis ABF3 gene regulation in drought, cold and oxidative stress tolerant in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). Vision for Practical Use of Biotechnology. pp. 102.

Gyeong-In Jang, Satoshi Nishiguchi, **Tae-Woong Bae**, Key-Zung Riu, Jeong-Il Kim, Pill-Soon Song and Hyo-Yeon Lee. (2004.10.22~10.23) Expression of shade-avoidance reduce gene on transformed Zoysia grass by *Agrobacterium*-mediated. Vision for Practical Use of Biotechnology. pp. 115.

Enkhchimeg Vanjildorj, **Tae-Woong Bae**, Key-Zung Riu, Soo-Young Kim, and Hyo-Yeon Lee. (2005.4.22.~4.23) The efficient regeneration and *Agrobacteruim tumefaciens*- mediated transformation systems for Mongolian bentgrass (*Agrostis mongolica* Roshev.). Plant Biotechnology and Human Welfare, Programs and Proceeding of the International Symposium on Plant Biotechnology. pp. 112.

Tae-Woong Bae, Satoshi Nishiguchi, Chang-Hyu Bae, Key-Zung Riu, Jong-ll Kim, Pill-Soon Song and Hyo-Yeon Lee (2005.4.22~4.23) Trials of confined and unconfined field level for ecological risks assessment of genetically modified zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). Plant Biotechnology and Human Welfare, Programs and Proceeding of the International Symposium on Plant Biotechnology. pp. 196. 한국식물생명공학회 춘계학술대회 및 국제심포지움 초록집

Enkhchimeg Vanjildorj, **Tae-Woong Bae**, Key-Zung Riu, Soo-Young Kim, Hyo-Yeon Lee. (2005.11.2-11.4). Enhanced tolerance to heat stress under water deficit in transgenic *Agrostis mongolica* Roshev. overexpressing ABF3 gene. Annual autumn meeting of Korean society for plant biotechnology and Korea-Japan joint symposium

on platform technology for plant bioproducts. pp. 210.

Tae-Woong Bae, Satoshi Nishiguchi, Enkhchimeg Vanjildorj, Chang-Hyu Bae, Shin-Young Park, Pil-Yong Yun, Key-Zung Riu, Song-Sook Yang, Ok-jin Hwang, Jong-ll Kim, Pill-Soon Song and Hyo-Yeon Lee (2005.11.2-11.4) Enviromental risk assessment of genetically modified herbicide-resistant Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). Annual autumn meeting of Korean society for plant biotechnology and Korea-Japan joint symposium on platform technology for plant bioproducts. pp. 348. 한국식물생명공학회 추계학술대회 발표논문초록집

Enkhchimeg Vanjildorj, **Tae-Woong Bae**, Hyo-Yeon Lee. 2005. Enhanced tolerance to heat stress under water deficit in transgenic *Agrostis mongolica* Roshev. overexpressing ABF3 gene and environmental risk assessment of GMO. Korea, China, Japan International symposium titled as Environmental favorable agriculture and subtropical bio-industry. pp. 47-76.

Tae-Woong Bae, Enkhchimeg Vanjildorj, Tae-Woo Kang, Chandrasekhar T, Song-Sook Yang, Ok-jin Hwang, Chang-Hyu Bae, Shin-Young Park, Key-Zung Riu, Jong-ll Kim, Pill-Soon Song and Hyo-Yeon Lee (2006. 6.15~6.17) Phenotypic performance and environmental risk assessments of genetically modified herbicide-tolerant Zoysia grass (*Zoysia japonica* Steud.). pp. 97. 육종학회·한국식물생명공학회 공동심포지엄 및 학술대회

배태웅, 송서영, 송인자, Satoshi Nishiguchi, 전영주, 강지연, 윤필용, 배창휴, 류기중, 이효연 (2006.6.15~6.17) 방사선 조사에 의해 유도된 돌연변이 잔디의 형태적 특성연구. pp: 98. 한국육종학회·한국식물생명공학회 공동심포지엄 및 학술대회

Tae-Woong Bae, Enkhchimeg Vanjildorj, Song-Sook Yang, Ok-jin Hwang, Chang-Hyu Bae, Shin-Young Park, Key-Zung Riu, Jong-ll Kim, Hyo-Yeon Lee and Pill-Soon Song (2006.6.21~6.23) Gentically modified Zoysia grass (*Zoysia japonica* Steud.) and it`s environment risk consideration. pp. 20. Crop Functional Genomics 2006.

Tae-Woong Bae, Enkhchimeg Vanjildorj, Satoshi Nishiguchi, Song-Sook Yang, Ok-jin Hwang, Pil-Yong Yun, Chang-Hyu Bae, Shin-Young Park, Key-Zung Riu, Jong-ll Kim, Pill-Soon Song and Hyo-Yeon Lee (2006.8.13~6.19) Environment Risk Assessment of Genetically Modified Herbicide-resistant Zoysiagrass (*Zoysia Japonica* Steud.). pp. 426. 27th International Horticultural Congress and Exhibition. COEX (Convention and Exhibition),Seoul, Korea.

Tae-Woong Bae, Enkhchimeg Vanjildorj, Tae-Woo Kang, Seo-Young Song, Song-Sook Yang, Chang-Hyu Bae, Shin-Young Park, Yong-Eok Lee, Ki Hyun Ryu, Pyung Ok Lim, Kye-Zung Riu, Jeong-Il Kim, Pill-Soon Song and Hyo-Yeon Lee (2006.9.24~9.29) Environment Risk Assessment of Genetically Modified (GM) Herbicide-resistant Zoysiagrass (*Zoysia Japonica* Steud.): Gene flow. 9th International Symposium on the Biosafety of Genetically modified Organisms. RAMADA, Jeju Island, Korea.

배태웅, Enkhchimeg Vanjildorj,, Satoshi Nishiguchi, 강태우, 송인자, 전영주, 송서영, 양지홍, 윤필용, 박신영, 이재천, 류기헌, 이용억, 임평옥, 고영진, 류기중, 송필순, 이효연 (2006. 11. 10) 대학연구기관에서의 GMO 실용화: 비선택성 제초제저항성 들잔디 개발 및 환경위해성평가. 한국식물생명공학회 심포지엄, 대구 인터불고 호텔.

Biographical sketch

BIOGRAPHICAL SKETCH			
	Name: 배 태 웅 (Bae Tae-Woong) **Date of birth :** November 15th 1972 (- 1972. 10. 10) **e-mail:** bae2020@hanmail.net **Address:** **Phone number:**		
INSTITUTION AND LOCATION	**DEGREE**	**YEAR**	**FIELD OF STUDY**
Cheju National University	Ph.D.	2007	Plant biotechnology
Sunchon National University	MSc	2002	Organic Chemistry and Education
Sunchon National University	BSc	1998	Chemistry

Employment

7/2002-6/2003: Reacher, Department of Natural Rubber, Kumho Life and Environmental Science Laboratory, Kwangju, Korea.

9/1999-8/2000: Assistant teacher of Experiment, Department of Chemistry, Sunchon National University, Sunchon, Korea.

감사의 글

많은 시간이 흘렀다. 내 인생의 아름다운 시간이 이작은 공간에 차곡차곡 쌓여왔다. 사람에게 있어서 삶의 의미는 자신의 소중한 것을 지키며 살아가는 것이다. 난 무엇을 위해서 이토록 험한 길을 걸어왔는가? 내가 지켜야 할 것은 무엇인가? 시간이 흐르면 원하는 것이 얻어지는 것이 아니라 그토록 원하는 것을 위해 노력하는 시간이 나에게 답을 줄 것이다. 눈이 내린다. 펄펄 날리는 눈을 맞으며 지난 시간 함께 했던 수많은 고마운 사람들을 생각한다.

내 인생의 아름다운 날들에 한결같은 사랑으로 학문적인 지도와 삶의 세심한 배려를 아끼지 않으신 이효연 교수님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

그리고 학문적 충고와 연구에 도움을 주신 송필순 교수님, 류기중 교수님, 농촌진흥청 김호일 박사님과 실험을 수행하는 동안 세밀한 충고와 조언을 이끌어주신 한라대학교 박신영 교수님, 동국대학교 이용억 교수님, 제주대학교 임평옥 교수님, 전남대학교 김정일 교수님, 서울여자대학교 류기헌 교수님, 제주대학교병원 이재천 교수님, 한국생명공학연구원 류병태 박사님, 제주하이테크산업진흥원 윤필용 박사님, 한국농업의 선구자 이범 사장님께 진심으로 감사드립니다.

또한 학위과정을 통해서 학문적 가르침으로서 성심껏 지도해 주신 제주대학교 류장걸 교수님, 고정삼 교수님, 김찬식 교수님, 현해남 교수님과 학문적 토대를 만들어 주신 순천대학교 최대옥 교수님, 신은주 교수님, 하동수 교수님, 곽지훈 교수님, 장만채 교수님, 배창휴 교수님께도 감사를 드립니다.

학문적 동지이자 충고자로서 조언을 아끼지 않은 송인자 박사, Enkhchimeg Vanjildorj 박사, Satoshi Nishiguchi, Thummala Chandrasekhar 박사, 이형률 박사, 강태우 박사, 부경환 박사, 양지홍 박사, 이도승님과 금호생명환경 연구소의 양성숙님, 김용민님, 이지연님께 감사의 마음을 전합니다. 그리고 실험실에서 함께 열심히 땀을 흘렸던 장경인, 오성은, Pam Chi Hoa와 많은 도움을 주면서 열심히 실험에 열중하고 있는 Burnee, 전영주, 양대화, 양성년, 우종수, 강지연, 고승희, 강은주, 김해든과 호주에서 잠시 방문한 최종원에게 고마움을 전합니다.

그리고 언제나 힘과 용기를 실어준 다정한 우리의 누나, 최수정 선생님과 고미영 선생님께 고마움을 전합니다. 그리고 먼 곳에서 열심히 응원해준 학순이형, 희진, 유미, 지현, 은정, 주은이와 사회생활의 일선에서 땀을 태우며 아낌없는 격리를 해준 친구 동준이, 화학과 동기들, 나의 바카스 광심, 나의 피부회복을 위해 화장품을 공급해준 인성, 그리고 언제라도 동지들, 조약돌 식구들, 정현이형, 규회, 현승이, 영호에게 고마움을 전합니다.

오늘 하루가 늘 아름답도록 만들어 준 사람, 오랜 시간동안 사랑으로 힘을 주는 사람, 학문적 동반자이자 인생의 동반자인 소중한 내사랑 송서영과 넓은 이해심으로 지켜봐 주신 내사람의 부모님께도 감사를 드립니다.

끝으로 오랜 세월동안 함께한 덕희 가족들, 경희 가족들, 동생 태진이에게 고마움을 전하고, 지금까지 변함없는 사랑으로 보살펴 주신 아버지, 어머니께 이 논문을 바칩니다.

2006년 12월 17일

배 태 웅 올림.