

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <div data-bbox="183 1384 391 1496" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 100px;"> <p>주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p style="text-align: center;">(15 포인트 고딕체열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p>좁 나 방 내 성</p> <p>G M 양 배 추 의</p> <p>수 출 용 계 통</p> <p>및</p> <p>품 종 개 발 과</p> <p>G M 양 배 추 의</p> <p>환 경 위 해 성 평 가</p> <p>농 림 수 산 식 품 부</p> <p>↑ 3cm ↓</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <div data-bbox="614 470 877 560" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 20px;"> <p style="text-align: center;">발간등록번호</p> <p style="text-align: center;">11-1543000-000958-01</p> </div> <p style="text-align: center;"> 좁나방 내성 GM양배추의 수출용 계통 및 품종개발과 GM양배추의 환경위해성 평가 (Development of the export-oriented GM lines and varieties of cabbage resistant to Diamondback moth and compilation of a regulatory dossier through environmental risk assessment study) </p> <p style="text-align: center; margin-top: 40px;">(주) 농우바이오</p> <p style="text-align: center; margin-top: 40px;">농림축산식품부</p>
--	--	---

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “좁나방 내성 GM양배추의 수출용 계통 및 품종개발과 GM양배추의 환경위해성 평가” 과제 (1세부과제 “좁나방 내성 GM양배추의 수출용 계통육성 및 품종화”, 2협동과제 “좁나방 내성 GM양배추 계통의 분자유전학적 분석”, “좁나방 내성 GM 양배추의 환경위해성평가”)의 보고서로 제출합니다.

2015년 8월 14일

주관연구기관명 : (주)농우바이오

주관연구책임자 : 한 지 학

연 구 원 : 신 종 섭

연 구 원 : 김 보 민

연 구 원 : 박 영 수

연 구 원 : 정 민

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 정 순 천

연 구 원 : 백 인 순

연 구 원 : 김 지 홍

연 구 원 : 배 정 은

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 김 창 기

연 구 원 : 고 은 미

연 구 원 : 김 영 중

연 구 원 : 문 두 범

요 약 문

I. 제 목

좁나방 내성 GM양배추의 수출용 계통 및 품종개발과 GM양배추의 환경위해성 평가

II. 연구개발의 목적 및 필요성

CryIAc1 유전자를 이용하여 GM양배추를 대량 개발하고 배추좁나방 저항성 양배추를 선발한 다음 수출용 계통을 육성하면서 위해성평가 자료를 확보하고자 함

III. 연구개발 내용 및 범위

1. *CryIAc1* 유전자를 이용하여 GM양배추를 대량 개발
2. 배추좁나방 내성 GM양배추 선발
3. 배추좁나방 내성 GM양배추의 수출용 계통 구축
4. 배추좁나방 내성 GM양배추 계통의 분자유전학적 분석
5. 배추좁나방 내성 GM양배추의 환경위해성평가

좁나방 내성 GM양배추의 수출용 계통육성 및 품종화(1세부과제: 농우바이오 한지학)

CryIAc1 유전자를 이용한 배추좁나방 내성 GM양배추 개발하고, PCR과 Southern blot으로 확인하여 독립적인 GM양배추 확보한다. 배추좁나방 내성인 GM양배추 T세대를 하우스에 정식 재배하여 배추좁나방 채취하여 저항성 조사하고, 배추좁나방 사육 시스템 구축하여 chamber내에서 저항성 조사하였다.

GM양배추 계통의 분자유전학적 분석(제1협동과제: 한국생명공학연구원 정순천)

개발된 GM 양배추 집단에서 단일 복제수의 유전자가 intergenic region에 삽입된 우량 event를 선발하고 선발된 event의 event-specific 검출 kit 제작, 도입유전자의 비의도적 변이 발생, 도입유전자의 유전적 안정성 및 도입 유전자 인접 유전자의 비의도적 발현 변이 유무를 시험하였다.

좁나방 내성 GM 양배추의 환경위해성평가(제2협동과제: 한국생명공학연구원 김창기)

Bt 양배추의 환경위해성평가 방법 확립을 위하여 *Bt* 양배추의 표현형질 평가, 양배추 재배 토양의 물리화학적 특성 분석, 토양미생물에 대한 영향 평가, *CryIAc1* 단백질의 대량발현, 절지동물 군집에 미치는 영향 평가, 비표적생물체에 미치는 영향 평가, *Bt* 양배추 포장에 서식하는 절지동물 체내의 *CryIAc1* 단백질 정량분석, 화분특성 평가, 유전자 이동성 평가를 수행하였다.

IV. 연구개발결과

좁나방 내성 GM양배추의 수출용 계통육성 및 품종화(1세부과제: 농우바이오 한지학)

*CryIAc1::pNW2300*을 이용하여 형질전환을 수행한 결과 56개체의 T₀ 형질전환체를 확보하였다. 56개체의 T₀ 형질전환체 중 제1협동과제에 여러 가지 분자유전학 실험 결과 single copy와 유전자 도입위치 분석으로 event 후보 2개체를 선발하였고, 내충성 실험을 진행한 결과 C95

라인이 강한 내충성을 갖는 것을 확인하였다. 선발된 계통은 T₂세대 확보하였고, T₃ 세대진전하기 위해 재배중이며, BC₁T₀ 세대 확보하여 내충성 시험 결과도 강한 내충성을 확인하였다. *CryIAC1::pPZP*을 이용한 *bar* 선발 형질전환을 통해 1,723개체의 소식물체를 얻어 PCR를 이용하여 transgene 검정하여 양배추 형질전환체 26개체(T₀ B1~B23-2)를 확보하였으며, 2개체(B10, B13)에서 one copy와 event 선발을 위한 분석을 진행 중이며, T₁세대진전 중이며, 종자 확보하여 내충성 시험 예정이다.

GM양배추 계통의 분자유전학적 분석(제1협동과제: 한국생명공학연구원 정순천)

선발유전자 *nptII* 또는 *bar*를 사용하여 선발한 70여점의 GM 양배추 집단을 분석하여 2점의 우량 event(C85-1 및 C95)를 선발하였다. 둘 중에서 좀나방 내성이 더 강한 C95 event의 event-specific detection kit을 제작하였으며, 도입유전자는 형질전환 동안 비의도적인 변이가 일어나지 않았으며, 본 line에서 도입유전자의 위치에 인접한 유전자의 발현은 변화하지 않음을 northern blot 분석과 real-time quantitative PCR로 확인하였다.

좀나방 내성 GM 양배추의 환경위해성평가(제2협동과제: 한국생명공학연구원 김창기)

선발된 C85와 C95 *Bt* 양배추를 모본(AD126)과 재배 시험한 결과 농업적 표현형질은 모본과 차이가 없었다. *Bt* 양배추와 모본의 근권 세균 군집 구조를 비교하였을 때, 계통에 따른 차이는 없었으며, 양배추의 성장 단계에 따른 차이만 관찰되었다. *Bt* 양배추는 표적곤충인 배추좀나방과 배추흰나비의 밀도를 감소시켰으나, 이를 제외한 비표적 절지동물의 군집에는 영향을 미치지 않았다. 모본과 비교해 보았을 때 *Bt* 양배추는 복숭아혹진딧물, 늑대거미, 톡토기 등 비표적생물체의 성장 또는 번식에 영향을 미치지 않았다. 서양뒤영벌을 이용하여 *Bt* 양배추로부터 모본으로의 유전자 이동성을 평가하였을 때 근접 재배하는 경우 유전자이동 빈도는 약 19.7%로 나타났다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. GM양배추의 계통화
2. 안정된 계통이 구축되면 조합작성을 통해서 품종구축
3. 위해성 평가 자료의 심사청구 및 품종등록
4. GM양배추의 환경위해성 평가 방법 구축
5. GM양배추의 환경위해성 심사청구 및 품종 등록

SUMMARY

The original proposal of this project was to 1) develop GM cabbages resistant to diamond back moth (DBM) by transforming *CryIAc1* gene into cabbages and 2) obtain an “event” line through the line breeding and selection as well as molecular analysis and 3) perform the risk assessment study for preparing submission a safety report for the GM cabbage event. For this, three research groups were collaborated studying three independent projects separately. The first group, Nongwoo Bio (1), worked on development of the GM cabbage and line breeding, and finally obtained the event line. The second group, KRIBB led by Dr. Jeong (2), studied the analysis of molecular characteristics of the GM cabbage and the third group, KRIBB led by Dr. Kim (3), worked on the environmental risk assessment for the GM cabbage.

(1) Cabbages was genetically transformed with *CryIAc1* under Kanamycin selection using the *Agrobacterium*-mediated transformation method. A total of 840 transformants were obtained and 56 cabbages were selected by PCR analysis. Southern blot analysis showed 2 T₀ cabbages contained a single copy of *CryIAc1* gene. The GM line C85-1 and C95 contained a single copy of transgene and the insert did not disrupt the coding region (intergenic), indicating those lines are event lines.

An Incubating system for breeding DBM established so that the resistant GM cabbages were selected at the seedling stage of cabbage in the chamber. T₁ seeds of the event line (C95) were resistant to the DBM at a rate of 100% resistance. The selected cabbages were self-crossed and the T₂ cabbages resistant to DBM were also selected.

Also GM cabbages with a different vector that contains *bar* gene as a selection marker was developed due to the international trend accepting *bar* selection instead of antibiotic selection. So far 2 T₀ cabbages have been obtained with *bar* selection.

(2) We aimed to screen a group of developed GM cabbage lines for elite events whose transgene was inserted into an intergenic region in a single copy status. Then, we conducted development of an event-specific detection kit for the selected elite events and investigated unintended mutation and genetic stability of the inserted gene and finally unintended expression changes of genes flanking the inserted gene.

Two elite events (C85-1 and C95) were screened from approximately 70 GM cabbage lines selected with *nptII* or *bar*. Of the two events, C95 that showed stronger tolerance to Diamondback moth has been further analysed. An event-specific detection kit of C95 was developed. Our results suggested that the inserted gene did not obtain any unintended mutation during the transformation, is stably inherited, and does not affect expression levels of its flanking genes.

(3) We assessed the phenotypic characteristics of *Bt* cabbage and the effects of *Bt* cabbage on soil bacterial communities and analyzed the physicochemical properties of soil. The effects of *Bt* cabbage on target and not-target arthropod communities and on non-target organisms were also assessed. We also measured the concentrations of *CryIAC1* protein in the bodies of arthropods occurred on *Bt* cabbage. We assessed the pollen viability and gene flow from *Bt* cabbages to wild-type controls.

The phenotypic characteristics of *Bt* cabbage and non-*Bt* controls were not significantly different. The structures of rhizosphere bacterial communities were not affected by cabbage genotypes (GM vs. non-GM) but significantly affected by cabbage growth stages. The abundance of target pests, *Plutella xylostella* and *Pieris rapae*, were significantly lower on the *Bt* cabbage than on the non-GM controls. However, the structure of non-target arthropods were not significantly affected by different cabbage line. *Bt* cabbage had no effects on the growth or reproduction of *Myzus persicae*, *Pardosa astrigera* and *Paronychiurus kimi*. We found that the average gene flow frequency from *Bt* cabbage to non-GM cabbage was 19.7% in the field.

CONTENTS

Chapter 1. R&D project summary and target goal -----	11
1. economic and industrial importance -----	11
2. Necessity of R&D -----	11
3. R&D purpose and Scope -----	12
 Chapter 2. Technology development status -----	14
1. Technology development status in Korea -----	14
2. Technology development status in oversea -----	14
 Chapter 3. Research results -----	15
1. Breeding of GM cabbage line and variety -----	15
1) Development of GM cabbage with <i>CryIAcI</i> -----	15
2) Protein expression analysis by immuno strip -----	17
3) Establishment of DBM rearing in chamber and feeding test method -----	19
4) Selection of GM cabbage T generation in plastic house -----	27
5) Monitoring of DBM near the GMO houses -----	33
 2. Molecular genetic analysis of GM cabbage lines tolerant to Diamondback moth -----	36
1) Screening of elite event from a group of developed GM cabbage lines -----	36
2) Molecular genetic analysis of the selected elite GM cabbage events -----	100
 3. Environmenatal risk assessment of DBM resistant <i>Bt</i> cabbage -----	116
1) Phenotype analysis of DBM resistant <i>Bt</i> cabbage -----	116
2) Analysis of physical and chemical characteristics of cultivation soil for cabbage ----	129
3) Effect of soil micro-organism to DBM resistant <i>Bt</i> cabbage -----	132
4) Large expression of <i>CryIAcI</i> protein -----	137
5) Effect evaluation of <i>Bt</i> cabbage to arthropod population -----	139
6) Effect evaluation of <i>Bt</i> cabbage to non-target organism -----	166
7) Quantification of <i>CryIAcI</i> protein in bodies of arthropods living in <i>Bt</i> cabbage cultivation area -----	178
8) Pollen characteristics analysis of <i>Bt</i> cabbage -----	179
9) Gene transfer analysis of <i>Bt</i> cabbage -----	183
 Chapter 4. Levels of achievement and contribution -----	187
1. Levels annual achievement of research target and performance -----	187
 Chapter 5. Plans for how to use the research results -----	188

1. Research achievement and plans for usage -----	188
2. expectational result -----	188
Chapter 6. Science and technology information obtained from oversea -----	191
Chapter 7. Research facility and equipment status -----	192
Chapter 8. Safety management performance of Laboratory -----	193
Chapter 9. Reference -----	194

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	11
1절 경제적·산업적 중요성 -----	11
2절 연구개발의 필요성 -----	11
3절 연구개발의 목적 및 범위 -----	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	14
제1절 국내 연구 현황 -----	14
제2절 국외 연구 현황 -----	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	15
제1절 좁나방 내성 GM양배추의 수출용 계통육성 및 품종화 -----	15
1. <i>CryIAc1</i> 유전자를 이용한 양배추 형질전환체 개발 -----	15
2. 형질전환체 immuno strip을 통한 단백질 발현 검정 -----	17
3. 배추좁나방 chamber 사육 방법 구축 및 내충성 양배추 feeding test -----	19
4. GM양배추 T세대의 하우스 선발 -----	27
5. 배추좁나방 실외 모니터링 -----	33
제2절 좁나방 내성 GM양배추 계통의 분자유전학적 분석 -----	36
1. GM 양배추 형질전환 집단의 분석을 통한 우량 event의 선발 -----	36
2. 선발된 우량 event의 분자유전학적 분석 -----	100
제3절 좁나방내성 <i>Bt</i> 양배추의 환경위해성평가 -----	116
1. 좁나방 내성 <i>Bt</i> 양배추의 표현 형질 분석 -----	116
2. 양배추 재배 토양의 물리화학적 특성 분석 -----	129
3. 좁나방내성 <i>Bt</i> 양배추의 토양미생물에 대한 영향 -----	132
4. <i>CryIAc1</i> 단백질의 대량 발현 -----	137
5. <i>Bt</i> 양배추의 절지동물군집에 미치는 영향 평가 -----	139
6. <i>Bt</i> 양배추의 비표적 생물체에 미치는 영향 평가 -----	166
7. <i>Bt</i> 양배추 야외포장에서 서식하는 절지동물 체내의 <i>CryIAc1</i> 단백질 정량분석 -----	178
8. <i>Bt</i> 양배추의 화분특성 조사 -----	179
9. <i>Bt</i> 양배추의 유전자 이동성 평가 -----	183
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	187
제 1절 연구개발의 최종목표 및 주요내용 -----	187
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	188
제 1절 연구개발결과의 활용방안 -----	188

제2절 기대성과 -----	188
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	191
제 7 장 연구시설·장비 현황 -----	192
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적 -----	193
제 9 장 참고문헌 -----	194

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 경제적·산업적 중요성

농업생명공학 응용을 위한 국제서비스(ISAAA)의 발표(2015)에 의하면 생명공학작물의 재배면적은 1996년 170만ha에서 2014년 181.5백만ha로 약 100배 증가하였다. 또한 전 세계적으로 28개국에서 1800만 명에 이르는 농민이 GM작물을 경작하고 있으며 2014년 GM작물 총 경작면적은 세계 총 작물경작지의 약 10%에 달하고 있다. 총 12작물(옥수수, 콩, 면화, 유채, 사탕수수, 알팔파, 파파야, 호박, 토마토, 피만, 포플라, 가지)이 재배되고 있으며 특히 콩의 82%; 면화의 68%; 옥수수의 30%, 캐놀라의 25%가 GMO이다. 국가마다 다르지만 미국에서 생산하는 콩과 옥수수 약 95%는 GM작물이며 GM작물의 특성은 제초제저항성, 곤충저항성, 바이러스저항성, 아밀로스프리 등이며 특히 제초제저항성과 곤충저항성 형질이 같이 들어가 있는 경우가 늘고 있다(stacking). 전체 GM 종자시장은 1996년 0.93억불에서 2014년 157억불로 성장하였으며 전체 종자시장(약 450억불)의 35%에 해당되어 인류역사상 농업에 특정 기술이 이렇게 빠르게 적용되는 경우는 없었으며 수확량 증가와 농약절감에 지대한 역할을 하고 있다. 또한 채소인 호박, 토마토, 피만 GM채소는 재배허가를 받았지만 실제로 GM종자가 유통되고 있지는 않으나 2013년서 부터 GM가지가 처음으로 방글라데시에서 소량 재배 중에 있다.

Brassica속 식물에는 경제적으로 중요한 작물들이 많이 속해 있으며, 그 종류도 매우 다양하다. 세계 채소 재배면적 5위안에 드는 양배추의 종자시장은 약 5,100억 원이며 전 세계적으로 약 1,700 ton을 생산하고 있다. 양배추는 기능성 채소로 각광을 받고 있으며 다른 채소에는 거의 없는 항궤양 성분인 비타민 U를 가져 위장에 좋은 효능을 가진다. 전 세계 모든 음식에서 긴요하게 사용되고 있는 세계적인 채소 작물임으로 육성이 절대적으로 필요하다. 중국이 약 500 ton의 양배추 종자를, 인도가 약 50 ton의 종자를 생산하고 있으며 러시아는 약 20 ton의 종자를 생산하면서 약 200억원 정도의 종자시장을 형성하고 있다. 중국과 인도는 모두 GM작물에 대한 재배와 시장이 형성되어 있으며, 연작장해와 기후변화로 내재해성 품종과 내병충성 품종의 요구도가 증가 하고 있다. 중국용, 인도용 배추좁나방 내성 수출용 양배추를 개발하면 GM시장을 현지에서 형성할 수 있을 것이다.

국내 양배추 종자시장은 2013년 약 45억 원이며(한국종자협회, 2014) 주로 해외 다국적기업의 종자로부터 시작하였기에 전통 육종기간은 비교적 짧다. 국내 수요보다는 수출 비중이 크며 해외 수출 증대를 위한 신품종 개발이 절실하다. 배추좁나방 내성 양배추 개발은 세계시장에 중요한 역할을 할 것으로 사료 된다. 곤충 내성이라는 유전자원을 확보하는 것은 기초과학적 및 산업적으로 매우 중요하게 다루어지고 있으며 특히 육종 관련이나 형질전환 동식물체에 적용할 수 있는 유전자원들을 확보하는 것은 생물다양성 확보차원에서 국가적으로 매우 중요하다.

2. 연구개발의 필요성

지구 온난화에 따른 온도 증가가 열대권의 범위를 확장하면서 곤충의 서식처가 확대되고 있다. 곤충의 번식은 곤충이 매개하는 여러 미생물의 번식으로 이어져 결국 병원균의 전이확대

로 생태, 농업에 미치는 영향이 매우 크다. 작물의 생산성 향상에 크게 기여해온 화학합성 농약의 장기간 사용 및 남용으로 인하여 환경오염, 생태계 파괴 등의 문제가 야기될 뿐만 아니라 농약에 대한 저항성을 갖는 병원균이나 곤충이 출현하게 되기 때문에, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 무농약 방제개발 및 대처방안인 해충저항성 GM작물 개발이 절실히 요구되고 있는 것이 현실이다. 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 세계적으로 분포하는 곤충으로 십자화과 작물에 심하게 피해를 입히고 있는 대표적 나비목 곤충으로서 유충 때 작물 잎을 갉아먹음으로서 작물의 상품성 가치를 떨어뜨릴 뿐만 아니라 작물의 생육을 방해함으로써 절대적으로 방제를 해야 한다. 배추좀나방 유충이 어린 때는 약제에 대하여 매우 민감하여 살충력이 높으나 크게 자라면 내성이 강해지므로 방제에 어려움이 있다. 그러나 지속적으로 살충체를 살포해야하는 방제 방법으로 환경오염을 야기하기 때문에 이에 대한 대책이 요구 된다(Crickmore 등, 2005).

바실러스 추린기엔시스 (*Bacillus thuringiensis*) 박테리아는 특이 독소를 생산하는데, 이 독소는 특정 곤충을 죽게 만드는 역할을 함으로서 일반 살충제보다는 매우 안전한 생물농약으로 오래전부터 사용하였다. 이 독소는 *B. thuringiensis*의 *Bt* 유전자로부터 발현되는데(CryI type 유전자로서 CryI type 단백질 생성) 특히 나비목 곤충의 중장(midgut)에서 활성화된다(Sarjeet, 1995). 이 독소는 중장의 상피조직에 있는 수용체(receptor)와 결합하고 조직 내로 침투하여 조직을 용해시키면서 결국은 곤충을 죽게 하며 대부분의 나비목 곤충들은 CryIAa, CryIAb, CryIAc 독소와 결합하는 수용체가 있다고 알려져 있다(Johnsone 등 1998, Horte 등 1989). 곤충병원성 미생물인 *Bt*의 살충성단백질은 현재까지 보고된 살충성 단백질 중 가장 강력하고 빠른 살충력을 보이는 반면 인축에는 안전하고 환경에 해가 없어, 이들 유전자의 형질 전환에 의해 해충으로부터 작물을 보호하는 기술이 현재까지 가장 보편적이면서, 가장 효율적인 방법으로 인정되고 있다. 지금까지 CryI type 유전자발현으로 GM 작물인 옥수수, 콩, 면화, 유채 등에서 많은 방제효과를 얻었으며 선진국 농민이나 저개발국가 농민들이 매우 선호하고 있다. 따라서 이 Cry1 type 유전자를 이용하여 배추좀나방 내성 엽채류를 확보할 필요 있으며 농가에서는 이를 재배하여 농약으로 인하여 환경오염, 생태계 파괴 등으로부터 벗어날 수 있으며 생산성증가, 비용감소 등으로 혜택이 많아질 것으로 기대된다. 국내에서도 5-8월 사이 좀나방에 의한 피해가 많이 발생되는데, 국내의 양배추 종자 시장은 현재 약 1.5 ton 생산하고 있으며 종자시장은 약 20억원 정도로 작으며 그것도 수입종자가 95%를 차지하고 있다. 즉 국내에서 개발된 종자가 국내에서 재배되는 경우가 매우 미진하다. 그러나 해외수출용 종자는 국내에서 개발하고 있으며 2009년에 약 250만 불을 수출하였으며, 수입대체와 더불어 수출 증대를 위해서 좀나방 내성 양배추의 육성이 절실히 요구된다(Kim 등, 1998). 따라서 십자화과 작물 중 세계적으로 시장 가치가 매우 큰 양배추에 *Bt* 유전자를 삽입하여 형질전환 함으로써 좀나방 내성 양배추를 선발하고 계통과 품종을 개발한 다음, GM 작물의 상업화 전 단계에서 요구되는 위해성 심사를 거치기 위한 환경위해성 평가를 위한 평가자료 기술개발이 필요하다. Romeis 등(2006)에 의하면 곤충을 포함한 절지동물이 유전자변형작물에 노출되었을 때 미치는 영향에 대한 연구는 *Bt*작물의 환경위해성 평가 단계 중 주요한 과정이며, 이를 위해 유전자변형작물의 직접적 노출이 될 수 있는 실내실험과 실제 환경을 반영할 수 있는 야외포장에서의 연구가 같이 이루어져야한다고 제시하였으며, 이와 같은 이유로 실내와 야외포장 환경에서의 *Bt*작물이 절지동물에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 국내에서 이루어진 연구들의 경우, 김 등(2008)은 *Bt*배추의 화분을 비표적 초식자인 누에의 애

벌레에 노출시키면서 생존과 성장의 차이를 알아보았으며, 이 등(2014)은 *Bt*벼 포장에서의 비표적 포식자인 거미의 군집을 비교하였다. 국외의 경우 실내와 야외에서의 *Bt*작물의 초식자, 포식자 및 기생자를 포함한 비표적 절지동물에 미치는 영향에 대한 수많은 연구들이 이루어져 있다(Naranjo 2009, Carpenter 2011).

3. 연구개발의 목적 및 범위

가. 연구개발의 목적

본 연구는 *CryIAC1* 유전자를 이용하여 GM양배추를 대량 개발하고 배추 좀나방 저항성 양배추를 선발한 다음 수출용 계통을 육성하면서 위해성평가 자료를 확보하고자 하였다.

나. 연구 범위

(1) *CryIAC1* 유전자를 이용한 GM양배추를 대량 개발 및 배추좀나방 내성 GM양배추 확보

(가)*CryIAC1* gene을 이용한 양배추 형질전환체 개발

(나)형질전환체 immuno strip을 통한 단백질 검정

(다)배추좀나방 chamber 사육 방법 구축 및 내충성 양배추 feeding test

(라)GM양배추 T세대의 하우스 선발

(마)배추 좀나방 실외 모니터링

(2) 좀나방 내성 GM양배추 계통의 분자유전학적 분석

(가)GM 양배추 형질전환 집단의 분석을 통한 우량 event의 선발

(나)선발된 우량 event의 분자유전학적 분석을 통한 GM 양배추의 위해성평가 심사자료 도출

(3) GM 양배추의 환경위해성평가

(가)GM양배추와 모본간의 농업형질조사

(나)유전자이동 평가

(다)종자의 휴면과 발아 특성 평가

(라)잡초화 가능성 평가

(마)농업 특성 평가

(바)화분 활력 및 형태 평가

(사)토양미생물상 변동 평가

(아)곤충상 변동 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 연구 현황

내충성 관련 연구는 서울대학교 제연호 교수팀이 여러 가지 살충성 *Bt* 유전자를 개발하여 다양한 내충성관련 연구를 진행하였으며(Park, 2000; Roh 등 2007), 일반 작물에 형질전환을 통하여 새로운 내충성 작물 개발을 진행 중이다. 농진청 농과원에서 *Bt* 유전자를 modify하여 배추좀나방 내성 배추(Park 등 2000)와 흑명나방 저항성 벼를 개발한 적이 있으며(Nam 등 2009), 농우바이오에서는 담배나방 내성 GM고추, 배추좀나방 내성 GM브로콜리와 GM 컬리플라워, GM배추를 개발한 경험이 있다. 십자화과 작물 중 배추에 대한 형질전환 연구가 가장 활발하며, 한국에서는 제초제 저항성, 내충성 저항성, 토코페롤 함유, 글로코시놀레이트 배추 등 여러 건이 연구 중에 있지만 세계 3대 채소 작물 중의 하나인 양배추는 세계적으로 중요한 작물인 것에 비해 형질전환 양배추에 관한 연구가 많지 않다. 현재까지 국내에서 양배추 형질전환 관련 발표는 단 한건 보고되었으며, 이는 1998년 포항공대에서 꽃양배추 ‘은배’라는 품종을 이용하여 *Proteinase Inhibitor II (PI-II)* 유전자를 이용하여 형질전환을 진행하여 PCR 분석과 Southern blot 분석을 통해 *PI-II* 유전자와 동일한 것으로 판단되는 약 500bp 위치에서 band를 확인한 보고가 있었다(Kim 등, 1998). 농우바이오는 기존 논문에서 이용한 자엽이 아닌 하배축을 사용하여 형질전환 개발 시스템을 구축하였으며 GM양배추를 개발하였다.

2. 국외 연구 현황

해충 저항성 GM 콩, 옥수수, 목화, 유채 등 4개 작물에 대해서 여러 다국적 기업들이 많은 품종을 개발하고 상업화되었다. 국외에서 국내와 마찬가지로 내충성 양배추 형질전환에 관한 논문은 많지 않으며, 배추좀나방 내충성 양배추 형질전환에 관해 발표된 논문은 두 건 있으며(Jin 등, 2000; Paul 등, 2005), 2건의 논문 모두 양배추 F₁ 품종을 이용하여 *Bt gene* 중 *CryIAb* 유전자를 형질전환을 진행하여 내충성 조사를 진행하여 확인한 보고였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절: 좁나방 내성 GM양배추의 수출용 계통육성 및 품종화

1. *CryIAc1* 유전자를 이용한 양배추 형질전환체 개발

가. *CryIAc1*::pNW2300을 이용한 형질전환

CryIAc1 유전자는 농진청 농과원에서 확보하였으며 형질전환을 위해 AD-126 (*Brassica loeracea* var. capitata) 계통의 하배축을 재료로 사용하였다. *CryIAc1* 유전자를 pCAMBIA 1390 벡터에 클로닝한 다음 *Kpn* I, *Nco* I으로 digestion 후 blunting하였다. pCAMBIA2300을 변형한 NW2300 destination 벡터에 *Sma* I 절단 하고 dephosphoylation한 다음 blunting 한 유전자를 삽입하여 Kanamycin 항생제를이용 하여 선발할 수 있게 하였다(그림1-1).

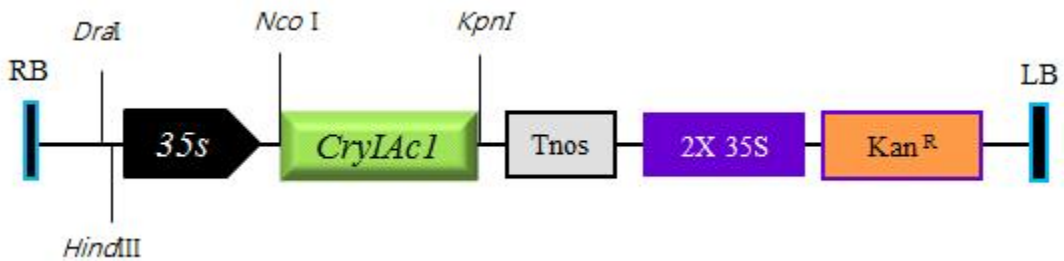


그림 1-1. *CryIAc1*::pNW2300 형질전환 벡터 제작

양배추의 하배축에서 shoot를 유도하는 direct 과정을 거쳐 형질전환을 하였고(그림1-2), 양배추 형질전환체를 확보 한 후 배추좁나방 내성을 갖는 개체를 선발하였으며 원예적으로 뚜렷한 개체를 많이 확보하였다. 매년 약 30여 개체 이상의 T₀를 확보하였지만 개체 당 transgene copy 수가 2-4개로 많아서 single copy 유전자가 들어 있는 개체 확보가 쉽지 않았다. 2010년 에 본 과제에 착수하여 event성 GM양배추를 개발하기 위하여 1, 2년차에 걸쳐 56개체의 T₀ 형질전환체를 확보하였으며, 형질전환 효율은 0.4%이다(표1-1). 56개체의 T₀ 형질전환체 중 제 1협동과제에 여러 가지 분자유전학 실험 결과 single copy로 판명된 event 후보 2개체를 선발 하였다(그림1-3). 이 개체들에 대한 내충성 검정을 진행하여 single copy이며 event성인 GM양 배추를 선발하고 계통을 만들고자 하였다.



그림 1-2. 양배추 형질전환 과정 중 direct로 하배축에서 shoot가 발생하는 모습

표 1-1. Kanamycin을 이용한 양배추 형질전환 효율

Inbred line	Gene	Number of explants	Number of shoot induction (%)	T ₀ plants (%)
AD-126	<i>CryIAc1</i>	15,554	840(5.4%)	56(0.4%)



그림 1-3. C85-1, C95 2개체 종자 채종 위해 교배 모습

양배추 형질전환 과정은 약 7-8개월이 소요되지만 과채류와는 달리 종자 확보를 위하여 저온 처리 과정을 거쳐야 하기 때문에 당해 연도에 종자채종이 어렵다. T₀에서 종자를 수확하고 T₁ 세대에서 내충성 실험을 통하여 선발하여 또 그 다음 세대의 종자를 확보하는 과정은 약 1년 6개월이 소요된다. 따라서 chamber 내에서 내충성 개체를 선발은 기내에서 동시에 이루어지면 효율성을 높이고 시간을 단축하는 효과가 있다. 2013년 6월 T₁ 종자 채종이 완료하였으며 농우바이오에서도 chamber내 내충성 feeding test를 수행하였다.

나. *CryIAc1::pPZP Bar*를 이용한 형질전환

양배추 선발 마커로 kanamycin을 사용한 벡터인 pNW2300은 multi-copy로 들어가는 경향이 있었을 뿐 아니라, 농진청의 LMO 평가위에서 항생제 선발 마커보다 비항생제 선발 마커인 *bar* 유전자를 권유하였기에 2012년 7월 *bar* 선발인 pPZP 벡터를 제작하였다(그림1-4). 결과적으로 *bar* selection을 위하여 ppt 농도 내성 실험구와 배지 호르몬 조사를 거쳐 형질전환 조건을 확립하였고, 신규벡터로 1,723개체의 식물체를 얻어 PCR를 이용하여 transgene 검정하였다. 그 결과 *bar* 유전자로 선발된 양배추 형질전환체 26개체(T₀ B1-B23-2)를 확보하였다(그림 1-5). 제1협동기관에서 분자유전학적 분석을 실시하였으며, 2개체(B10, B13)에서 one copy라는 결과를 얻었다(그림1-6). T₀ B10은 협동기관에서 *bar* 유전자가 소실되어 폐기하였으며, T₀ B13 개체에 대하여 도입유전자 삽입 위치 분석하였다.

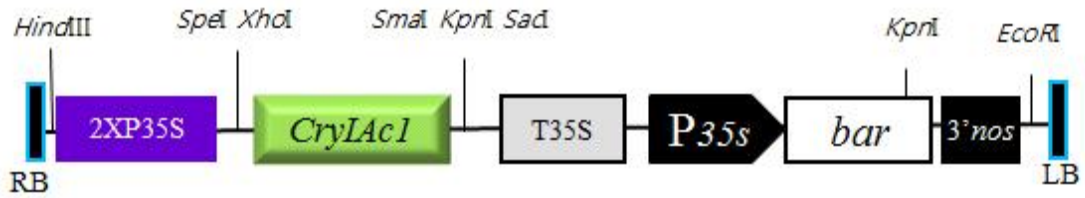


그림 1-4. *CryIAc1::pPZP Bar* 형질전환 벡터 제작

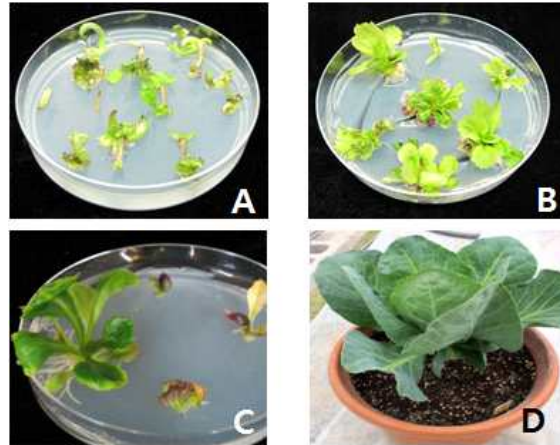


그림 1-5. *CryIAc1::pPZP Bar* 를 이용하여 양배추 형질전환체 개발

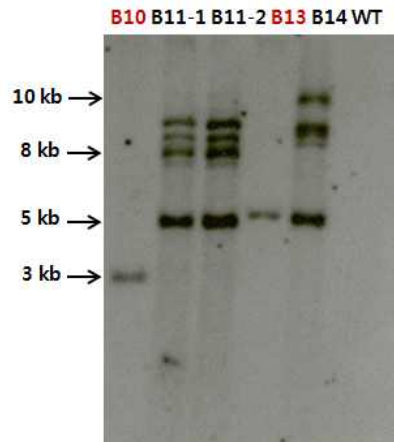


그림1-6. T₀ 양배추의 southern blot 분석

2. 형질전환체 immuno strip을 통한 단백질 발현 검정

가. C85-1, C95 형질전환체의 *CryIAc1* 단백질 발현 검정

1 copy로 검정된 T₀ 형질전환체 C85-1, C95의 *CryIAc1*의 발현유무를 위해 immuno strip을 검정하였다(그림1-7). T₀ 세대에서는 C85-1 형질전환체는 band가 보이지 않았고 C95에서는 단백질 발현 band를 볼 수 있었다. 이후 저온처리 과정을 거친 후 selfing을 통해 T₁ 종자를 채종하였으며, T₁ 종자들을 파종하고 정식한 다음 immuno strip을 이용하여 단백질 발현 여부를 검정하였다. T₁ 개체에서도 C85-1은 여전히 band가 보이지 않는 것으로 보아 *CryIAc1* 단백질의 발현양이 매우 적거나 없는 것으로 보이며, C95에서는 band를 확인할 수 있었다(그림1-7).

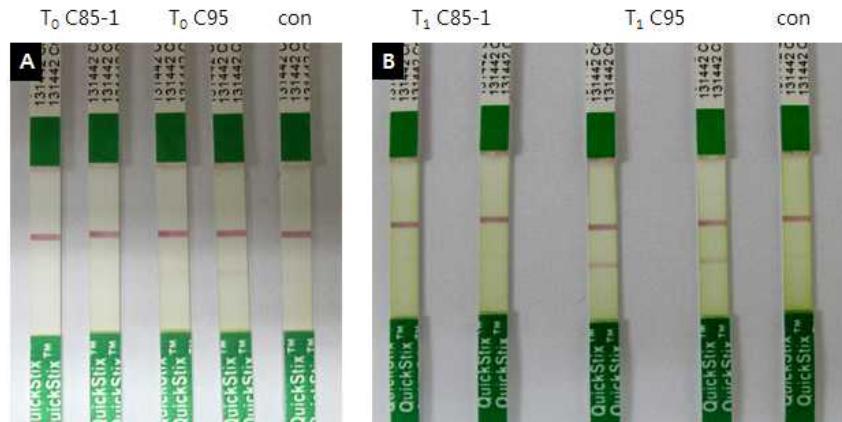


그림 1-7. Immuno strip을 통한 *CryIAcI* 단백질 발현 검정
(A: T₀C85-1, T₀C95, Con, B: T₁C85-1, T₁C95, Con)

나. T₀ B13 형질전환체의 *CryIAcI*, *Bar* 단백질 검정

1 copy로 검정된 T₀ 형질전환체 B13의 *CryIAcI*와 *bar*의 발현유무를 위해 immuno strip 검정을 하였으며(그림 1-8), *CryIAcI* 단백질과 *bar* 단백질 모두 확인하였다. T₁ 세대를 얻기 위하여 T₀ 식물체를 저온처리 후 재배 중이며, 이후 T₁세대 어린 육묘에서 PCR과 immuno strip 검정, 내충성 검정을 수행하고자 한다. 양배추는 작물은 구가 형성되며, 고온기 여름철 재배 기간을 거쳐 종자 확보가 어렵기 때문에 선발된 T₀ B13 개체의 안정적인 세대진전과 종자량 확보를 위해서 양배추의 측아를 삽목 하여 여러 개체로 증식하였다.

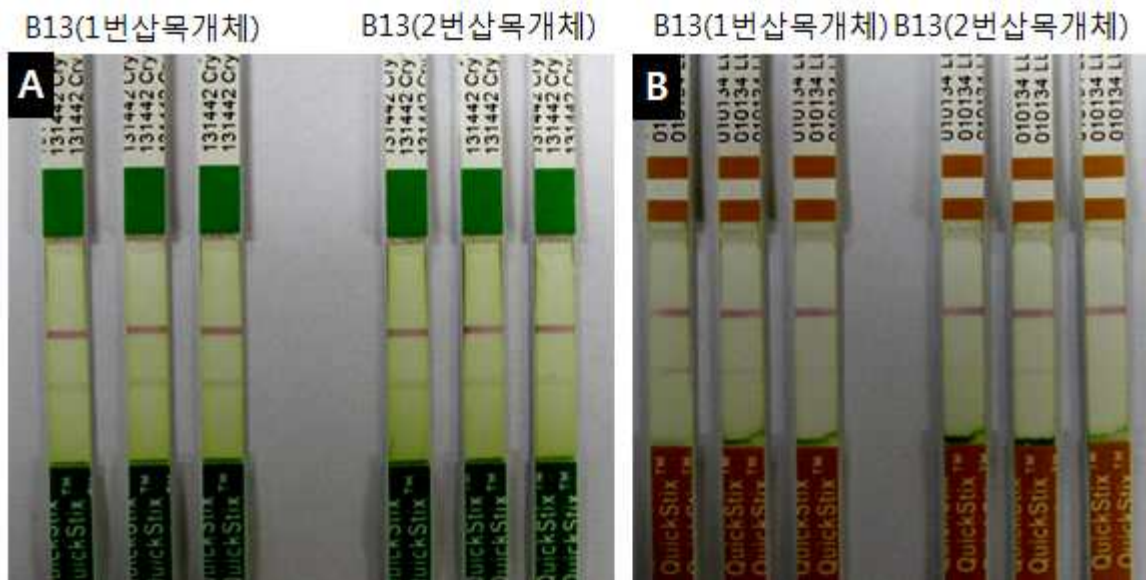


그림 1-8. T₀ B13의 immuno strip (A: *CryIAcI* 단백질, B: *Bar* 단백질)

3. 배추좀나방 chamber 사육 방법 구축 및 내충성 양배추 feeding test

가. 배추좀나방 chamber 사육 방법 구축

배추좀나방을 격리하우스에 투입할 경우 어린 유충을 사용하는데 이들이 자라면서 성충이 되고 산란하는 등 하우스내에서 자체적으로 세대가 잘 유지되어야 실험결과를 제대로 얻을 수 있다. 그러나 가장 큰 문제는 자연상태에서 배추좀나방의 채취기간과 수가 한정적이어서 충분한 수의 애벌레와 성충을 공급하기가 매우 어려웠고 실험이 제대로 수행되지 못하였다. 따라서 실험실에서 배추좀나방을 365일 공급할 수 있는 배양시스템이 필요하였다. 배추좀나방의 가장 알맞은 서식 조건은 23℃~25℃로 30℃가 넘어가면 성충들이 산란을 하지 못한다. 하우스 내에서 내충성 실험을 진행할 때 온도가 30℃가 훨씬 넘거나 20℃ 이하로 내려갈 경우 정확한 실험 data를 얻을 수 없는 경우가 발생할 수 있다. 또한 물에 접촉하면 쉽게 죽게 되는 애벌레의 특성에 따라 여러 차례의 시행착오를 통해 chamber에서 배추좀나방 저항성 test를 할 수 있는 시스템을 구축하였다(그림1-9, 그림1-10). 기내 내충성 검정 시스템은 양배추 어린 육묘 단계에서 검정할 수 있는 장점을 가지며 연중 내내 배추좀나방을 사육하는 동시에 형질전환체에 투입하여 저항성개체를 선발할 수 있다. 배추좀나방의 주요 먹이가 되는 십자화과 작물들은 브로콜리, 컬리플라워, 양배추, 배추, 유채 5 작물의 유식물체를 먹이로 이용하면서 배추좀나방을 사육하였다. chamber 온도는 25℃, 습도는 38% 내외로 유지하였으며, 배추좀나방 유충은 초기에 농촌진흥청 국립농업과학원 곤충산업과 이상계박사 실험실에서 분양받아 실험에 사용하였다.



그림 1-9. 배추좀나방 사육을 하고 있는 chamber 외부, 내부모습



그림1-10. chamber내의 단계별 배추좀나방

나. 배추좀나방의 chamber내 내충성 양배추 feeding test

(1) 2010년 내충성 시험

본 실험실에서 사육한 배추좀나방 유충을 이용하여 chamber내에서 양배추 feeding test를 시행하였다(그림1-11). 유충은 부화하고 1주일 정도 자란 2령 정도인 애벌레를 이용하여 실험을 진행하였다.

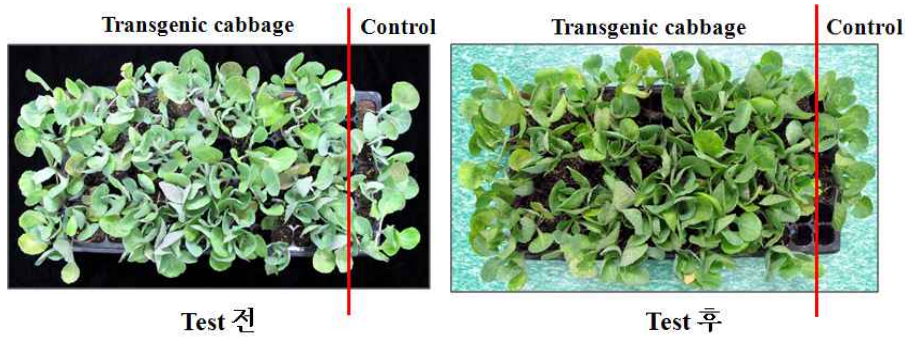


그림1-11. 양배추 chamber내 내충성 test 전후

105구 tray 원예 상토를 사용해서 BC₁T₁ 7계통, T₂ 5계통을 파종하고 육묘하였으며, PCR 검정을 통해 GM 양배추만 선발하였다(그림1-12). 육묘상에 배추좀나방 유충 2령을 약 50~100마리 가량 방사한 후 일주일가량 실험을 진행하였으며, 하루에 두 번씩 물을 공급하며 실험을 진행하였다. 습기가 많은 tray에서 애벌레들의 왕성한 성장 및 활동을 저해되었지만, 애벌레들이 활동한 짧은 기간 동안에도 육안으로는 control구는 충분히 가해한 것을 볼 수 있었고 GM 양배추는 개체별로 선발이 가능하였다(표1-2).

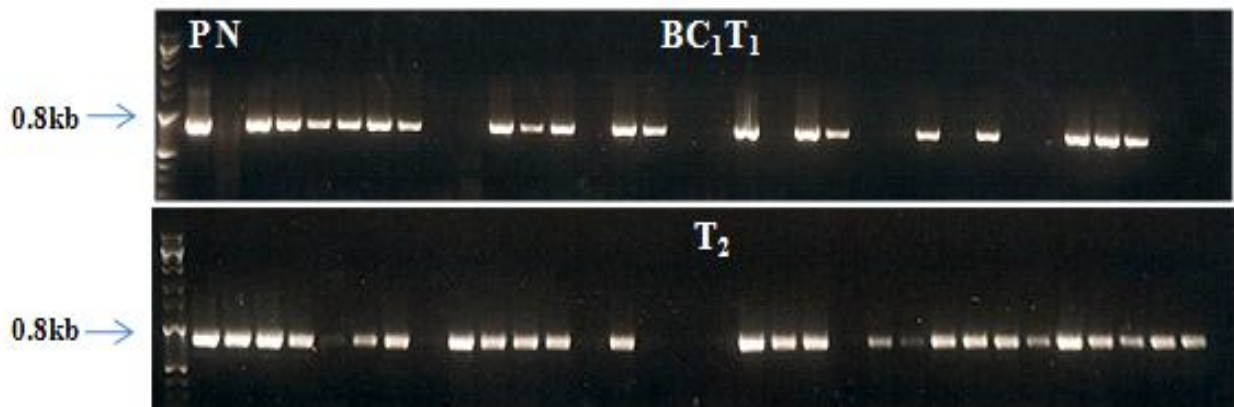


그림 1-12. 양배추 *CryIAC* chamber test PCR 검정

표 1-2. 양배추 chamber 내충성 test 결과

Vector	Line	Code No.	Copy	PCR 검정	Resistansce rate(%)	최종확보 개체수	비고	
pNW2300	AD-126	BC ₁ T ₁	C8-1/AD126	3	9	0/9	0	T ₁ X Elite L
			C(11-2)-1/AD126	x	8	1/8 (13%)	1	"
			C20-11/AD126	1	4	3/4 (75%)	2	"
			C24-11/AD126	1	2	2/2 (100%)	2	"
			C24-12/AD126		4	0/4	0	"
			C30-11/AD126	1	7	3/7 (43%)	2	"
			C41-11/AD126	3	2	1/2 (50%)	1	"
			T ₂	C30-1	1	9	3/9(33.3%)	3
	C8-1	3		10	4/10(40%)	4	"	
	C10-1	2		2	2/2(100%)	2	"	
	C(11-2)-1	x		12	7/12(58.3%)	7	"	
	C20-1	1		3	2/3(66.7%)	2	"	

(2) 2011년 내충성 시험

1차년도 실험에서 일반적인 상토에 파종하여 실험을 진행하였는데, 애벌레들이 높은 습도 피해를 받아 죽는 경우 발생하였다. 그래서 2년차 시험은 2010년 격리하우스에서 선발한 배추좀나방 내성 양배추의 후세대 종자들을 사용하였으며, chamber에서 유충들에게 feeding하였으며, 요쿠르트 플라스틱 용기에 최소 40립 이상을 파종하였다(그림1-13). Chamber의 온도 조절을 하는 fan 바람에 의해 금방 마르는 상토 대신 물을 오랫동안 머금고 있는 질석을 활용하였다. feeding 시험은 어린 유충 1-4령까지 투입된 육묘에서 저항성 또는 내성을 갖는 육묘를 선발하였다(그림 1-14). 선발된 개체들은 약 1달 동안 실내에서 재배한 다음, 격리하우스에서 화분에 재식하고 추대를 거쳐 종자를 채종하였다.

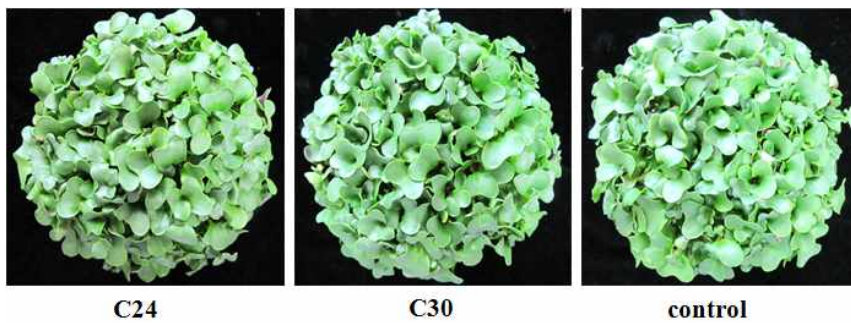


그림 1-13. Chamber내에서 배추좀나방 내성 실험을 위한 양배추 파종

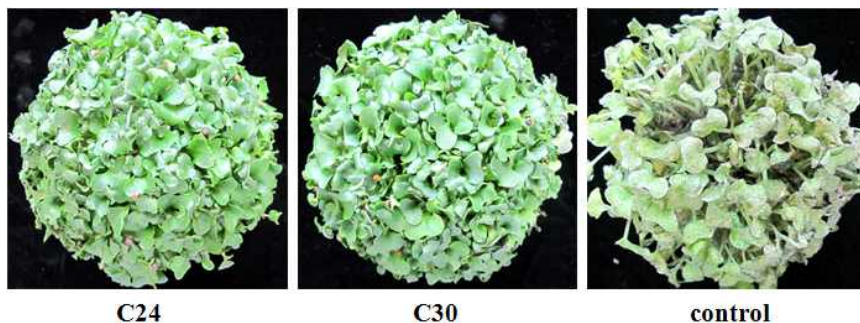


그림 1-14. 배추좀나방 유충 투입 후 GM양배추와 일반양배추 육묘간의 차이

(3) 2012년 내충성 시험

2010년 격리하우스에서 선발한 배추좀나방 내성 양배추의 종자들을 파종하여 chamber에서 유충들에게 feeding하면서 여러 조건을 만들었다. T₁, T₂ 또는 T₃ 종자들은 분리가 되기 때문에 반복적으로 내성 선발이 요구되며, BC₁T₂ C24, BC₁T₂ C30, AD-126 종자를 실험에 사용하였다. 플레인 요쿠르트 플라스틱 용기에 최소 20립 이상을 파종(그림1-15)하였으며, 질석을 이용하였다.

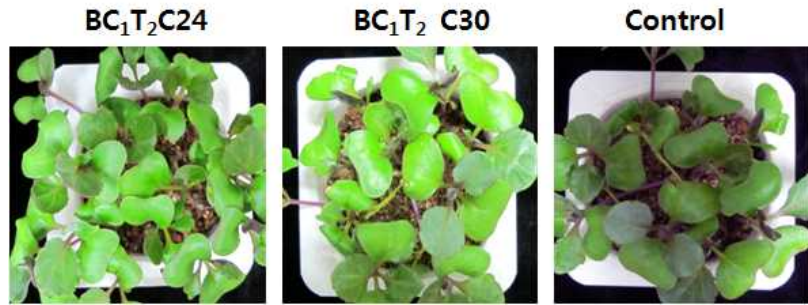


그림 1-15. Chamber내에서 배추좀나방 내성 실험을 위한 양배추 파종

1-4령의 어린 유충들이 방사된 육묘에서 저항성 또는 내성을 갖는 양배추 육묘를 선발하였다(그림1-16). 선발된 개체들은 약 1달 동안 실내에서 재배한 다음, 격리하우스에서 화분에 재식하고(그림1-17) 추대를 거쳐 종자를 수확하였다.

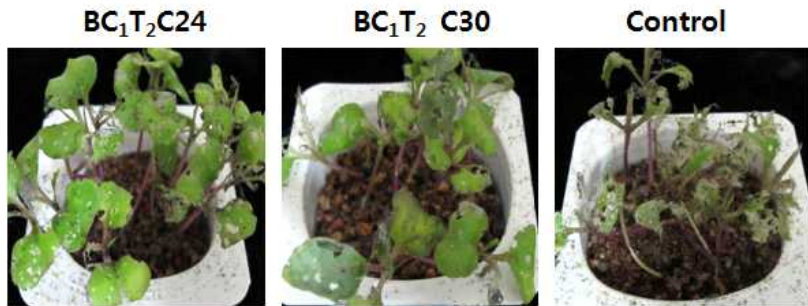


그림 1-16. 배추좀나방 유충 투입 후 GM양배추와 일반양배추 육묘간의 차이



그림 1-17. 격리하우스에 재식 한 GM양배추와 일반양배추 상토 순화

질석을 이용한 feeding 시험 종료 후 계속 재배를 위해서 유묘를 상토로 옮겨 재배하였다(그림 1-17). 그 과정에서 control로 사용한 모본 AD-126은 2개체 살아남았지만, 비정상적으로 작게 성장했지만, GM 계통인 BC₁T₂ C24, BC₁T₂ C30 계통은 정상적으로 내충성을 보이며 성장하였다(표1-3).

표 1-3. chamber내 배추좀나방 양배추 feeding test 선발

Cabbage	파종주수	실험주수	내충성 선발주수	PCR 검정 최종선발 주수 (%)
BC ₁ T ₂ C24	20	16	13	6(46%)
BC ₁ T ₂ C30	20	9	8	8(100%)
AD-126 (Control)	20	13	0	0(0%)

내충성 시험을 실시할 때 배추좀나방 애벌레(1-2령)를 방사한 후 5일 후 내충성 정도를 확인한 후 선발된 개체는 PCR을 통해 내충성 유전자 도입여부를 확인하였다.

(4) 2013년 내충성 시험

2012년 pPZP *Bar* 벡터를 이용 형질전환을 진행하여 1 copy이며 온전성 분석이 완료된 T₀ C85-1, C95의 종자를 받아 T₁ 개체를 가지고 실험을 진행하였다. 2013년 격리하우스에서 selfing을 진행하여 얻은 T₁ C85-1, T₁ C95, AD-126의 종자들을 파종하여 어린 유묘에서 DNA를 확보한 다음 PCR검정으로 transgene의 유무를 확인하였다. 그리고 유전자가 삽입된 개체만 선발하여 본엽이 6-8장 될 때까지 생육을 하였다(그림1-18). 그 후 선발된 형질전환체를 25℃ chamber내에서 clip cage를 이용하여 유충을 feeding하여 내충성 검정을 실시하였다. Clip cage를 이용하여 저항성 유무를 확인하는 방법은 KRIBB의 김창기 박사로부터 제안을 받아서 활용하였는데 GM양배추의 저항성 또는 내병성 유무를 확인하는데 매우 효과적이었다. Chamber내에서 어린 유묘에 유충을 방사하여 저항성, 내병성 유무를 관찰하는 것 보다 더 효과적이었다.



그림 1-18. Chamber내에서 배추좀나방 내성 실험을 위한 양배추 (2013년 9월)

GM양배추 앞에 clip cage를 씌우고, clip cage 안에 3-4령 정도의 유충 5마리를 방사하여 실험을 수행하였다. 4일 동안 개체 당 3개의 잎에서 실험을 진행하여 내충성 GM 양배추를 선발하였다(그림1-19). T₁ C85-1은 40개체 내충성 실험을 진행하였으나 40개체 모두 control과 똑같이 가해가 되고 모든 유충이 번데기가 된 것을 확인할 수 있었고, T₁ C95은 30개체 내충성 실험을 진행하여 3개체는 control과 똑같은 가해를 입었고 남은 27개체 중 10개체는 3개의 잎에서 모두 내성을 보였고, 17개는 2개의 잎에서 내성을 보였다. 3개 잎에서 모두 내충성을 보인 10개체만 선발(표1-4)하여 격리하우스에서 생육하였으며 겨울에 저온처리 과정을 거쳐 추대하였다(그림1-20).

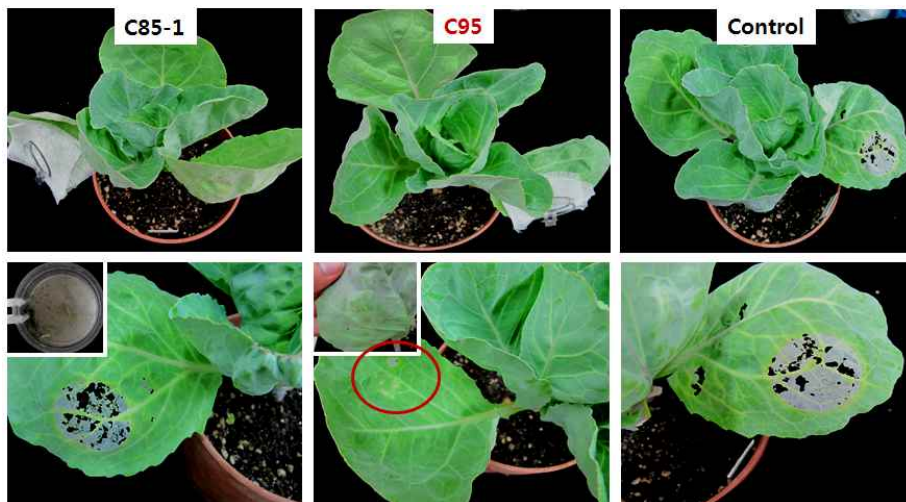


그림 1-19. 배추좀나방 유충 투입 후 GM양배추와 non-GM양배추 차이 (2013년 9월)

표 1-4. GM양배추 배추 좀나방 clip cage feeding test 선발 (2013년 12월)

Cabbage	파종주수	실험주수	내충성 선발주수	최종선발 주수(%)
T ₁ C85-1	49	40	0	0(0%)
T ₁ C95	49	30	27	10(30%)
AD-126 (Control)	49	30	0	0(0%)



그림 1-20. 격리하우스에서 clip cage feeding test로 선발된 개체 교배 (2014년4월)

(5) 2014년 내충성 시험

Clip cage 내충성 시험은 25℃ Chamber 내에서 실험은 진행 되었으며 event line C95의 T₂세 대로 실험을 진행하였다.

(가) 육묘상의 배추좀나방 feeding test

Clip cage를 이용하여 내충성 test를 진행 해 보니 내충성의 유무를 확실하게 판단할 수 있는 장점이 있었지만, 많은 개체수를 실험 할 수 없다는 단점이 있었다. 양배추 같은 십자화과 작물은 세대진전을 위해 저온 처리를 해야 하는데 많은 개체수를 동시에 clip cage 시험에 한계가 있기 때문에 육묘 상에서 1차 검정 후 2차 검정은 clip cage를 이용하여 재검정을 진행하였다.

육묘상의 배추좀나방 feeding test는 T₂ C95 5 line과 AD-126(control)을 실험 재료로 사용하였고, 실험개체는 각 line당 14-29개체로 49립씩 파종하여 PCR 검정으로 trasgene의 유무를 확인하여 *CryIac1* gene이 삽입된 개체만 선발하여 본엽이 4-5장 될 때 실험을 진행하였고, 실험을 진행한 Chamber는 25℃, 16시간 light, 8시간 dark의 조건으로 4일간 진행하였다(그림 1-21). 실험에 사용한 종자는 T2 C95-1, T2 C95-2, T2 C95-3, T2 C95-4, T2 C95-5, AD-126(control)이며, 105구 tray에 49립씩 파종하였다.

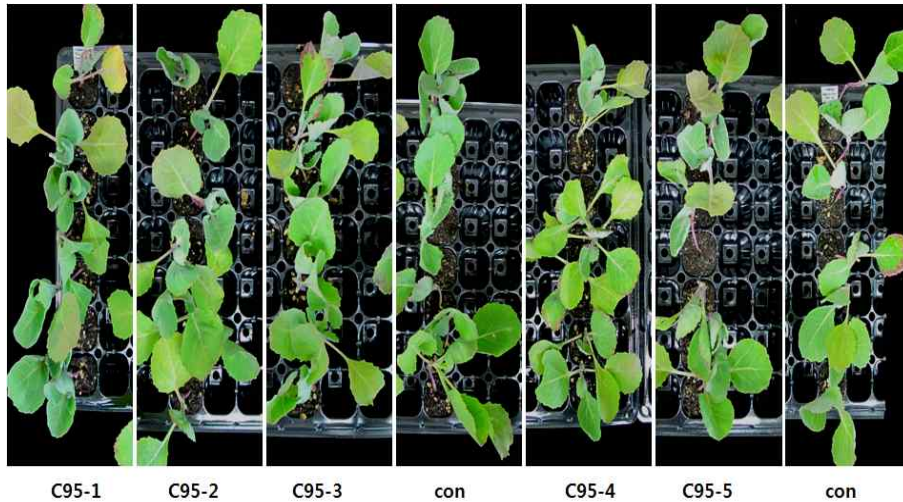


그림 1-21. Chamber내에서 배추좀나방 내성 실험을 위한 양배추 (2014년 9월)

105구 tray에 계통당 7개체씩 정렬하고 배추좀나방 유충은 1-2령 7마리, 3-4령 7마리를 방사한 뒤 4일 동안 관찰하였다. T₂ C95-1 14개체, T₂ C95-2 17개체, T₂ C95-3 19개체, T₂ C95-4 22개체, T₂ C95-5 29개체, control 28개체를 실험을 진행하여 배추좀나방 내성 GM양배추를 선발하였다(그림1-22). T₂ C95-1은 14개체 내충성 실험을 진행하여 12개체의 내성 개체를 선발하였고, T₂ C95-2는 17개체 내충성 실험을 진행하여 13개체의 내성 개체를 선발하였다. 또 T₂ C95-3은 19개체 내충성 실험을 진행하여 4개체의 내성개체를 선발하였고, T₂ C95-4는 22개체 내충성 실험을 진행하여 6개체의 내성개체를 선발하였다. 그리고 T₂ C95-5는 29개체 내충성 실험을 진행하여 13개체의 내성개체를 선발하였고, control인 AD-126은 28개체 내충성 실험을 진행하여 28개체 모두 가해 된 것을 확인할 수 있었다. 선발 기준은 control과 비슷한 정도의 가해 흔적이 있는 개체만 제거하였고, 가해 흔적이 있더라도 spot이 크지 않거나 spot의 수가 적다고 판단되는 개체들은 선발하여 clip cage를 이용하여 한 번 더 내충성 실험을 진행하였다.

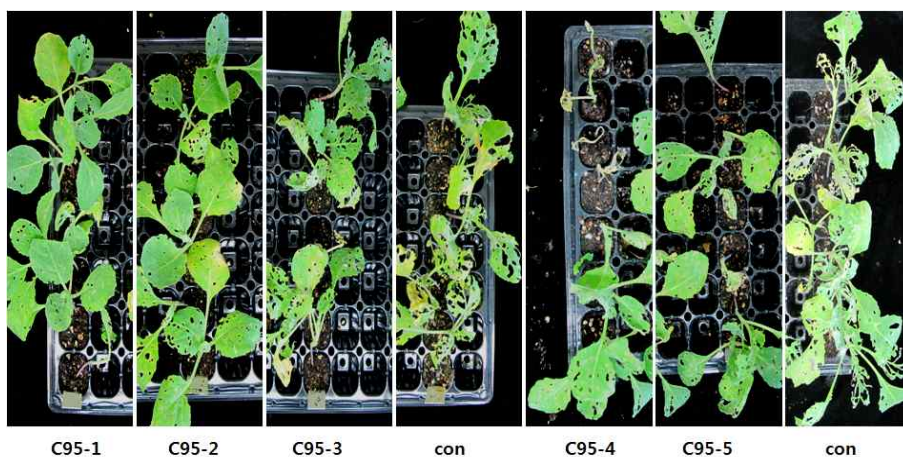


그림 1-22. 배추좀나방 유충 투입 후 GM양배추와 non-GM양배추 차이

(나) Clip cage feeding test

육묘상의 배추좀나방 feeding test에서 선발된 개체들을 갈색 pot으로 순화하여 GM양배추의 본엽이 8장 정도 되었을 때 진행하였다. 3-4령 정도의 배추좀나방 유충 5마리를 clip cage에 넣고 4일 동안 관찰하여 배추좀나방 내성 GM양배추를 선발하였다(그림1-23). T₂ C95-1은 12개체 clip cage 실험을 진행하여 약 85%인 10개체에서 가해 후 죽은 유충들을 발견할 수 있었고(그림1-23), 내충성 개체를 최종적으로 선발하였다. T₂ C95-2에서는 13개체 중 약 50%인 7개체에서 배추좀나방 내성을 보였고, T₂ C95-3에서 역시 4개체 중 1개체만 내성을 보였고, T₂ C95-4도 6개체 중 1개체에서만 내성을 보였다. T₂ C95-1, T₂ C95-2는 배추좀나방 내성이 높은 반면 T₂ C95-3, T₂ C95-4는 반대의 결과를 보였으며, T₂ C95-5에서는 13개체 중 약 40%인 5개체에서 배추좀나방 내성을 보였다(표1-5).

표 1-5. 배추좀나방 내성 GM 양배추 최종 선발

line	Code No.	실험개체	육묘검정내성개체	Clip cage 검정내성개체	기타	
AD-126	T ₂	C95-1	14	12(86%)	10(83%)	선발 후 저온처리하여 세대진전
		C95-2	17	13(76%)	7(54%)	
		C95-3	19	4(21%)	1(25%)	
		C95-4	22	6(27%)	1(16%)	
		C95-5	29	13(45%)	5(40%)	
WT : AD-126		14	0(0%)	0(0%)		
Total		115	48	24		

T₁에서 선발된 내충성 정도(유충으로 처리한 전체 GM양배추 중에서 내충성개체로 확인된 수)는 완전 저항으로 확인되었으나 T₂에서는 100%의 저항성을 갖는 개체가 없는 이유에 대해서는 잘 파악이 되지 않는다. 그러나 *Bt*에 의한 저항성을 표출하는데 도와주는 여러 관련 인자들이 분리가 됨으로서 약해 졌을 것으로 사료 된다. 최종 선발된 24개체는 2015년 겨울에 저온처리 과정을 거쳐 추대를 하고 2016년 3월 교배 예정이다.

4. GM양배추 T세대의 하우스 선발

가. GM양배추 T세대의 하우스 선발

(1) 2010년

2010년 새로운 GM양배추 T₀(11계통)에서 얻은 T₁과 배추좀나방 내성 실험을 거치지 않은 새로운 T₂ 종자를 36립씩 파종하여 PCR로 transgene이 확보 된 육묘만 선발하여 총 육묘 463주

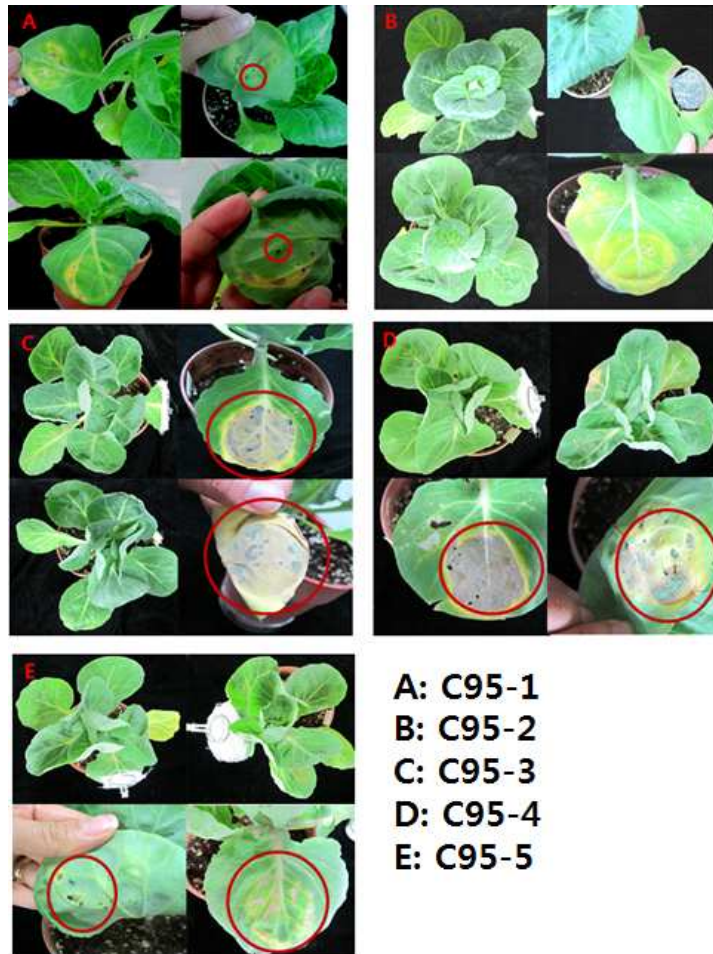


그림 1-23. Clip cage를 이용한 내충성 GM양배추 선발

를 정식하였다(그림1-24). 종자 과종 후 45-50일이 지난 육묘에 배추좀나방 1-2령, 3-4령 각각 100마리를 방사하여 배추좀나방에 내성인 양배추를 선발하였다(그림1-25). 총 26계통 중에서 50%는 부분적 내성을 갖으며 100%의 내성을 갖는 계통은 없었다. 그리하여 이들을 선발할 때 내성을 보인 개체별로 T₁ 3계통(5개체), T₂ 6계통(23개체)선발하였다(표1-6).



그림 1-24. 2010년 정식된 GM 양배추



GM cabbage (T₁) Control(non-GM)AD-126 GM cabbage (T₂)

그림 1-25. GM양배추와 non-GM양배추와의 비교

표 1-6. 2010년 양배추 내충성 test 결과

Vector	Line	Code No.	Copy	정식	Resistance rate(%)	최종확보개체수	
pNW2300	AD-126	T ₁	C43	4	12	1/12(8.3%)	1
			C59	3	7	3/7(42.9%)	3
			C60	1	16	1/16(6.3%)	1
	AD-126	T ₂	C20-2	1	24	9/24(25%)	9
			C24-2	2	14	2/14(14.3%)	2
			C30-1	2	19	5/19(26.3%)	4
					23	21/23(91.3%)	2
			C39-1	2	23	3/23(13.0%)	3
					19	3/19(15.8%)	3

(2) 2011년

2010년까지 GM양배추 4개 서로 다른 계통(C10, C24, C30, C41)을 확보하였다. 총 4계통 중 2계통(C10, C41)은 제1협동과제인 오창에서의 분석 결과 tandem repeat 형태로 삽입되었기 때문에 이후의 실험에서 제외하였으며 나머지 2계통(C24, C30)은 T₁에서 100% 완전저항이었지만 재확인하고자 하였다(그림 1-29). T₁을 selfing하여 확보한 T₂(총 63 lines)종자를 42립씩 파종하였으며(그림27), PCR로 transgene의 유무가 확인된 육묘만 선발하였고(그림1-26) 총 육묘 2,132주를 정식하였다. 정식 후 14일이 지난 육묘에 두 번에 걸쳐 배추좀나방 1-2령, 3-4령 각각 400마리, 200마리 방사하여 배추좀나방에 내성인 양배추를 선발하였다. T₂에서는 30%이하의 내성률과 50%이상의 부분적 내성을 갖으며 100%의 저항성을 갖는 계통은 없었다(표1-7). 이들을 선발할 때 50%이상의 내성을 보인 개체별로 T₂ 5계통에서 각 2개체씩 10개체를 선발하였다(그림1-28). T₁에서 선발된 내충성 정도는 완전 저항으로 확인되었으나 T₂에서는 100%의 저항성을 갖는 개체가 없는 이유에 대해서는 잘 파악이 되지 않는다. 그러나 Bt에 의한 저항성을 표출하는데 도와주는 여러 관련 인자들이 분리가 됨으로서 약해진 것으로 사료된다.

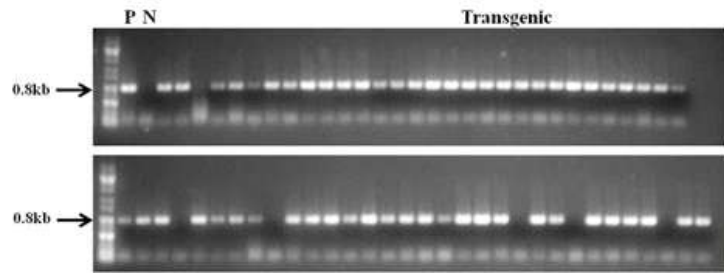


그림 1-26. PCR 검정을 통한 transgene 삽입 확인



그림 1-27. 2011년 정식하기 전 GM 양배추 (격리하우스에서 재배)



그림 1-28. 곤충을 투입한 후 GM양배추와 non-GM양배추와의 비교

표 1-7. 2011년 양배추 내충성 test 결과

Vector	Line	Code No.	copy	정식	Resistance rate(%)	최종확보개체수	
pNW2300	AD-126	T ₂ C30	2	33	17/33(52%)	2	10개체
				33	25/33(52%)	2	
				45	25/45(56%)	2	
				24	21/24(88%)	2	
				39	20/39(51%)	2	



그림 1-29. 2011년 배추좀나방 내성 선발 개체의 모습

(3) 2014년

2013년 event line으로 예상되는 C95계통으로 배추좀나방 field feeding test를 진행하였다. 제1협동과제인 오창 생명공학연구원에서 분자유전학적 분석 결과 C85-1과 C95에 유전자 삽입 위치와 copy수가 위해성 평가 재료로 사용하기에 적합하다는 판정을 받고 2계통으로 실험을 수행하려고 하였다. 그러나 2013년 T₁ C85-1, T₁ C95의 Clip cage를 이용한 배추좀나방 feeding test 결과 T₁ C85-1이 100% 가해를 보였고, CryIAC 단백질 immuno strip 결과 밴드가 확인되지 않은 점으로 보아, 내충성이 없다고 판단하여 2014년 field 실험에서는 C85-1은 제외하였다. 또한 Field에서도 실내에서 같은 결과를 보이는지 확인하기 위해서 실험을 진행하였다. T₁ C95 계통의 종자를 100립 파종하여 PCR 검정을 통해 transgene의 유무가 확인된 육묘만 선발하였고(그림1-30), 대조구인 AD-126과 함께 각각 52주씩 총 육묘 104주를 정식하였다. 정식 후 14일이 지난 육묘에 3번에 걸쳐 배추좀나방 1-2령, 3-4령 각각 400마리, 200마리, 성충 100마리 방사하여 배추좀나방에 내성인 양배추를 선발하였다(그림1-31). Clip cage feeding test에서는 29개체 중 3개체를 제외하고 내성을 보였었지만, field feeding test에서는 대조구와 같은 정도의 가해 개체는 없었고, spot의 수를 세어 내성 정도를 판단하였다. spot이 0개인 개체는 31개체, 10개 이하는 20개체, 20개 이하가 1개체였고, spot의 수가 20개라고 할지라도 크게 내성이 없다고 볼 정도의 가해 수준은 아니라고 판단하였다(그림1-32). 2013년 clip cage feeding 실험과 비교하여 정리해 보았다(표1-8).

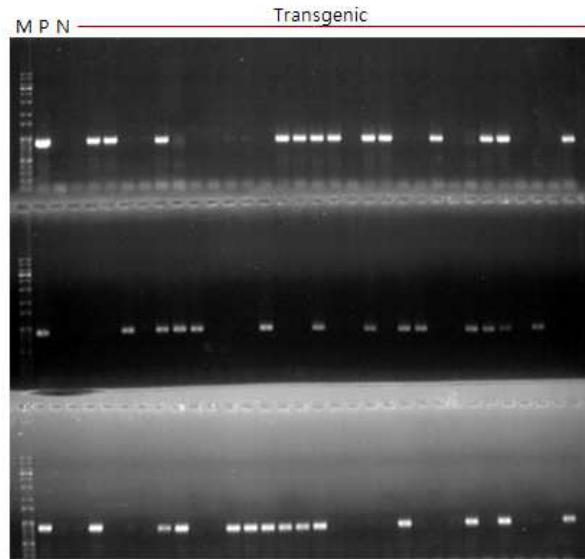


그림 1-30. PCR 검정을 통한 trangene 삽입 확인

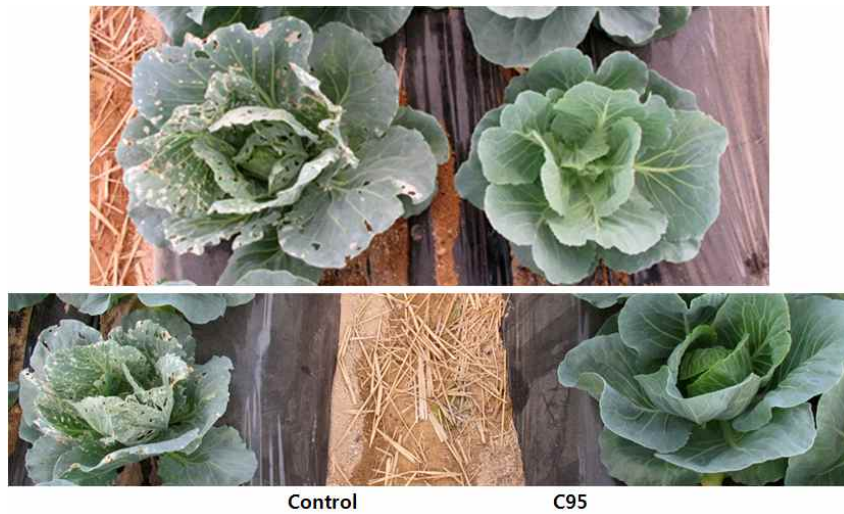


그림 1-31. 배추좀나방 투입 후 GM양배추와 non-GM양배추와의 비교



그림 1-32. T₁ C95의 가해 정도

표 1-8. 양배추 clip cage test, Field feeding test 비교 결과

GM 양배추		발병지수 (DI)	1	2	3	4	5	합계
			(spot:0)	(spot:100이하)	(spot:200이하)	(spot:300이하)	(spot:30초과)	
T ₁	C85-1					3	37	40
	C95			13	13		3	29
대조구	AD-126						26	26
Clip cage feeding test								
GM 양배추		발병지수 (DI)	1	2	3	4	5	합계
			(spot:0)	(spot:100이하)	(spot:200이하)	(spot:300이하)	(spot:30초과)	
T ₁	C95		31	20	1			52
대조구	AD-126				1	1	50	52
Field feeding test								

Clip cage feeding test 실험에서 클립 케이지로 배추좀나방 유충을 가두어 실험을 진행하게 되면 유충들이 도망갈 곳이 없어지게 된다. *Bt*의 살충 기작을 보면 섭취 후 중장을 파괴하여 피사하게 만들기 때문에 clip cage 실험에서는 식물체의 spot이 1개 이상 존재하였다. 그에 반해 field에서는 대조구가 함께 있었고, 배추좀나방 유충들이 GM양배추 보다 control 양배추를 섭취하려는 경향이 있었기에 가해되지 않은 식물체들이 존재하였다.

5. 배추좀나방 실외 모니터링

배추좀나방 field test는 인공 사육한 배추좀나방을 비닐하우스 내에 방사하여 실험을 진행하였다. 내충성 실험이 진행 과정에서 본 실험으로 인한 자연 생태계로 배추좀나방 방사 피해가 나타날 수 있기 때문에 비닐하우스내 방출시험 전 과정 동안뿐 아니라 실험을 기준으로 한두 달 전후 동안 외부환경에서 출현되는지를 페로몬트랩으로 모니터링을 실시하였다. 격리 포장에 60평당 1개씩 배추좀나방 페로몬 트랩을 설치하였고, 총 6군데에서 모니터링을 실시하였다(그림1-33). 페로몬 트랩에는 배추좀나방의 수컷을 유인하는 페로몬 루어가 들어 있으며, 트랩은 지상에서 160cm-180cm 사이에 설치하였고, 배추좀나방 발생 시기 전인 4월 초 봄에 설치하였다. 끈끈이는 3-4주에 한 번씩 교체하며 배추좀나방의 출현을 조사하였고 50-60일 마다 페로몬 루어를 교체 하였다(그림1-34).

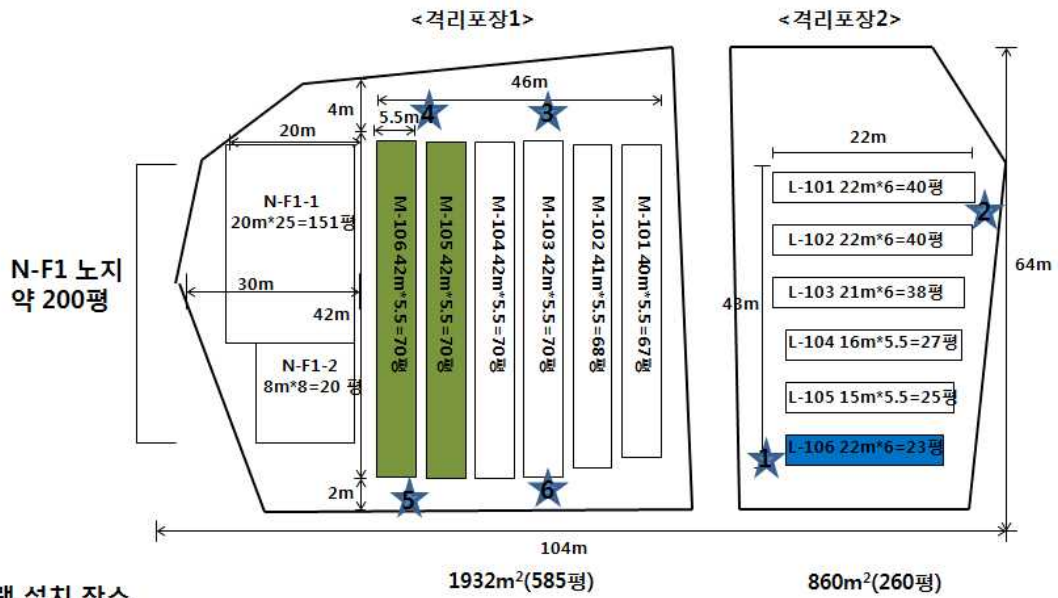


그림 1-33. 배추좁나방 페로몬 트랩 설치 설계 (2014년 4월)

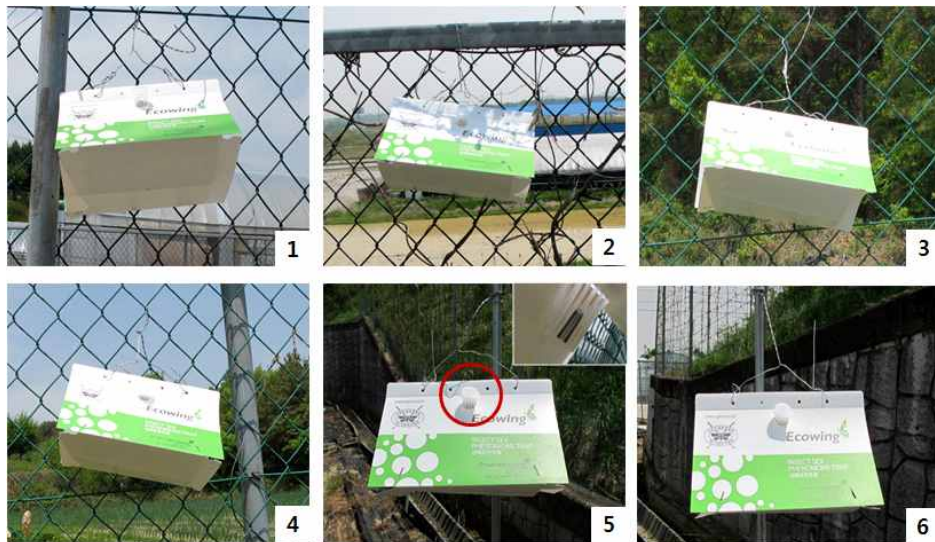


그림 1-34. 배추좁나방 60평당 1곳에 총 6곳에 트랩 설치

2014년 4월 2일 배추좁나방 트랩을 설치하고 4월 24일, 5월 15일, 6월 26일, 7월 31일, 8월 28일, 9월 25일 총 6번의 모니터링을 실시하였다.

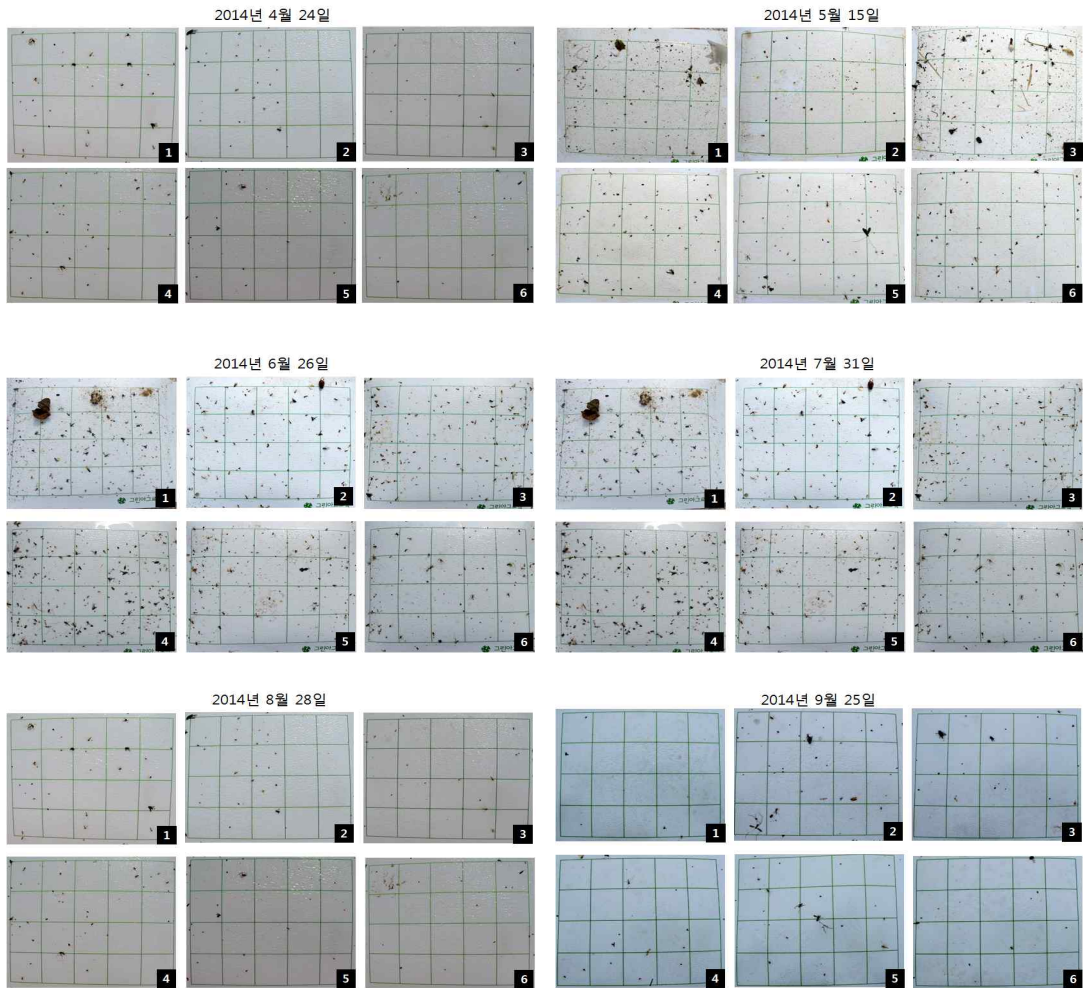


그림 1-35. 배추좀나방 트랩 설치 결과

농우바이오 포장에서는 6월부터 8월까지 내충성 실험을 진행하므로 모니터링은 4월부터 9월까지 진행하는 것으로 정하였고, 모니터링 결과 단 한 마리의 배추좀나방도 발견되지 않았다(그림1-35). 이로써 농우바이오에서 진행 중인 배추좀나방 내충성 실험의 의한 외부 유출이나 그로 인한 농가 피해가 없는 것을 확인하였다. 2014년도 유난히 배추좀나방의 출현이 적고, 번식도 용이하지 않았는데, 2014년도에는 밤에도 열대야 현상이 지속되었고, 낮 온도도 35℃ 이상이 되는 날이 잦은 등 배추좀나방의 일반적인 생육온도와 맞지 않아 배추좀나방의 출현이 적었던 것으로 사료된다.

제2절 좀나방 내성 GM양배추 계통의 분자유전학적 분석

1. GM 양배추 형질전환 집단의 분석을 통한 우량 event의 선발

우량 event 선발 연구는 제1세부과제에서 개발하여 분자유전학적 분석을 수행하는 본 제1협동과제에 의뢰하는 즉시 분석을 착수하였는데, 1 - 2년차(2010 - 2012년)에는 본 과제의 원계획과 같이 *nptIII* 선발 마커를 사용하여 개발한 GM 양배추를 의뢰 받았다. 하지만 3-5년차부터(2012-2015년) 제초제 저항성 마커인 *bar* 유전자 선발 마커를 사용하여 개발한 GM 양배추를 의뢰받았으므로, 크게 *nptIII* 선발 GM 양배추의 분석과 *bar* 선발 GM 양배추의 도입유전자 copy 수 및 위치 분석으로 연구 내용 및 결과를 구분하여 기술하였다.

가. *NptIII* 선발 마커 사용 좀나방 내성 GM 양배추의 우량 event 선발

(1) GM 양배추 event C20, C24, C30의 분석

GM 양배추 event C20, C24, 및 C30은 본 과제의 제안 당시에 기확보한 event이며, 이들 event의 분석을 과제 착수와 동시에 수행하였다.

(가) 도입유전자 수 분석

도입 유전자 copy 수를 분석하고자 먼저 Southern blot 분석을 시행하였다. 2010년 7월에 농우 바이오에서 입수한 *Bt* 양배추 C20, C24, C30과 형질전환 숙주 양배추 AD-216 유식물을 5주 정도 온실에서 재배하여 분갈이하였다. 5주 정도 더 자란 개체의 어린잎을 골라 각 event별로 CTAB method를 이용하여 DNA를 추출하고, 형광 정량 법으로 정량하였다. 도입유전자 cassette sequence map의 *nptIII* 부분에서 probe 위치를 정하고, *npt* 448U 5'-TATGACTGGGCACAACAGACA-3'와 *npt* 973L 5'-TGATATTCGGCAAGCAGGCAT-3'를 사용하여 증폭된 *nptIII* DNA fragment를 포함하는 T-vector clone에서 상기 primers와 Biotin-14-dCTP를 이용하여 probe PCR 하고, Gel purification 하였다. Probe를 기준으로 한쪽 방향에만 restriction site 가 있는 *AflIII*, *EcoRI*, *HindIII*를 선정하여 각 event별 DNA 5 µg에 30 unit 처리하여 overnight digestion하였다. Digestion한 양배추 DNA는 1% Seakem agarose gel에 전기영동하고, 분리된 DNA를 capillary 현상을 이용하여 membrane으로 transfer하였고, 95°C에서 denature시킨 probe를 DNA와 hybridization 시킨 후에, probe에 conjugate와 substrate를 붙여 X-ray film에 exposure시키고 현상하였다. Southern blot 분석 결과는 양배추 C20 event는 단일 copy, C24 과 C30 event는 2 copy 를 가짐을 제시하였다(그림2-1).

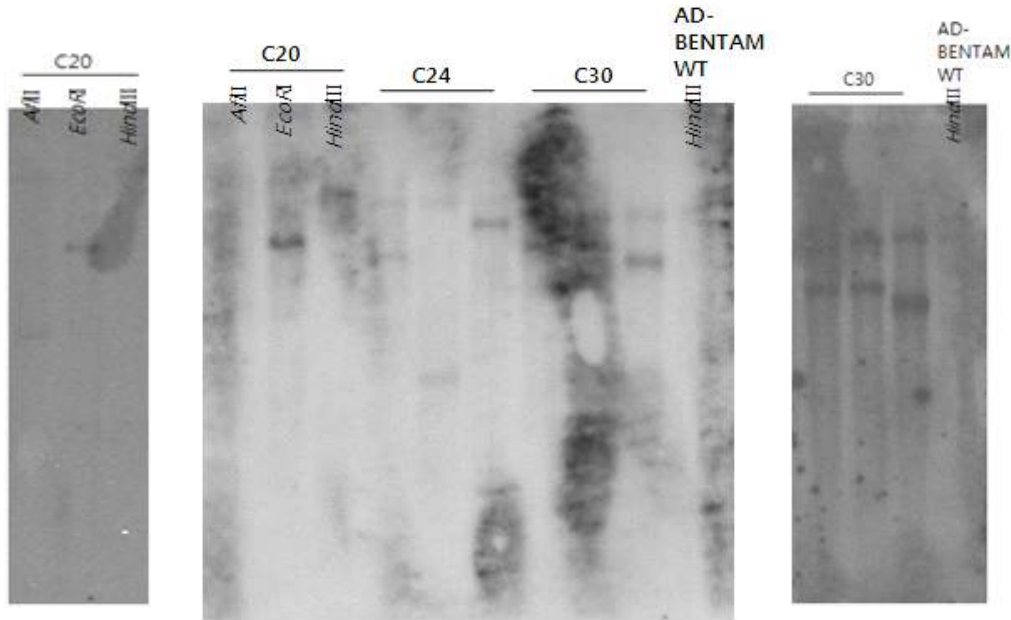


그림 2-1. 좁나방 저항성 양배추의 Southern blot 분석 결과. GM event C20, C24, C30을 분석 결과인 중앙 그림이 background로 인하여 band의 구분이 어려우므로, 반복 실험한 결과를 오른쪽과 왼쪽에 제시함.

(나) C24, C30 event의 도입유전자 삽입형태 분석

GM 작물 event의 위해성 평가 대상 식물의 조건을 1 copy의 도입유전자 cassette가 intergenic region에 삽입된 경우를 전제할 때 현재 분석한 3점의 event는 1점만 제외하고는 모두 2 copy 이상의 도입유전자 cassette이 삽입되었다. 2 copy의 삽입은 대부분의 경우에 tandem repeat 즉 연속해서 삽입되므로 위해성 평가 대상에서 제외되나, 일부의 경우에는 2 copy가 각각 다른 chromosome 부위에 삽입되므로 Southern blot 분석에서 2 copy 이상의 도입유전자가 삽입된 것으로 밝혀진 event에 대한 독립적인 삽입 여부를 시험하였다. 2 copy가 삽입된 것으로 확인된 C24, C30 event의 삽입형태 분석을 위하여 그림 2와 같은 여러 가지 조합의 가능성을 고려하여 삽입형태를 확인 할 수 있는 primer를 고안(표2-1)하여 분석한 PCR 분석을 수행하였다.

그 결과 그림 3와 같이 숙주에 비하여 GM에서 특이적인 band가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 C24와 C30에는 2 copy의 도입유전자가 연속적이지 않고 다른 chromosome 부위에 삽입되었을 가능성이 있다. 이 두 event에 대해서는 개발자가 숙주에 backcross 또는 후대 검정을 실시하여 도입유전자를 분리할 수도 있으나, 추후 더 많은 형질전환체를 얻는 방향으로 연구를 진행하였다.

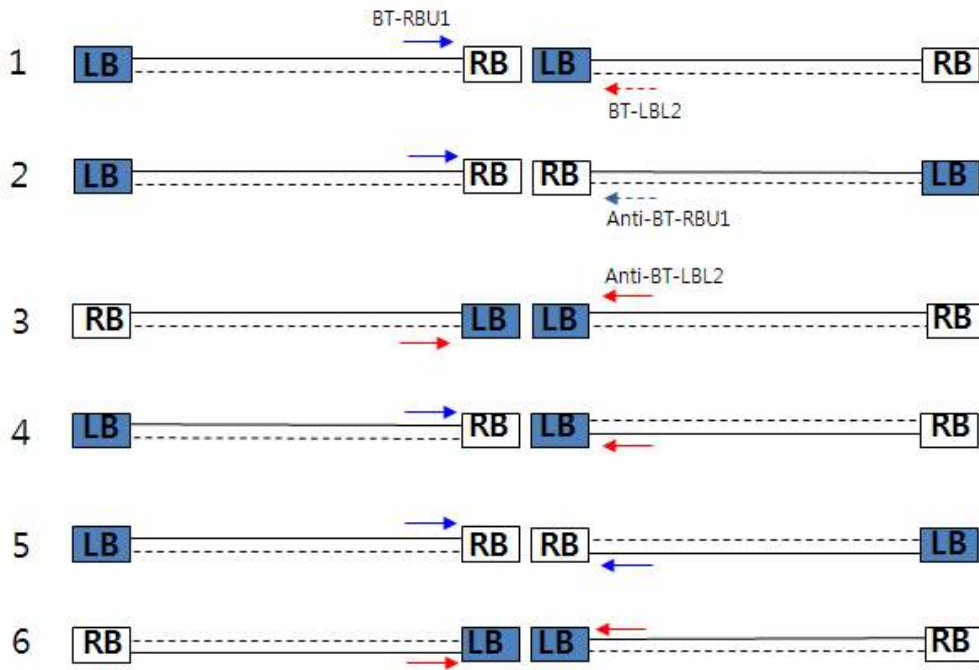


그림 2-2. 유전자변형 *CryIAcI* 양배추 도입유전자 cassette 삽입형태 분석 모식도

표 2-1. 유전자변형 *CryIAcI* 양배추 C24, C30 event의 도입유전자 cassette 삽입형태 분석에 사용된 primer list

primer 명칭	sequence
BT-RB-U1	5'-GTCGTGACTGGGAAAACCCT-3'
pCambia2300-LB-L2 (BT-LB-L2)	5'-TTTCGCTCATGTGTTGAGCA-3'
Anti-BT-RB-U1	5'-CAGCTCTGACCCTTTTGGGA-3'
Anti-pCambia2300-LB-L2 (Anti-BT-LB-L2)	5'-AAAGCGAGTACACAACCTCGT-3'

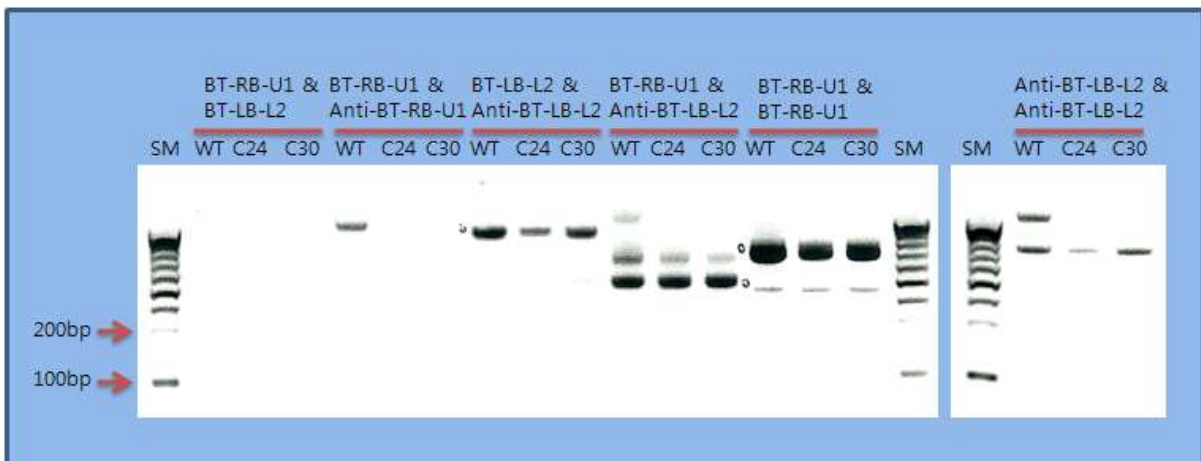


그림 2-3. 유전자변형 *CryIa* 양배추 C24, C30 event의 도입유전자 cassette 삽입형태 분석 PCR 결과

(다)도입유전자 양배추 게놈상의 위치 해명

- 단일 도입유전자 cassette이 삽입된 C20 event와 2 copy 이상의 도입유전자가 독립적으로 삽입된 event들에 대한 도입 유전자 cassette의 말단 온전성 확인하였고, 삽입위치 확인을 위한 inverse PCR을 일부 수행하였다.

- C20, C24 event의 도입유전자 cassette의 말단 온전성 확인

도입된 유전자 cassette의 말단 온전성 확인은 도입위치 확인을 위한 inverse PCR을 위해 필요한 연구일 뿐만 아니라, 도입유전자 cassette가 truncated 로 삽입된 경우를 탐색하는 연구이다.

기본 vector가 pCAMBIA2300으로 정보가 입수되어 pCAMBIA2300의 LB와 RB부분에서 말단 확인용 primer set을 각각 2쌍씩 작성하였다 (표2-2). 이를 이용하여 C20 event 과 C24 event의 말단 확인 PCR 분석 결과 LB부분은 숙주에서는 관찰이 되지 않고 (그림2-4), C20 event 과 C24 event 둘다에서 두 쌍 모두 확인되어 그 부분에서는 결실이 이루어지지 않음을 확인하여 inverse PCR용 primer를 제작하였다.

표 2-2. 유전자변형 *CryIa* 양배추의 도입유전자 말단 온전성 분석에 사용된 primer list

primer 명칭	sequence
pCAM2300-LB-F1	5'-TCGGGGGATCTGGATTTTAG-3'
pCAM2300-LB-R1	5'-TTTCGCTCATGTGTTGAGCA-3'
pCAM2300-LB-F2	5'-TGCTCAACACATGAGCGAAA-3'
pCAM2300-LB-R2	5'-TGACGAGTTCTTCTGAGCGG-3'
pCAM2300-RB-F1	5'-CAGCTGGCGTAATAGCGAAG-3'
pCAM2300-RB-R1	5'-CTGATCCAAGCTCAAGCTGC-3'
pCAM2300-RB-F2	5'-CCAACTTAATCGCCTTGCAG-3'
pCAM2300-RB-R2	5'-TCTAGCATTCGCCATTCAGG-3'

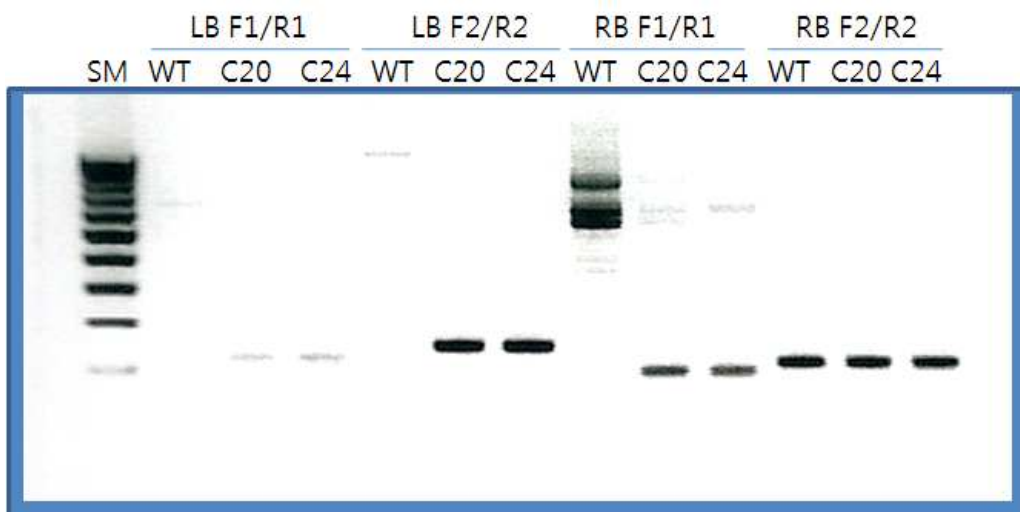


그림 2-4. 유전자변형 *CryIa1* 양배추의 도입유전자 말단 온전성 분석

- 단일copy의 도입유전자가 삽입된 C20 event의 LB위치 도입유전자 cassette의 삽입위치분석 C20 event의 LB부분 삽입위치 분석을 위하여 inverse PCR을 수행하였다. 사용된 제한효소는 *Sph*I, *Pvu*II, *Nco*I이며, 1차 PCR을 위해서는 pCAM2300-LB-R2와 pCAM2300-LB-U1을 사용하였고, 2차 PCR을 위해서는pCAM2300-LB-R1과 pCAM2300-LB-U2를 사용하였고, 3차 PCR을 위해서는pCAM2300-LB-L3와 pCAM2300-LB-U3를 사용하였다 (표2-3,그림2-5). 3차 PCR 반응 후 얻은 products를 gel purification을 거쳐 염기서열 분석을 수행하였다. Inverse를 통하여 획득한 양배추의 도입유전자 인접 염기서열은본 결과는 인접 염기서열과 cassette에서 제작한 primer를 사용한 confirmation PCR에서 재확인되었으며(그림2-6), *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (배추) EST인 BR119914와 97%의 상동성을 보여 C20 event에는 도입유전자가 genic region에 삽입되었음을 알 수 있었다.

표 2-3. 유전자변형 *CryIAc1* 양배추의 도입유전자 삽입위치 분석에 사용된 primer list

primer 명칭	sequence
pCAM2300-LB-R2 (pCAM2300-LB-L1)	5'-TGACGAGTTCTTCTGAGCGG-3'
pCAM2300-LB-R1 (pCAM2300-LB-L2)	5'-TTTCGCTCATGTGTTGAGCA-3'
pCAM2300-LB-L3	5'-CTAAAATCCAGATCCCCCGA-3'
pCAM2300-LB-U1	5'-GCCACACCCAGCCGGCCACAG-3'
pCAM2300-LB-U2	5'-TCGATGAATCCAGAAAAGCG-3'
pCAM2300-LB-U3	5'-CCACCATGATATTCGGCAAG-3'

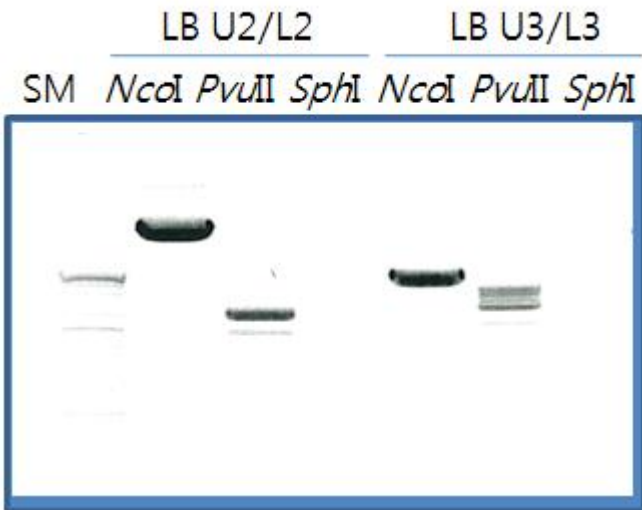


그림 2-5. 유전자변형 *CryIAc1* 양배추의 도입유전자 삽입위치 분석을 위한 IPCR

```

1      CTGAAGGTAA TTGTCTCCAG AGACATTTAG GGTAGCAAAA TCCAAGTTAT
51     TGATTTTCGA CATCTGAAAT CATAGATTAT AATATAGGTC TTTAGAAATA
101    GGGTTTTTCGG TTAAAAACAA ACAAGCAAGC CTAATGGCCA AGACATATGC
151    CTCACGGCCA AGACAGAAGC CGCACGACCA TGGCCGACAC GGTTCACCTT
201    CTTGATGGTC CTCACAGTCG TCATCGCCAT GATTGCCGTA GCTTATGGAT

```

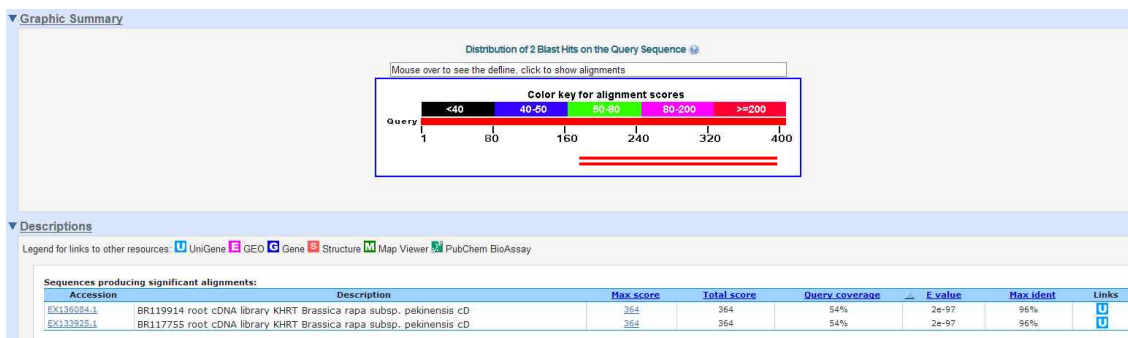

251 ACTCCTCTGT TTCATCATCA AATCATAAGT TTCCTCATT A CAAGTACAAA
 301 GCCCCTCTC CTCCAACGAC TTATTCTCCT TACCGTTACT TCTCCCCGCC
 351 TCCACCTCCT CCGGTTACAG ATTCAGATTC TGCAGCGTAT GCTCGATGAC
 401 GTTCTGCA

Unknown 부분

GC GGACGTTTAA TTCTAAAAGC NNGNANN

LB시작부분

- Unknown 염기서열 NCBI blast EST search 결과



> [gb|EX136084.1](#) [U](#) BR119914 root cDNA library KHRT Brassica rapa subsp. pekinensis
 cDNA clone KHRT-66D09 5', mRNA sequence.
 Length=538

Score = 364 bits (197), Expect = 2e-97
 Identities = 213/221 (97%), Gaps = 0/221 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 179 CATGGCCGACACGGTTCACCTTCTTGATGGTCCTCACAGTCGTCATCGCCATGATTGCCG 238
          |||
Sbjct 47 CATGGCCGACACGGTTCACCTTCTTGATGGTCCTCACAGTCGTCATCGCCATGATTGCCG 106

Query 239 TAGCTTATGGATACTCCTCTGTTTCATCATCAAATCATAAGTTTCCTCATTACAAGTACA 298
          |||
Sbjct 107 TGGCTTATGGATATTCATCTGTTTCATCAAACCATAAGTTTCCTCATTACAAGTACA 166

Query 299 AAGCCCCACTTCCTCCAACGACTTATTCTCCTTACCGTTACTTCTCCCCGCCTCCACCTC 358
          |||
Sbjct 167 AAGCCCCACTTCCTCCAACGACTTATTCTCCTTACCGTTACTTCTCCCCGCCTCCACCTC 226

Query 359 CTCCGGTTACAGATTAGATTCTGCAGCGTATGCTCGATGA 399
          |||
Sbjct 227 CTCCGGTTACAGATTAGATTCTGCAGCTTATGCTCAATGA 267
  
```

> [gb|EX133925.1](#) [U](#) BR117755 root cDNA library KHRT Brassica rapa subsp. pekinensis
 cDNA clone KHRT-39G08 5', mRNA sequence.
 Length=601

Score = 364 bits (197), Expect = 2e-97
 Identities = 213/221 (97%), Gaps = 0/221 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 179 CATGGCCGACACGGTTCACCTTCTTGATGGTCCTCACAGTCGTCATCGCCATGATTGCCG 238
          |||
Sbjct 30 CATGGCCGACACGGTTCACCTTCTTGATGGTCCTCACAGTCGTCATCGCCATGATTGCCG 89

Query 239 TAGCTTATGGATACTCCTCTGTTTCATCATCAAATCATAAGTTTCCTCATTACAAGTACA 298
          |||
Sbjct 90 TGGCTTATGGATATTCATCTGTTTCATCAAACCATAAGTTTCCTCATTACAAGTACA 149

Query 299 AAGCCCCACTTCCTCCAACGACTTATTCTCCTTACCGTTACTTCTCCCCGCCTCCACCTC 358
          |||
Sbjct 150 AAGCCCCACTTCCTCCAACGACTTATTCTCCTTACCGTTACTTCTCCCCGCCTCCACCTC 209

Query 359 CTCCGGTTACAGATTAGATTCTGCAGCGTATGCTCGATGA 399
          |||
Sbjct 210 CTCCGGTTACAGATTAGATTCTGCAGCTTATGCTCAATGA 250
  
```

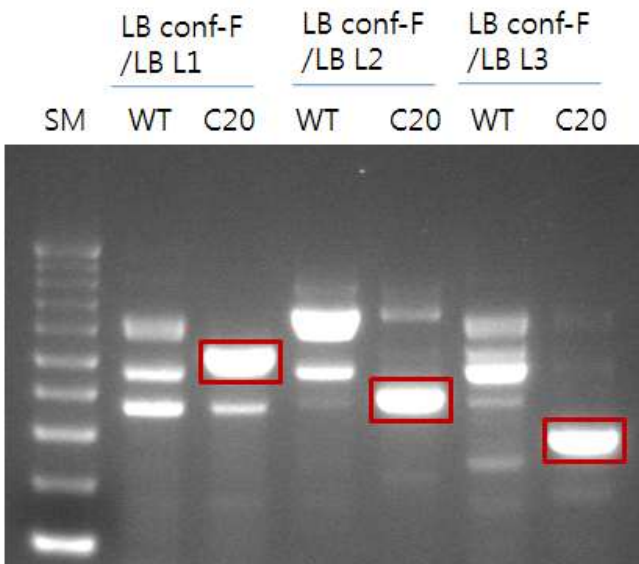


그림 2-6. 유전자변형 *CryIacI* 양배추의 도입유전자 삽입위치 LB confirm

-C20 event의 RB 위치 도입유전자 cassette의 삽입위치 분석

-C20 event의 LB IPCR결과를 바탕으로 추측되는 RB쪽의 gDNA 부분에서 confirmation용 primer를 디자인(표2-4)하여 RB flanking region을 확인하고자 하였다.

그러나, 숙주에 비하여 GM에서 특이적인 band가 전혀 나타나지 않아 일단 개발자가 제공하지 못한 도입유전자 cassette의 RB부분 염기서열을 밝히고자 하였다. 도입유전자 cassette 내부의 *CryIAcI*와 RB(pCAMBIA2300)근처에서 primer 쌍을 디자인(표2-5)하여 PCR로 GM 특이적인 약 1kb의 band를 얻어 염기서열분석을 한 결과 pGWB706, pGWB606등의 GATEWAY vector의 RB와 일치하였다. 밝혀낸 도입유전자 cassette의 RB부분 염기서열을 이용하여 추측되는 RB쪽의 gDNA 부분에서 confirmation용 primer를 디자인하여 RB flanking region을 다시 분석하였으나 GM에서 특이적인 band의 확인이 되지 않아, IPCR용 primer를 디자인하여 이를 바탕으로 RB inverse PCR을 수행하였다.

- C20 event의 RB IPCR 결과

LB-RB 도입유전자 cassette에 이어져서 도입유전자 cassette의 LB근처의 vector부분이 같이 삽입된 것을 확인하였다.

표 2-4. 유전자변형 *CryIAcI* 양배추의 도입유전자 cassette RB 염기서열 분석에 사용된 primer list

primer 명칭	sequence
<i>CryIAcI</i> -seq-F	5'-CTGGGTTACTCAAGCAGTTG-3'
pCAM2300-RB-R1	5'-CTGATCCAAGCTCAAGCTGC-3'

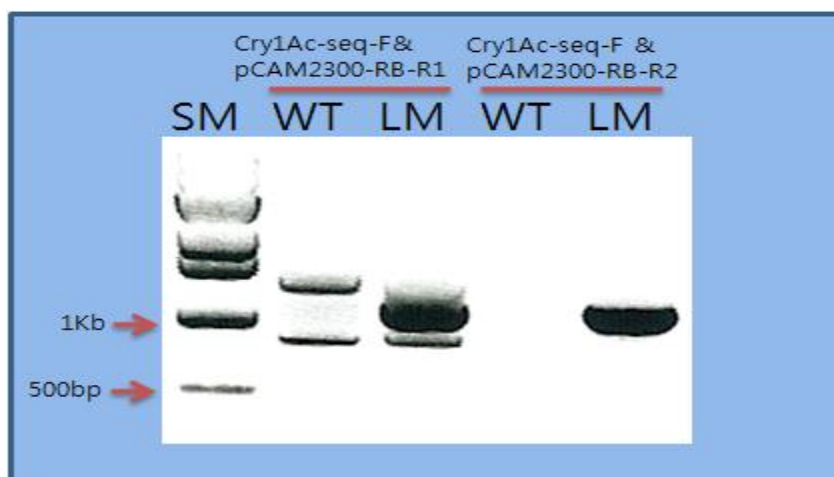


그림 2-7. 유전자변형 *CryIAcI*양배추의 도입유전자 cassette의 RB 염기서열 분석을 위한 PCR결과

1 TCTGGGTTAC TCAAGCAGTT GTATGGAATG CATTCGTTGA TGTTTGGGTT
*CryIAcI*염기서열 부분

51 GTTGTCCATG GGGGATCCTC TAGAGTCCCC CGTGTTCTCT CCAAATGAAA

101 TGAACTTCCT TATATAGAGG AAGGGTCTTG CGAAGGATAG TGGGATTGTG
 151 CGTCATCCCT TACGTCAGTG GAGATATCAC ATCAATCCAC TTGCTTTGAA
 201 GACGTGGTTG GAACGTCTTC TTTTCCACG ATGCTCCTCG TGGGTGGGGG
 251 TCCATCTTTG GGACCACTGT CGGCAGAGGC ATCTTCAACG ATGGCCTTTC
 301 CTTTATCGCA ATGATGGCAT TTGTAGGAGC CACCTTCCTT TTCCACTATC
 351 TTCACAATAA AGTGACAGAT AGCTGGGCAA TGGAATCCGA GGAGGTTTCC
 401 GGATATTACC CTTTGTGAA AAGTCTCAAT TGCCCTTTGG TCTTCTGAGA
 451 CTGTATCTTT GATATTTTGG GAGTAGACAA GTGTGTCGTG CTCCACCATG
 501 TTGACGAAGA TTTTCTTCTT GTCATTGAGT CGTAAGAGAC TCTGTATGAA
 551 CTGTTGCGCA GTCTTTACGG CGAGTTCTGT TAGGTCCTCT ATTTGAATCT
 601 TTGACTCCAT GGCCTTTGAT TCAGTGGGAA CTACCTTTTT AGAGACTCCA
 651 ATCTCTATTA CTTGCCTTGG TTTGTGAAGC AAGCCTTGAA TCGTCCATAC
 701 TGGAATAGTA CTTCTGATCT TGAGAAATAT ATCTTTCTCT GTGTTCTTGA
 751 TGCAGTTAGT CCTGAATCTT TTGACTGCAT CTTAACCTT CTGGGAAGG
 801 TATTTGATTT CCTGGAGATT ATTGCTCGGG TAGATCGTCT TGATGAGACC
 851 TGCTGCGTAA GCCTCTCTAA CCATCTGTGG GTTAGCATTC TTTCTGAAAT
 901 TGAAAAGGCT AATCTGGGGA CCTGCAGGCA TGCAAGCTTG GCACTGGCCG
 951 TCGTTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT
 1001 CGCCTTGCAG CACATCCCCC TTTCCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC
 1051 CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GGCGAATGCT
 1101 AGAGCAGCTT GAGCTTGGAT CAGA

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB608272.1	Gateway binary vector pGWB706 DNA, complete sequence	1962	1962	100%	0.0	100%	
AB543115.1	Gateway binary vector pGWB606 DNA, complete sequence	1962	1962	100%	0.0	100%	
EU315007.1	Transformation vector pC23C, complete sequence	1962	3161	100%	0.0	100%	
AB294473.1	Gateway binary vector pGWB506 DNA, complete sequence	1962	1962	100%	0.0	100%	
AB294430.1	Gateway binary vector pGWB406 DNA, complete sequence	1962	1962	100%	0.0	100%	
EF546437.1	Binary vector pGFPUSplus, complete sequence	1960	4157	99%	0.0	100%	
AB608311.1	Gateway binary vector pGWB760 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608308.1	Gateway binary vector pGWB754 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608305.1	Gateway binary vector pGWB751 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608302.1	Gateway binary vector pGWB744 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608299.1	Gateway binary vector pGWB741 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608295.1	Gateway binary vector pGWB729 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608292.1	Gateway binary vector pGWB726 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608289.1	Gateway binary vector pGWB723 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608286.1	Gateway binary vector pGWB720 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608283.1	Gateway binary vector pGWB717 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608280.1	Gateway binary vector pGWB714 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	
AB608277.1	Gateway binary vector pGWB711 DNA, complete sequence	1953	1953	99%	0.0	100%	

그림 2-8. 유전자변형 *CryIAc1*양배추의 도입유전자 cassette의 RB쪽 염기서열과 NCBI 분석 결과

표 2-5. 유전자변형 *CryIAcI* 양배추의 도입유전자 cassette RB 삽입위치 분석에 사용된 primer list

primer 명칭	sequence
BT-RB-R2	5'-AGGTGGCTCCTACAAATGCC-3'
BT-RB-R1	5'-GCTTGCTTCACAAACCAAGGCAAG-3'
BT-RB-U1	5'-GTCGTGACTGGGAAAACCCT-3'
BT-RB-U2 (pCAM2300-RB-F2)	5'-CCAACTTAATCGCCTTGCAG-3'
BT-RB-U3 (pCAM2300-RB-F1)	5'-CAGCTGGCGTAATAGCGAAGA-3'

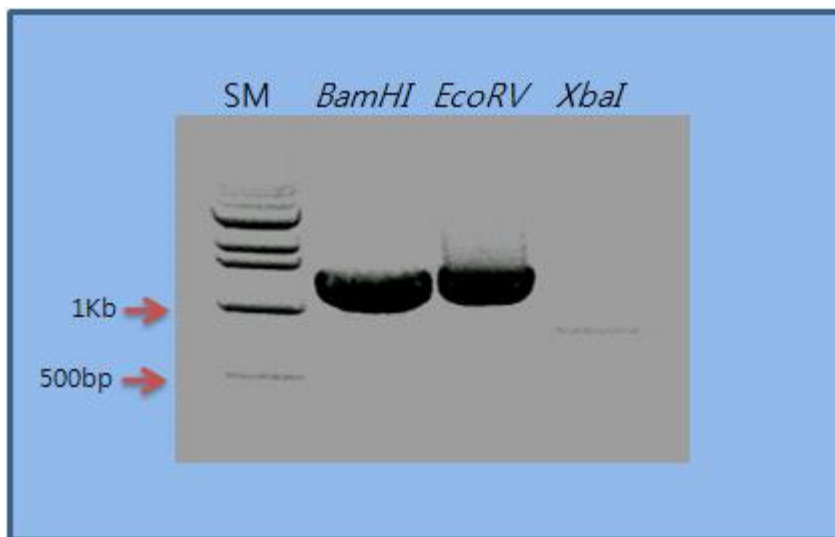


그림 2-9. C20의 도입유전자 cassette RB 삽입위치 분석을 위한 IPCR결과

```

1   TCGAGCTGGC GTATAGCGAA GAGGCCCGCA CCGATCGCCC TTCCCAACAG
51  TTGCGCAGCC TGAATGGCGA ATGCTAGAGC AGCTTGAGCT TGGATCAGAT
101 TGTCGTTTCC CGCCTTCAGT TAAACTATC AGTGTTTGAC ACCAGCCAGC
도입유전자 Cassette의 RB Vector 부분
151 CAACAGCTCC CCGACCGGCA GCTCGGCACA AAATCACCAC TCGATACAGG
201 CAGCCCATCA GTCCGGGACG GCGTCAGCGG GAGAGCCGTT GTAAGGCGGC
251 AGACTTTGCT CATGTTACCG ATGCTATTTCG GAAGAACGGC AACTAAGCTG
301 CCGGGTTTGA AACACGGATG ATCTCGCGGA GGGTAGCATG TTGATTGTAA
351 CGATGACAGA GCGTTGCTGC CTGTGATCAC CGCGGTTTCA AAATCGGCTC
401 CGTCGATACT ATGTTATACG CCAACTTTGA AAACAACTTT GAAAAAGCTG
451 TTTTCTGGTA TTTAAGGTTT TAGAATGCAA GGAACAGTGA ATTGGAGTTC
501 GTCTTGTTAT AATTAGCTTC TTGGGGTATC TTAAATACT GTAGAAAAGA
551 GGAAGGAAAT AATAAATGGC TAAAATGAGA ATATCACCGG AATTGAAAAA
    
```

601 ACTGATCGAA AAATACCGCT GCCTAAAAAA TAAAGAAAGG AAGGTCGCC
651 TGC

>gb|AF234315.1|AF234315 Binary vector pCAMBIA-2300, complete sequence
Length=8742

Score = 902 bits (488), Expect = 0.0
Identities = 505/513 (98%), Gaps = 2/513 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1 CCAGCCAGCCAACAGCTCCCCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCCTCGATACAGGC 60
      |||
Sbjct 6172 CCAGCCAGCCAACAGCTCCCCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCCTCGATACAGGC 6113

Query 61 AGCCCATCAGTCCGGGACGGCGTCAGCGGAGAGCCGTTGTAAGGCGGCAGACTTTGCTC 120
      |||
Sbjct 6112 AGCCCATCAGTCCGGGACGGCGTCAGCGGAGAGCCGTTGTAAGGCGGCAGACTTTGCTC 6053

Query 121 ATGTTACCGATGCTATTCGGAAGAACGGCAACTAAGCTGCCGGGTTTGAAACACGGATGA 180
      |||
Sbjct 6052 ATGTTACCGATGCTATTCGGAAGAACGGCAACTAAGCTGCCGGGTTTGAAACACGGATGA 5993

Query 181 TCTCGCGGAGGGTAGCATGTTGATTGTAACGATGACAGAGCGTTGCTGCCTGTGATCACC 240
      |||
Sbjct 5992 TCTCGCGGAGGGTAGCATGTTGATTGTAACGATGACAGAGCGTTGCTGCCTGTGATCACC 5933

Query 241 GCGGTTTCAAATCGGCTCCGTCGATACTATGTTATACGCCAACTTTGAAAACAACCTTTG 300
      |||
Sbjct 5932 GCGGTTTCAAATCGGCTCCGTCGATACTATGTTATACGCCAACTTTGAAAACAACCTTTG 5873

Query 301 AAAAAAGCTGTTTTCTGGTATTTAAGGTTTTAGAAATGCAAGGAACAGTGAATTGGAGTTCG 360
      |||
Sbjct 5872 AAAAAAGCTGTTTTCTGGTATTTAAGGTTTTAGAAATGCAAGGAACAGTGAATTGGAGTTCG 5813

Query 361 TCTTGTATAATTAGCTTCTTGGGGTATCTTTAAATACTGTAGAAAAGAGGAAGGAAATA 420
      |||
Sbjct 5812 TCTTGTATAATTAGCTTCTTGGGGTATCTTTAAATACTGTAGAAAAGAGGAAGGAAATA 5753

Query 421 ATAAATGGCTAAAATGAGAATATCACCGGAATTGaaaaactgatgaaaaataccgctg 480
      |||
Sbjct 5752 ATAAATGGCTAAAATGAGAATATCACCGGAATTGAAAAAACTGATCGAAAAATACCGCTG 5693

Query 481 cctaaaaataaagaaaGGAAGGTCGCCCTGCT 513
      | ||| || ||| ||| || |||
Sbjct 5692 CGTAAAAGATACGGAA-GGAATGTCTCC-TGCT 5662
```

source 1..8742
/organism="Binary vector pCAMBIA-2300"
/mol_type="other DNA"
/db_xref="taxon:118407"

```

misc_feature    complement(980..1980)
                /note="STA region from pVS1 plasmid"
rep_origin      complement(2573..3573)
                /note="pVS1-REP; replication origin from pVS1"
misc_feature    complement(3983..4243)
                /note="bom site from pBR322"
rep_origin      complement(4383..4663)
                /note="pBR322 origin of replication"
CDS             complement(4954..5748)
                /note="aadA (kanamycin resistance) gene amplified from
                pIG121Hm"
                /codon_start=1
                /product="aminoglycoside phosphotransferase"
                /protein_id="AAF65399.1"
                /db_xref="GI:7638147"

```

/translation="MAKMRISPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLK

MTDSRYKGTITYDVEREKDMMLWLEGKLPVPKVLHFERHDGWSNLeventSEADGVLCSSEY

EDEQSPEKIIELYAECIRLFHSIDISDCPYTNSLDSRLAELDYLLNNDLADVDCENWE

EDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKDGKVSFGFIDLGRSGRADKW

YDIAFCVRSIREDIGEEQYVELFFDLLGIKPDWEKIKYYILLDELFF

```

misc_feature    6173..6198

```

```

                /note="left border repeat from C58 T-DNA"

```

그림 2-10. C20 event의 RB IPCR 염기서열 및 NCBI 분석 결과

(2) GM 양배추 event C8, C10, C11-2, C39-1, C41, C60의 분석

2011년 3월에 농우 바이오에서 가져온 *Bt* 양배추 C8, C10, C11-2, C39-1, C41, C60 과 숙주 양배추 AD-126을 일주일 정도 온실에서 순화시킨 후, 분갈이하였다.

(가) 도입유전자 수 분석

2주 정도 더 자란 개체의 어린잎을 골라 각 event별로 CTAB method를 이용하여 DNA를 추출하고, 위와 같은 방법으로 Southern blotting을 수행하였다. 그 결과, 모든 분석한 6점의 event에는 모두 2 copy 이상의 도입유전자가 삽입되었음을 알 수 있었다(그림 2-11).

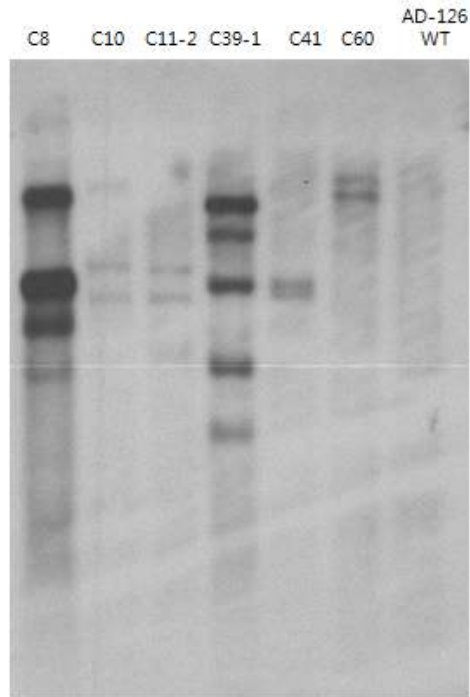


그림 2-11. 좀나방 저항성 양배추의 Southern blot 분석 결과. GM event C8, C10, C11-2, C39-1, C41, C60 lane에서 모두 2 band 이상이 관찰되어 2 copy 이상의 도입유전자가 삽입되었음을 확인

(나) C8, C10, C11-2, C41, C60 및 C39-1 event의 삽입형태 분석

Southern blot 분석에서 2 copy 이상이 삽입된 것으로 확인된 유전자변형 양배추 6 event의 삽입형태 분석을 위하여 위에 기술한 바와 같이 여러 가지 조합의 가능성을 고려하여 삽입형태를 확인 할 수 있는 primer를 고안하여 분석한 결과, 그림 2-12와 같이 숙주에 비하여 GM에서 특이적인 band가 나타난 4개의 event(C8, C10, C41 및 C39-1)는 그림2-4의 모식도 중 1번과 같은 형태의 tandem repeat형태로 삽입되었음을 보여준다. 2 copy의 도입유전자가 연속적이지 않고 다른 chromosome 부위에 삽입된 것으로 보이는 C11-2, C60, C39-1에 대해서는 각각의 도입유전자 cassette의 도입위치를 inverse PCR을 수행하여 해명함과 동시에 농우바이오에서 숙주에 backcross 또는 후대 검정을 실시하여 도입유전자를 분리할 예정이다.

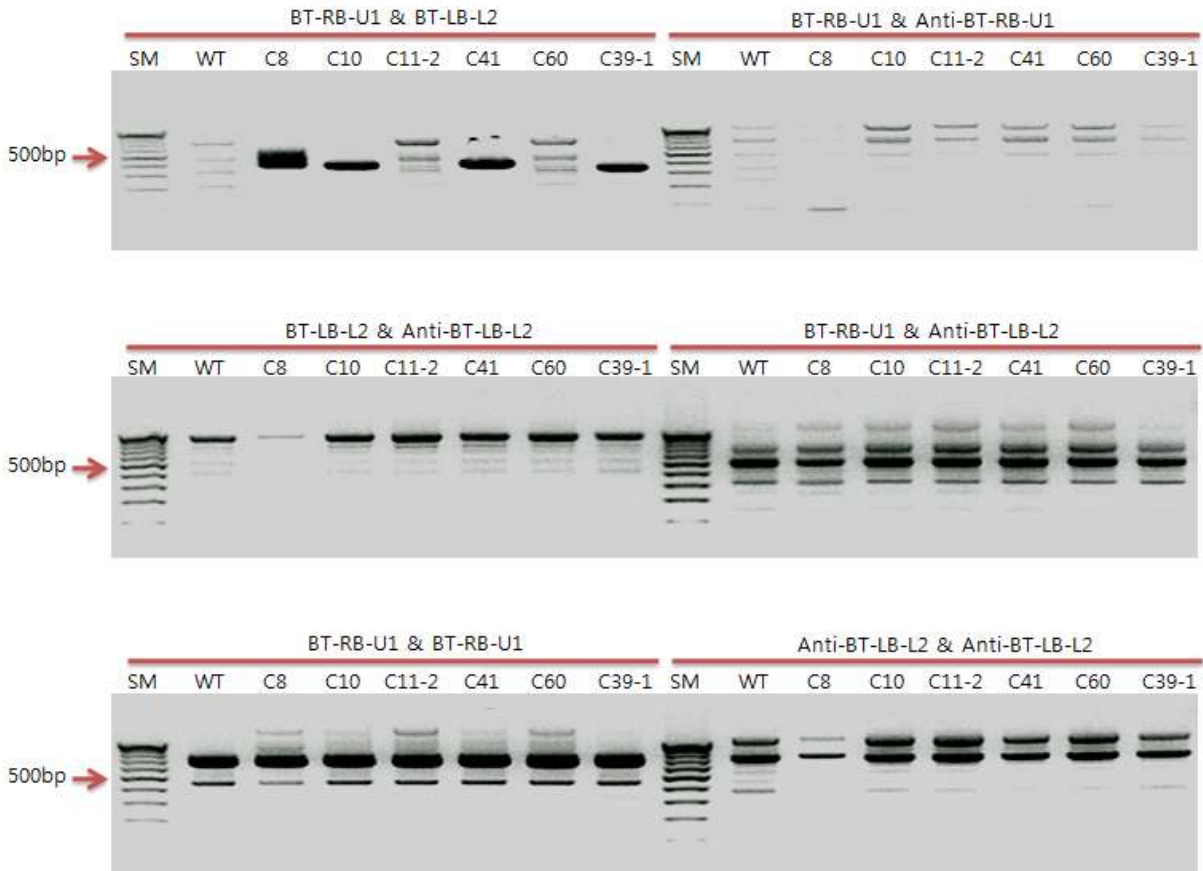


그림 2-12. 유전자변형 *CryIAcI* 양배추 C8, C10, C11-2, C41, C60 및 C39-1 event의 도입유전자 cassette 삽입형태 분석 PCR 결과

(다) 도입유전자 양배추 게놈상의 위치 해명

- 유전자변형 *CryIAcI* 양배추 C8, C10, C11-2, C41, C60 및 C39-1 line의 도입유전자 cassette의 말단 온전성 확인

C20, C24 event의 말단 온전성 확인에 사용된 방법과 동일하게 시험한 결과, 모든 event에서 말단이 관찰되었다(그림 2-13). 하지만 이러한 결과는 도입유전자가 2 copy 이상 삽입되었으므로 이들 중 하나가 말단이 소실된 경우에 대한 검출을 할 수가 없다.

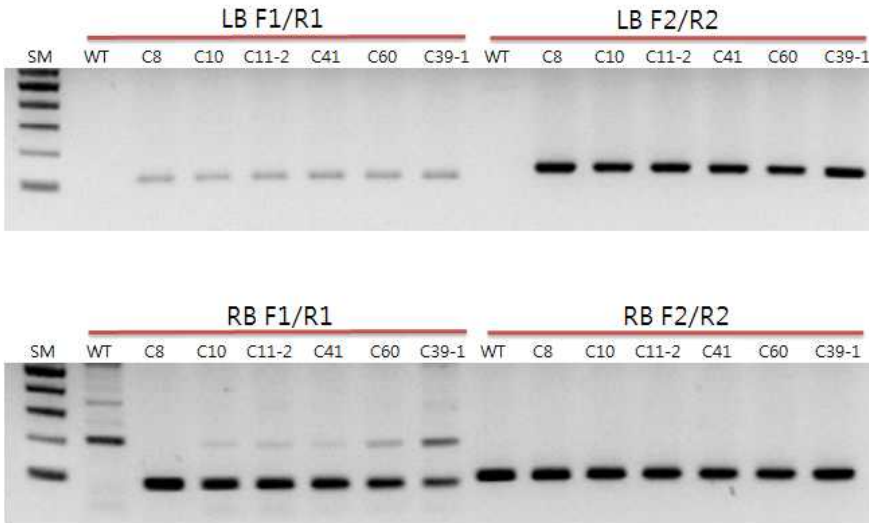


그림 2-13. 유전자변형 *CryIAc1* 양배추 C8, C10, C11-2, C41, C60 및 C39-1의 도입유전자 말단 온전성 분석

(3) 추가 49개 *nptII* 선발 마커 사용 GM 양배추에서 우량 event의 선발

(가) 1차년도 (2010-2011) 연구 결과에 따른 대규모 우량 event 반복 수행 근거

단일 copy의 도입유전자가 intergenic region에 삽입된 형질전환 event를 선발하기 위하여 1차년도에 9개의 event를 분석하였다. 이들 중 1개 event만 단일 copy의 도입유전자가 삽입된 event (C20) 이었고, 5점의 event (C24, C30, C11-2, C60, C39-1)는 PCR을 통한 삽입형태 분석을 통해 2 copy 이상의 도입유전자가 연속적이지 않고 서로 다른 chromosome에 삽입된 것으로 예측하였다. C20의 경우에는 도입유전자가 배추의 EST인 BR119914에 유사한 유전자에 삽입된 것을 알 수 있었다. 두 개의 도입유전자가 다른 chromosome에 삽입된 것으로 예측된 5개 event에 대한 분석을 당해연도 (2차년도) 초반에 수행하였는데, 그 결과는 vector의 backbone이 일부 삽입되거나 도입유전자의 내부가 잘린 fragment가 tandem repeat를 이루는 등으로 삽입 구조 분석 PCR에서 두 개 이상의 온전한 도입유전자 cassette이 tandem repeat로 삽입된 경우에 PCR 산물이 생산되지 않는 구조로 2 copy 이상의 도입유전자가 삽입되었음을 알 수 있었다. 결론적으로, 이러한 결과에 기초하여 제1세부과제에서는 대량의 형질전환체를 다시 생산하였고, 본 협동과제에서는 1차년도와 유사한 방법으로 이들 대량의 형질전환체에 대해 단일 copy의 도입유전자가 intergenic region에 삽입된 형질전환 event를 선발을 2차 연도에 수행하였다.

(나) 다중 도입유전자 cassette의 삽입 구조의 PCR 분석을 통한 우량 event 예비 선발

제1세부과제에서 입수한 양배추 형질전환 event들은 일차적으로 도입유전자의 말단 온전성 및 도입유전자 삽입 유무를 PCR 기법을 사용하여 확인하였다. 도입유전자가 2 copy 이상 형질전환된 경우에는 대부분의 경우에 tandem repeat 즉 연속해서 삽입되는 경향이 있으며, 이러한 event는 위해성 평가 대상에서 제외되는데, 본 과제에서는 PCR 분석을 통하여 일차적으로 tandem repeat로 예측되는 산물이 생성되는 경우에는 Southern blot 분석이나 inverse PCR 분석에서 제외하였다.

① 2011년 11월 입수 양배추 형질전환체의 분석 결과

○ 제1세부과제에서는 총 3차에 걸쳐 형질전환 양배추 T₀ event의 분석용 엽조직을 제공하였다. 2011년 11월에 제공받은 엽조직은 표 2-6과 같다.

표 2-6. 2011년 11월 10일 제공받은 형질전환 양배추 내역

LM line	Tandem PCR	Southern blotting
C61	○	
C62	○	
C63	○	
C64	○	
C65	X	☑
C66-1	○	
C66-2	○	
C67-1	○	
C67-2	○	
C68	X	☑
C69-1	○	
C69-2	○	
C69-3	○	
C70	○	
C71	X	☑
C72	X	☑
C73	X	☑
C74	○	
C75	○	
C76	△	☑
C77	○	

㉓ 말단 온전성 분석

○ 2011년 11월에 농우로부터 수령한 *Bt* 양배추 21개 event에 대하여 도입유전자의 말단 온전성 분석을 실시하였다(표 2-7, 그림 2-15). 대부분의 event에서 left border (LB) 및 right border (RB) 말단이 온전히 삽입된 것으로 보이나 event C74는 LB 말단, event C62 및 C64는 RB 말단 구조의 이상을 확인하였다.

표 2-7. 말단 온전성 확인을 위한 PCR primers

	Primer 명칭	Sequence(5'→3')
LB	pCAM2300-LB-F1	TCGGGGGATCTGGATTTTAG
	pCAM2300-LB-R1	TTTCGCTCATGTGTTGAGCA
	pCAM2300-LB-F2	TGCTCAACACATGAGCGAAA
	pCAM2300-LB-R2	TGACGAGTTCTTCTGAGCGG
RB	pCAM2300-RB-F1	CAGCTGGCGTAATAGCGAAG
	pCAM2300-RB-R1	CTGATCCAAGCTCAAGCTGC
	pCAM2300-RB-F2	CCAACCTAATCGCCTTGCAG
	pCAM2300-RB-R2	TCTAGCATTCGCCATTCAGG

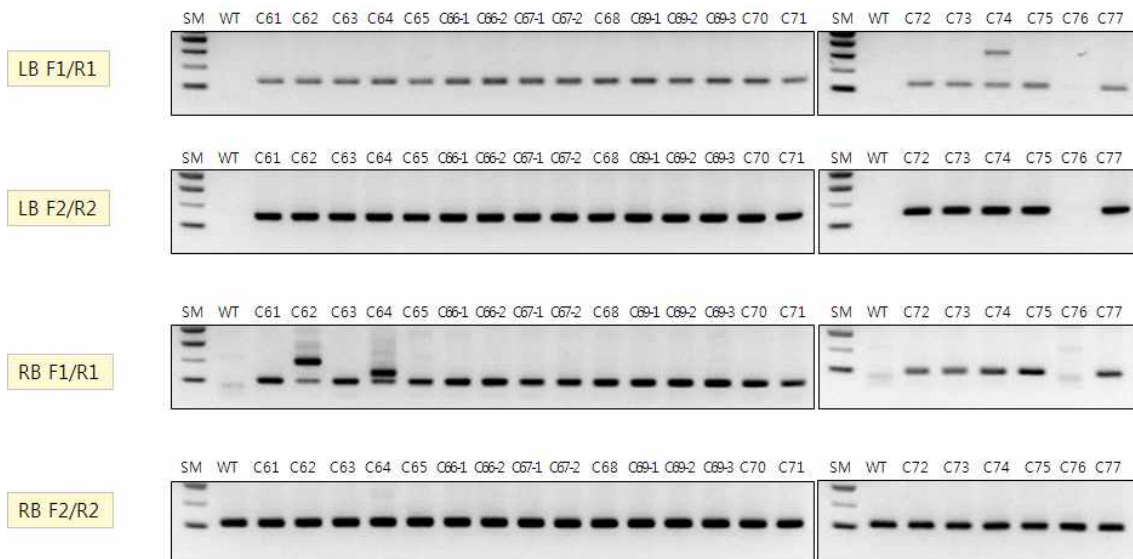


그림 2-15. 말단 온전성 확인 PCR 산물의 agarose gel 분리 결과

㉞ 삽입 구조 분석

○ Tandem repeat로 도입유전자가 삽입되었는지를 확인하는 PCR scheme은 그림 2-16에 나타낸 바와 같고, 사용된 primer 명칭 및 염기서열은 표 2-8에 기술한 바와 같다. PCR 분석 결과, event C65, C68, C71, C72, C73, C76을 제외한 나머지 event의 경우 최소 2 copies가 1번 형태의 tandem repeat로 삽입 된 것으로 확인되었다(그림2-17).

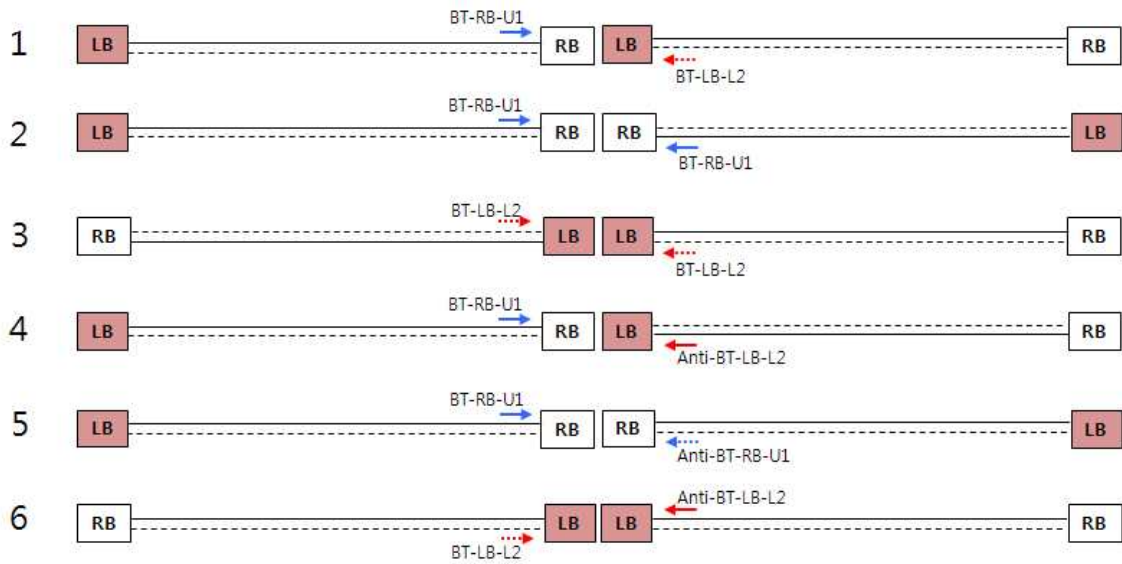


그림 2-16. 유전자변형 *CryIac1* 양배추 도입유전자 cassette 삽입형태 분석 모식도

표 2-8. 유전자변형 *CryIac1* 양배추 C24, C30 event의 도입유전자 cassette 삽입형태 분석에 사용된 primer list

primer 명칭	sequence
BT-RB-U1	5'-GTCGTGACTGGGAAAACCCT-3'
pCambia2300-LB-L2 (BT-LB-L2)	5'-TTTCGCTCATGTGTTGAGCA-3'
Anti-BT-RB-U1	5'-CAGCTCTGACCCTTTTGGGA-3'
Anti-pCambia2300-LB-L2 (Anti-BT-LB-L2)	5'-AAAGCGAGTACACAACCTCGT-3'

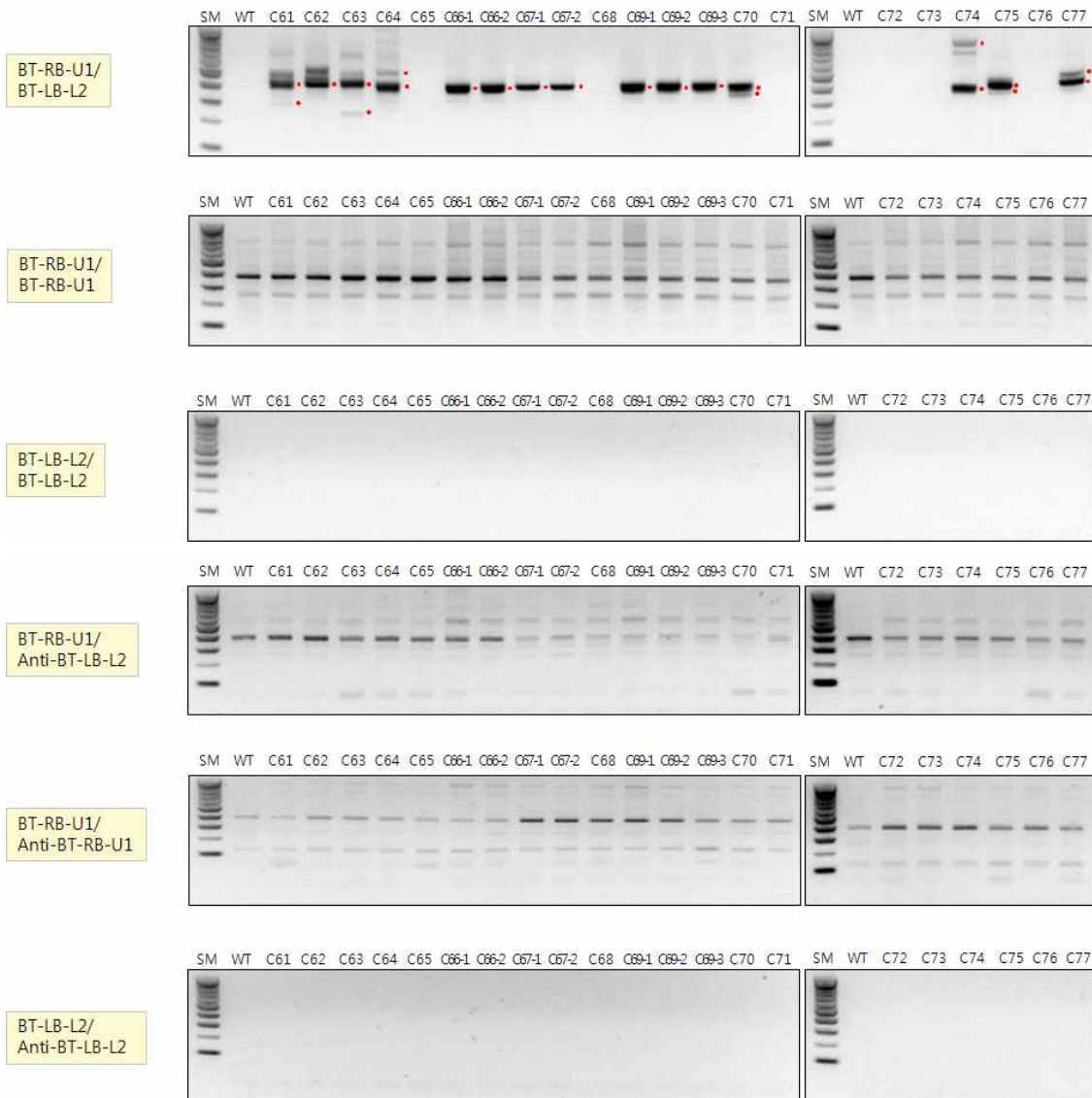
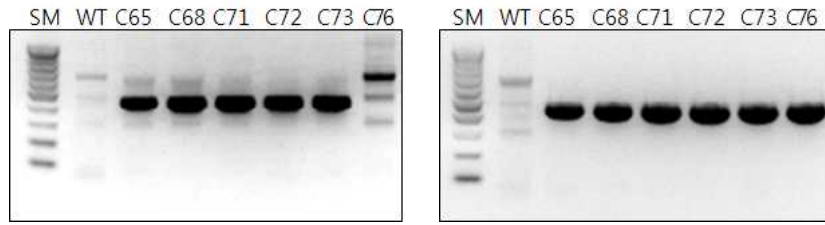


그림 2-17. 삽입 구조 분석 결과

㉔ 도입유전자 온전성 분석 : selection marker 확인

○ 삽입구조의 분석 결과 tandem repeat가 아닐 가능성이 있는 event C65 및 C68, C71, C72, C73, C76의 6개 event에 대하여 selection marker로 사용된 nptII를 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하였다. 농우에서 제공 받은 DNA와 CTAB을 이용하여 추출한 DNA를 이용하여 각각 PCR 분석을 하였다. Event C76의 경우 농우에서 제공 받은 DNA에서는 selection marker가 확인되지 않았으나 CTAB 방법으로 다시 추출한 DNA에서는 selection marker가 확인되었다.



<농우에서 제공받은 DNA>

<CTAB으로 추출한 DNA>

그림 2-18. Selection marker의 삽입여부 분석 결과

○ CTAB으로 추출한 DNA로 위 6개의 event의 삽입 형태의 재분석을 실시하였다. primers set는 앞서 실시한 실험과 동일하였다. Event C76의 경우 농우에서 제공 받은 DNA를 이용한 분석에서는 삽입 형태 및 말단 온전성 분석에서 어떠한 결과도 얻지 못하였으나, CTAB으로 다시 추출한 DNA를 이용한 분석에서는 RB-LB 형태의 tandem repeat로 삽입된 것을 확인하였다.

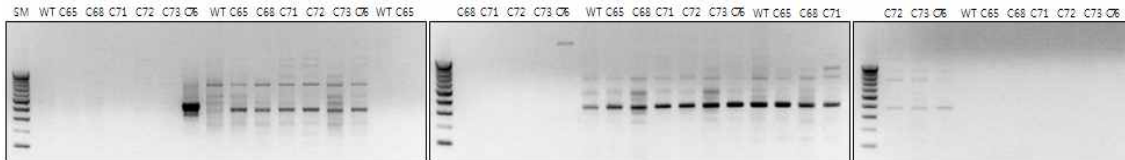


그림 2-19. 삽입 구조의 재분석 결과 (Event C76에서 tandem repeat 확인)

② 2011년 12월 및 2012년 3월 입수 양배추 형질전환체의 분석 결과

○ 2011년 12월에 2차적으로 양배추 26개 T₀ event의 엽조직을 입수하였으며(표2-9), 2012년 3월에 추가적으로 양배추 2개 T₀ event의 엽조직을 입수하였다 (표2-10). 2012년 3월에 입수한 2 event의 엽조직은 PCR 분석 없이 Southern blot 분석을 수행하였다.

표 2-9. 2011년 12월 21일 제공받은 형질전환 양배추 내역

LM line	Tandem PCR	Southern blotting (1차 DNA)	Southern blotting(2차 DNA)
C78	○		
C79	○		
C80	X		
C81	○		
C82	○		
C83	○		
C84	○		
C85-1	X	☑	☑
C85-2	○		
C86-1	X	☑	☑
C86-2	○		
C87-1	○		
C87-2	○		
C88-1	X	☑	
C88-2	X		
C88-3	X		
C89	○		
C90	X		
C91	○		
C92	X		
C93	X		
C94-1	X	☑	☑
C94-2	X	☑	☑
C94-3	○		
C95	X	☑	☑
C96	○		

표 2-10. 2012년 3월 2일 제공받은 형질전환 양배추 내역

LM line	Southern blotting
C97-1	☑
C97-2	☑

㉔ Selection marker *nptII* 삽입 여부 확인

○ 2012년 12월 21일 샘플링 해온 *CryIAc1* 양배추 26개 event에 대하여 selection marker *npt II*가 삽입되었는지 PCR 분석을 통하여 확인하였다. PCR 분석 결과, wild type에서는 product가 확인되지 않았으나 *CryIAc1* 양배추 모든 event에서 *nptII*가 확인되었다.

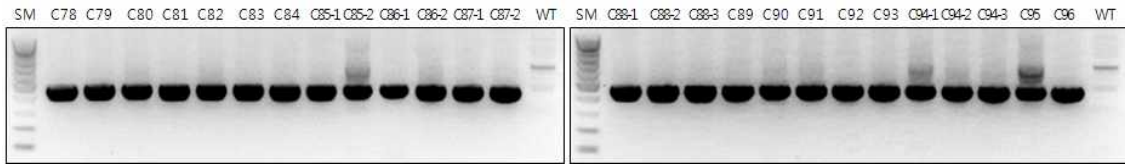


그림 2-20. Selection marker의 삽입 여부 분석 결과

㉞ 삽입 구조 분석

○ Tandem repeat로 2개 이상의 도입유전자가 삽입되었는지를 분석하기 위하여 위 표 2-8에서 열거한 primer와 그림 2-16의 모식도에 따라 PCR 분석을 수행하였다. PCR 분석 결과, event C80, C85-1, C86-1, C88-1, C88-2, C88-3, C90, C92, C93, C94-1, C94-2, C95은 tandem repeat로 삽입 되지 않은 것으로 예측되었다.

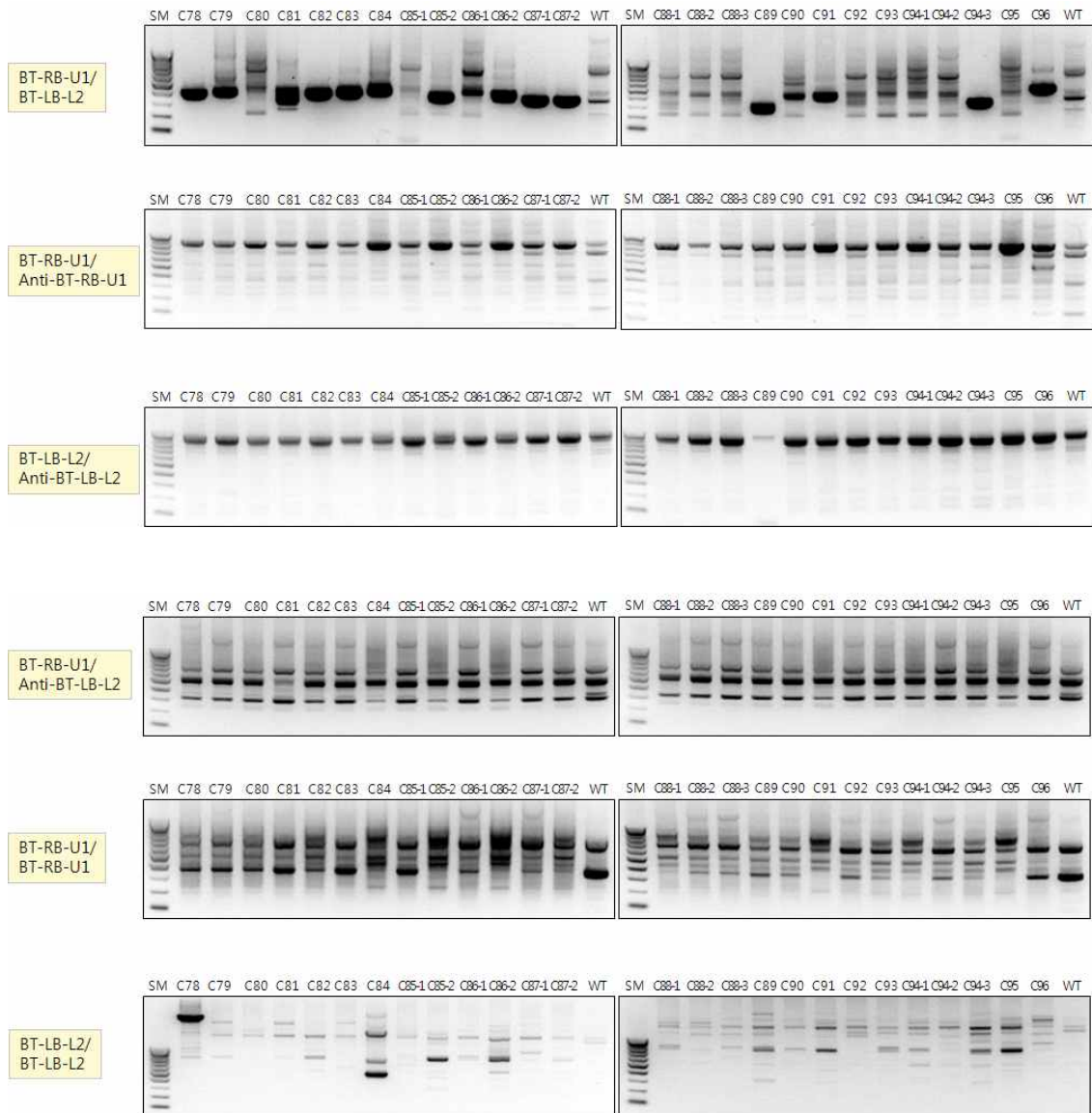


그림 2-21. 삽입 구조 분석 결과

(나) Southern blot 분석을 통한 도입유전자 수 분석

○ PCR 기법을 사용하여 도입유전자가 온전히 삽입되었으며, 다중 도입유전자가 tandem repeat로 삽입되지 않은 것으로 예측된 event들에 대하여 Southern blot 분석을 통해 도입유전자 copy 수 분석을 실시하였다.

① 2011년 11월 입수 양배추 형질전환체의 분석 결과

○ 실험목적

좁나방 저항성 유전자가 transformation된 LM 양배추의 도입 유전자 copy 수를 분석한다.

○ 실험방법 및 결과

2011년 11월에 농우 바이오에서 가져온 LM 양배추 line 중 PCR 분석을 통해 단일 copy로 예상되는 line을 선발하고, 각 line별로 CTAB method를 이용하여 DNA를 추출하여 형광 정량 방법으로 정량하였다. 도입유전자 cassette sequence map의 *nptII* 부분에서 probe 위치를 정하고, primer 쌍을 *npt* 48F 5'-GGTGGAGAGGCTATTCGGCT-3'와 *npt* 515R 5'-CCCTGATGCTCTTCGTCCAT-3'로 제작한 primer와 Biotin-14-dCTP를 이용하여 probe PCR 하고, Gel purification 하였다. Probe를 기준으로 한쪽 방향에만 restriction site 가 있는 *EcoRI*과 *HindIII*을 선정하여 각 line별 DNA 5 µg에 30 unit 처리하여 overnight digestion하였다. Digestion한 양배추 DNA는 1% Seakem agarose gel에 전기영동하고, 분리된 DNA를 capillary 현상을 이용하여 membrane으로 transfer하였고, 95°C에서 denature시킨 probe를 DNA와 hybridization 시킨 후에, probe에 conjugate와 substrate를 붙여 X-ray film에 exposure시키고 현상하였다.

실험결과, 모든 line 이 2 band 이상이 관찰되어 도입유전자가 2 copy 이상이 삽입되었음을 확인하였으며, C65 line은 band가 확인되지 않았다 (그림2-22).

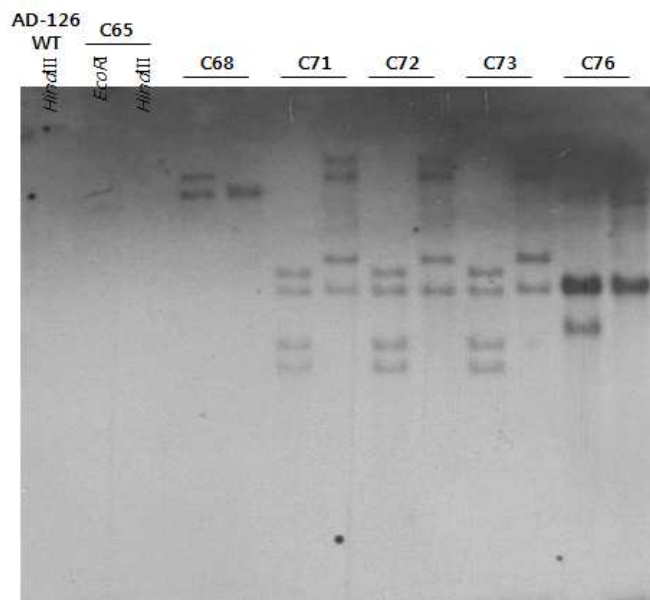


그림 2-22. Bt 양배추의 Southern blotting analysis

② 2011년 12월 및 2012년 3월 입수 양배추 형질전환체의 분석 결과

○ 실험목적

PCR 기법을 사용하여 도입유전자가 tandem repeat로 다중 삽입되지 않은 것으로 예측된 event C80, C85-1, C86-1, C88-1, C88-2, C88-3, C90, C92, C93, C94-1, C94-2, C95 및 2012년 3월에 입수한 C97-1 및 C97-2 event에 대한 도입유전자 copy 수 분석을 실시하였다.

○ 실험방법 및 결과

실험 방법은 위에 기술한 바와 같다. 실험결과, C85-1, C86-1, C88-1, C94-1, C94-2, C95 line에서 약하게 1 copy로 확인되었으며 (그림 2-23), 실험 결과를 보완하고자 위 6개 line의 DNA를 재추출하고, 새로 수령한 line C97-1, C97-2를 함께 DNA 추출하여 restriction enzyme으로 *Hind*III를 반응시켜 반복 실험을 수행하였다. 실험 결과, C86-1과 C95는 band intensity가 매우 낮았고, C88-1, C97-1과 C97-2 line은 2 copy 이상으로 확인되었다(그림 2-24). 단일 copy로 예상되는 C85-1, C86-1, C94-1, C94-2, C95 line의 DNA에 50 μ g/ml RNase A를 처리한 후 반복실험 한 결과, C86-1 line은 band intensity가 매우 낮았고, 나머지 line들은 *Eco*RI과 *Hind*III에 대하여 1 copy로 확인되었다(그림 2-25).

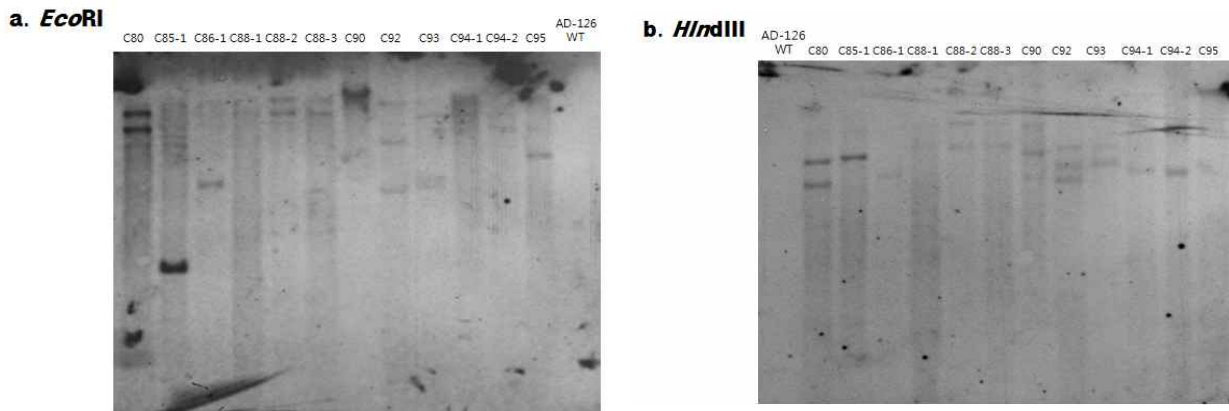


그림 2-23. *Bt* 양배추의 Southern blotting analysis

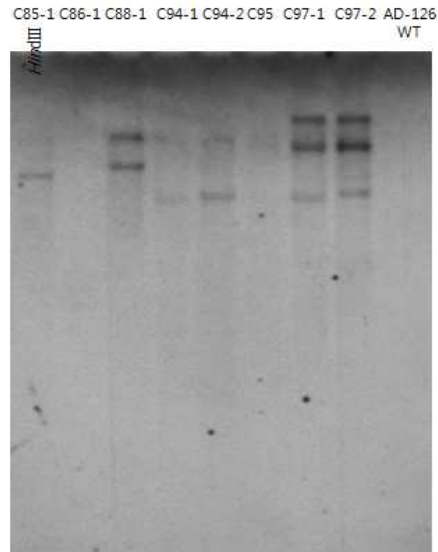


그림 2-24. *Bt* 양배추의 Southern blotting analysis

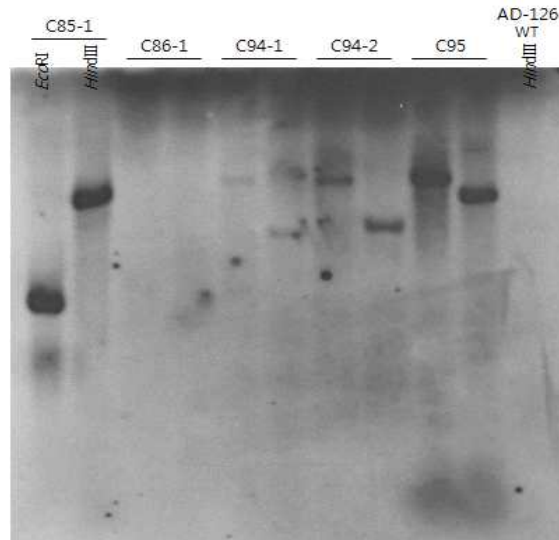


그림 2-25. *Bt* 양배추의 Southern blotting analysis

(다) 도입유전자 삽입 위치 분석을 통한 우량 event의 선발

○ 다중 도입유전자 cassette의 삽입 구조의 PCR 분석, 말단 온전성 확인, Southern blot 분석 등을 통해 선발한 후보 우량 event에서 도입유전자의 삽입위치의 인접 염기서열을 inverse PCR 기법을 통해 해명하여 도입유전자가 intergenic region에 삽입되었는지를 확인하여 우량 event 후보를 선발하였다. C65, C68, C85-1, C86-1, C94-1, C94-2, C95로서 위 후보 event 분석에서 single copy의 도입유전자가 삽입된 것으로 예측된 event에 대해 inverse PCR을 수행하였다. 삽입위치 해명 결과를 요약한 표는 아래와 같다 (표 2-11).

표 2-11. 양배추 형질전환체의 도입유전자 인접 염기서열 분석 결과 요약

Event	도입유전자 인접 염기서열의 특성	비고
C62	RB-LB 구조의 tandem repeat	
C68	Vector backbone 삽입	
C85-1	Intergenic region	
C86-1	Intergenic region	
C94-1	Genic region, 삽입시 37 bp 중복	C94-1과 C94-2는 동일 event임
C94-2	Genic region, 삽입시 37 bp 중복	C94-1과 C94-2는 동일 event임
C95	Intergenic region	Suppression subtractive hybridization에 의해 생산된 artifact로 간주되는 EST에 상동성이 있으므로 인접 sequence의 발현 가능성 시험을 요함

① Vector NW2300/*CryIAC1* whole sequence 결정

○ Inverse PCR에는 binary vector의 RB와 LB 내부의 염기서열이 필요하나 개발자인 제1세부 과제에서 RB 부위의 염기서열을 모르기 때문에, PCR 및 sequencing 분석을 통해 *CryIAC1* 양배추에 도입된 vector NW2300/*CryIAC1*의 전체 sequence를 결정하였다.

```

1      TGGCAGGATA TATTGTGGTG TAAACAATT GACGCTTAGA CAACTTAATA ACACATTGCG
      LB
61     GACGTTTTTA ATGTA CTGAA TTAACGCCGA ATTAATTCGG GGGATCTGGA TTTTAGTACT
      CaMV 3'UTR(polyA signal)
121    GGATTTTGGT TTTAGGAATT AGAAATTTTA TTGATAGAAG TATTTTACAA ATACAAATAC
181    ATACTAAGGG TTTCTTATAT GCTCAACACA TGAGCGAAAC CCTATAGGAA CCCTAATTCC
241    CTTATCTGGG AACTACTCAC ACATTATTAT GGAGAAACTC GAGCTTGTCG ATCGACTCTA
301    GCTAGAGGAT CGATCCGAAC CCCAGAGTCC CGCTCAGAAG AACTCGTCAA GAAGGCGATA
      nptII
361    GAAGGCGATG CGCTGCGAAT CGGGAGCGGC GATACCGTAA AGCACGAGGA AGCGGTCAGC
421    CCATTCGCCG CCAAGCTCTT CAGCAATATC ACGGGTAGCC AACGCTATGT CCTGATAGCG
481    GTCCGCCACA CCCAGCCGGC CACAGTCGAT GAATCCAGAA AAGCGGCCAT TTTCCACCAT
541    GATATTCGGC AAGCAGGCAT CGCCATGTGT CACGACGAGA TCCTCGCCGT CGGGCATGCG
601    CGCCTTGAGC CTGGCGAACA GTTCGGCTGG CGCGAGCCCC TGATGCTCTT CGTCCAGATC
661    ATCCTGATCG ACAAGACCGG CTTCATCCG AGTACGTGCT CGCTCGATGC GATGTTTCGC
721    TTGGTGGTCG AATGGGCAGG TAGCCGATC AAGCGTATGC AGCCGCCGCA TTGCATCAGC
781    CATGATGGAT ACTTTCTCGG CAGGAGCAAG GTGAGATGAC AGGAGATCCT GCCCCGGCAC
841    TTCGCCAAT AGCAGCCAGT CCCTTCCCGC TTCAGTGACA ACGTCGAGCA CAGCTGCGCA
901    AGGAACGCCG GTCGTGGCCA GCCACGATAG CCGCGCTGCC TCGTCCTGGA GTTCATTTCAG
961    GGCACCGGAC AGGTTCGGTCT TGACAAAAAG AACCGGGCGC CCCTGCGCTG ACAGCCGGAA
1021   CACGGCGGCA TCAGAGCAGC CGATTGTCTG TTGTGCCAG TCATAGCCGA ATAGCCTCTC
1081   CACCCAAGCG GCCGAGAAC CTGCGTGCAA TCCATCTTGT TCAATCCCCA TGGTTCGATCG
1141   ACAGATCTGC GAAAGCTCGA GAGAGATAGA TTTGTAGAGA GAGACTGGTG ATTCAGCGT
      CaMV35S2 promoter
  
```

1201 GTCCTCTCCA AATGAAATGA ACTTCCTTAT ATAGAGGAAG GTCTTGCGAA GGATAGTGGG
1261 ATTGTGCGTC ATCCCTTACG TCAGTGGAGA TATCACATCA ATCCACTTGC TTTGAAGACG
1321 TGGTTGGAAC GTCTTCTTTT TCCACGATGC TCCTCGTGGG TGGGGGTCCA TCTTTGGGAC
1381 CACTGTTCGGC AGAGGCATCT TGAACGATAG CCTTTCCTTT ATCGCAATGA TGGCATTGT
1441 AGGTGCCACC TTCCTTTTCT ACTGTCCTTT TGATGAAGTG ACAGATAGCT GGGCAATGGA
1501 ATCCGAGGAG GTTCCCGAT ATTACCCTTT GTTGAAAAGT CTCAATAGCC CTTTGGTCTT
1561 CTGAGACTGT ATCTTTGATA TTCTTGGAGT AGACGAGAGT GTCGTGCTCC ACCATGTTAT
1621 CACATCAATC CACTTGCTTT GAAGACGTGG TTGGAACGTC TTCTTTTCC ACGATGCTCC
1681 TCGTGGGTGG GGGTCCATCT TTGGGACCAC TGTCGGCAGA GGCATCTTGA ACGATAGCCT
1741 TTCTTTTATC GCAATGATGG CATTTGTAGG TGCCACCTTC CTTTCTACT GTCCTTTTGA
1801 TGAAGTGACA GATAGCTGGG CAATGGAATC CGAGGAGGTT TCCCAGATATT ACCCTTTGTT
1861 GAAAAGTCTC AATAGCCCTT TGGTCTTCTG AGACTGTATC TTTGATATTC TTGGAGTAGA
1921 CGAGAGTGTC GTGCTCCACC ATGTTGGCAA GCTGCTCTAG CCAATACGCA AACC GCCTCT
1981 CCCC GCGCGT TGGCCGATTC ATTAATGCAG CTGGCACGAC AGGTTTCCCG ACTGGAAAGC
2041 GGGCAGTGAG CGCAACGCAA TTAATGTGAG TTAGCTCACT CATTAGGCAC CCCAGGCTTT
2101 ACACCTTATG CTTCCGGCTC GTATGTTGTG TGGAATTGTG AGCGGATAAC AATTTACAC
2161 AGGAAACAGC TATGACATGA TTACGAATTC CCGATCTAGT AACATAGATG ACACCGCGCG

nos terminator

2221 CGATAATTTA TCCTAGTTTG CGCGCTATAT TTTGTTTTCT ATCGCGTATT AAATGTATAA
2281 TTGCGGGACT CTAATCATAA AAACCCATCT CATAAATAAC GTCATGCATT ACATGTTAAT
2341 TATTACATGC TTAACGTAAT TCAACAGAAA TTATATGATA ATCATCGCAA GACCGGCAAC
2401 AGGATTCAAT CTTAAGAAAC TTTATTGCCA AATGTTTGAA CGATCGGGGA AATTCGAGCT
2461 CGGTACCCCT TAAAGATTGT ACTCAGCCTC AAGAGTGGCA GTAACAGGAA TGAACTCGAA

cryIaC

2521 TCTGTCAATG ATCACTCCTG CAGTACCGCT GAAATTCCTA ACACCCACGA TGTTGCCCAA
2581 TGAAGAAGTG AATGCGTTGG CACTTTCGAA GTAACCAAAA TCGCTGGATT GAAGATTATC
2641 GAGTGAGGTA GCAGTAGCTG GAACGGTGTT GGAGAAGATA GATGAATTGC CCCAGTTCAC
2701 GTTAAGGTGG ATTGGGGTCA CAGAGGCGTA TCTAACCCTA ACTCTGTATC TAGTAGATGT
2761 GGATGGGAAG TGGATAGGAA CTTCGATGTA GCCTCTATTC TGAATGTTGT TGCCAGAGCT
2821 GTTAAGTCTC ACAAGATCTC CGCCAGTGAA TCCTGGTCCG CTGATTACGC TTCCATTGAA
2881 AAGGAAGTTT CCCTTCACGG CAGGGATTTG AGTAATACTA TCAGATGCGA TGATGTTGTT
2941 GAACCTCGGCA GAACGGTGAA TCCAAGAGAA CATAGGAGCT CTGATGATGC TCACGGAAC
3001 GTTGCTGAAT CCGGAACGGA ACATGGACAC GTGGCTAAGC CTGTGGGAGA ATCCTTGCC
3061 GGGTGGCACA TTGTTGTTCT GTGGTGGGAT TTCGTCCAAG GAATCAACGG TTCCGCTCTT
3121 TCTGTAAACA GCGGATGGCA AGTTAGAAGA GGTTCCATAG GCGAACTCTG TTCCGTCAAG
3181 AACGGAAAGT TGCTGGTTGT TGATACCGAT ATTGAAGGGT CTTCTGTACA AGGTGGAAGA
3241 CAAGGTTCTG TAGACACCCT GTCCTAGTTG AGCAACGATA CGTTGTTGTG GAGCGGCGTT
3301 TCCCATAGTT CCATAGAGAG GAAAGGTAAC CTCAGGTCCG GAGAATCCAA CTGGAGAGGC
3361 CATGATCTGG TGTCCAGACC AGTAATAGTA TCCTCTGTGA GCATCGGTGT AGATAGTTAT
3421 GCTGTTCAAG ATGTCCATCA AGTGTGGGCT CCTGATGGAT CTTTCGATAC CCTGGGCAGA
3481 ACCACGGAAG CTACCGTCGA AGTTCTCAAG AACTGGGTTA GTGTAGATTT CTCTGGTAAG
3541 TTGGGACACT GTACGGATAG GGTAACGTCT GGAGTCATAG TTCGGGAAGA GAGCCACAAT
3601 GTCCAAAACGT GTGAGGGTCA ATTCTCTCCT GAACTGGTTG TATCTCACCC AATCTCTAGA
3661 ATCAGGACCC CAGACACGCT CCAAGCCAGT GTTGTACCAA CGAACAGCGT AGTCGGTGTA
3721 GTTTCCAATC AGCCTAGTAA GGTCGTTGTA ACGGCTATTG ATGGTTGCAG CATCGAATCC
3781 CCATCTTTGC CCAAACACGC TAACGTCTCG AAGCACGCTG AGGTGAAGAT TAGCTGCTTG
3841 AACGTACACG GACAAGAGAG GAACTTGTA GTTCTGGACT GCGAACAATG GGATAGCTGT
3901 GGTCAAGGCG CTGTTTATGT CGTTGAATTG AATACGCATT TCCTCGCGGA GAGCTGGGTT

3961 AGTAGGATCG GCTTCCCACT CTCTGAAGCT CTCTGCATAG ATTTGGTAGA GATTGCTCAA
 4021 TCCTTCCAAA CGAGAGATGG CCTGGTTCCT GGCGAACTCT TCGATCCTCT GGTTGATCAA
 4081 CTGCTCAATT TGCACCAGGA ATGCATCCCA TTGAGATGGA CCAAAGATAC CCCAGATGAT
 4141 GTCAACTAGT CCGAGAACGA ACCCAGCTCC TGGCACGAAC TCGCTGAGCA GAAACTGTGT
 4201 CAAGGACAAG GAGATGTCTG TGGGAGTGTA ACCGGTTTCA ATGCGTTCTC CACCAAGTAC
 4261 TTCAACTTCT GGGTACTCA AGCAGTTGTA TGGAATGCAT TCGTTGATGT TTGGGTTGTT
 4321 GTCCATGGGG GATCCTCTAG AGTCCCCCGT GTTCTCTCCA AATGAAATGA ACTTCCTTAT

35S promoter

4381 ATAGAGGAAG GGTCTTGCGA AGGATAGTGG GATTGTGCGT CATCCCTTAC GTCAGTGGAG
 4441 ATATCACATC AATCCACTTG CTTTGAAGAC GTGGTTGGAA CGTCTTCTTT TTCCACGATG
 4501 CTCCTCGTGG GTGGGGGTCC ATCTTTGGGA CCACTGTCCG CAGAGGCATC TTCAACGATG
 4561 GCCTTTCCTT TATCGCAATG ATGGCATTG TAGGAGCCAC CTCCTTTTTC CACTATCTTC
 4621 ACAATAAAGT GACAGATAGC TGGGCAATGG AATCCGAGGA GGTTCGGGA TATTACCCTT
 4681 TGTTGAAAAG TCTCAATTGC CCTTTGGTCT TCTGAGACTG TATCTTTGAT ATTTTGGAG
 4741 TAGACAAGTG TGTCGTGCTC CACCATGTTG ACGAAGATTT TCTTCTTGTC ATTGAGTCGT
 4801 AAGAGACTCT GTATGAACTG TTCGCCAGTC TTTACGGCGA GTTCTGTTAG GTCCTCTATT
 4861 TGAATCTTTG ACTCCATGGC CTTTGATTCA GTGGGAACTA CCTTTTTAGA GACTCCAATC
 4921 TCTATTACTT GCCTTGTTTT GTGAAGCAAG CCTTGAATCG TCCATACTGG AATAGTACTT
 4981 CTGATCTTGA GAAATATATC TTTCTCTGTG TTCTTGATGC AGTTAGTCCT GAATCTTTTG
 5041 ACTGCATCTT TAACCTTCTT GGGAAGGTAT TTGATTTTCT GGAGATTATT GCTCGGGTAG
 5101 ATCGTCTTGA TGAGACCTGC TGCGTAAGCC TCTCTAACCA TCTGTGGGTT AGCATTCTTT
 5161 CTGAAATTGA AAAGGCTAAT CTGGGGACCT GCAGGCATGC AAGCTTGGA CTGGCCGTCG
 5221 TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCCTG GCGTTACCCA ACTTAATCGC CTTGCAGCAC
 5281 ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG CACCGATCGC CCTTCCCAAC
 5341 AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGCTAGA GCAGCTTGAG CTTGGATCAG ATTGTGCTTT
 5401 CCCGCCTTCA GTTTAAACTA TCAGTGTTTG ACAGGATATA TTGGCGGGTA AACCTAAGAG

RB

5461 AAAAGAGCGT TTA

② 양배추 형질전환체의 도입유전자 해명

㉠ Event C65의 도입유전자 삽입 위치 해명

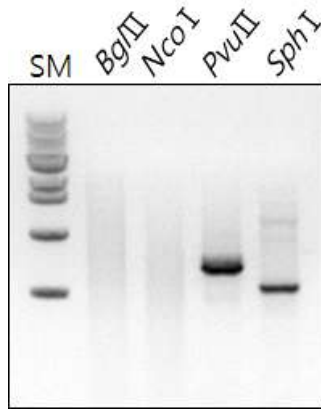
○ *CryIAc1* 양배추 event C65의 LB 부위 삽입 위치를 확인하기 위하여 restriction enzyme *Bgl*II 및 *Nco*I, *Pvu*II, *Sph*I 으로 digestion 하였다. enzyme 처리 후 phenol:CHCl₃ purification 하여 self ligation 후 정량하였다. 이를 inverse PCR 시 template DNA로 사용하였다.

○ Primers set pCAM2300-LB-L1+pCAM2300-LB-U1을 이용하여 1차 PCR을 수행하였고, 1차 PCR product를 template로 하여 primers set pCAM2300-LB-L2+pCAM2300-LB-U2를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. 확인된 product는 primer pCAM 2300 - LB - L2+ pCAM 2300-LB -U2를 이용하여 sequencing 하였다(표 2-12).

○ Event C65의 경우 삽입 형태 분석에서 단일 copy로 예상되었으나 inverse PCR 결과, RB-LB의 tandem repeat 형태로 삽입된 것을 확인하였다.

표 2-12. Inverse PCR에 사용된 primer list

Primer 명칭	Sequence(5'→3')
pCAM2300-LB-L1	TGACGAGTTCTTCTGAGCGG
pCAM2300-LB-L2	TTTCGCTCATGTGTTGAGCA
pCAM2300-LB-L3	CTAAAATCCAGATCCCCCGA
pCAM2300-LB-U1	GCCACACCCAGCCGGCCACAG
pCAM2300-LB-U2	TCGATGAATCCAGAAAAGCG
pCAM2300-LB-U3	CCACCATGATATTCGGCAAG



Event C65의 iPCR 결과

> Reverse_Complement of pCAM2300-LB-L2(Sph I)

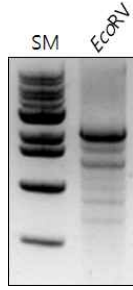
```

1   AAGCTTGGCA CTGGCCGTCG TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCCTG GCGTTACCCA
                                     BT-RB-U1 >>
61  ACTTAATCGC CTTGCAGCAC ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCCG
121 CACCGATCGC CTTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGCTAGA GCAGCTTGAG
181 CTTGGATCAG ATTGTCGTTT CCCGCCTCA GTTTAAACTA TCAGTGTTTG A
                                     CAGGATATA
                                     LB
241 TTGTGGTGTA AACAAATTGA CGCTTAGACA ACTTAATAAC ACATTGCGGA CGTTTTTAAT
301 GTACTGAATT AACGCCAAT TAATTCCGGG GATCTGGATT TTAGTACTGG ATTTTGGTTT
361 TAGGAATTAG AAATTTTATT GATAGAAGTA TTTTACAAAT ACAAATACAT
    
```

㉔ Event C68의 도입유전자 삽입 위치 해명

○ C68 genomic DNA에 대해 restriction enzyme *EcoRV*로 digestion 후 event C68의 LB region에 대한 inverse PCR을 수행하였다. Inverse PCR을 통해 확인된 band는 primer pCAM2300-LB-L2와 pCAM2300-LB-U2를 이용하여 sequencing 하였다.

○ Sequencing 분석을 통해 확인된 인접염기서열인 unknown sequence를 BLAST search한 결과, binary vector pCAMBIA-2300의 vector backbone으로 확인되었다. 삽입된 vector backbone의 크기를 확인하기 위하여 primer BT-RB-U1과 BT-LB-L2를 이용하여 long PCR 분석을 실시하였다. PCR 분석 결과, WT에서는 PCR product가 확인되지 않았으나, event C68에서는 PCR product를 확인할 수 있었다. Product의 크기로 볼 때 삽입된 vector backbone의 크기는 약 6.3 Kb로 추정되며, 이는 left border 쪽의 vector backbone이 전부 삽입된 것으로 사료된다(그림 2-26).



Event C68의 LB region iPCR 결과

> *C68_LB-U2(EcoRV)*

(Inserted vector LB region sequence)

```

1      GCAGGCATCG CCATGTGTCA CGACGAGATC CTCGCCGTCG GGCATGCGCG CCTTGAGCCT
61     GGCGAACAGT TCGGCTGGCG CGAGCCCCTG ATGCTCTTCG TCCAGATCAT CCTGATCGAC
121    AAGACCGGCT TCCATCCGAG TACGTGCTCG CTCGATGCGA TGTTTCGCTT GGTGGTCGAA
181    TGGGCAGGTA GCCGGATCAA GCGTATGCAG CCGCCGATT GCATCAGCCA TGATGGATAC
241    TTTCTCGGCA GGAGCAAGGT GAGATGACAG GAGATCCTGC CCCGGCACTT CGCCCAATAG
301    CAGCCAGTCC CTTCCCGCTT CAGTGACAAC GTCGAGCACA GCTGCGCAAG GAACGCCCGT
361    CGTGGCCAGC CACGATAGCC GCGCTGCCTC GTCCTGGAGT TCATTCAGGG CACCGGACAG
421    GTCGGTCTTG AAAAAAAGAA CCGGGCGCCC CTGCGCTGAC AGCCGAAACA CGGCGGCATC
481    AGAGCAGCCG ATTGTCTGTT GTGCCAGTC ATAGCCGAAT AGCCTCTCCA CCCAAGCGGC
541    CGGAGAACCT GCGTGCAATC CATCTTGTTT AATCCCCATG GTCGATCGAC AGATCTGCGA
601    AAGCTCGAGA GAGATAGATT TGTAGAGAGA GACTGGTGAT TTCAGCGTGT CCTCTCCAAA
661    TGAAATGAAC TTCCTTATAT AGAGGAAGGG TCTTGCGAAG GATAGTGGGA TTGTGCGTCA
721    TCCCTTACGT CAGTGGAGAT ATC(EcoRV)

```

(Unknown sequence)

```

              CTCCCTG ATCGACCGGA CGCAGAAGGC AATGTCATAC
781    CACTTGTCGG CCCTGCCGCT TCTCCCAAGA TCAATAAAGC CACTTACTTT GCCATCTTTC
841    ACAAAGATGT TGCTGTCTCC CAGGTCGCCG TGGGAAAAGA CAAGTTCTC TTCGGGCTTT
901    TCCGTCTTTA AAAAATCATA CAGCTCGCGC GGATCTTTAA ATGGAGTGTC TTCTTCCAG
961    TTTTCGCAAT CCACATCGGC CAGATCGTTA TTCAGTA

```

> *Reverse_Complement of LB-L2(EcoRV)*

(Unknown sequence)

```

1      AGCTTATATA CCTTAGCAGG AGACATTCCT TCCGTATCTT TTACGCAGCG GTATTTTTCG
61     ATCAGTTTTT TCAATTCCGG TGATATTCTC ATTTTAGCCA TTTATTATTT CCTTCCTCTT
121    TTCTACAGTA TTAAAGATA CCCCAAGAAG CTAATTATAA CAAGACGAAC TCCAATTCAC
181    TGTTCCCTTG ATTCTAAAAC CTTAAATACC AGAAAACAGC TTTTCAAAG TTGTTTTCAA
241    AGTTGGCGTA TAACATAGTA TCGACGGAGC CGATTTTGAA ACCGCGGTGA TCACAGGCAG
301    CAACGCTCTG TCATCGTTAC AATCAACATG CTACCCTCCG CGAGATCATC CGTGTTTCAA
361    ACCCGGCAGC TTAGTTGCCG TTCTTCCGAA TAGCATCGGT AACATGAGCA AAGTCTGCCG
421    CCTTACAACG GCTCTCCCGC TGACGCCGTC CCGACTGAT GGGCTGCCTG TATCGAGTGG
481    TGATTTTGTG CCGAGCTGCC GGTCGGGGAG CTGTTGGCTG GCTGGT

```

(Inserted vector LB region sequence)

GGCA GGATATATTG

541 TGGTGTAAC AAATTGACGC TTAGACAAC TAATAACACA TTGCGGACGT TTTTAATGTA
 601 CTGAATTAAC GCCGAATTAA TTCGGGGGAT CTGGATTTTA GTACTGGATT TTGGTTTTAG
 661 GAATTAGAAA TTTTATTGAT AGAAGTATT

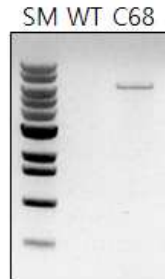


그림 2-26. Event C68의 long PCR 결과

㉔ Event C85-1의 도입유전자 삽입 위치 해명

○ *CryIAc1* 양배추 event C85-1의 RB 부분을 restriction enzyme *Bam*HI 및 *Eco*RV, *Nsi*I, *Xba*I 으로 digestion하였다. enzyme 처리 후 phenol:CHCl₃ purification 하여 self ligation 후 정량하였다. 이를 inverse PCR 시 template DNA로 사용하였다.

○ Primers set BT-RB-R1+BT-RB-U1을 이용하여 1차 PCR을 수행하였고, 1차 PCR product를 template로 하여 primers set BT-RB-R2+BT-RB-U2를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. 확인된 product는 primers set BT-RB-R2+BT-RB-U2를 이용하여 sequencing 하였다 (그림 2-27).

○ Sequencing 결과, *Brassica rapa* Chr5_867의 whole genome shotgun sequence와 88%의 상동성을 나타내었으며, Phytozome data (www.phytozome.net)의 *Brassica rapa*의 gene annotation에 따르면 Bra027346과 Bra027347 유전자 사이의 intergenic region에 위치하였다 (그림 2-28). 또한 NCBI database에 대한 BLAST search에서도 알려진 유전자에 대한 특이한 유사성은 없었다.

Primer name	Sequence(5'→3')
BT-RB-R1	GCTTGCTTCACAAACCAAGGCAAG
BT-RB-R2	AGGTGGCTCCTACAAATGCC
BT-RB-U1	GTCGTGACTGGGAAAACCCT
BT-RB-U2	CCAACTTAATCGCCTTGCAG

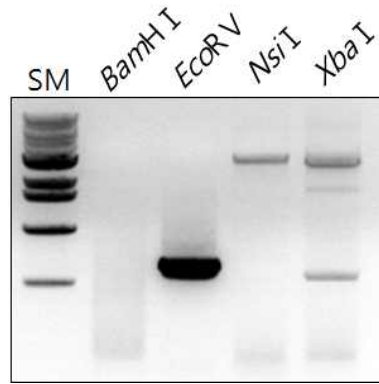


그림 2-27. Event C85-1의 RB region inverse PCR의 gel 양상

> *C85-1(EcoRV)*

(RB region vector seq.)

```

1      GCCTTGCAGC ACATCCCCCT TTCGCCAGCT GGCGTAATAG CGAAGAGGCC CGCACCGATC
61     GCCCTTCCCA ACAGTTGCGC AGCCTGAATG GCGAATGCTA GAGCAGCTTG AGCTTGGATC
121    AGATTGTCGT TTCCCGCCTT CAGTTTAAAC TATCAGTGTT
  
```

(Unknown seq.)

ATTAAGTGGG GGTGATCTAT

```

181    ACATATTATG TTATTTTAAA TTTCGTGGGT GGAAAATATC TCAACGTAAA CCATAGAAGC
241    ATATATACAC CATCAATTAT ATATTGTAAA ATAGATAAAT AGAAAAAAAAA ACGTACAAAA
301    TACACACTAA CATGCACGCA CCGACCGTTT TAGTATAGAA GCAAATAGTT TTCCTCCATC
361    CTTGCGTATG GACCTACCAA AATAACGTAG TTAGGTCGCC TAGCTTTTGT AGAAATCAGA
421    AATTAACACG ACGCGTAGTT TGTCGGCAAG CATATAAACG GCAGCTATTA CGTGTGGACT
481    AGTCA
  
```

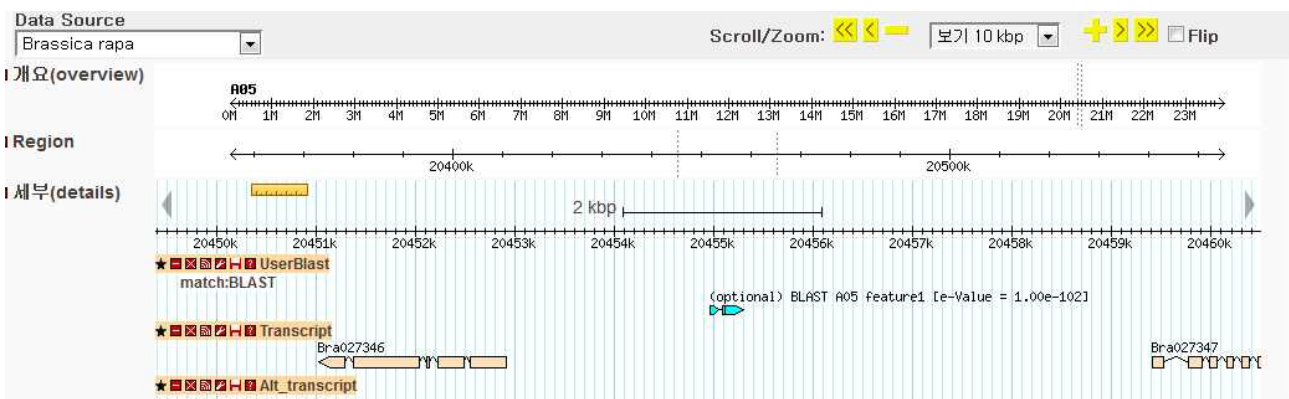


그림 2-28. C85-1 event의 도입유전자 인접 염기 서열의 Phytozome *Brassica rapa* genome의 annotation database에 대한 BLAST search 결과.

○ RB region 도입유전자 삽입 위치 확인

○ *CryIac1* 양배추 event C85-1의 RB region 도입유전자의 삽입 위치를 확인하기 위하여 도입유전자의 RB region과 iPCR을 통해 얻은 sequence를 바탕으로 primer를 디자인하여 primer

BT-RB-U2와 PCR 분석을 수행하였으며, 확인된 product는 sequencing을 하였다 (그림 2-29). Sequencing 결과는 iPCR에서 얻은 결과와 동일하였다.

Primer name	Sequence(5'→3')
BtC85-1-RB-cfm R	GCTGCCGTTTATATGCTTGC

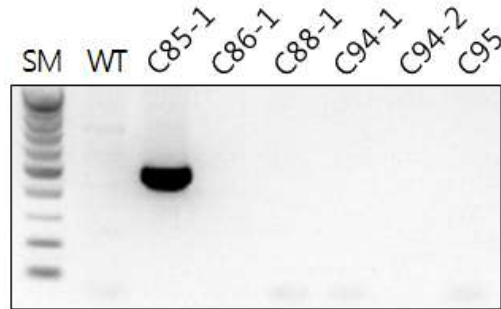


그림 2- 29. Event C85-1의 RB region 도입위치 확인

> *C85-1*

(RB region vector seq.)

```

1   ATAGCGAAGA GGCCCGCACC GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT
61  GCTAGAGCAG CTTGAGCTTG GATCAGATTG TCGTTTCCCG CCTTCAGTTT AAACTATCAG
121 TGTT

```

(gDNA)

```

      ATTAAG TGGGGGTGAT CTATACATAT TATGTTATTT TAAATTTTCGT GGGTGGAAAA
181  TATCTCAACG TAAACCATAG AAGCATATAT ACACCATCAA TTATATATTG TAAAATAGAT
241  AAATAGAAAA AAAAACGTAC AAAATACACA CTAACATGCA CGCACCGACC GTTTTAGTAT
301  AGAAGCAAAT AGTTTTCTTC CATCCTTGCG TATGGACCTA CCAAATAAC GTAGTTAGGT
361  CGCCTAGCTT TTGTAGAAAT CAGAAATTA AACGACGCGT AGTTTGTCGG CAAGCATATA
421  AACGGCAG

```

<< BtC85-1-RB-cfm R

○ LB region 도입유전자 삽입 위치 확인

○ *CryIAC1* 양배추 event C85-1의 LB region 도입유전자의 삽입 위치를 확인하기 위하여 RB region의 iPCR 결과를 바탕으로 primer BtC85-1-LB-cfm F를 디자인하였다. 이를 도입유전자의 LB region에서 디자인된 primer pCAM2300-LB-L2와 PCR 분석에 이용하였다. PCR 분석 결과, 예상 크기(867 bp)보다 큰 약 2.2 Kb 정도의 산물이 event C85-1에서 확인되어 이를 sequencing 하였다. Direct sequencing을 위하여 추가로 primer BtC85-1-LBcF-1, BtC85-1-LBcF-2, BtC85-1-LBcR-1, BtC85-1-LBcR-2를 디자인하여 sequencing에 사용하였다 (그림 30). 본 2.2 kb sequence 또한 NCBI database에 대한 BLAST search에서 기존의 protein database에 유의한 유사성을 보여주지 않았다.

- LB region 도입유전자 삽입 위치 확인을 위한 primer 위치

>gb|AENI01004592.1| Brassica rapa Chr5_867, whole genome shotgun sequence

48121 actctcgcta tagatagatt tagattagaa agaacaattt atatcattta attgcaagt
 48181 cttgtgactt tttgggacat atacatgttt ctactcttga catgcacgca atacgtcgggt

BtC85-1-LB-cfm F >>

48241 tctgtatggt atcagttcac aatattaatt attccgaaag agaaactctc caacaagcaa
 48301 agcatttttt ttctgggtgt gcttctcttt ttcagacga gtacatacta tatatatata
 48361 tatatattac agtttcattt agctatttga ttctagaatc ttagttgtga atttgtgata
 48421 tatttggcga aagacatata tctatgaata tgatatatga atttagtttt taattaaact
 48481 ttttatatgt aattaaatac tatattttct ctgtttcttt ctgtgagaat ttttgggtgga
 48541 ctattttatt ttaacaagt ggcttatttt gatatttata gaaattagtg ctggaataaa
 48601 tttcagtgtc ttatatattt aaattaaag aaaaactata ttattcggtc tgtgaacggt
 48661 atttatcaaa aaaaaaagt ttgtgaacgt tacgaactaa ggagtacttt ataagatcca
 48721 gtctatataa aggcgtttgt agtg

Primer name	Sequence(5'→3')
BtC85-1-LB-cfm F	CGCAATACGTCGGTTCTGTA
BtC85-1-LBcF-1	TTCGGTCTGTACATCACACCA
BtC85-1-LBcF-2	CATCACCACATGCACTCTCA
BtC85-1-LBcR-1	GGGTCGAAGACAACCTTGGGA
BtC85-1-LBcR-2	TCAGTGATGGTCACGACAAAA

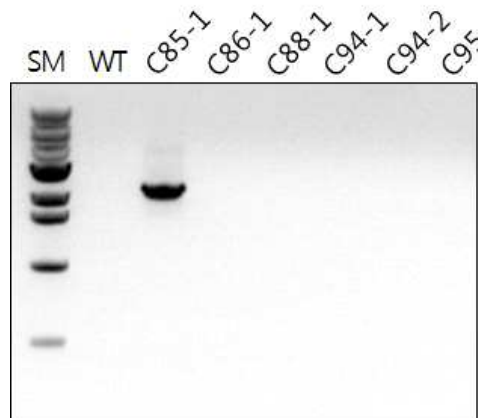


그림 2-30. Event C85-1의 LB region 도입위치 확인

> C85-1

(gDNA)

1 ACTCTCCAAC AAGCAAAGCA TTTTTTTTCT TGTGTGCTTC TCTTTTCTCA GACGAGTACA
 61 TACTATATGT TACAGTTTCA TTTAGCTATT TGATTCTAGA ATCTTAGTTG TGAATTTGTG
 121 ATATATTTAG CAGAATATGG TACTTTCAAT TTATAAAAAA TCTAGCGAGC TAGTTTGGCG
 181 AAAGACATAT ATCTATGAAT ATGATATATG AATTTTGT TTAAAACTTT TTATATGTAA
 241 CTAATACTA TTTTCTCTGT GAGAATTTTT GGTAGACTAT TTTATTTTTT TTAACAAGTG
 301 GCTTATTTTG ATATTTCAAG AAATTAGTGT TGGAATAACT TTCAGTGCTT TATATATTTA
 361 AATTTAAAAGG AAACATATATT ATTCGGTCTG TACATCACAC CAAAACCATA TACAATACAG

BtC85-1-LBcF-1 >>

421 ACTCCTGGAT TCCAAAGGAA TCCCTTTCTT GTTAAAGCAG CAGCATTGCT AGAAATAAAC

481 CTTGGCCTCA TGTGTTTATT ACATGAGTGC CATTTCCTAG GTGTCATCAC CACATGCACT
 BtC85-1LBcF-2 >>
 541 CTCACTTACT TTTTAGAAAA ACCCTTCATG AACTAGAAAA ATTACATACA AATGCCACTG
 601 GTCATTACAT TATACTATAT GATTTCCGAT TTCAAAAATC ACTTTCGGAT TACATTTCGA
 661 TTTCCAAAAA AAAAATCGGG ATCTAAATAA GGCAGCATAT TAACTCATT CTAAGGTAGA
 721 CTTTATGATA TGTTCAAAAA TTTGGAAATG TTTTATTTAA ATAAGGCAAC ACAATAAGTG
 781 TCTCATCGAT CGTTATGTAT GCTTTAGTAC AATTTTTGAT TCTTTAAACG TGGTACAAC
 841 AAGTTCTTTA ACCTGTATCA GACTTTGGTA CATCTAAAGT TCATATCAAA ATTCATAAAA
 901 CTAATCTTGC AACAAGCAAA CTATGTTTAT CATAAACTA ATCTACAATC GTTTATCATA
 961 ATATTTATAT CATAACCTAT ACGAATGTT ATATCAAATC GTTTTATGAT ATTTTTGATT
 1021 CAATTCATCG AAAATAACCA ATTAAACCCA AGACTTAATG CTTCAAATA TTAAGGAAAC
 1081 ACAATTTAAT TGTTAATGTA ATCAAGGAAA CTAAATTCAA AGAATTGAAA AACTTACTTG
 1141 ATATTTTTGA TTCAATTCAT CGAAAATAAC CAATTAACC CAAGACTTAA TGCTTCAAAA
 1201 TATTAAGGAA ACACAATTTA ATTGTTAATG TAATCAAGGA AACTAAATTC AAAGAATTGA
 1261 AAAACTTACT TTAATCGATA GGGGAATGAT TCTGATATAT TTTTGTCTG ACCATCACTG
 << BtC85-1-LBcR-2
 1321 ATACATCTAA AGTTCATATC AAAATTCATA AACTAATCT TGCAACAAGC AAATATGTT
 1381 TACAGGAGTA GGATTTCTTG AAGAATATAT GATGGAACCT ACGAACGGAA ATAATGGTAT
 1441 CATCGACCAC AAAATCTGTT TTTTGTACT ACACATCCCG TAAGTATTCA ACATCTGTAA
 1501 AAAGAAAGAT ATACATTTGT ATAGTATCAC ATGGTTTGAA CCCCTTTTTT TTTACAGTAA
 1561 CGTCGTCATT AAGTGTGTCG CTTATGGTGC ATTTGCTCAT GTTTTCAATG ATTTATGGAA
 1621 TTCTATAGAT GCAGACATAA TATTATGTGT TTTGTAGTGT TGGCAAATTA AATGGGGACA
 1681 AGGTAATCTA TTGTATTTAT TGTATATACA ATAAATTAAT CGGAGCTGAT ATTATATGTA
 1741 TATTTTACTA ATATTTTTTC ATATTTTATA ATAAGGCCGA CTTAAGAGGG TTTACTAACAT
 1801 TGATGGGTTT TCCAAAGTTG TCTTCGACCC CATTGGTGT CCAGAAATTG ATGCTTTACG
 << BtC85-1-LBcR-1
 1861 ATTGAGGTAA TACATGCATT CACATATTTT GTTAAATAAT GTTTTTAAAT TCTCTAGATG
 1921 ATCTATTTGC TATATTTCTC ATAATAGGAT TGCAAACGAA GACTTATGAA AACATTATTG
 1981 ACATCAGTTA TTTTGTCTCC ATTTTTATTT TTGTTTGTGTT TTTTATAACA TTGTTCAATT
 2041 TATATTTTA
 (LB region vector seq.)
 T TAATAACACA TTGCGGACGT TTTTAATGTA CTGAATTAAC GCCGAATTAA
 2101 TTCGGGGGAT CTGGATTTTA GACTGGATT TTGGTTTGTAG GAATTAGAAA TTTTATTGAT
 2161 AGAAGTATTT

*Bold체 부분은 LB iPCR을 통해 얻은 sequence와 일치하는 부분

㉠ Event C86-1의 도입유전자 삽입 위치 해명

○ C86-1 및 C88-1 line의 삽입위치 분석을 위하여 IPCR을 동시에 수행하였다. 하지만 88-1 line은 IPCR 수행 중 Southern blot 분석에서 2 copy로 확인되었기 때문에 분석을 중단하였다. 먼저 LB IPCR을 위하여 사용된 제한효소는 *PvuII*, *NcoI* 이며, 1차 PCR을 위해서는 pCAM2300-LB-R2(pCAM2300-LB-L1)와 pCAM2300-LB-U1을 사용하였고, 2차 PCR을 위해서는 pCAM2300-LB-R1(pCAM2300-LB-L2)과 pCAM2300-LB-U2를 사용하였다. 2차 PCR 반응 후 얻은 products를 gel purification을 거쳐 염기서열 분석을 수행하였다 (그림2-31).

○ RB IPCR을 위하여 사용된 제한효소는 *BamHI*, *EcoRV*이며, 1차 PCR을 위해서는 BT-RB-R1와 BT-RB-U1을 사용하였고, 2차 PCR을 위해서는 BT-RB-R2과 BT-RB-U2 (pCAM2300-RB-F2)를 사용하였다. 2차 PCR 반응 후 얻은 products를 gel purification을 거쳐

염기서열 분석을 수행하였다.

○ C86-1 line의 경우 *EcoRV* 제한효소를 이용한 RB IPCR 결과에서 RB와 연결된 gDNA의 염기서열을 얻었다. 이 부분에서 C86-1 RBgDNA primer를 제작하여 BT-RB-U2 및 BT-RB-U3를 이용하여 confirmation PCR을 수행하였다 (그림2-32). 또한 이 염기서열을 NCBI에서 검색한 결과 일부 염기서열이 *Brassica rapa* Chr8.의 염기서열과 일치함을 보여 도입유전자 cassette의 LB flanking region을 밝히고자 LB 부분과 연결되었을 것으로 추측되는 부분에서 86-1LBgDNA1와 86-1LBgDNA2 primer를 제작하여 pCAM2300-LB-L2 및 pCAM2300-LB-L3를 이용하여 얻은 PCR 산물을 sequencing 하였다 (그림2-33).

○ Sequencing 결과를 Phytozome database (www.phytozome.net)에 BLAST search하였을 때, *Brassica rapa*의 gene annotation에 따르면 도입유전자는 Bra014354과 Bra014353 유전자 사이의 intergenic region에 위치하였다 (그림2-34). 또한 NCBI database에 대한 BLAST search에서도 알려진 유전자에 대한 특이한 유사성은 없었다.

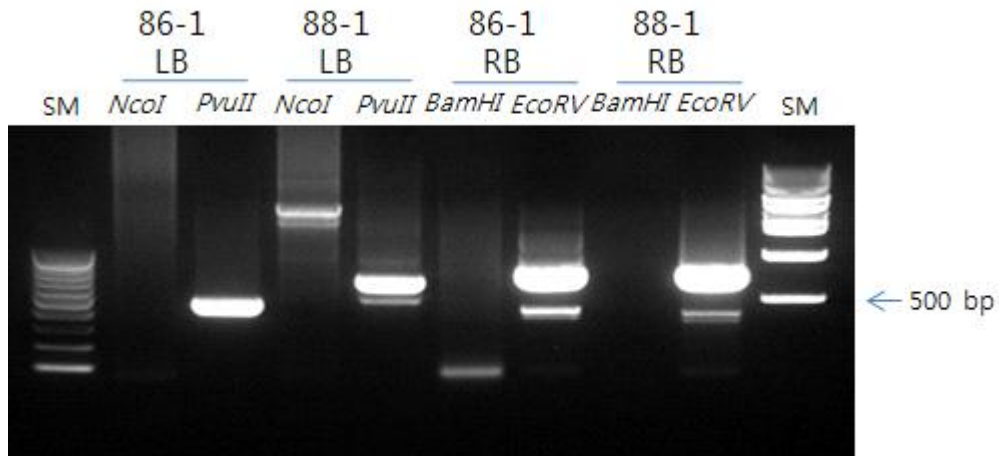


그림 2-31. 유전자변형 *Cry1a* 양배추의 IPCR 결과

- C86-1 line의 RB IPCR 분석결과(BT-RBU2로 읽음)

```

1      ANNNCNATCG CGCTGGCGTA TAGCGAAGAG GCCCGCACCG ATCGCCCTTC
51     CCAACAGTTG CGCAGCCTGA ATGGCGAATG CTAGAGCAGC TTGAGCTTGG
101    ATCAGATTGT CGTT
    
```

RB부분

Unknown 부분

```

1      TCCCGCCTTC AGTTCAAATT AGTTCACTAT AAAGTTACAA TTTCATAGAA
51     AGTATGGTGA TTAATGATCA TATTGGATTT TACAAAATAC ATAGAGTTCT
101    AGGAAAATAA GCTTTTAAAT TACAATCAAC AGTAACAATC ACCCTCATTA
151    TATGCAAAAA TGCGGAATTC TCTCAGGTGC GTTTCCTCAAT GACCGGCAAA
201    CAACCCCAA AGCATTAAATT CTCCACTGCT CCTAACGCTC AACCTCCGCA
251    AGAAAAGAAG AGCCCCACCG TAATCCCTCT CTCCGATGAC CTAAAGTTGA
301    AGATTTCAA TTTCTCCAG TCATTCGATA GATCCAGGCA TGGGTACCAC
    
```

351 GCTCCTGTGT TTA CTCTTCC GAGGCAGCCC CTCCATTTCA AGCTACACAG
 401 GATTGAGAGG CAATTTTTCT TTGAGGTTGA AGTTTCTGAA GAGCATCAAA
 451 GCTTGGGTGG TTACCGCTTA CTGAGGTTTT CAGTCGCTAC ATTCTTACCT
 501 CCCTTTGAAG ATATCACATC AATCCACTTG CTTTGAAGAC GTGGTTGGAA
 551 CGTCTTCTTT TTCCACGATG CTCCTCGTGG GTGGGGGTCC ATCTTTGGGA
 601 CCACTGTCGG CAGAGGCATC TTCAACGATG GCCTTTCCTT TATCGCAATG



그림 2-32. 유전자변형 *CryIac1* 양배추 C86-1 line의 RB IPCR Confirmation 결과

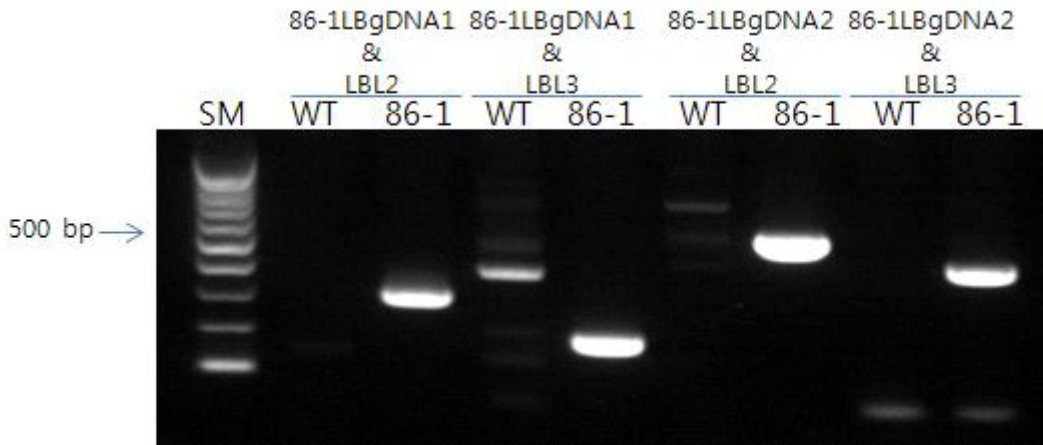


그림 2-33. 유전자변형 *CryIac1* 양배추 C86-1 line의 LB IPCR Confirmation 결과

- C86-1 line의 LB Flanking region PCR 분석결과(C86-1 LBgDNA2로 읽음)

Unknown 부분

1 TTTGGAGTAC ATAAACATAA AAATATCAAT TTATATCCTT TG TTCCTTAA
 51 CTTTGAAAAG AAGGAACTT GTATTGTATT ATCTTAAAAA TGAATTACGT
 101 GTTATGCACT GTTTGATAAT GATCGACATA CTAGAAGGGT GATGTCATGC
 151 AACTAACCA TTATCTATTT CATAGTTCAT AACAAATGTCA TCCAACATGT

201 TAAACCTTCT ACTGTTTCAGT TCTATAATCT TCAAATGTTA ATCATTTATG
 251 TAAATGACCC TAACTTCTAT AAGGATATAC AATCTTGCAG TTA

LB부분

1 ACGCTTAGAC AACTTAATAA CACATTGCGG ACGTTTTTAA TGTACTGAAT
 51 TAACGCCGAA TTAATTCGGA GGATCTGGAT TTTAGTACTG GATTTTGGTT
 101 TTAGGAATTA GAAATTTTAT TGATAGAAGT ATTTTACAAA TACAAATACA
 151 TACTAAGGGT TTCTTATATG CTCAACAATG GGA

- WT에서 Flanking region PCR 분석결과(C86-1 LBgDNA2로 읽음)

Genomic DNA 염기서열

1 CACTTTGGAA ATACATAAAC ATAAAAATAT CAATTTATAT CCTTTGTTCC
 51 TTAACCTTGA AAAGAAGGAA ACTTGTATTG TATTATCTTA AAAATGAATT
 101 ACGTGTTATG CACTGTTTGA TAATGATCGA CATACTAGAA GGGTGATGTC
 151 ATGCACACTA ACCATTATCT ATTTCATAGT TCATAACAAT GTCATCCAAC
 201 ATGTTAAACC TTCTACTGTT CAGTTCTATA ATCTTCAAAT GTTAATCATT
 251 TATGTAAATG ACCCTAACTT CTATAAGGAT ATACAATCTT GCAGTTAACA
 301 ATAAAAGACA TAGTCTATAT ACAGATGCAT GTGTTATAAA TTGTATATAT
 351 GTGAAAGAGA TGAAGAGTGG AAAAATGCCA TGAAAGTACC ATCACTTTGG
 401 ATACACCAGA TCAATTGCTT ATTTTATTTT TCAAATTAGT TCACTATAAA
 451 GTTACAATTT CATAGAAAGT ATGGTGATTA ATGATCATAT TGGATTTTAC
 501 AAAATACATA GAGTTCTAGG AAAATAAGCT TTTTAT

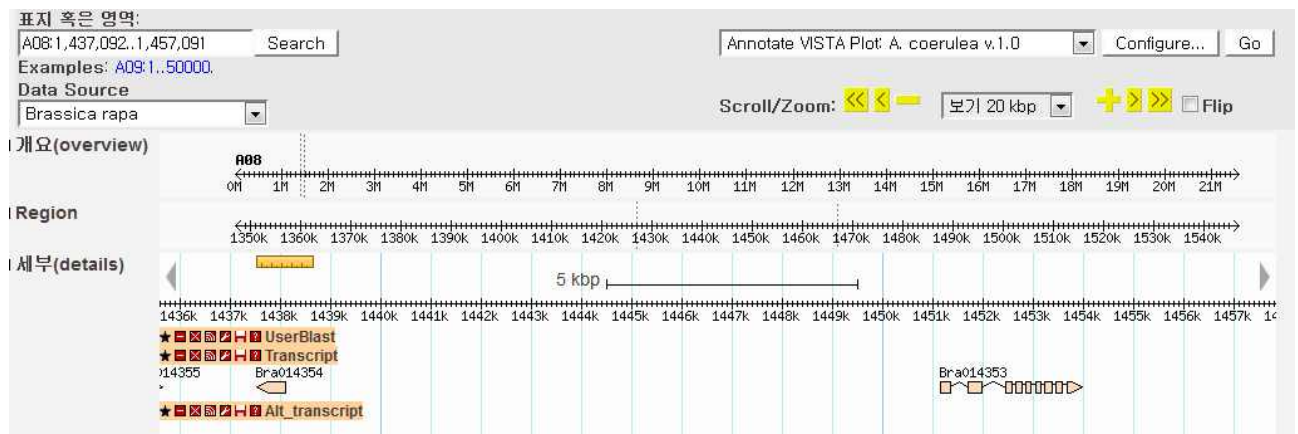


그림 2-34. C86-1 event의 도입유전자 인접 염기 서열의 Phytozome *Brassica rapa* genome의 annotation database에 대한 BLAST search 결과

㉓ Event C94-1 및 C94-2의 도입유전자 삽입 위치 해명

○ *CryIac1* 양배추 event C94-2의 RB 부분을 restriction enzyme *Bam*H I 및 *Eco*RV, *Nsi*I 으로 digestion하였다. enzyme 처리 후 phenol:CHCl₃ purification 하여 self ligation 후 정량하였다. 이를 inverse PCR 시 template DNA로 사용하였다.

○ Primers set BT-RB-R1+BT-RB-U1을 이용하여 1차 PCR을 수행하였고, 1차 PCR product

를 template로 하여 primers set BT-RB-R2+BT-RB-U2를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. 확인된 product는 primers set BT-RB-R2+BT-RB-U2를 이용하여 sequencing 하였다 (그림 2-35).

○ Sequencing 결과를 Blast search한 결과, *Brassica rapa* Chromosome 2의 whole genome shotgun sequence와 96%의 상동성을 가진 것으로 확인되었다.

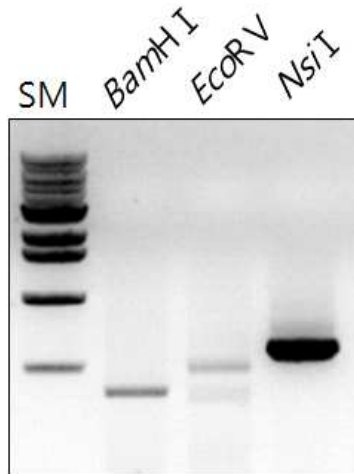


그림 2-35. Event C94-2의 RB region inverse PCR의 gel 양상

> C94-2(Nsi I)

(RB region vector seq.)

```

1   TCCAAC TTTA ATGCCTTGCA GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG
61  CCCGCACCGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGC TAGAGCAGCT
121 TGAGCTTGGA TCAGATTGTC GTTCCCGCC TTCAGTTTAA ACTATCAGTG TTTGA

```

(Unknown seq.)

```

                                     AATCG
181  ATGGTTTGTA TTATTGTAGA TGATGGACCC ATCAAGCCCA ATAATTTGAC CACTTTCCTC
241  GGCCCACTTT AAGCTAAGTT TAATCCATAT GTATGTTAGA GCACCCTCGG TTAATGGTT
                                     << BtC94-2-RB-F
301  GCAACTCAAA TTAAACGT

```

- RB region 도입유전자 삽입 위치 확인

○ *CryIAc1* 양배추 event C94-2의 RB region 도입유전자의 삽입 위치를 확인하기 위하여 도입유전자의 RB region과 iPCR을 통해 얻은 sequence를 바탕으로 primer를 디자인하여 PCR 분석을 수행하였으며, 확인된 product는 sequencing을 하였다. PCR 분석 결과, wild type 및 event C85-1, C86-1, C88-1, C95에서는 PCR product가 확인되지 않았으나 event C94-1과 C94-2에서 확인되었다. 이 결과를 바탕으로 event C94-1과 C94-2는 동일한 event로 보인다 (그림 2-36).

Primer name	Sequence(5'→3')	Exp. product size
BtC94-2-RB-cfm F	ACCATTTAACCGAGGGTGCT	298 bp
BT-RB-U2	CCAACCTAATCGCCTTGCAG	

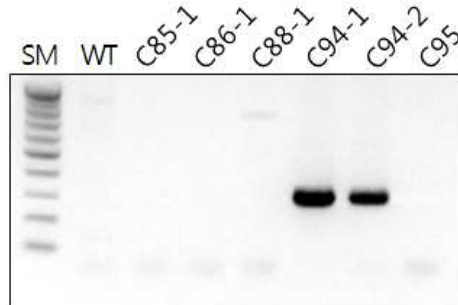


그림 2-36. Event C94-2의 RB region 도입위치 확인

> *C94-1*

(RB region vector seq.)

```

1   CCAACTTAAT CGCCTTGCAG CACATCCCC TTTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC
      BT-RB-U2 >>
61  CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GGCGAATGCT AGAGCAGCTT
121 GAGCTTGGAT CAGATTGTCG TTTCCCGCCT TCAGTTTAAA CTATCAGTGT TTGA

```

(gDNA)

```

                                          AATCGA
181 TGGTTTGTAT TATTGTAGAT GATGGACCCA TCAAGCCCAA TAATTTGACC ACTTTCCTCG
241 GCCCACTTTA AGCTAAGTTT AATCCATATG TATGTTAGAG CACCCTCGGT TAAATGGT
                                          << BtC-94-2-RB-F

```

> *C94-2*

(RB region vector seq.)

```

1   CCAACTTAAT CGCCTTGCAG CACATCCCC TTTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC
      BT-RB-U2 >>
61  CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GGCGAATGCT AGAGCAGCTT
121 GAGCTTGGAT CAGATTGTCG TTTCCCGCCT TCAGTTTAAA CTATCAGTGT TTGA

```

(gDNA)

```

                                          AATCGA
181 TGGTTTGTAT TATTGTAGAT GATGGACCCA TCAAGCCCAA TAATTTGACC ACTTTCCTCG
241 GCCCACTTTA AGCTAAGTTT AATCCATATG TATGTTAGAG CACCCTCGGT TAAATGGT
                                          << BtC94-2-RB-F

```

- LB region 도입유전자 삽입 위치 확인

○ *CryIAc1* 양배추 event C94-2의 LB region 도입유전자의 삽입 위치를 확인하기 위하여 RB region의 iPCR 결과를 바탕으로 primer BtC94-2-LB-cfm R1과 BtC94-2-LB-cfm R2를 디자인하였다. 이를 도입유전자의 LB region에서 디자인된 primer pCAM2300-LB-L2와 PCR 분석

에 이용하였다. PCR 분석 결과, event C94-2에서는 예상되는 크기의 산물을 확인할 수 있었으나, wild type에서는 확인되지 않았다. 확인된 product는 sequencing 분석을 하였다 (그림 2-37).

- LB region 도입유전자 삽입 위치 확인을 위한 primer 위치

>gb|AENI01001440.1| Brassica rapa Chr2_301, whole genome shotgun sequence

45721 tcttataatg gtgtttgtca gcctggagcc aggagtcctt cattcatgag cgtgggtcga
 45781 tttaaccaag gctgcathtt catattacta atacggaaag acctcttaat taaaaggcat
 45841 ttacctctag tattgggttt gtttcgaag cccaatggg cctctaaca tataaggtat
 45901 agttttgcat acgtgaggag tgttttagtg tgatgtgtg tcaactatcaa agtatcaatc
 45961 aatggatttg gttgtacttg gatgttttg ggcattaagc gattgtcgg aactggaat

<< BtC94-2-LB-cfm R1

46021 gtggtacgaa tatacgaac agtttaata actttttgct tagagaaaaa gggttattat
 46081 aatggatta agacatggtt agatttttaa ctatgtacga aatcaaagt ttgtctgagc
 46141 aacaagaagg tgatgatcag taaggatgaa cattcctgt aagaccattg acattgggtga
 46201 agaaccgac atgtttgtac ggaagatac atctcgttt cccttcttc cttatcgctc
 46261 tgttctcat gtacagcctc tcgtgtgccg acttcgttt catcttcgcc ttctcgctc
 46321 tcttcagcc gctcggttc gccgccgccg ccgccgtga aggagacgac tgcgacgaag
 46381 aaccgttact aagaaacaca aacgcgtctt taccgtcgt tttgcttctc aggacaagat

<< BtC94-2-LB-cfm R2

46441 ctctaaacct ccaaagctc gagaatcctg tcgagttact ttccgacaa gtcttcggcg

Primer name	Sequence(5'→3')	Exp. product size
BtC94-2-LB-cfm R1	CGCTTAATGCCCAAAAACAT	약 500 bp
BtC94-2-LB-cfm R2	AGCAAAAAGCGACGGTAAAGA	약 925 bp
pCAM2300-LB-L2	TTTCGCTCATGTGTTGAGCA	
C94-LBcF	TTCGGCGTTAATTCAGTACA	sequencing 용
C94-LBcR1	ATGCAGCCTTGGTTAAATCG	
C94-LBcR2	AGCTTCTTGTTGCTCTGACAAA	

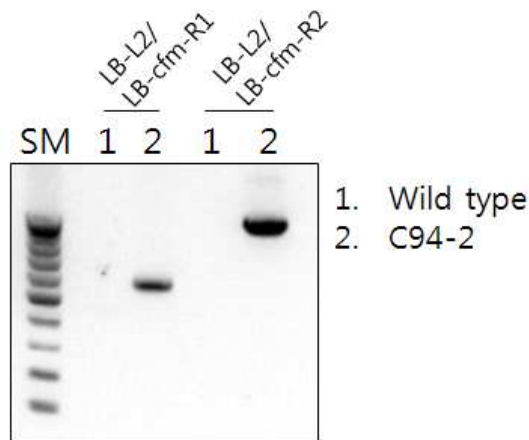


그림 2-37. Event C94-2의 LB region 도입위치 확인

> *C94-2(LB-cfm-R2/LB-L2)*

(gDNA)

```

1      TTCTTCGTCG CAGTCGTCTC CTTCTACGGC GGCGGCGGCG GCGGCGAAAC CGAGCGGCGT
61     GAAGAGAGCG GAGAAGGCGA CGAAGATGAA AACGAAGTTCG GCACACGAGA GGCTGTACAT
121    GAGGAACAGA GCGATACGAG AAGAAGGGAA ACGGAGATCG TATCTTCCGT ACAAACATGT
181    CGGGTTCTTC ACCAATGTCA ATGGTCTTAC AAGGAATGTT CATCCTTACT GATCATCAGC
241    TTCTTGTTGC TCTGACAAAA CTTTGATTTC GTGTATAGTT AAAATCTAAC CATGTCTTAA
      C94-LBcR2 >>
301    TACTATTATA ATAACCCTTT TTCTCTAAGC AAAAAAGTTA TTAAACTGT TTCGTATATT
361    CGTATCACAT TCTAGTTTAC CGACAATCGC TTAATGACCA AAAACATCCA AGTACAACCA
421    AATCCATTGA TTGATACTTT GATAGTGACA ACACATCACA CTAAACACTC CAAACTCTAG
481    ATATGCGTCT CCCATGTATG CAAAACTATA CCTTATATGT TTAGAGGCCC ATTGGGGCTT
541    CRAAAACAAA CCCAATACTA GAGGTAAATG CCTTTAATTA AGAGGTAAAT GCCTTTAATT
601    AAGAGGTCTT TCCGTATTAG TAATGCAGCC TTGGTTAAAT CGAACCACCC TCATGAATGA
661    AGACTCCTGG CTCCAGGCTG ACAAACACCA TTATAAGAAA TCGATAGTTT GTGTCAAAAA
721    AAAAAAGAAA TCGATGGTTT GTATTATTGT AGATGATGGA CCCATTGCG

```

(LB region vector seq.)

```

                                          G ACGCTTAGAC
781    AACTTAATAA CACATTGCGG ACGTTTTTAA TGTACTGAAT TAACGCCGAA TTAATTCGGG
      << C94-LBcF
841    GGATCTGGAT TTTAGTACTG GATTTTGGTT TTAGGAATTA GAAATTTTAT TGATAGAAGT
901    ATTT

```

- LB/RB flanking region의 연속성 확인

○ LB와 RB의 flanking region의 연속성 확인을 위하여 primers set BtC94-2-RB-cfm F+BtC94-2-LB-cfm R1과 BtC94-2-RB-cfm F+BtC94-2-LB-cfm R2를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR 분석 결과, wild type과 event C94-2 모두 product가 확인되었으며, 확인된 band 중 primers set BtC94-2-RB-cfm F+BtC94-2-LB-cfm R2에서 확인된 band를 sequencing 하였다 (그림 2-38). Sequencing 결과, 대부분의 sequence는 동일하였으나, 2 bp에

서 base change(T→C, A→G)가 있었으며 1 bp는 deletion(A-rich 부분에 밀출) 된 것을 확인 하였다.

○ LB 및 RB 삽입부위 확인과 LB/RB flanking region의 연속성 확인을 통하여 도입 유전자의 삽입 시 일부 sequence (AATCGATGGTTTGTATTATTGTAGATGATGG ACCCAT)의 중복이 일어난 것으로 보인다(그림 2-39). Sequencing 결과를 Phytozome database (www.phytozome.net)에 BLAST search하였을 때, *Brassica rapa*의 gene annotation에 따르면 도입유전자는 Bra007913의 3'UTR 또는 intergenic region에 위치하였다(그림 2-40). 한편, NCBI database에 대한 BLAST search에서는 Brassica napus의 EST인 EF470476, EF472254 등과 95%이상의 상동성을 보여, 삽입 위치가 genic region임을 제시하였다.

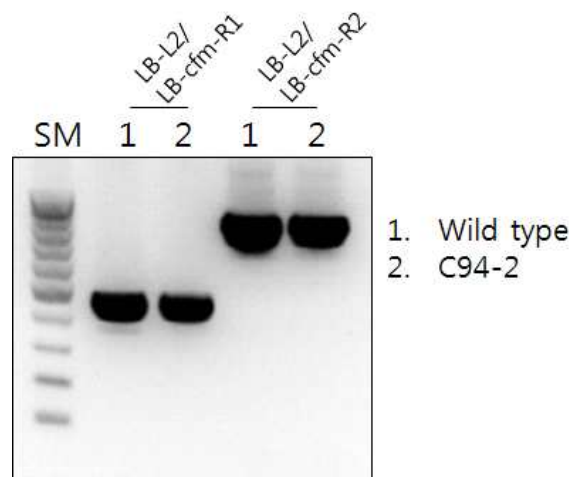


그림 2-38. LB/RB flanking region의 연속성 확인

> Wild Type

```

1   AGCAAAGCG ACGGTAAAGA CGCGTTTGTG TTTCTTAGCA ACGGTTCTTC GTCGCAGTCG
    BtC94-2-LB-cfm R2>>
61  TCTCCTTCTA CGGCGGCGGC GGCGGCGGCG AAACCGAGCG GCGTGAAGAG AGCGGAGAAG
121 GCGACGAAGA TGAAAACGAA GTCGGCACAC GAGAGGCTGT ACATGAGGAA CAGAGCGATA
181 CGAGAAGAAG GGAAACGGAG ATCGTATCTT CCGTACAAAC ATGTCGGGTT CTTCACCAAT
241 GTCAATGGTC TTACAAGGAA TGTTTCATCCT TACTGATCAT CAGCTTCTTG TTGCTCTGAC
301 AAAACTTTGA TTTTCGTGTAT AGTTAAAATC TAACCATGTC TTAATACTAT TATAATAACC
361 CTTTTTCTCT AAGCAAAAAA GTTATTTAAA CTGTTTCGTA TATTCGTATC ACATTCTAGT
421 TTACCGACAA TCGCTTAATG ACCAAAAACA TCCAAGTACA ACCAAATCCA TTGATTGATA
481 CTTTGATAGT GACAACACAT CACTACTAAC ACTCCAAACT CTAGATATGC GTCTCCCATG
541 TATGCAAAAC TATACCTTAT ATGTTTAGAG GCCCATTGGG GCTTCGAAAA CAAACCCAAT
601 ACTAGAGGTA AATGCCTTTA ATTAAGAGGT AAATGCCTTT AATTAAGAGG TCTTTCCGTA
661 TTAGTAATGC AGCCTTGGTT AAATCGAACC ACCCTCATGA ATGAAGACTC CTGGCTCCAG
721 GCTGACAAAC ACCATTATAA GAAATCGATA GTTTGTGTCA AAAAAAAAAA AGAAATCGAT
781 GGTTTGTATT ATTGTAGATG ATGGACCCAT CAAGCCAAT AATTTGACCA CTTTCCTCGG
841 CCCACTTTAA GCTAAGTTTA ATCCATATGT ATGTTAGAGC ACCCTCGGTT AAATGGT
    << BtC94-2-RB-cfm F

```

> C94-2

```

1   AGCAAAAGCG ACGGTAAAGA CGCGTTTGTG TTTCTTAGCA ACGGTTCTTC GCCGCAGTCG
    BtC94-2-LB-cfm R2 >>
61  TCTCCTTCTA CGGCGGCGGC GCGGCGGCG AAACCGAGCG GCGTGAAGAG AGCGGAGAAG
121 GCGACGAAGA TGAAAACGAA GTCGGCACAC GAGAGGCTGT ACATGAGGAA CAGAGCGATA
181 CGAGAAGAAG GGAAACGGAG ATCGTATCTT CCGTACAAAC ATGTCGGGTT CTTCACCAAT
241 GTCAATGGTC TTACAAGGAA TGTTTCATCCT TACTGATCAT CAGCTTCTTG TTGCTCTGAC
301 AAAACTTTGA TTTCGTGTAT AGTTAAAATC TAACCATGTC TTAATACTAT TATAATAACC
361 CTTTTTCTCT AAGCAAAAAA GTTATTTAAA CTGTTTCGTA TATTCGTATC ACATTCTAGT
421 TTACCGACAA TCGCTTAATG ACCAAAAACA TCCAAGTACA ACCAAATCCA TTGATTGATA
481 CTTTGATAGT GACAACACAT CACACTAAAC ACTCCAAACT CTAGATATGC GTCTCCCATG
541 TATGCAAAC TATACCTTAT ATGTTTAGAG GCCCATTGGG GCTTCGAAAA CAGACCCAAT
601 ACTAGAGGTA AATGCCTTTA ATTAAGAGGT AAATGCCTTT AATTAAGAGG TCTTTCCGTA
661 TTAGTAATGC AGCCTTGGTT AAATCGAACC ACCCTCATGA ATGAAGACTC CTGGCTCCAG
721 GCTGACAAAC ACCATTATAA GAAATCGATA GTTTGTGTCA AAAAAAAAAA GAAATCGATG
781 GTTTGTATTA TTGTAGATGA TGGACCCATC AAGCCCAATA ATTTGACCAC TTTCTCGGC
841 CCACCTTAAG CTAAGTTTAA TCCATATGTA TGTTAGAGCA CCCTCGGTTA AATGGT
    << BtC94-2-RB-cfm F
  
```

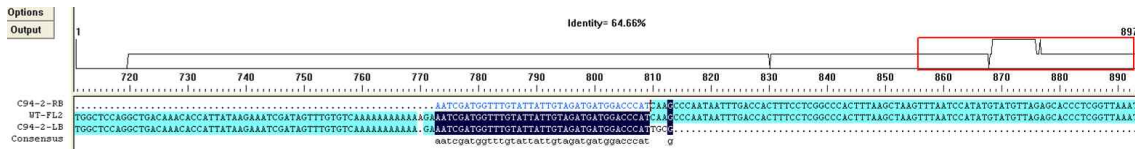


그림 2-39. 삽입위치의 genome sequence와 iPCR을 통해 얻은 LB 및 RB 인접 sequence의 alignment 결과

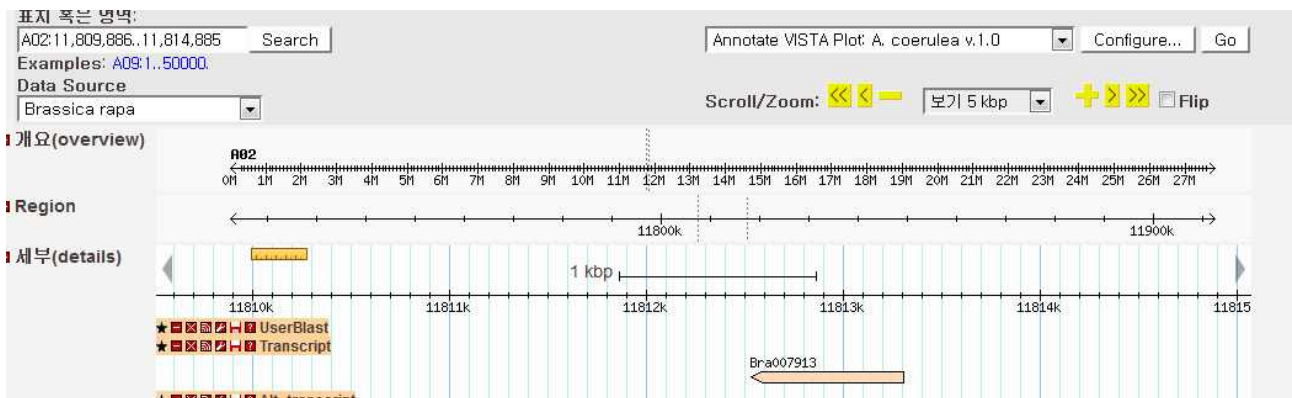


그림 2-40. C94-1 event의 도입유전자 인접 염기 서열의 Phytozome Brassica rapa genome의 annotation database에 대한 BLAST search 결과

㉞ Event C95의 도입유전자 삽입 위치 해명

○ *CryIacI* 양배추 event C95의 LB 부분을 restriction enzyme *Bg*III 및 *Nco*I, *Pvu*II로 digestion하였다. enzyme 처리 후 phenol:CHCl₃ purification 하여 self ligation 후 정량하였다.

이를 inverse PCR 시 template DNA로 사용하였다.

○ Primers set pCAM2300-LB-U1+pCAM2300-LB-L1을 이용하여 1차 PCR을 수행하였고, 1차 PCR product를 template로 하여 primers set pCAM2300-LB-U2+pCAM2300-LB-L2를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. 확인된 product는 2차 PCR용 primer를 이용하여 sequencing 하였다 (그림 2-41).

Primer 명칭	Sequence(5'→3')
pCAM2300-LB-L1	TGACGAGTTCTTCTGAGCGG
pCAM2300-LB-L2	TTTCGCTCATGTGTTGAGCA
pCAM2300-LB-L3	CTAAAATCCAGATCCCCGA
pCAM2300-LB-U1	GCCACACCCAGCCGGCCACAG
pCAM2300-LB-U2	TCGATGAATCCAGAAAAGCG
pCAM2300-LB-U3	CCACCATGATATTCCGGCAAG

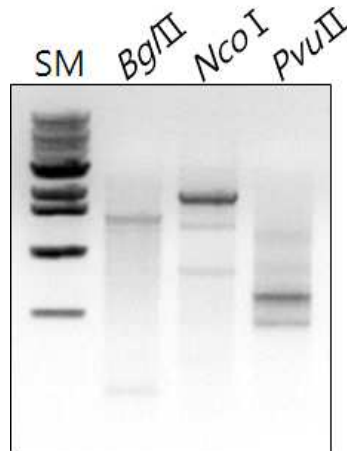


그림 2-41. Event C95의 LB region inverse PCR의 gel 양상

> C95_LB-U2(*NcoI*)

(Inserted vector seq.)

```

1   AGCAGGCATC GCCATGTGTC ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC
61  TGGCGAACAG TTCGGCTGGC GCGAGCCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA
121 CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TGGTGGTCGA
181 ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGCAT TGCATCAGCC ATGATGGATA
241 CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA GGAGATCCTG CCCC GGCACT TCGCCAATA
301 GCAGCCAGTC CTTTCCGCT TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCC
361 TCGTGGCCAG CCACGATAGC CGCGCTGCCT CGTCCTGGAG TTCATTCAGG GCACCGGACA
421 GGTTCGGTCTT GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGAAAC ACGGCGGCAT
481 CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCAGT CATAGCCGAA TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG
541 CCGGAGAACC TGCGTGCAAT CCATCTTGTT CAATCCCAT GG

```

(*NcoI*)

(Unknown seq.)

AATTTAAG CACGTGATT

601 GGTGAAAATG GATTACTTGT A

C95-LBcfm2 >>

> Reverse_Complement of LB-L2(*NcoI*)

(Unknown seq.)

1 CGNGACGTCG TTTCCATCGA ACCACCATGC CTCCATCTNT TTGTNGTAGC TGCTCCGGCA
61 TGGTGAGCCG CCGCAACCAT ATCTCCTCTA GATCGTCCAA ATAACTAAAA CTAAAACTG

C95-LBcfm1 >>

<< C95-LB-gDNA

121 GGTCGAGTTC ATCACATTAA GCGATGCAGA CTTCTTCAAA CGCTTAATCC ATGCTTACGT
181 GAAAAAAGGC TGATCGGGGT TTGGATTGAA TGCTCCAGAT CGAGCACGTC TAAAATCACT
241 CATCGACAAT CTGATCCAAG CTGATAGTTT AAAGTGAAGG CGGGAAACGA CAATCTGATC
301 CAAGCTCAAG CTGCTCTAGC ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC
361 GGTGCGGNCC TCTTAATTCG GCGTTAATTC AGTAAGTTG

(LB region vector seq.)

T TGACGCTTAG ACAACTTAAT

421 AACACATTGC GGACGTTTTT AATGTACTGA ATTAACGCCG AATTAATTCG GGGGATCTGG
481 ATTTTAGTAC TGGATTTTGG TTTTAGGAAT TAGAAATTTT ATTGATAGAA GTATTT

Inverse PCR product를 whole sequencing하지 못하였으나 iPCR로 얻은 sequence를 바탕으로 primer C95-LBcfm1 및 C95-LBcfm2, C95-LB-gDNA를 디자인하여 iPCR을 통해 얻은 sequence의 정확성을 확인하고자 하였다.

○ Primers set C95-LBcfm1+pCAM2300-LB-L2 및 C95-LBcfm2+pCAM2300-LB-L2, C95-LBcfm2+C95-LB-gDNA를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR 분석 결과, 예상되는 크기의 산물을 확인하였고, 확인된 산물은 sequencing을 수행하였다. Sequencing 결과, primer set C95-LBcfm1+pCAM2300-LB-L2와 C95-LBcfm2+pCAM2300-LB-L2의 sequence에서 일치하는 부분을 확인하여 iPCR을 통해 얻은 sequence가 도입된 유전자 LB region의 flanking 부분으로 확인하였다 (그림 2-42).

Primer 명칭	Sequence(5'→3')	Exp. product size
C95-LBcfm1	GCCGCAACCATATCTCCTCT	521 bp
C95-LBcfm2	CGTGATTTGGTGAAAATGGA	1.1~1.2 kb

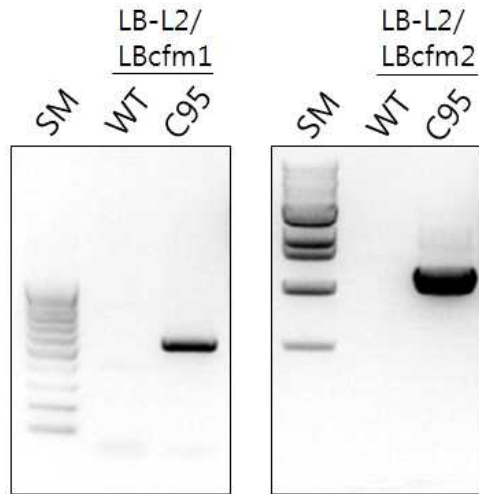


그림 2-42. Event C95의 LB region 도입위치 확인

> *C95(LB-L2/LBcfm1)*

(gDNA)

```

1   GCCGCAACCA TATCTCCTCT AGATCGTCCA AATAACTAAA ACTTAAAACT GGGTCGAGTT
    C95-LBcfm1 >>
61  CATCACATTA AGCGATGCAG ACTTCTTCAA ACGCTTAATC CATGCTTACG TGAAAAAAGG
121 CTGATCGGGG TTTGGATTGA ATGCTCCAGA TCGAGCACGT CTAAAATCAC TCATCGACAA
181 TCTGATCCAA GCTGATAGTT TAAACTGAAG GCGGGAAACG ACAATCTGAT CCAAGCTCAA
241 GCTGCTCTAG CATTGCGCAT TCAGGCTGCG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT CGGTGCGGGC
301 CTCTTAATTC GCGGTTAATT CAGTAAGTTG

```

(LB region vector seq.)

```

                                TTGACGCTTA GACAACTTAA TAACACATTG
361 CGGACGTTTT TAATGTACTG AATTAACGCC GAATTAATTC GGGGGATCTG GATTTTAGTA
421 CTGGATTTTG GTTTTAGGAA TTAGAAATTT TATTGATAGA AGTATTTTAC AAATACAAAT
481 ACATACTAAG GGTTCCTTAT ATGCTCAACA CATGAGCGAA A
    << pCAM2300-LB-L2

```

> *C95(LB-L2/LBcfm2)*

(gDNA)

```

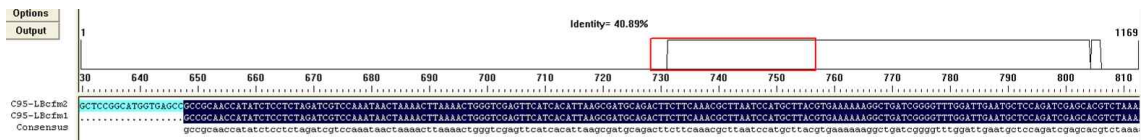
1   TTAAGTGAATA CCGTGAAACC GTATGCGATT ATTAAATCTG TAGCGTGTCT TATGTAAAAAT
61  ATCTTCTAGT AAATAGTATG CAGCTATACA TGTATATAACC ATCTGAAACA TAGAGGAGAT
121 GACTATACCA TGAAGCACAG ACGTCATCTC GCTTCGCTCT ATGTGACCGG AAACCTGTAC
181 TAAAAAATGG CAAAACCGAC CTTTATTGGG CTAATTGTCA AAGACTTAAT TATGTCAAAA
241 TCATTGGTAT ATTTTTCATT TTTCTTTGTG TTTTGTATAT ACACCAAATT CTCCATTTA
301 AAAATGTGTA GTGAACCCGA AGCCGGAATT AAGTGGATTT GATAATAACC CACTTGCTTG
361 CTTTTCGGGT AAGGACTAAT TAATTTTTTT TTTTACTTT CTGCAACTTT TACAGAGGAA
421 AGTGAGAGAA ATTGAAATGA ACGATTGAAG GAGAGGACTG ACGATGAACC TTTTGATACT
481 ATGGCGGAAA AATCGCGACC GGGAGAGATG CCGAAGAGGT GTGGCCGTCA AGGGAAAGAG
541 AACGATGGTT AGTTTTTTTT TCGCGACTGT CTCCATCACC GCGACGTCGT TTCCATCGAA
601 CCACCATGCC TCCATCTCTT TGTCGTAGCT GTCGCGCAT GGTGAGCCGC CGCAACCATA
661 TCTCCTCTAG ATCGTCCAAA TAACTAAAAC TAAAACTGG GTCGAGTTCA TCACATTAAG

```

721 CGATGCAGAC TTCTTCAAAC GCTTAATCCA TGCTTACGTG AAAAAAGGCT GATCGGGGTT
 781 TGGATTGAAT GCTCCAGATC GAGCACGTCT AAAATCACTC ATCGACAATC TGATCCAAGC
 841 TGATAGTTTA AACTGAAGGC GGGAAACGAC AATCTGATCC AAGCTCAAGC TGCTCTAGCA
 901 TTCGCCATTC AGGCTGCGCA ACTGTTGGGA AGGGCGATCG GTGCGGGCCT CTTAATTCGG
 961 CGTTAATTCA GTAAGTTG

(LB region vector seq.)

TT GACGCTTAGA CAACTTAATA ACACATTGCG GACGTTTTTA
 1021 ATGTACTGAA TTAACGCCGA ATTAATTCGG GGGATCTGGA TTTTAGTACT GGATTTTGGT
 1081 TTTAGGAATT AGAAATTTTA TTGATAGAAG TATTTACAAA TACAAA



- RB region의 도입유전자 삽입 위치 확인을 위한 inverse PCR
- *CryIAC1* 양배추 event C95의 RB 부분을 restriction enzyme *BamH I* 및 *EcoRV*, *Nsi I*, *Xba I* 으로 digestion하였다. enzyme 처리 후 phenol:CHCl₃ purification 하여 self ligation 후 정량하였다. 이를 inverse PCR 시 template DNA로 사용하였다.
- Primers set BT-RB-R1+BT-RB-U1을 이용하여 1차 PCR을 수행하였고, 1차 PCR product를 template로 하여 primers set BT-RB-R2+BT-RB-U2를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. 확인된 product는 primers set BT-RB-R2+BT-RB-U2를 이용하여 sequencing 하였다 (그림 2-43).

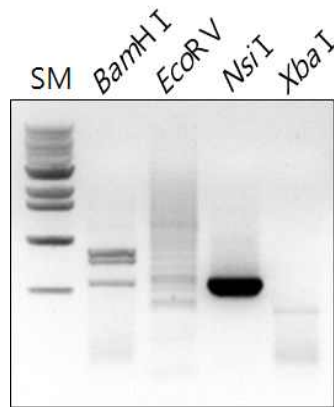


그림 2-43. Event C95의 RB region inverse PCR의 gel 양상

> C95_RB-U2(*NsiI*)

(RB vector region)

1 AGAGGCCCGC ACCGATCGCC CTTCCCAACA GTTGC GCAGC CTGAATGGCG AATGCTAGAG
 61 CAGCTTGAGC TTGGATCAGA TTGTCGTTTC CCGCCTCAG TTAAACTAT CAGTTT

(Unknown seq.)

AAAC

121 TATCAGATTG TCGTCCGCAA TGTGTTATTA AACTCTCTTT TTCGTAAGGG TTAACCCATA
 181 GATTTTGAGA AAAATTTAAA AATATGAAAA TATTGTTGTA ATGCAT

○ C95 event의 LB와 RB 부위의 인접 염기서열의 sequencing 결과를 Phytozome database (www.phytozome.net)에 BLAST search하였을 때, *Brassica rapa*의 gene annotation에 따르면 도입유전자는 Bra0039402와 Bra039403사이의 intergenic region에 위치하거나, Bra039403의 promoter 부위에 위치하였다 (그림 2-44). 한편, NCBI database에 대한 BLAST search에서는 Suppression subtractive hybridization에 의해 생산한 다수의 EST에 RB 부위가 유의한 상동성을 보여주었는데, SSH 기법이 artifact를 생산하는 경향이 있으므로 본 sequence의 발현 가능성의 시험이 요망된다.

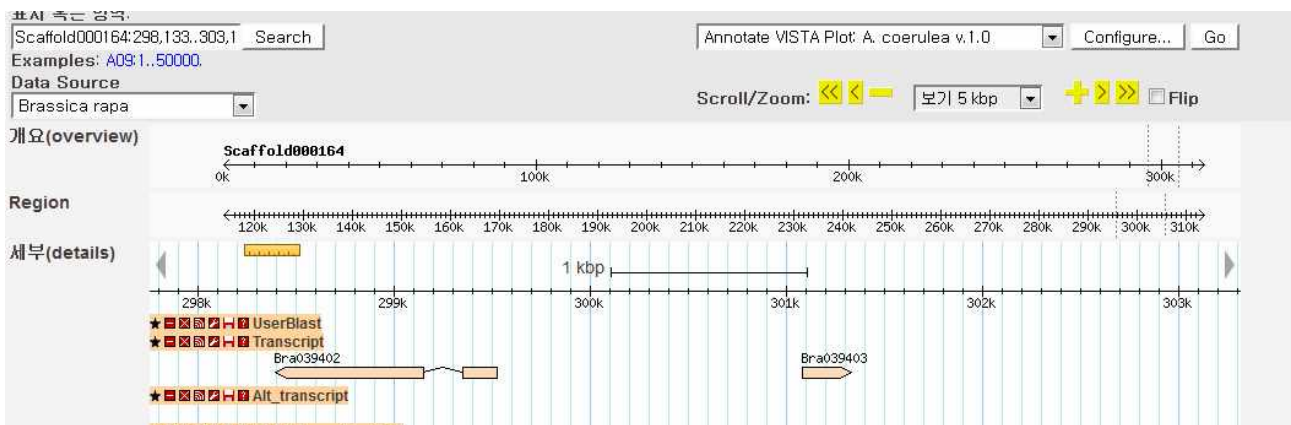


그림 2-44. C95-1 event의 도입유전자 인접 염기 서열의 Phytozome Brassica rapa genome의 annotation database에 대한 BLAST search 결과.

나. *Bar* 선발 마커 사용 좁나방 내성 GM 양배추의 우량 event 선발

GM 작물 개발과 관련하여 농촌진흥청의 LMO 평가위와 차세대바이오그린21사업단에서 *bar* selection을 권고함에 따라, 원계획에는 없었으나 제1세부과제에서 basta 저항성 GM 양배추를 개발하였으며, 제공하는 신규 basta 저항성 양배추 형질전환체의 스크리닝을 당초 계획 보다 우선적으로 실시하였으므로, 세대간 안전성 분석은 다소 축소되었다. 농우바이오에서는 *bar* 선발 마커를 장착한 pPZP 벡터에 *CryIAC1*를 cloning한 vector를 사용하는 형질전환 방법을 구축하여 2013년초에 *Bt* 양배추 1 line에 의뢰하였으며, 4차년도에 추가로 basta 저항성 *Bt* 양배추 lines의 분자유전학적 분석을 2013년 9월, 2014년 1월, 3월 각각 의뢰하였다.

(1) 3차년도 개발 GM 양배추 event B1의 분석

2차 년도에 분석에 참가하여 농우바이오에서 추가적으로 형질전환체 1 line의 추가 분석을 요청하여 본 LM 양배추에 대한 도입유전자수 분석을 수행하였다.

2013년 3월 농우 바이오에서 sampling하여 전달한 *Bt* 양배추 B1 line, 1개체의 어린잎을 CTAB method를 이용하여 DNA를 추출하였다.

LM 양배추의 copy 수 분석을 위해 도입유전자 cassette sequence map의 *CryIAC* 부분에서 probe 위치를 정하여, primer를 제작하고 T.vector cloning하여 plasmid를 추출하였다. Plasmid와 Biotin-14-dCTP를 이용하여 probe PCR 하고 PCR purification 하였다. 각 line별 DNA 5 µg에 *EcoRI*과 *HindIII*를 30 unit 처리하여 overnight digestion하였다. Digestion한 양배추

DNA는 1% Seakem agarose gel에 전기영동하고, 분리된 DNA를 capillary 현상을 이용하여 membrane으로 transfer하였고, 95°C에서 denature시킨 probe를 DNA와 hybridization 시킨 후에, probe에 conjugate와 substrate를 붙여 X-ray film에 exposure시키고 현상하였다. 실험결과, 양배추의 모든 lane에서 2 copy 이상으로 확인되었다 (그림 2-45).

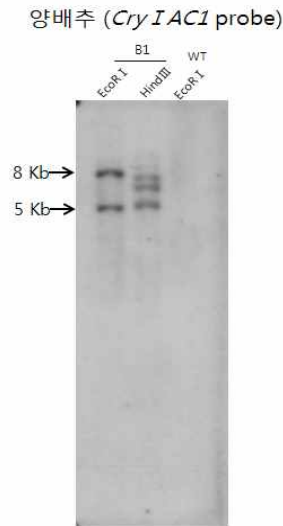


그림 2-45. *Bt* 양배추 Southern Hybridization.

(2) 4차년도 개발 GM 양배추 event들의 분석

(가) 도입유전자 복제수 분석

분석 대상 lines의 수가 많지 않으므로 1, 2차 년도에 보고한 바와 같이 tandem PCR를 통한 스크리닝 과정을 생략하고 곧바로 Southern blot 분석을 수행하였다.

농우바이오에서 sampling하여 전달한 양배추 엽조직에서 DNA를 CTAB 방법으로 분리하였다. 분리한 DNA를 제한효소로 잘라서 blotting을 수행한 후, primer CryIac-F 5'-AACAATGGGATAGCTGTGGT-3'와 CryIac-R 5'-GACAACAACCCAAACATCAA-3'를 사용하여 제작한 probe를 사용하여 (그림 2-46) chemiluminescent hybridization 방법을 수행하여 도입유전자의 복제수를 측정하였다.

그 결과 B10, B13 line에서 *EcoRI*과 *HindIII*로 자른 DNA 모두에서 단일 band임을 보였으므로, 본 Southern blot 분석 결과는 이들 두 line에 single copy의 도입유전자가 형질전환 되었음을 제시하였다.

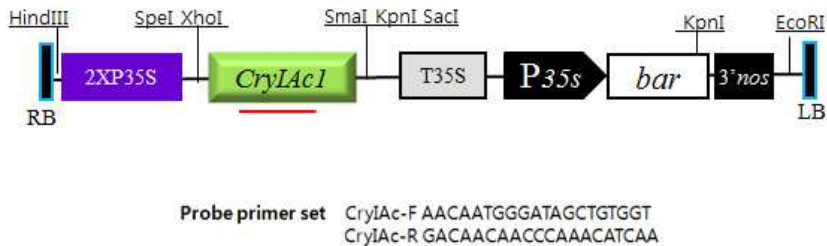


그림 2-46. Vector map 및 Southern probe 위치

① 2013년 9월 의뢰 B2 line.

B2 line에 *bar*와 *CryIAc* 유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위하여 유전자 specific PCR를 수행한 결과는 본 line에 의도한 도입유전자가 삽입되었음을 제시하였다(그림 2-47). 이후 *EcoRI* 과 *HindIII*를 처리하여 Southern blot 분석 결과는 B2 line에는 2 copy 이상의 도입유전자가 삽입된 것을 제시하였으므로, 분석을 중단하였다(그림 2-48).

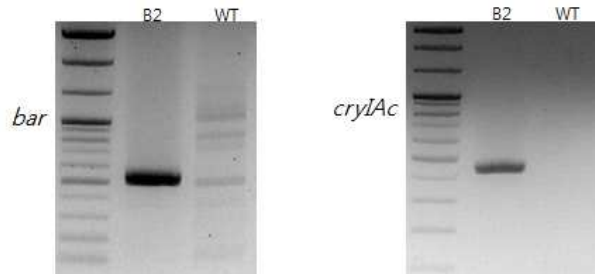


그림 2-47. *Bt* 양배추의 도입유전자 온전성 확인

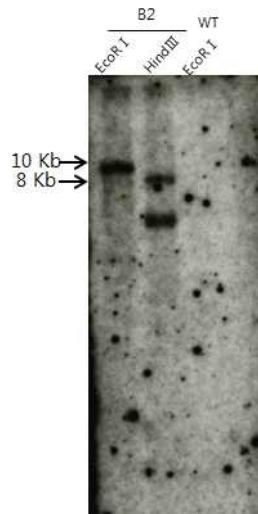


그림 2-48. *Bt* 양배추의 Copy수 분석 결과

② 2014년 1월 의뢰 B4-1, B4-2, B6, B7 line

B4-1, B4-2, B6, B7 line에 *bar*위치의 Tnos와 *CryIAc* 유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위하여 유전자 specific PCR를 수행한 결과는 본 line에 의도한 도입유전자가 삽입되었음을 제시하였다 (그림 2-49). 이후 *EcoRI*과 *HindIII*를 처리하여 Southern blot 분석 결과는 모든 line에 2 copy 이상의 도입유전자가 삽입된 것을 제시하였으므로, 분석을 중단하였다(그림 2-50).

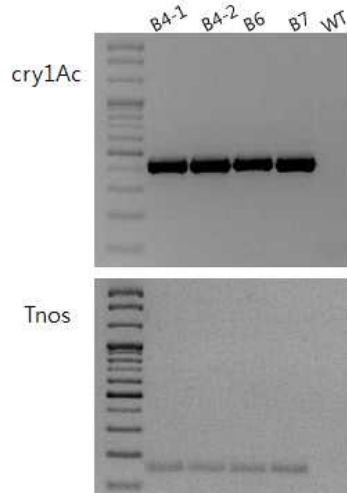


그림 2-49. 형질전환 *Bt* 양배추 온전성 확인

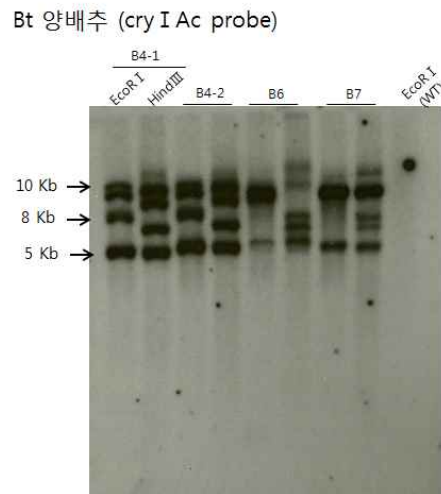


그림 2-50. *Bt* 양배추의 copy수 분석

③ 2014년 3월 의뢰 B10, B11-1, B11-2, B13, B14 line

B10, B11-1, B11-2, B13, B14 line에 *bar*와 *CryIAC* 유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위하여 유전자 specific PCR을 수행한 결과는 *CryIAC* 유전자는 모두 확인되었으나, *bar* gene은 B10 개체에서 밴드가 보이지 않았다 (그림 2-51). 이는 B10 개체에는 아마도 *bar* 유전자의 일부가 결실되었으나, 단백질의 기능은 온전함을 제시한다. 이후 *EcoRI*과 *HindIII*를 처리하여 Southern blot 분석한 결과는 B10과 B13 line에 1 copy의 도입유전자가 삽입된 것을 제시하였으므로, 도입위치 해명을 위한 분석을 진행하였다 (그림 2-52).

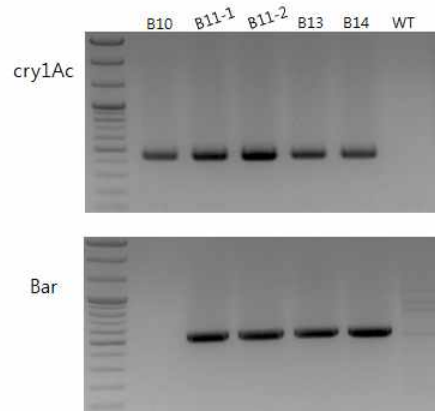


그림 2-51. 형질전환 *Bt*양배추 온전성 확인

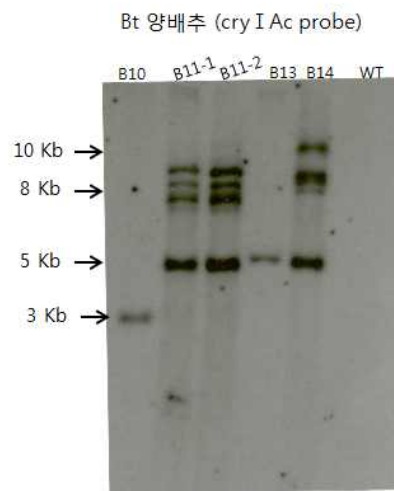


그림 2-52. *Bt*양배추의 copy수 분석

④ *Bar* 선발 B10, B13 *Bt* 양배추의 도입위치의 해명

B10, B13 *Bt* 양배추에는 단일 copy의 도입유전자가 삽입되었으므로, 도입위치가 숙주의 유전자 발현에 영향을 주지않는 위치인지를 밝히기 위하여 도입위치를 해명하는 연구를 진행하였다.

㉞ pPZP vector의 구조

Bar 선발용 vector의 구조인 pPZP 상의 주요 제한효소 위치는 그림 2-53과 같으며, 이들 제한효소 위치에 따라서 도입위치 해명을 위한 inverse PCR 용 primer를 design하였다.



그림 2-53. pPZP vector 구조 모식도

㉔ 도입유전자 온전성 확인

pPZP 양배추에서 도입유전자 온전성 확인을 위하여 도입된 vector내에 있는 *Cry1Ac1*에서 primer을 제작하였다 (표2-13). 확인결과 B10, B11-1, B11-2, B13, B14에서 온전하게 도입되었음을 확인하였다(그림 2-54).

표 2-13. 도입유전자 온전성 확인을 위한 primer list

Oligo	Length	Size (bp)	Sequence (5' → 3')
<i>Cry1Ac1-F</i>	20	441	AACAATGGGATAGCTGTGGT
<i>Cry1Ac1-R</i>	20		GACAACAACCCAAACATCAA

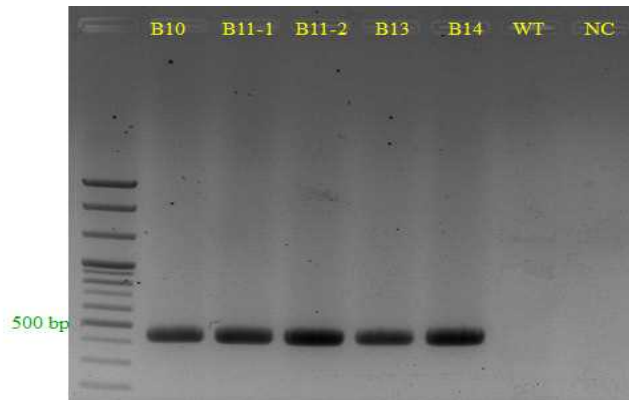


그림 2-54. 양배추 도입유전자 온전성 확인

㉕ 말단온전성 확인

Inverse PCR은 말단 sequence를 이용하므로 말단 온전성을 확인하기 위하여 LB와 RB 부위에서 primer을 제작하여 확인을 하였다 (표 2-14, 그림 2-55). 확인결과 B10은 LB쪽에 위치하는 *Bar* 유전자 부위까지 결손된 것을 알 수 있었다 (그림 2-56).

표 2-14. 말단 온전성 확인을 위한 primer list

Oligo	Length	Size (bp)	Sequence (5' → 3')
pPZP-RB-F1	20	202	ACAATCTGATCCAAGCTCAA
pPZP-RB-R1	22		CCTTCCTTTTCCACTATCTTCA
pPZP-RB-F2	20	252	TCAACAAAGGGTAATATCCG
pPZP-RB-R2	21		CCACCATGTTCCACATCAATCC
pPZP-LB-F1	21	116	ATGATTAGAGTCCCGCAATTA
pPZP-LB-R1	22		TTGAATTCCCGATCTAGTAACA
pPZP-LB-F2	22	178	TCTTAAGATTGAATCCTGTTGC
pPZP-LB-R2	20		GCGCGCTATATTTTGTTTTC
pPZP-LB-F3	18	214	CTTCAAGCACGGGAAGTCTG
pPZP-LB-R3	23		CATGCTTAACGTAATTCAACAG A
pPZP-LB-F4	20	147	GGAAAAAGAAGACGTTCCAA
pPZP-LB-R4	20		CGTGTCTCTCCAAATGAAA

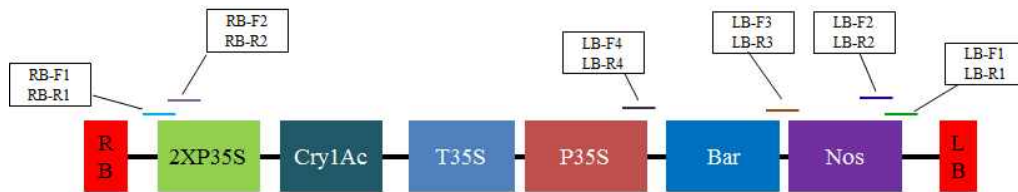


그림 2-55. pPZP 양배추 말단 온전성 primer 위치 모식도

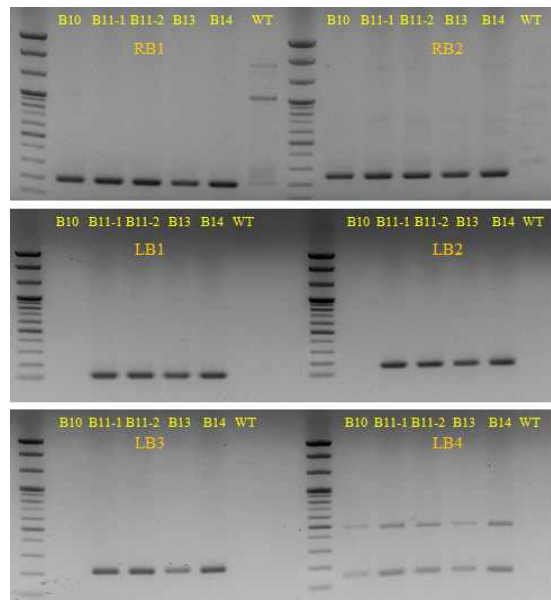


그림 2-56. 말단 온전성 PCR 결과

㉔ Tandem PCR

Multi copy를 확인하기 위하여 말단 primer을 토대로 tandem PCR primer을 제작하였다. PCR primer 및 primer set는 다음과 같다 (표2-15). Tandem PCR 결과 1set에서 특이적인 band가 보인 것으로 보아 B11-1, B11-2, B14은 Southern blot 결과와 일치하게 multi copy로 예측이

된다. Southern blt 결과 B11-1, B11-2, B14가 multi copy로 판별이 되었다(그림 2-57).

표 2-15. Tandem PCR을 위한 primer list

Set	Oligo	Length	Sequence (5' → 3')
1	pPZP-RB-R2	21	CCACCATGTTCACATCAATCC
	pPZP-LB-F2	22	TCTTAAGATTGAATCCTGTTGC
2	pPZP-RB-R2	21	CCACCATGTTCACATCAATCC
	anti-pPZP-RB-R2	21	GGTGGTACAAGTGTAGTTAGG
3	pPZP-LB-F2	22	TCTTAAGATTGAATCCTGTTGC
	anti pPZP-LB-F2	22	AGAATTCTAACTTAGGACAACG
4	pPZP-RB-R2	21	CCACCATGTTCACATCAATCC
	anti pPZP-LB-F2	22	AGAATTCTAACTTAGGACAACG
5	pPZP-RB-R2	21	CCACCATGTTCACATCAATCC
	pPZP-RB-R2	21	CCACCATGTTCACATCAATCC
6	anti pPZP-LB-F2	22	AGAATTCTAACTTAGGACAACG
	anti pPZP-LB-F2	22	AGAATTCTAACTTAGGACAACG

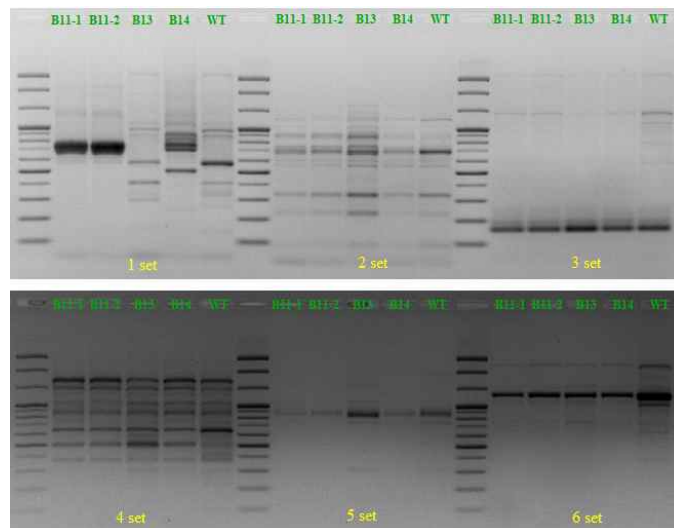


그림 2-57. Tandem PCR 결과

㉓ Inverse PCR

Inverse PCR을 위해 LB region에서 digestion하였다. B10은 결손 된 부분이 많아서 *CryIac1* 유전자 부분에 있는 *Bgl*III, *Xma*I 으로 절단을 하였고, B13은 *Bar* 유전자에 있는 *Sac*II, *Sal* I 으로 digestion을 하였다(표 2-16, 그림 2-58). Phenol, chloroform으로 gDNA을 추출을 하고 self ligation을 한 후 제작한 primer로 RB와 LB region에서 inverse PCR을 진행하였다. PCR 결과 B13 RB와 LB region에서 band가 보여 sequence을 의뢰하였다.

표 2-16. Inverse PCR 위한 primer list

Oligo	Length	Sequence (5' → 3')
B10-pPZP-iPCR-LB-C1	20	GTCCTGAATCTTTTACTGTC
B10-pPZP-iPCR-LB-F1	20	CACAAACCAAGGCAAGTAAT
B10-pPZP-iPCR-LB-C2	20	GGGTAGATCGTCTTGATGAG
B10-pPZP-iPCR-LB-F2	20	GGTAGTTCCTACTGAATCAA
pPZP-iPCR-LB-C1	21	GCAACAGGATTCAATCTTAAG
pPZP-iPCR-LB-F1	20	TATGATTAGAGTCCCGCAAT
pPZP-iPCR-LB-C2	20	TATTGCCAAATGTTTGAACG
pPZP-iPCR-LB-F2	20	GAAAACAAAATATAGCGCGC
cab-pPZP-iPCR-RB-C1	20	CATCTCTCGTTTGGAAAGGAT
cab-pPZP-iPCR-RB-F1	20	GACCAAAGATACCCAGATG
cab-pPZP-iPCR-RB-C2	20	AGAGCTTCAGAGAGTGGGAA
cab-pPZP-iPCR-RB-F2	20	GAACCTCGCTGAGCAGAACT

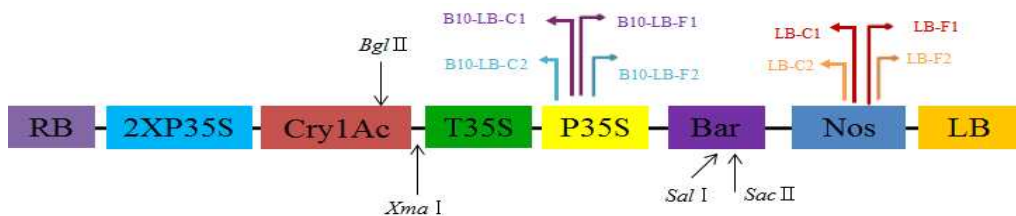


그림 2-58. Inverse PCR을 위한 제한효소 및 primer 위치 모식도

Sequence 분석 결과 B13에서 *Sal*I 으로 절단한 PCR 결과에서 Brassica napus BNSCS2CT Brassica napus cDNA 5', mRNA sequence으로 밝혀졌다. 또한 confirm PCR primer을 제작하여 PCR을 하였다. 확인결과 337 bp와 600 bp에 band가 보여 elution을 하여 sequence을 의뢰하였을 때 특이 band가 예측하는 band임을 알 수 있었다(표2-17, 그림2-59,60). 결과적으로 B13은 genic region에 도입유전자가 삽입된 것을 알 수 있었다.

표 2-17. B13 LB confirm PCR primer list

Oligo	Size	Length	Sequence (5' → 3')
B13-LB-cfm-F (iPCR-LB-F2)	337 bp	20	GAAAACAAAATATAGCGCGC
B13-LB-cfm-R		20	TTTGGAGGATGGTTTTGAAT

※ B13 LB sequence

[cassette.seq](#)

```

1   GAAAACAAA TATAGCGCGC AAAGTAGGAT AAATTATCGC GCGCGGTGTC
51  ATCTATGTTA CTAGATCGGG AATTC AATTC GGCGTTAATT CAGTACATTA
101 AAAACGTCCG CAATGTGTTA TTAAGTTGTC TAAGCGTCAA TTTGTTTACA
151 CCACAA
    
```

unknown seq. (Brassica napus BNSCS2CT Brassica napus cDNA 5', mRNA sequence.)

```

ATTT GAGGGAGGAG AAAAGGGAAG GGAAGGTGAG TAAATGTAAC
    
```


cloning하여 plasmid를 제작하였다. Probe는 plasmid를 주형으로 biotin-14-dCTP를 첨가하여 probe PCR로 제작하였다. Probe PCR 반응조건은 94°C 2분후 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 4분의 cycle을 40회 반복하였다. Southern blotting 과정은 연구실에서 보유한 한 Southern blotting protocol (2015년 5월 21 일 주의사항 업데이트)에 따랐으며, 대략적인 과정은 다음과 같다. DNA 6µg에 *EcoRI* 20unit 처리하여 37°C에서 overnight digestion하였다. Digestion한 DNA는 1% agarose gel에서 30V로 8시간 전기영동하여 capillary현상을 이용하여 membrane으로 transfer하였다. 95°C에서 5분간 denature시킨 probe를 membrane에 transfer된 DNA hybridization시키고, probe에 conjugate와 substrate를 붙여 X-ray film에 exposure시키고 현상하였다.

표 2-18. 형질전환 양배추 Southern analysis를 위한 primer

Name	Forward	Reverse	size
P35Sp	TCCATCTTTGGGACCACTGT	ATCAAGACGATCTACCCGAG	594bp

도입유전자 삽입을 간단히 시험하고자 형질전환체 B15, B16, B17, B18, B19의 genomic DNA를 주형으로 P35Sp primer로 PCR하였을 때, 모든 형질전환체에서 예상되는 size의 band를 관찰하였고, wild type에서는 P35Sp가 증폭되지 않았다. (그림2-62). 형질전환체에 삽입 copy수를 확인하기 위해서 *EcoRI* 처리한 형질전환체의 DNA를 P35Sp probe로 hybridization한 Southern analysis를 실시하였다. Southern analysis결과인 그림 2-63의 A, B, C에서 A와 B는 같은 membrane으로 A가 X-ray film에 노출시간이 더 길어서 강한 signal이 보이지만, A에서 band수를 관찰하기 어려운 B16은 B를 통해서 band수를 관찰하였고, A, B와 다른 membrane인 C를 통해서 B17, B18, B19의 band수를 관찰할 수 있었다. 세 개의 Southern 결과물로 각 형질전환체의 삽입 copy수를 세어보면, B15에서 4개의 band를 관찰하였고(그림2-63A), B16에서 4개의 band를 관찰하였고(그림2-63B), B17에서 2개의 band를 관찰하였고(그림2-63C), B18에서 2개의 band를 관찰하였고(그림2-63C), B19에서 2개의 band를 관찰하였으며(그림 2-63C), 대조군인 wild type에서는 band가 나타나지 않았다. 이 결과는 모든 형질전환체 line에 2 copies 이상의 도입유전자가 삽입되었음을 제시하였다.

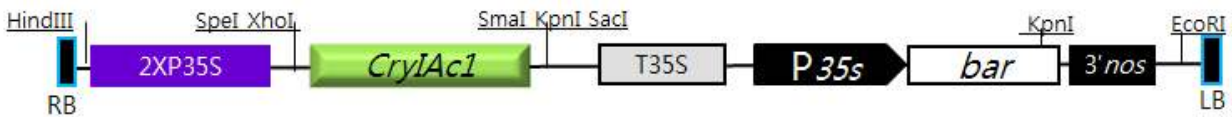


그림 2-61. Bar 선발 Bt 양배추 vector map

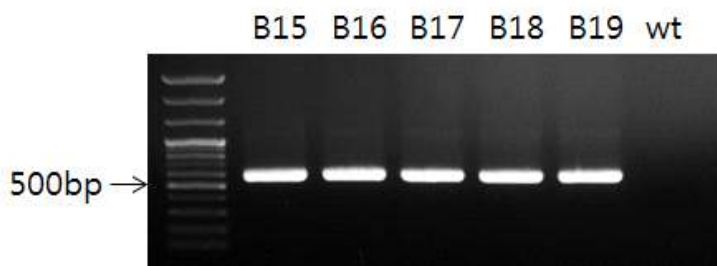


그림 2-62. Bt 양배추에서 P35Sp PCR 결과

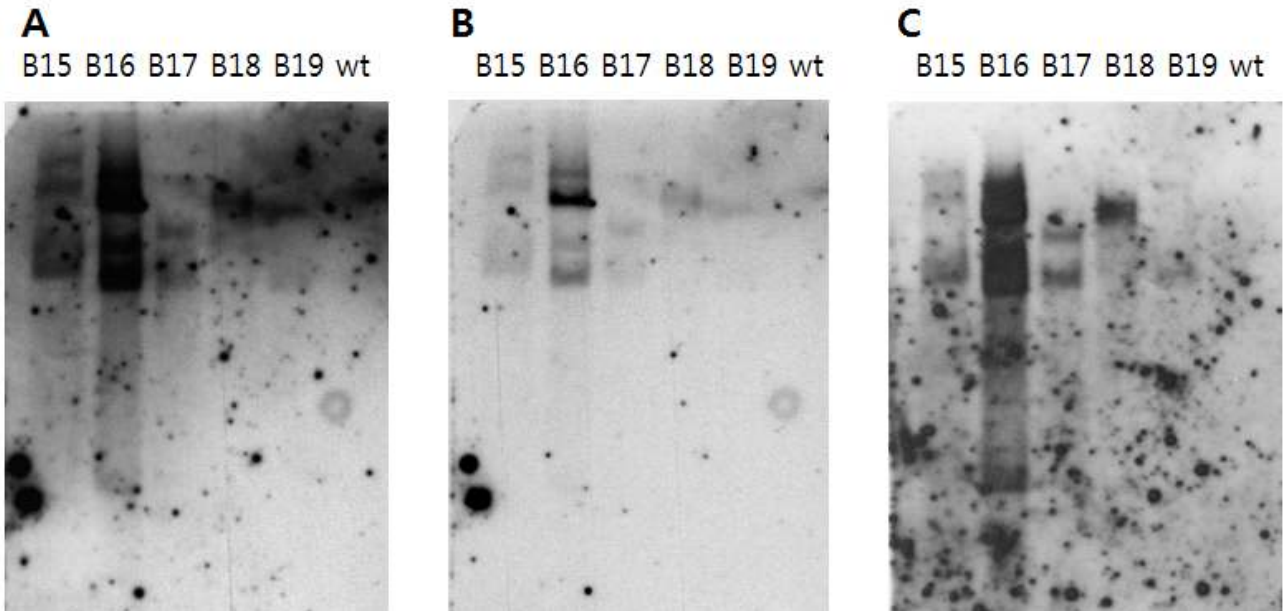


그림 2-63. *EcoRI* 처리한 형질전환체 *Bt* 양배추 DNA에서 P35Sp probe를 사용한 Southern analysis. A, B, C 모두 *EcoRI* 처리한 형질전환체 *Bt* 양배추 DNA이며, A와 B는 같은 membrane이지만, X-ray film에 노출시간이 다르며, C는 A, B와 다른 membrane임

(나) pPZP *Bt* 양배추의 도입위치 분석

농우바이오로부터 입수된 의뢰받은 pPZP *Bt* 양배추 #17, #18라인의 도입유전자 cassette의 삽입위치를 확인하기 위하여 Inverse PCR을 위해 수행하였다. 먼저 Genomic DNA를 RB region에서 *XbaI* 으로 처리하였고, LB region에서는 *SacI*, *SalI* 으로 처리하였다. Phenol, chloroform으로 gDNA을 추출을 하고 self ligation을 한 후 제작한 primer로 RB와 LB region에서 inverse PCR을 진행하였다. 2차 PCR 결과 특이적으로 생성된 밴드를 순수 분리하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과 위에 언급한 바와 같이 모두 2 copy 이상의 도입유전자가 삽입되었을 때 예측할 수 있는 vector sequence가 나왔다.

① 말단온전성 확인

말단 온전성을 확인하기 위하여 LB와 RB부위에서 primer을 제작하여 확인을 하였다. 확인결과 모든 sample에서 말단이 거의 온전한 것을 확인하였다(그림 2-64).

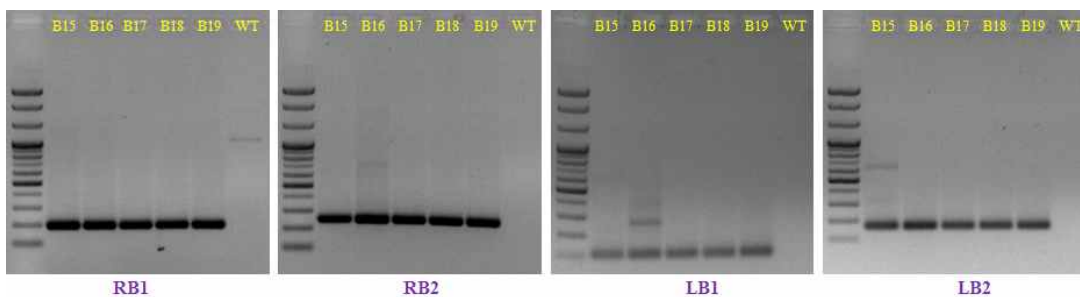


그림 2-64. 양배추 말단 온전성 확인 결과

③ Tandem PCR

Multi copy를 확인하기 위하여 말단 primer을 토대로 tandem PCR primer을 제작하였다. Primer을 여러 set로 조합하여 tandem PCR을 수행하였다. PCR 결과 1set에서 특이적인 band가 보였다. 따라서 B15, B16, B19 sample은 multi copy라 생각 되어진다 (그림 2-65).

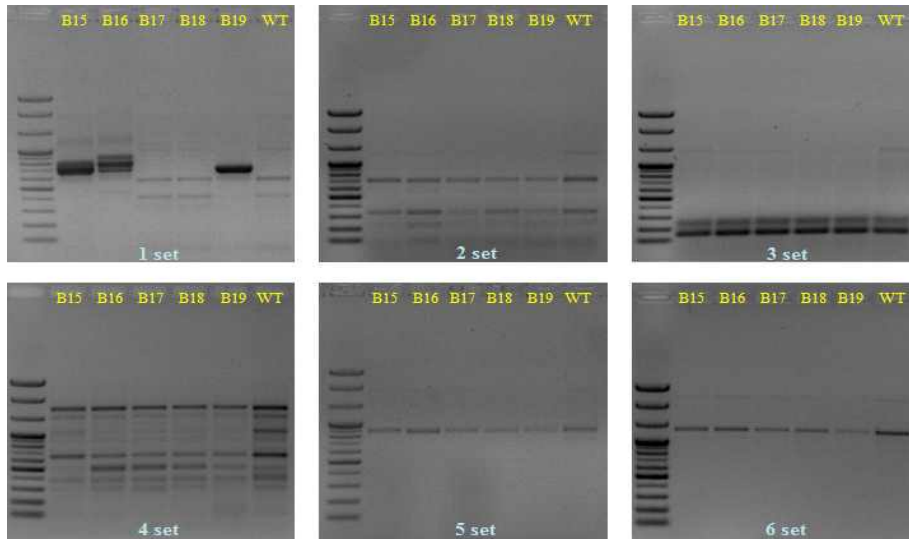


그림 2-65. 양배추 tandem PCR 결과

④ Inverse PCR

Inverse PCR을 위해 RB와 LB region에서 digestion하였다. RB region에서는 *Xba*I으로 절단을 하였고, LB region에서는 *Sac*II, *Sal*I으로 digestion을 하였다. 이후 phenol, chloroform으로 gDNA을 추출을 하고 self ligation을 하였다. 이것을 template로 제작한 primer로 1st, 2nd inverse PCR을 하였다.

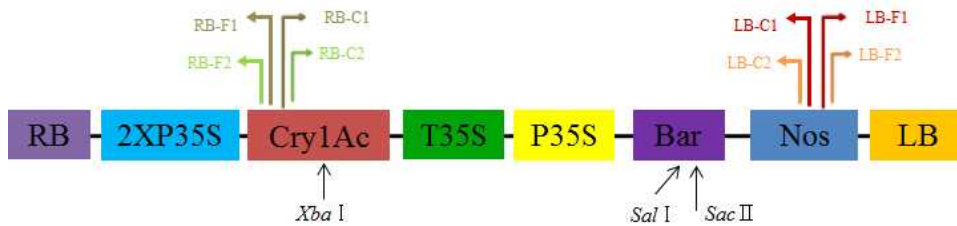


그림 2-66. Inverse PCR을 위한 primer 및 restriction enzyme 모식도

표 2-19. Inverse PCR 위한 primer list

Oligo	Length	Sequence (5' → 3')
cab-pPZP-iPCR-RB-C1	20	CATCTCTCGTTTGGGAAGGAT
cab-pPZP-iPCR-RB-F1	20	GACCAAAGATACCCCAGATG
cab-pPZP-iPCR-RB-C2	20	AGAGCTTCAGAGAGTGGGAA
cab-pPZP-iPCR-RB-F2	20	GAACTCGCTGAGCAGAAACT
pPZP-iPCR-LB-C1	21	GCAACAGGATTCAATCTTAAG
pPZP-iPCR-LB-F1	20	TATGATTAGAGTCCCAGCAAT
pPZP-iPCR-LB-C2	20	TATTGCCAAATGTTTGAACG
pPZP-iPCR-LB-F2	20	GAAAACAAAATATAGCGCGC

- #18 IPCR-LBF2(*Sal*I) : 1차

- 1 CNGNNGTGTC ATCTATGTTA CTAGATCGGG AATTCAATTC GGCCTTAATT
 51 CAGTACATTA AAAACGTCCG CAATGTGTTA TTAAGTTGTC TAAGCGTCAA
 101 TTTGTTTACA CCACAATATA TCCTGCCA

Vector

unknown부분

CC AGCCAGCCAA CAGCTCCCCG

151 ACCGGCAGCT CGGCACAAAA TCACCACTCG ATACAGGCAG CCCATCAGTC
 201 CGGGACGGCG TCAGCGGGAG AGCCGTTGTA AGGCGGCAGA CTTTGCTCAT
 251 GTTACCGATG CTATTCGGAA GAACGGCAAC TAAGCTGCCG GGTTTGAAAC
 301 ACGGATGATC TCGCGGAGGG TAGCATGTTG ATTGTAACGA TGACAGAGCG
 351 TTGCTGCCTG TGATCAATTC NGGNACGAAC CCANTGGACA TAAGCCTGTT
 401 CGGTTTCGTAA GCTGTAATGN ANGTNGCGTA TGCCTCNCG CAACTGGTCC
 451 AGAACCTTGA CNGAACGCAG CGNTGGTAAC GGCGCAGTGG NGGTTTTTCAT
 501 GGCTTGTTNT NANTGTTTTT TNGGGGTACN GNCTATGCCT CGGGCATNCA
 551 AGCAGCAAGC GCGTTACGCC GTGGGTCNAT GTTTNATGTT NNGAGANCAG
 601 NAACGANGTT ACGCAGCNGG GNNNTCNNNC TAAANANNT TTN

- #18 IPCR-LBC2(*Sal*I) : 2차

1 NNNNNATCAG ATCTCGGTGA CGGGCAGGAC CGGACGGGGC GGTACCGGCA
 51 GGCTGAAGTC CA

Vector

unknown부분

GCTGCCAG AAACCCACGT CATGCCAGTT CCCGTGCTTG

101 AAGCCGGCCG CCCGCAGCAT GCCGCGGGGG GCATATCCGA GCGCCTCGTG
 151 CATGCGCACG CTCGGGTCGT TGGGCAGCCC GATGACAGCG ACCACGCTCT
 201 TGAAGCCCTG TGCCTCCAGG GACTTCAGCA GGTGGGTGTA GAGCGTGGAG
 251 CCCAGTCCCG TCCGCTGGTG GCGGGGGGAG ACGTACACGG GTGGAAAAAG
 301 AAGGTGNCTC CTACAAATGC CATCNTTGCN ATAAAGGAAA GGTCTTNNTT
 351 NAAGATGCCT CTGCCGACAG TGGTCCCAA GATGGACCCC CACCCACGAG

401 GAGCATCGTG GAAAAAGAAA ACGTTCCAAC CACGTCTTCT TANTTTCGGA
451 TTGATGTGAT ATCTCCAATG ACGTAGGGAT GACGCACAAT CCCACTATCC
501 TTCNCAAGAC CCTTCCTCTA TATAAGGAAT TTCATTTTNT TTGTAGAGAA
551 CA

- #18 IPCR-RBC2(*Xba*I)

1 TNNNNNGNNT NCAGCTCTCG CGAGGATGCG TATTCAATTC AACGACATGA
51 ACAGCGCCTT GACCACAGCT ATCCCATTTT TCGCAGTCCA GAACTACCAA
101 GTTCCTCTCT TGTCCGTGTA CGTTCAAGCA GCTAATCTTC ACCTCAGCGT
151 GCTTCGAGAC GTTAGCGTGT TTGGGCAAAG ATGGGGATTC GATGCTGCAA
201 CCATCAATAG CCGTTACAAC GACCTTACTA GGCTGATTGG AAACACTACACC
251 GACTACGCTG TTCGTTGGTA CAACACTGGC TTGGAGCGTG TCTGGGGTCC
301 TGATTCTAGA

Vector

unknown부분

AAAGTAGATC TNGCTGAGTG CAGTGACAGC TGAGTGCAGT
351 GACATGGTTT AAAGTTCTTT CCGAGCACAA TGACTTTTCA AAGNCTTTC
401 TCGAGCACCT GAANGTACTG ATTGTTCTTA CTTTATTCTC ACTGTGACTT
451 TNATTTTAAAC TTTTGANTTT GANTTNACCA ATACCAATNA TACAAGNCAC
501 NNAATACCTC NTTANCTCNA TAGGANNAAC ACNNNTNTCG GNNNGTGAAN
551 TTATNATCCA CNCANANGAA NGANNTNACA CGANAGANAA CGTNNGCNAA
601 CANANCGNNA ACTGNNNGCC ANCGNACAAA AGACGCGNTG NTGGCTNGNT

- #17 IPCR-LBF3(*Sac*I)

AANNGC CTTCGTCTTA AACGTCCGCA

Vector

unknown부분

1 GGGAACCTTGTT TGATCCCTTT ATAAACTCAC ATGCATATAT ATAAGCTTCA
51 GTAAACAGAT TATTCTTAAC TAAGTATGGC TATGAATTTT GTTTAACAAT
101 TTGTTTACTT CCATTAATTC ACTTACAAGT TATTTTAAAT ACGTAGGAGC
151 ATGCGGCATG CTGCGGGCGG CCGGCTTCAA GCACGGGAAC TGGCATGACG
201 TGGGTTTCTG GCAGCTGGAC TTCAGCCTGC CGGTACCGCC CCGTCCGGTC
251 CTGCCCCTCA CCGAGATCTG ATGACCCCGA ATTTCCCGA TCGTTCAAAC
301 ATTTGGCAAT AA

- #17 IPCR-LBC3(*Sac*I)

1 NNNGNANAAA GGGCGGTACG GCAGGCTGAG TCCAGCTGCC AGAAACCCAC
51 GTCATGCCAG TTCCCGTGCT TGAAGCCGGC CGCCCGCAGC ATGCCGC

Vector

unknown부분

ATG

101 CTCCTACGTA TAAAAATAA CTTGTAAGTG AATTAATGGA AGTAAACAAA

151 TTGTAAACA AAATTCATAG CCATACTTAG TTAAGAATAA TCTGTTTACT
 201 GAAGCTTATA TATATGCATG TGAGTTTATA AAGGGATCAA CAAGTTCCT
 251 TGCGGACGTT TTTAATGTAC TGAATTAACG CCGAATTGAA TTCCCGATCT
 301 AGTAACATAG ATGACACCGC GCGGATAAT TTATCCTAGT TTGCGCGCTA
 351 TATTTTGTTC TC

- #17 IPCR-RBC3(*Xba*I)

1 NNANTATCAG TTCTCTCTTG TCCGTGTACG TTCAGCAGCT AATCTTCACC
 51 TCAGCGTGCT TCGAGACGTT AGCGTGTTTG GGCAAAGATG GGGATTTCGAT
 101 GCTGCAACCA TCAATAGCCG TTACAACGAC CTTACTAGGC TGATTGGAAA
 151 CTACACCGAC TACGCTGTTC GTTGGTACAA CACTGGCTTG GAGCGTGTCT
 201 GGGGTCCTGA TTC

Vector

unknown부분

CCAAACA TCAACGAATG CATTCCATAC AACTGCTTGA
 251 GTAACCCAGA AGTTGAAGTA CTTGGTGGAG AACGCATTGA AACCGGTAC
 301 ACTCCCATCG ACATCTCCTT GTCCACA

pPZP-LBF1 : ATGATTAGAGTCCCGCAATTA
 BT-#17-LB-cfmR : AATTGTTAAACAAAATTCATA
 BT-#17-RB-cfmF : AACTGCTTGAGTAACCCAGAA
 pPZP-RBR1 : CCTTCCTTTTCCACTATCTTCA

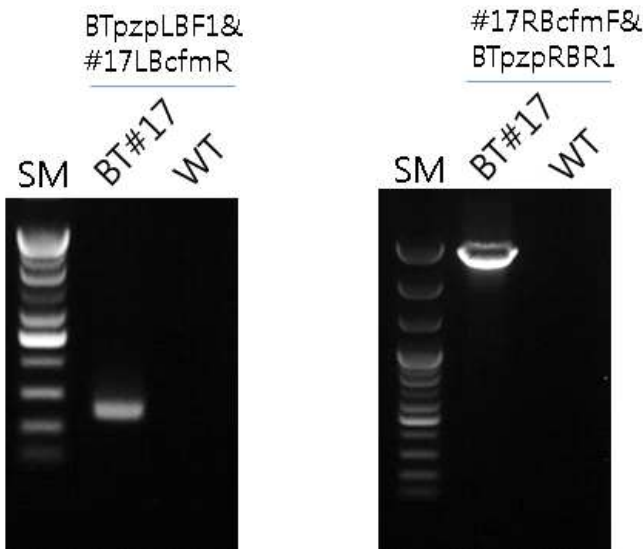


그림 2-67. 좀나방 내성 형질전환 양배추 #17번의 LB 및 RB IPCR confirmation PCR 결과

pPZP-LBF1 : ATGATTAGAGTCCCGCAATTA
 pPZP-LBF2 : TCTTAAGATTGAATCCTGTTGC
 BT-#18-LB-cfmR : CCCGCTGACCGCTCCCGGAC
 BT-#18-RB-cfmF : TGCAGTGACAGCTGAGTGCAGT
 pPZP-RBR1 : CCTTCCTTTTCCACTATCTTCA

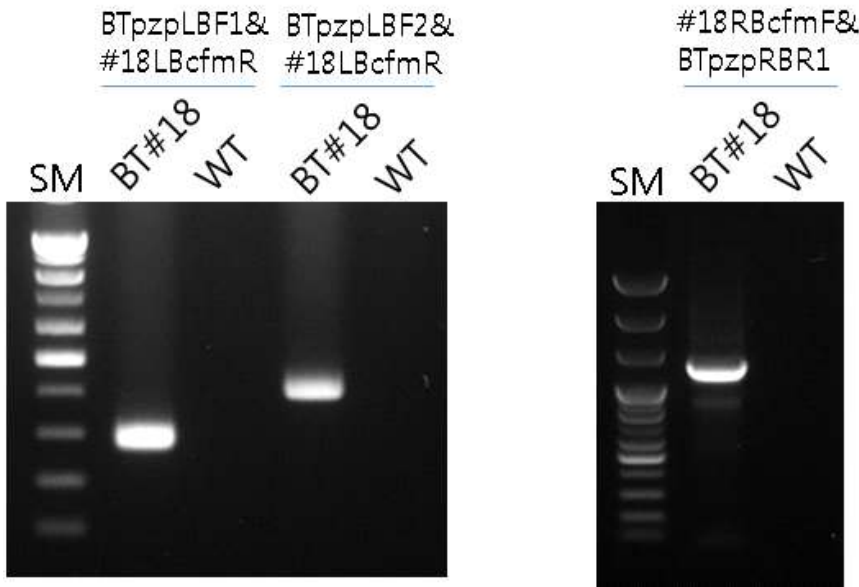


그림 2-68. 좀나방 내성 형질전환 양배추 #18번의 LB 및 RB IPCR confirmation PCR 결과

2. 선발된 우량 event의 분자유전학적 분석

가. 우량 event에 삽입된 transgene의 염기서열 온전성 분석

(1) 연구 수행의 목적

2차 년도에 49개 양배추 형질전환 event 중에서 단일 copy의 transgene construct(도입유전자)가 삽입된 것으로 예측된 7개의 event에 삽입위치 인접 염기서열을 분석하였다. 그 결과 7개 중 3개 event에서 도입유전자가 intergenic region에 삽입되었음을 확인하였다. 이들 3개 event (C85-1, C86-1, C95)의 종자를 받아서 소규모 재배를 통하여 숙주와의 농업형질의 유사성을 조사할 계획이었다. 하지만 이들 3개 event에 대한 채종이 지연되는 관계로 우선적으로 도입유전자가 형질전환 도중 염기서열의 변화 없이 온전히 삽입되었는지를 염기서열 결정을 통하여 확인하였다. 한편, 3개 event 중 C86-1은 유지 도중 죽었기 때문에 C85-1과 C95에 대해서만 genomic DNA에서 도입유전자를 PCR 증폭하여 염기서열을 결정하였다.

(2) *Bt* 양배추 C95 line에 도입된 유전자 cassette의 full sequencing

Bt 양배추 C95 line의 도입유전자 cassette의 full sequencing을 위하여 iPCR을 통하여 얻은 도입유전자 cassette 인접 염기서열에서 약 5.5kb의 long PCR을 위한 primer 2쌍을 주문 제작하였다 (표 2-20). 프라이머는 각각 10 μ M씩 사용하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 2분30초, [94 $^{\circ}$ C에서 30초, 54 $^{\circ}$ C에서 30초, 68 $^{\circ}$ C에서 5분] \times 30회, 72 $^{\circ}$ C에서 10분 조건으로 반응하였다. BtC95-F와 BtC95-R 프라이머를 사용한 조합에서만 약 5.5kb의 특이적인 band가 확인되었다(그림 2-68). 이 특이적인 band를 gel purification하여 염기서열 분석을 위한 주형으로 사용하고, 표 2-21의 염기서열 분석을 위한 프라이머들을 이용하여 분석하였다. Transgene construct에 기초하여 제작한 sequencing primer는 그림 2에서 보는 바와 같이 4군데의 gap을 생산하였으므로, 4개의 프라이머를 추가적으로 제작하였다. 그래도 특이적인 구조로 인하여 잘 분석되지 않는 부분은 Btseq3과 Btseq-6-1R을 이용하여 PCR로 부분 증폭한 후 분석하였다 (그림 2-69).

표 2-20. *Bt* 양배추 C95 line의 도입유전자 cassette의 full sequencing위한 long PCR 프라이머

이름	염기서열	증폭크기
BtC95-F	GTCTAAAATCACTCATCGACAA	5.5 kb
BtC95-R	CGAAAAAGAGAGTTTAATAACACA	
BtC95-F	GTCTAAAATCACTCATCGACAA	5.5 kb
BtC95-R1	TTAACCCCTTACGAAAAAGAGAG	

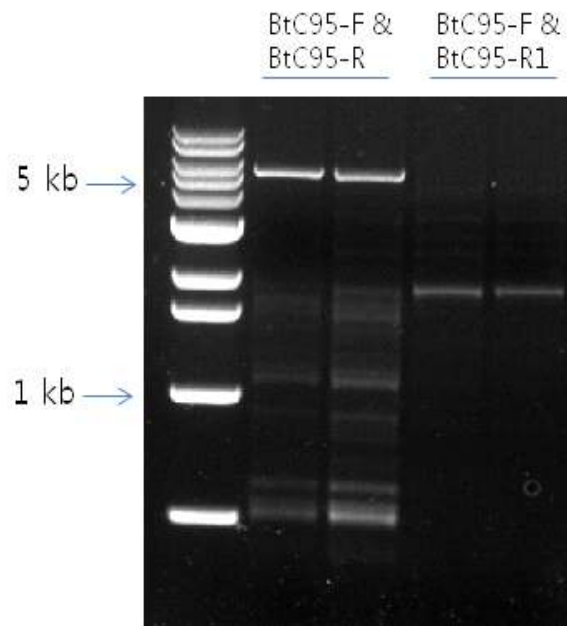


그림 2-69. *Bt* 양배추 C95 line의 도입유전자 cassette full sequencing을 위한 long PCR 결과

표 2-21. *Bt* 양배추 C95 line의 도입유전자 cassette의 full sequencing위한 프라이머 염기서열

이름	염기서열	방향
Btseq1	ACCCTAATTCCCTTATCTGG	정방향
Btseq2	GCTGAAATCACCAGTCTCTC	역방향
Btseq3	GTCGGTCTTGACAAAAAGAA	정방향
Btseq4	CTAGAGCAGCTTGCCAAC	역방향
Btseq5	CCACCATGTTATCACATCAA	정방향
Btseq6	TATCTTCTCCAACACCGTTC	역방향
Btseq7	ATGATCACTCCTGCAGTACC	정방향
Btseq8	ACTACACCGACTACGCTGTT	역방향
Btseq9	TTCTCTCCTGAACTGGTTGT	정방향
Btseq10	GAAAATCTTCGTCAACATGG	역방향
Btseq11	TCAAGCAGTTGTATGGAATG	정방향
LB95seq1	AGTACATTA AAAACGTCCGC	역방향
RB95seq2	CCGATCGCCCTTCCAAC	정방향
BT95 LB-L-Seq	GCGCATCGCCTTCTATCGCCTTC	역방향
Btseq-pre3	AGGAGGTTTCCCGATATTACCCTTTG	정방향
Btseq-6-1R	GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG	역방향
Btseq12	CTTTGATTCAGTGGGAACTACCTTTT TAG	정방향

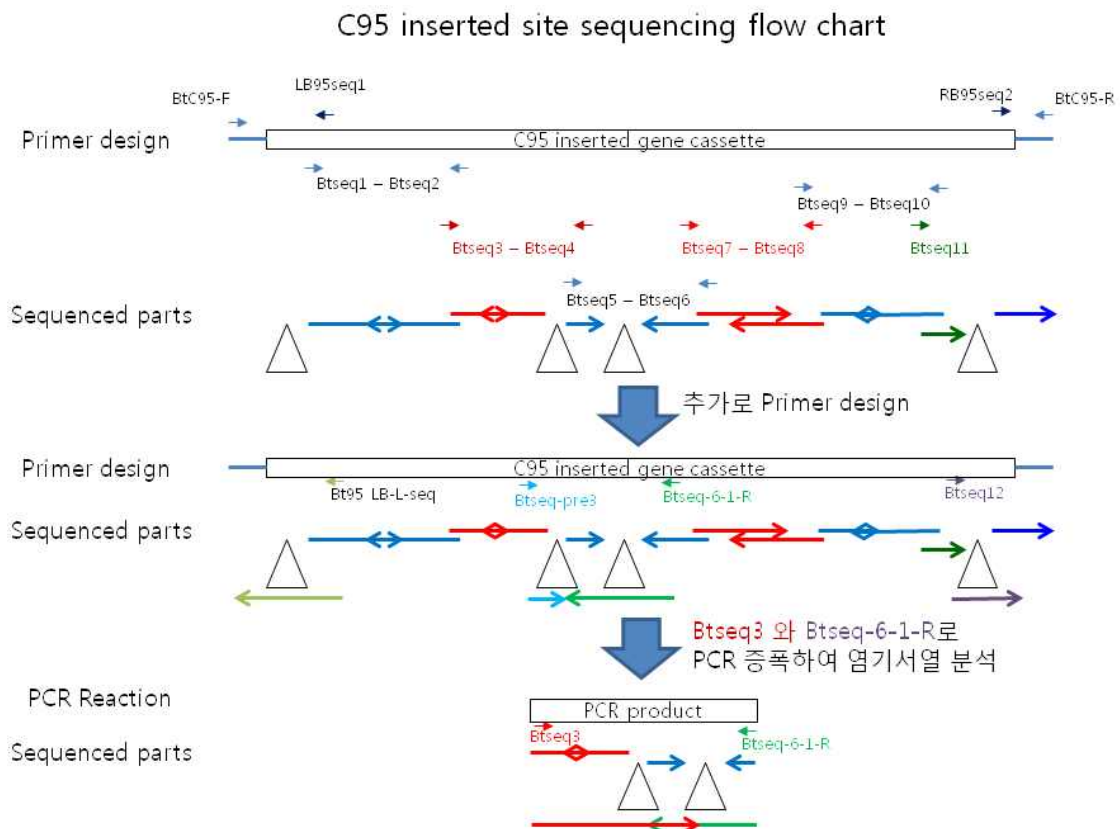


그림 2-70. *Bt* 양배추 C95 line의 도입유전자 cassette full sequencing을 위한 flow chart

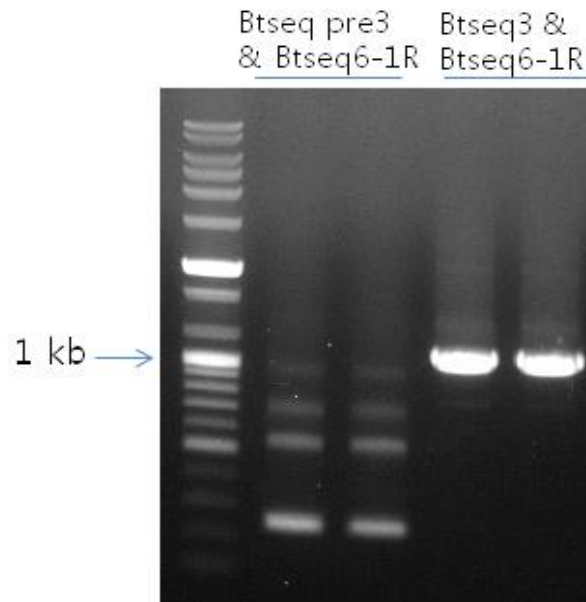


그림 2-71. *Bt* 양배추 95 line의 도입유전자 cassette full sequencing을 위한 부분 PCR 결과

C95의 transgene의 sequencing 결과들은 editing을 수행한 후 하나의 contig로 assemble 되었다. C95의 transgene의 contig sequence는 2차 년도에 관찰한 바와 같이 삽입 시에 left border에서 13 bp, right border에서 50 bp가 결실되어 삽입된 결과를 보여주었다. 2차 년도에 획득한 개발자의 정보에 기반 한 transgene cassette의 염기서열과의 비교 결과, *CryIAc1* 유전자에서 개발자가 제시한 염기서열과는 달리 2개의 SNP (C/T, A/T)가 관찰되었고, 35S promoter에서는 1개의 T deletion, 1개의 C insertion, 및 C/T SNP가 관찰되었다. 개발 당시에 사용한 *CryIAc1* 유전자는 국내에서 개조한 유전자로 알려져 있으며, 개발자가 종종 다른 version의 binary vector를 사용하는 경우가 있으므로 이러한 결과는 C85-1과의 비교를 통하여 이러한 변이가 형질전환시의 자연적인 돌연변이인지 도입시 vector의 염기서열을 그대로 반영하는지를 알 수 있을 것으로 사료되었다.

(3) *Bt* 양배추 C85-1 line에 도입된 유전자 cassette의 full sequencing

C85-1의 transgene의 full sequencing을 위하여 C95와 같이 primer 쌍을 작성하여(표2-22 long PCR를 수차례 시도하였으나, 기대되는 size의 band를 얻지 못하였다. 이는 C85-1이 heterozygote 상태이기 때문으로 사료되지만, 혹시 DNA quality에 기인할 수도 있기 때문에 농우바이오에서 보유하고 있는 C85-1 식물체에서 아래와 같이 다시 DNA를 추출하여 실험을 수행하였으나, 역시 long PCR 산물을 얻지 못하였다. 그러므로 C85-1의 경우에는 예측되는 구조에 바탕 하여 sequencing primer를 사용하여 5개의 DNA 산물을 획득하여 transgene의 full sequence를 획득하였다.

표 2-22. *Bt* 양배추 C85-1 line의 도입유전자 cassette의 full sequencing위한 long PCR 프라이머

이름	염기서열	증폭크기
BtC85-F	TAATACATGCATTACATATTTTG	5.5 kb
BtC85-R	CCTAACTACGTTATTTTGGTAGGT	
BtC85-F1	AAACGAAGACTTATGAAAACATTA	5.5 kb
BtC85-R1	TCGTTTTAATTTCTGATTTCTACA	

C85-1 *Bt* 양배추의 genomic DNA는 CTAB 방법을 이용하여 추출하였다. 액체질고를 넣은 막자사발에 잎을 넣고 곱게 간 후 0.2% 2-mercaptoethanol을 넣은 CATB 용액을 10~15 ml 넣고 65°C 항온수조에서 80~85 rpm에서 60분간 방치하였다. 2/3 (V/V)의 chloroform: isoamylalcohol (24:1)을 넣고 15분간 교반을 하였다. 4°C, 5000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 상층액을 조심스럽게 새 튜브에 옮겼다. Isopropanol을 상층액의 2/3 만큼 넣고 조심스럽게 섞어준 후 상온에 30분가 두었다. Loop을 이용하여 DNA 가닥을 조심스럽게 감고 wash buffer 10 ml을 넣고 overnight로 방치하였다. DNA을 건어 올려 wash buffer을 없앤 후 ammonium acetate solution 500 μ l을 넣고 DNA을 녹였다. RNase A 10 mg/ml을 1~2 μ l 정도 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다.

추출한 genomic DNA를 사용한 PCR 반응은 반응당 *Ex Tag*과 20 ng의 DNA를 넣어 사용하여 94°C에서 2분간 반응시킨 후, 94°C 30 sec, 51°C 30 sec, 72°C 60 sec의 30 cycle를 반응시킨 후, 72°C에서 5분간 extension 반응을 시켰다. PCR product는 gel elution을 하여 sequencing을 의뢰하였다.

PCR에 사용한 primer 및 sequencing primer 의 내역은 표 2-23와 같으며, 산물의 agarose gel 전기영동 분석 결과는 그림 2-72와 같다.

표 2-23. *Bt* 양배추 C85-1 sequencing을 위한 primer list

Primer	Length	Size (bp)	Sequence (5' → 3')
BtC85-F	24	1335	TAATACATGCATTACATATTTTG
Btseq2-R	20		GCTGAAATCACCAGTCTCTC
Btseq3-F	20	988	GTCGGTCTTGACAAAAAGAA
Btseq4-R	18		CTAGAGCAGCTTGCCAAC
Btseq5-F	20	1072	CCACCATGTTATCACATCAA
Btseq6-R	20		TATCTTCTCCAACACCGTTC
Btseq7-F	20	1195	ATGATCACTCCTGCAGTACC
Btseq8-R	20		ACTACACCGACTACGCTGTT
Btseq9-F	20	2042	TTCTCTCCTGAACTGGTTGT
BtC85-R	24		CCTAACTACGTTATTTTGGTAGGT
Btseq1-F	20		ACCCTAATTCCTTATCTGG
Btseq10-R	20		GAAAATCTTCGTCAACATGG
Btseq11-F	20		TCAAGCAGTTGTATGGAATG

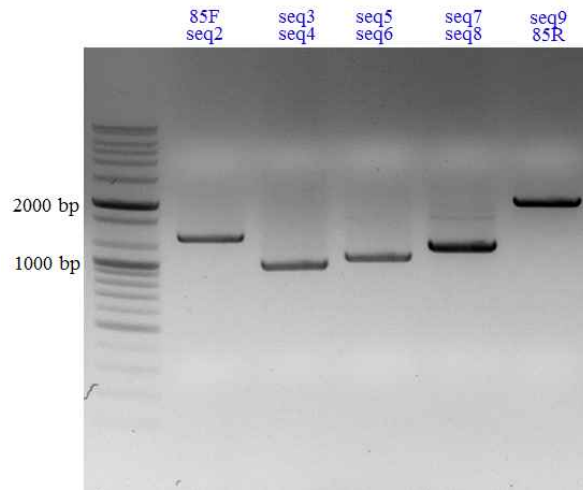


그림 2-72. *Bt* 양배추 C85-1 PCR 결과

C85-1의 transgene의 sequencing 결과들은 editing을 수행한 후 하나의 contig로 assemble 하였다. C95의 transgene의 contig sequence는 2차년도에 관찰한 바와 같이 삽입시에 left border에서 44 bp, right border에서 45 bp가 결실되어 삽입된 결과를 보여주었다. 2차 년도에 획득한 개발자의 정보를 통하여 transgene cassette의 염기서열과의 비교 결과, C95 event에서 관찰된 위치와 동일한 위치에서 염기서열의 차이점이 관찰되었다. 이러한 결과는 형질전환시에 자연적인 돌연변이가 일어나지 않았음을 시사하며, 형질전환시에 사용한 binary vector의 정보를 다시 한 번 점검할 필요를 제시한다.

나. 양배추 특이적인 내부양성 대조 유전자 발굴 및 이를 이용한 정성분석 kit 개발

(1) 내재유전자 발굴의 배경 및 목적

십자화과의 배추속의 식물들은 염색체의 수가 다르나 중간 합성이 일어날 수 있음이 일찍이 밝혀져 왔으며, 정리된 결과는 U's triangle로 잘 알려져 있다(그림 2-73). 본 triangle에서 양배추 (*Brassica oleracea*)와 *B. rapa*의 합성종은 유채 또는 카놀라 (Canola)로 불리는데, 현재 전 세계에서 가장 널리 재배되는 유채는 제초제 저항성 GM 유채이다. GM 유채의 개발은 검출 kit의 활발한 개발을 수반하였는데, 배추속 식물들은 유전체를 공유하기 때문에 GM 유채의 검출에 사용되는 내부양성대조유전자(내재유전자)는 양배추와 배추에서 모두 PCR 증폭이 되는 경우가 대부분이다. 본 과제에서는 기존에 보고된 유채 내재유전자를 분석하여 양배추에 특이적인 PCR 산물을 생산하는 유전자 염기서열을 확보하고자, 유채 유전자 염기서열에서 *B. rapa* 염색체에 특이적일 것으로 예측되는 유전자를 배제하는 전략을 사용하였다. 발굴된 양배추 특이 내재유전자 염기서열은 C85-1과 C96 event의 event-specific 정성분석 kit의 제작에 사용하였다.

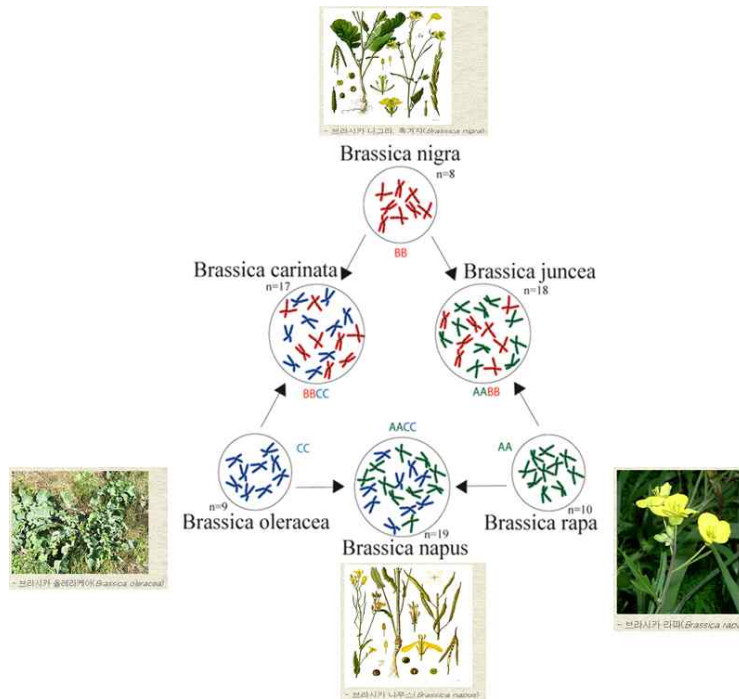


그림 2-73. 우장춘의 삼각형 (U's triangle) (<http://putso.com.ne.kr/brassica/rape.html>, 조무환 요약 편집). 원 안은 염색체로 녹색은 배추 (A genome), 파란색은 양배추 (C genome), 빨간색은 흑겨자 (B genome)의 염색체를 나타냄. n은 염색체의 수

(2) 양배추 내재유전자의 발굴

국립농업과학원으로부터 분양받은 꽃양배추(*Brassica oleracea*), 흑갓(*B. nigra*) 및 배추(*B. rapa*)의 종자를 배양토에 파종하여 격리온실에서 배양한 후 MP Biomedicals사의 FastDNA KIT을 사용하여 gDNA를 추출한 후 양배추 특이적인 내재유전자 발굴 실험에 사용하였다.

양배추 특이적인 유전자 발굴을 위한 후보유전자를 Akiyama et al. (Anal. Chem. 2010, 82, 9909-9916)와 Wu et al (J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 2812-2817)를 참고하였을 때, acetyl-CoA carboxylase gene (*BnACCG8*), high-mobility-group protein I/Y gene (*HMG-I/Y*), 및 cruciferin gene (*BnCI*)이 양배추에 특이성이 있는 염기서열이 있음을 제시하였으며, 추가적으로 *BnCI*의 경우에는 인위적으로 base mismatch를 도입하는 allele-specific PCR primer를 제작하여 바이오니아사에서 주문 및 제작하였다 (표 2-24).

50ng의 DNA를 주형으로 사용하여 94°C에서 2분30초, [94°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 30초]×35회, 72°C에서 5분 조건으로 primer 4쌍을 분석한 결과 BnCI-sp-F와 BnCI-sp-R를 이용한 조건에서만 양배추(*B. oleracea*) 특이적으로 증폭이 되었다. 나머지 3쌍에서는 양배추 WT, 양배추(*B. oleracea*), 흑갓(*B. nigra*) 및 배추(*B. rapa*)에서 모두 증폭되었다(그림 2-74).

BnCI-sp-F와 BnCI-sp-R를 이용하여 *Bt* 양배추 85-1과 95 line의 정성 검출 kit을 제작하였다(그림 7, 8). 우선 *Bt* 양배추 C85-1 line을 위하여 BnCI-sp-F와 BnCI-sp-R를 각각 25 μM씩 사용하였고, 2차년도에 발굴한 *Bt* 양배추 85-1 RB flanking region을 증폭할 수 있는 프라이머 BT-RB-U2(CCAACTTAATCGCCTTGCAG)와 BtC85-1-RB-cfm R (GCTGCCGTTTATATGCTTGC)를 각각 5 μM씩 사용하여 94°C에서 2분30초, [94°C에서 30초, 58.5°C에서 30초, 72°C에서 40초]×35회, 72°C에서 5분 조건으로 반응하였다.

Bt 양배추 C95 line을 위하여 BnC1-sp-F와 BnC1-sp-R를 각각 20 μ M씩 사용하였고, *Bt* 양배추 95 RB flanking region을 증폭할 수 있는 프라이머 BT-RB-U3 (CAGCTGGCG TAAT AGCGAAGA)와 BtC95-RB-cfm R(CCATGGGCATCGTTTTATT)를 각각 5 μ M씩 사용하여 94°C에서 2분30초, [94°C에서 30초, 58.5°C에서 30초, 72°C에서 40초]×35회, 72°C에서 5분 조건으로 반응하였다.

표 2-24. 양배추 특이적인 내재유전자를 위한 Primer 염기서열

후보 유전자	이름	염기서열	증폭크기
<i>BnACCg8</i>	BnACCg8-F	GAGAATGAGGAGGACCAAGCTC	421bp
	BnACCg8-R	ACATCCTCCTGACTGGCACC	
<i>HMG-I/Y</i>	HMG-I/Y-F	TCCTTCCGTTTCCTCGCC	206bp
	HMG-I/Y-R	TTCCACGCCCTCTCCGCT	
<i>BnC1</i>	BnC1-F	GCTCTGGTGTCTCCTTTGTA	162bp
	BnC1-R	CTGAACCTTAAAGATCACGAA	
<i>BnC1</i>	BnC1-sp-F	GCTCTGGTGTCTCCTTTGgA	162bp
	BnC1-sp-R	CTGAACCTTAAAGATCACGgA	

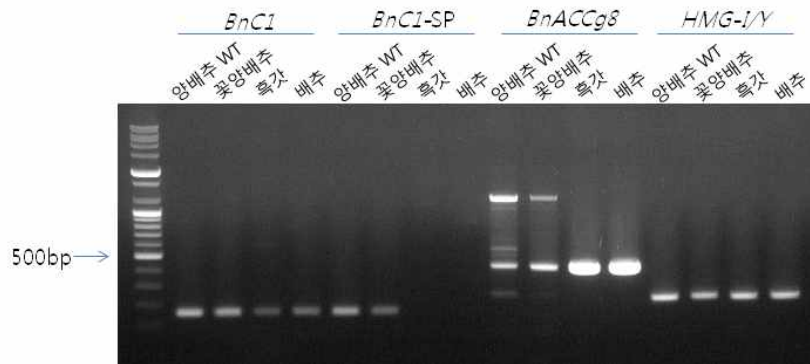


그림 2-74. 양배추 특이적인 내재유전자 후보들의 PCR 분석 결과

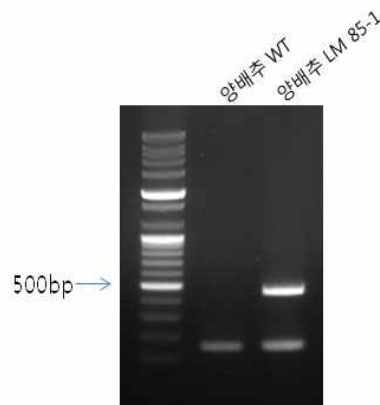


그림 2-75. *Bt* 양배추 85-1 line 정성 검출 kit 제작

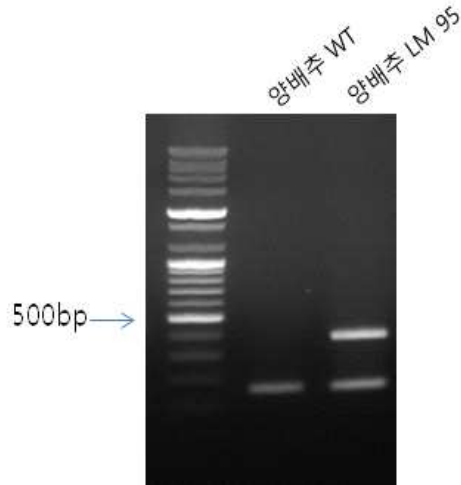


그림 2-76. *Bt* 양배추 95 line 정성 검출 kit 제작

다. 형질전환시 비의도적 유전자 생성 또는 소멸 가능성 분석

(1) 형질전환시 비의도적 유전자 변이 분석

3차년도에 C85-1과 C95 event의 *CryIAc1* 유전자의 염기서열은 개발자가 알려준 염기서열에 비교하여 2개의 SNP가 관찰되었는데, 이 변이가 형질전환시에 일어난 것인지 원래 vector에 있었던 것인지 확인하기 위하여 형질전환에 사용된 vector의 염기서열을 sequencing을 통해 확인하였다. 염기서열 결정 결과는 이들 변이가 형질전환 vector에 원래 있었던 것이며, 형질전환 과정에서 일어난 돌연변이가 아님을 제시하였다.

(2) 형질전환시 비의도적 유전자 삽입 가능성 분석

(가) 실험 내용

2013년 8월에 농우 바이오에서 모종으로 받은 T₂ *Bt* 양배추 C85, C95개체와 WT를 온실에 파종하고, 어린잎을 골라 CTAB method를 이용하여 DNA를 추출하여 형광 정량 법으로 정량하였다. 도입 유전자 전체 vector를 네 부분으로 나누어 probe 위치를 정하고 (그림 2-77), 각각의 primer를 제작하여(표 2-25), 농우바이오에서 수령한 plasmid를 template로 PCR 증폭하여 예상 size의 PCR product를 확인한 후(그림2-78), T-vector에 cloning하였다. Restriction enzyme은 *EcoRI*과 *HindIII*을 선정하여 각 line별 gDNA 5 µg에 30 unit 처리하여 overnight digestion하였다. Digestion한 양배추 DNA와 plasmid DNA를 전기영동하고, 분리된 DNA를 membrane으로 transfer하였다. 95°C에서 denature시킨 probe를 DNA와 hybridization 시킨 후에, X-ray film에 exposure시키고 현상하였다.

(나) 실험결과

도입유전자 *CryIAc* probe로 hybridization 했을 때 C85개체에서 DNA band가 확인되었고, 도입유전자 내부에서 제작한 NW2300T1F • R probe로 hybridization했을 때는 C85개체에서는 예측되는 2 band에 이외에 1 band가 관찰되었다 (그림2-79). NW2300T2F • R probe의 경우에서 추가적인 약한 band가 관찰되었으므로, 본 추가적인 band가 도입유전자 cassette의 일부가 현재 동정된 도입유전자 위치 이외에 삽입되었는지는 추가적인 복잡한 연구를 통하여 재확인 실

힘이 요구된다. C95의 경우에는 DNA quality의 문제로 약한 band가 blot의 위쪽에 관찰되고 있으므로, 개발자가 추후 위해성 심사 자료를 제출하려면 추가적인 blot 제작을 통한 재실험이 필요하다.

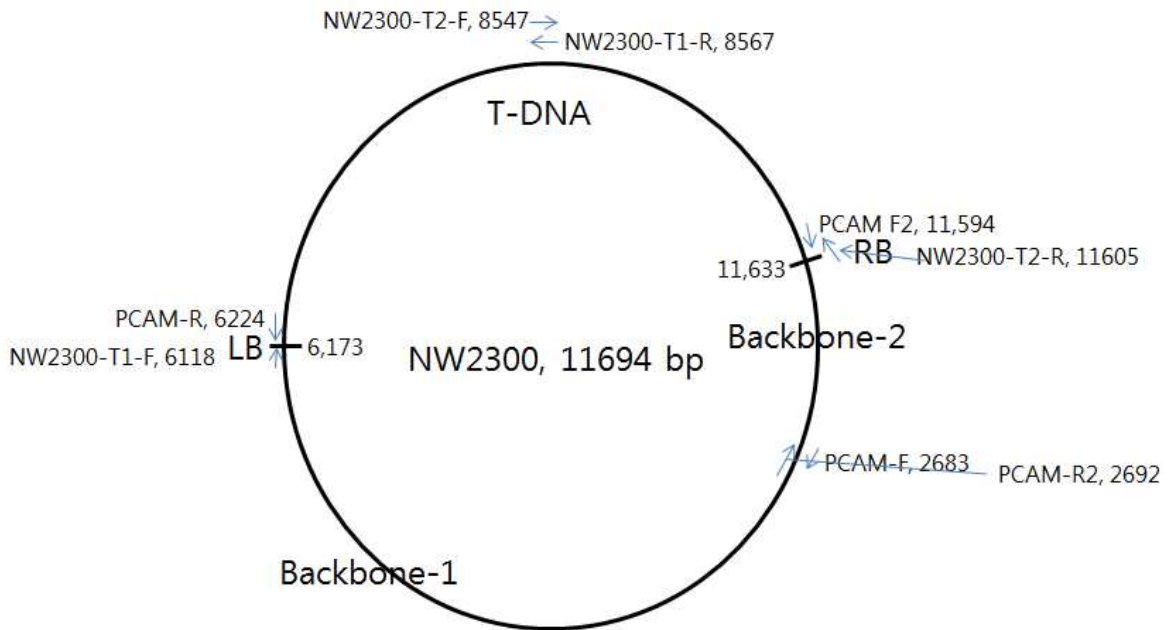


그림 2-77. *Bt* 양배추의 형질전환을 위해 사용된 T-DNA 전체를 망라하는 probe 제작을 위한 PCR primer의 위치

표 2-25. Probe primer set와 product size

명 칭	염기 서열	product size(bp)
PCAM F	GGATTACGACCTGGTACTGA	3542
PCAM R	GTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAA	
PCAM F2	GGATATATTGGCGGGTAAAC	2793
PCAM R2	GTCGTAATCCCACACACTG	
NW2300-T1-F	TATCGAGTGGTGATTTTGTG	2450
NW2300-T1-R	CCGGTCTTGCGATGATTA	
NW2300-T2-F	TGATAATCATCGCAAGACC	3059
NW2300-T2-R	GCCAATATATCCTGTCAAACA	

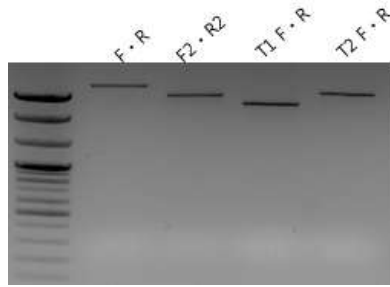
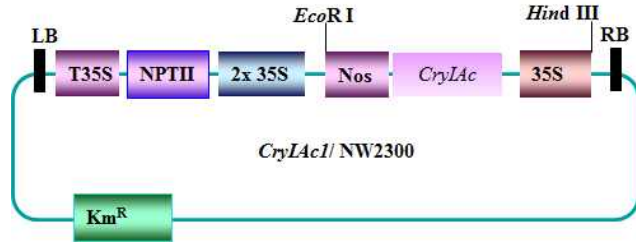


그림 2-78. Vector에서 map 및 *Bt* 양배추(NW2300)의 PCR 확인

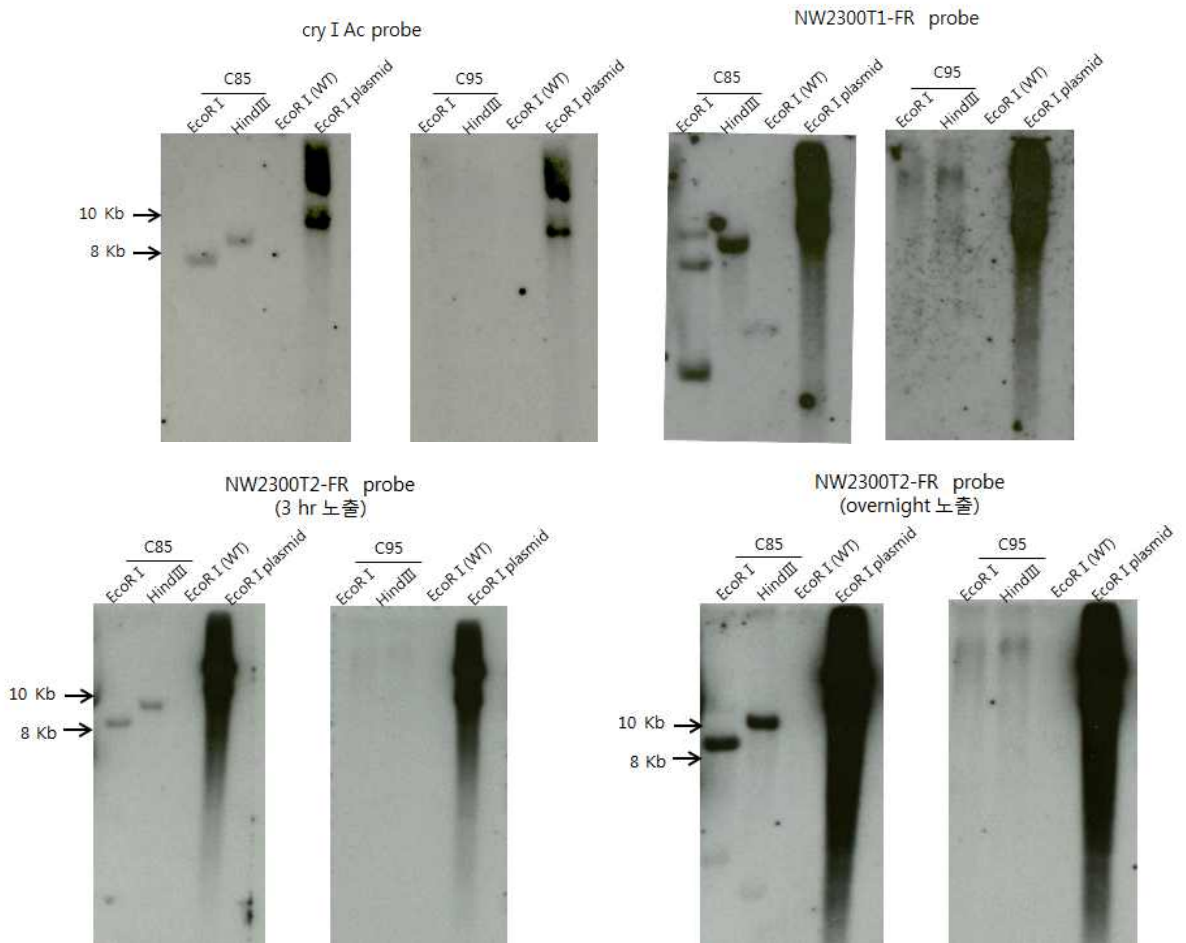


그림 2-79. 형질전환시 비의도적 유전자 삽입 가능성 분석을 위한 *Bt* 양배추의 whole vector Southern blot 분석 결과. 도입유전자인 *CryIacI*, NW2300T1-FR, 및 NW2300T2-FR probes를 사용하여 hybridization한 결과

라. 세대별 안정성 및 비의도적 발현 시험

우량 event로 선발된 C85-1와 C95 중에서 C95의 좁나방 내성이 우수하였으므로, C95의 세대별 안정성과 도입유전자 주위 유전자의 비도의적 발현 양상을 조사하였다.

(1) T0에서 T1으로의 도입유전자의 안정적 유전 확인

5차년도에 2차에 걸쳐 5개체 및 20개체의 T1 식물을 수령하여 온실에서 재배한 후 genomic DNA를 분리하였다. T0에서 T1으로 도입유전자가 안정적으로 유전되는지 확인하기 위하여 C95 event-specific 정성 PCR kit(표 2-26)를 사용하여 T0와 같은 동일한 pattern이 나오는지 확인하였을 때, 모두 같은 pattern이 나왔으므로 C95의 도입유전자는 T0에서 T1으로 안정적으로 유전됨을 알 수 있었다 (그림 2-80,81). 그런 다음, 본 양배추의 엽조직은 아래 도입유전자 위치에 인접한 유전자의 비의도적 발현 여부를 조사하기 위하여 사용되었다.

표 2-26. C95 양배추 정성 PCR을 primer list

Specificity	Oligo	Length	Size	Sequence (5' → 3')
양배추 내부양성	BnC1-sp-F	20	162	GCTCTGGTGTCTCCTTTGGA
대조 유전자 <i>BnCl</i>	BnC1-sp-R	21		CTGAACCTTAAAGATCACGGA
C95 specific	BT-RB-U3	21		CAGCTGGCGTAATAGCGAAGA
	BtC95-RB-cfm-R	20		CCATGGGCATCGTTTTATTT

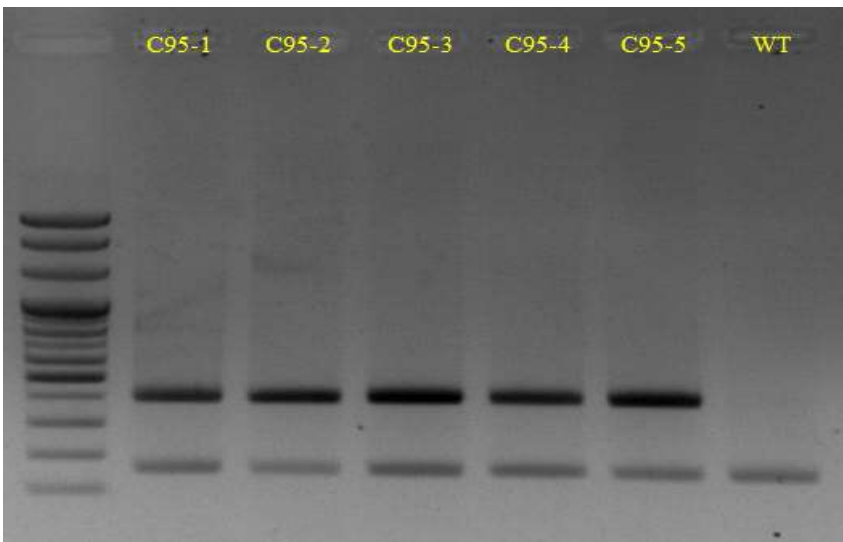


그림 2-80. C95 line T1 세대 개체의 event-specific detection PCR 결과 (1차)

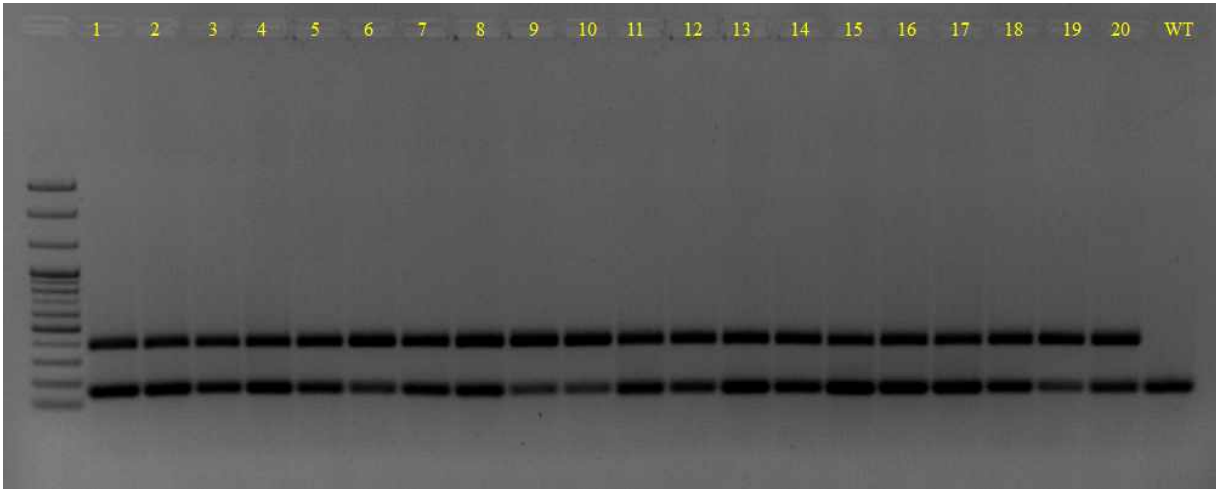


그림 2-81. C95 line T1 세대 개체의 event-specific detection PCR 결과 (2차)

(2) 도입유전자 인접 숙주 유전자의 비의도적 발현 시험

C95 event에 도입유전자는 Bra039402와 Bra039403의 promoter 사이의 intergenic region에 삽입이 되었음을 도입유전자 인접 염기서열의 해명을 통하여 알 수 있었다. 이들 두 유전자 중 Bra039402는 intron도 있는 전형적인 유전자로 보이나 Bra039403은 intron도 없으며 EST database에 100% 가깝게 발현되는 tag sequences도 없었다. 또한 이들 유전자의 발현을 검출하기 위한 reverse transcriptase (RT) PCR 예비실험 결과는 숙주와 GMO 둘다에서 Bra039403의 발현이 전혀 검출되지 않았으므로, Bra039402의 비의도적 발현 변화 가능성만 조사하였다.

(가) Northern Blot 분석

C95 event에 삽입된 유전자로 인하여 인접한 Bra039402의 발현이 영향을 받는지를 조사하기 위하여 Northern blot을 수행하였다.

인접유전자의 발현을 감지하기 위해서 Bra039402L primer와 대조유전자인 actin 유전자를 감지하기 위한 Bo_Act1 primer를 제작하였다 (표2-27). 형질전환체 C95와 wild type 양배추의 어린잎에서 RNeasy plant mini kit(Qiagen)를 이용하여 total RNA를 추출한 후 DNase를 처리하여 genomic DNA를 제거한 후 500ng의 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA를 주형으로 Bra039402L과 Bo_Act1을 primer로 PCR하여 T-vector에 cloning하였다. 각 plasmid의 염기서열을 확인한 후, Biotin-14-dCTP를 첨가하여 PCR을 수행하여 probe로 사용하였다. 형질전환체 C95와 대조군인 wild type에서 RNA purification kit (Norgen Biotek, Canada)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 2ug의 RNA를 95°C에서 5분간 denature한 후 얼음에서 식힌다음, 1% agarose gel에서 50V로 한 시간 동안 전기영동한 후, capillary현상을 이용하여 membrane으로 transfer하였다. 95°C에서 5분간 denature시킨 probe를 membrane에 transfer된 RNA에 hybridization시키고, probe에 conjugate와 substrate를 붙여 X-ray film에 exposure시키고 현상하였다.

표 2-27. 양배추 Northern blot을 위한 primer

Name	Forward	Reverse	size
Bra039402L	CTGCACACTCTCTTGTTTCA	TTCTCTTTGAGGAGGAGGAT	558 (gDNA), 359 (cDNA)
Bo_Act1	CCGAGAGAGGTTACATGTTCA CCAC	GCTGTGATCTCTTTGCTCATAC GGTC	376bp

양배추의 Northern 실험에서, control 유전자인 양배추 actin에서 제작한 probe인 Bo_Act1은 형질전환체인 C95와 대조군 wild type에서 모두 발현되는 것을 확인하였다 (그림 2-82). 하지만, Bra039402L를 이용한 northern에서는 band를 얻지 못하였다. qRT-PCR에서 Bra039402L의 Ct값이 크게 나오는 것으로 보아, 극미량으로 발현되는 유전자이거나 발현되지 않는 유전자일 가능성이 있다.

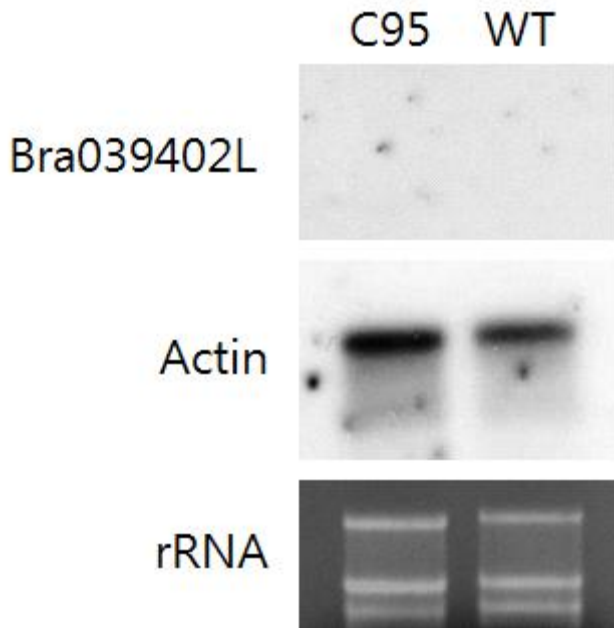


그림 2-82. actin을 probe로 사용한 northern blot

(나) 정성 및 정량 PCR을 통한 발현 조사

- 격리온실에서 재배중인 C95 line 및 WT의 잎에서 RNA를 추출한 후 500ng을 이용하여 cDNA 합성한 후 위하여 도입유전자 cassette 근처의 Bra039402 유전자의 비의도적 발현을 확인하기 위한 primer와 양배추 specific actin primer를 이용하여 (표 2-28) Real Time PCR을 사용하여 C95 line 및 WT에서 발현량을 분석하였다.

- Bra039402의 real time PCR 조건

500ng의 RNA를 Template로 사용하여 cDNA를 합성한 후 cDNA 2 μ l, Power SYBR Green PCR master mix 10 μ l, forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l 및 DW 6 μ l로 96well plate의 well당 총 20 μ l로 만든 후 ABI 7900 Real-Time PCR 기기를 이용하여 분석하였다. Bra039402 유전자의 반응조건은 95 $^{\circ}$ C 2분을 거쳐 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 1분의 사이클을 40회 반복하였다. 모든

샘플에 대하여 한 plate 내에서 내재유전자인 actin과 Bra039402를 분석하여 얻은 두 유전자의 ct값을 가지고 발현량을 분석하였다. 한편, 동일한 조건에서 SYBR Green을 제외하고 PCR한 산물을 agarose gel에서 분리하여 발현을 시각적으로 분석하였다.

표 2-28. 양배추 유전자 Bra039402의 정성 및 정량 PCR을 위한 primer

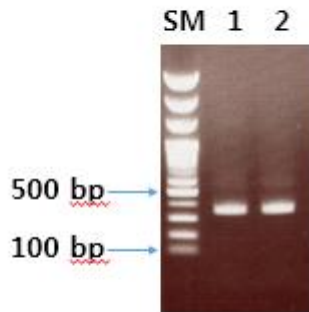
Oligo	Size	Sequence (5' → 3')
Bra039402L-f	359	CTGCACACTCTCTTGTTTCA
Bra039402L-r		TTCTCTTTGAGGAGGAGGAT
Bo_Act1-f	376	CCGAGAGAGGTTACATGTTCACCAC
Bo_Act1-r		GCTGTGATCTCTTTGCTCATAACGGTC

2차에 걸친 real-time PCR 분석 결과는 actin이 강하게 검출되는 조건에서 Bra039402는 35 cycle 이상에서 Ct 값이 나올 정도로 미량이 발현되고 있었으며, C95와 숙주 사이에는 유의한 차이가 없었으며(그림 2-83, 85), 이는 RT-PCR 산물을 agarose gel에서 분리하였을때도 마찬가지였다(그림 2-84). 이러한 결과는 C95에는 도입유전자의 삽입에 따라 인접한 유전자의 발현이 영향을 받지 않았음을 알 수 있었다.

1차	402	WT	BT95	2차	402	WT	BT95
			35.587			37.134	35.045
		36.211					
			35.587			37.759	35.858
평균ct값		36.211	35.587	평균ct값		37.447	35.452
	actin	WT	BT95		actin	WT	BT95
		22.329	21.866			22.512	22.098
		22.410	21.738			22.562	21.916
		22.479	21.915			22.412	21.886
		22.511	22.136			22.404	21.967
평균ct값		22.467	21.930	평균ct값		22.459	21.923
		13.744	13.657			14.987	13.529
			-0.087				-1.459
상대적 발현량		1.0	1.1	상대적 발현량		1.0	2.7

그림 2-83. Bra039402 유전자의 real-time quantitative PCR 의 Ct 값 및 상대적 발현량 측정 결과

Bra039402 유전자의 RT-PCR



Lane 1. size marker
Lane 2. WT
Lane 3. BT-95 line

그림 2-84, Bra039402 유전자의 reverse transcriptase (RT) PCR 산물의 agarose gel 분리비교

Real Time PCR amplification plot

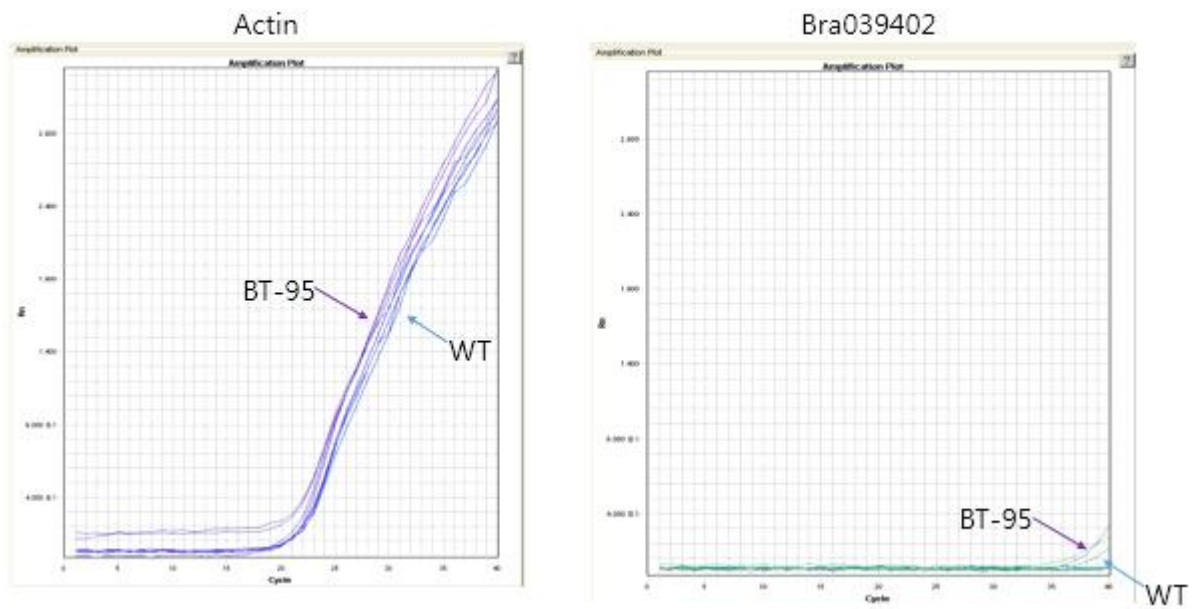


그림 2-85. Bra039402 유전자의 real-time quantitative PCR 의 증폭 곡선

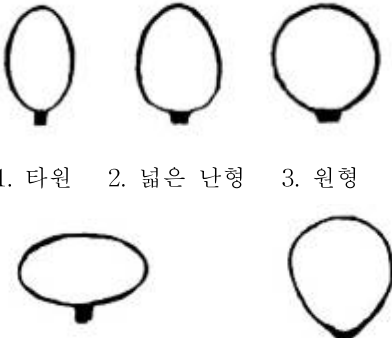
제3절: 좀나방내성 Bt 양배추의 환경위해성평가

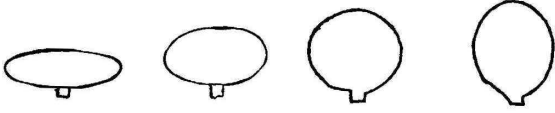
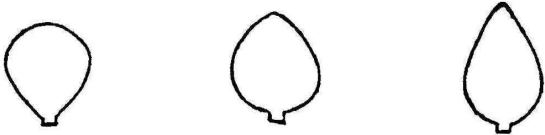
1. 좀나방 내성 Bt 양배추의 표현 형질 분석

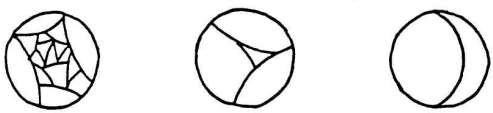
가. 양배추의 표현 형질 조사 방법

양배추의 표현 형질 비교는 수확기 식물체를 대상으로 국립종자원의 『신품종 심사를 위한 작물별 특성조사요령 - 양배추』의 방법을 기준으로 하여 실시하였다. 양배추의 표현 형질은 질적형질 21개 항목(표3-1)과 양적형질 10개 항목(표3-2)으로 나누어 조사하였다.

표 3-1. 양배추의 표현 형질(질적 형질) 조사 방법

질적형질	조사시기	형질 조사 방법
식물체: 바깥잎의 자세	수확기	식물체 바깥잎 중 중간부위의 잎자세 조사 3. 서다 5. 약간 서다 7. 눕다
바깥잎: 잎몸의 모양	수확기	최대외엽의 잎몸 모양 조사  1. 타원 2. 넓은 난형 3. 원형 4. 누운 넓은 타원형 5. 도란형
바깥잎: 잎몸 윗면의 옆모습	수확기	최대외엽의 잎몸 윗면의 옆모습 조사 1. 오목하다 2. 평평하다 3. 볼록하다
바깥잎: 요철	수확기	최대외엽의 잎표면의 요철 조사 1. 없거나매우약하다 2. 중간 3. 심하다
바깥잎: 요철의 크기		최대외엽의 잎표면 요철의 크기 조사 3. 작다 5. 중간 7. 크다

질적형질	조사시기	형질 조사 방법
바깥잎: 색(납질포함)	수확기	최대외엽의 잎색 조사 1. 연두색 2. 녹색 3. 회녹색 4. 청록색 5. 보라색
바깥잎: 색의 강도	수확기	최대외엽의 잎색의 강도 조사 3. 연하다 5. 중간 7. 진하다
바깥잎: 납질	수확기	최대외엽의 납질의 정도 조사 1. 없거나매우약하다 3. 약하다 5. 중간 7. 강하다 9. 매우 강하다
바깥잎: 가장자리 물결모양	수확기	최대외엽의 잎 가장자리 물결모양의 정도 조사 1. 없거나매우약하다 3. 약하다 5. 중간 7. 심하다 9. 매우 심하다
바깥잎: 가장자리말림	수확기	최대외엽의 잎 가장자리의 말림유무 조사 1. 없다 9. 있다
구: 세로로 자른면의 모양	수확기	구를 세로로 자른 단면의 모양 조사  1. 누운 좁은 타원형 2. 누운 타원형 3. 원형 4. 넓은 타원형
구: 세로로 자른면의 모양	수확기	 5. 넓은 도란형 6. 넓은 난형 7. 모난 난형
구: 세로로 자른면의 밑부분의 모양	수확기	구를 세로로 자른 단면의 아랫부분의 모양 조사  1. 볼록하다 2. 평평하다 3. 오목하다

질적형질	조사시기	형질 조사 방법
구: 가장 큰 너비의 위치	수확기	구의 가장 큰 너비의 위치 조사 1. 윗쪽 2. 중간 3. 아래쪽
구: 짜임	수확기	구의 짜임 정도 조사  1. 짜여있지 않다 2. 약간 짜여있다 3. 짜여있다
구: 결구엽 가장자리말림	수확기	결구 엽 가장자리의 말림 유무 조사 1. 없다 9. 있다
구: 결구엽의 색	수확기	결구 엽의 색 조사 1. 연두색 2. 녹색 3. 회녹색 4. 청록색 5. 보라색
구: 결구엽 색의 강도	수확기	결구엽 색의 강도 조사 3. 연하다 5. 중간 7. 진하다
구: 결구엽의 안토시아닌 착색	수확기	결구엽의 안토시아닌색소 정도 조사 1. 없거나매우약하다 3. 약하다 5. 중간 7. 진하다 9. 매우 진하다
구: 속 색	수확기	구를 세로로 자랐을 때 속의 색 조사 1. 흰색계통 2. 황색계통 3. 녹색계통 4. 보라색

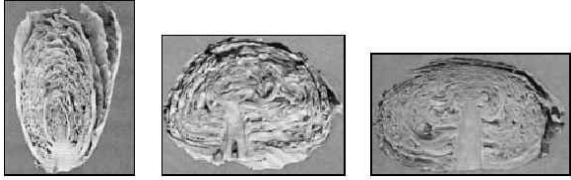
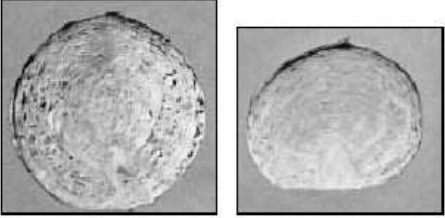
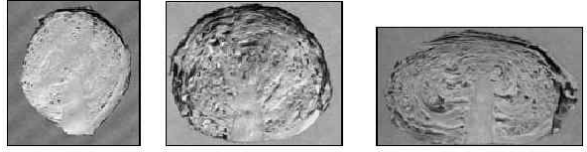
질적형질	조사시기	형질 조사 방법
<p>구:</p> <p>밀도</p>	<p>수확기</p>	<p>구를 세로로 자른면에서 엽의 밀착정도 조사</p>  <p>1. 매우 성기다 3. 성기다 5. 중간</p>  <p>7. 뻑뻑하다 9. 매우 뻑뻑하다</p>
<p>구:</p> <p>속 구조</p>	<p>수확기</p>	<p>구를 세로로 잘랐을 때 속 구조 상태를 조사</p>  <p>3. 곱다 5. 중간 7. 거칠다</p>

표 3-2. 양배추의 표현 형질(양적 형질) 조사 방법

양적형질	조사 시기	표현 형질 조사 방법
식물체: 키(cm)	수확기	결구부위를 포함하여 지체부에서 결구 정상까지의 높이 조사 1. 매우 작다 3. 작다 5. 중간 7. 크다 9. 매우 크다
식물체: 최대너비(cm)	수확기	구에서 결구된 부위의 바깥을 포함하는 최대너비를 조사 3. 좁다 5. 중간 7. 넓다
식물체: 아래쪽 줄기의 길이(cm)	수확기	지체부부터 구까지의 줄기길이 조사 3. 짧다 5. 중간 7. 길다
바깥잎: 크기(cm)	수확기	식물체의 최대 바깥잎 크기 조사 3. 작다 5. 중간 7. 크다
바깥잎: 잎자루의 길이(cm)	수확기	최대외엽의 잎자루의 길이 조사 3. 짧다 5. 중간 7. 길다
구: 키(cm)	수확기	구에서 결구된 부위의 세로길이 조사 3. 작다 5. 중간 7. 크다
구: 너비(cm)	수확기	구에서 결구된 부위의 최대너비 조사 3. 좁다 5. 중간 7. 넓다
구: 고갱이/키의 비율(cm)	수확기	구를 세로로 자랐을 때 고갱이의 길이정도를 구의 길이와 비교 3. 짧다 5. 중간 7. 길다
구: 무게(g)	수확기	구의 무게 조사 1. 매우 가볍다 3. 작다 5. 중간 7. 많다 9. 매우 무겁다
건물중(g)	수확기	65℃/5일간 건조기에서 건조 후 측정

나. 2011년도 실험

좁나방 내성 *Bt* 양배추 (*Cry1Ac1* 유전자 도입 양배추) 2계통(C24, C30)과 모본인 AD126, 참조품종으로 동북, 은누리 양배추를 농우바이오로부터 분양받아 사용하였다(과종: 2011년 4월 8일). 전체 실험구의 면적은 28 m × 30 m 였으며, 이를 1 m 간격의 3개의 블록(각 블록 면적: 5 m x 9.3 m)으로 나누어 총 15개의 실험구를 설치하였다. 각각의 실험구에는 총 6개의 이랑을 만들었으며, 비닐을 이용하여 멀칭재배를 하였다. 한 개의 실험구에 한 계통의 양배추 60개체(10개체 × 6이랑)를 정식하였다. 각 양배추는 2011년 5월 17일에 정식하였고, 각 실험구는 3반복 난괴법으로 배치하였다(그림3-1).

충북 청원군 농업기술센터로부터 토양관리처방서를 받아 양배추 재배를 위한 토양 적정 시비

량(10a)인 N : P : K = 25 : 19 : 24 kg을 기준으로 5월 2일에 밑거름을 시비하였다. 실험기간 동안 살충제 및 살균제를 처리하지 않았다.

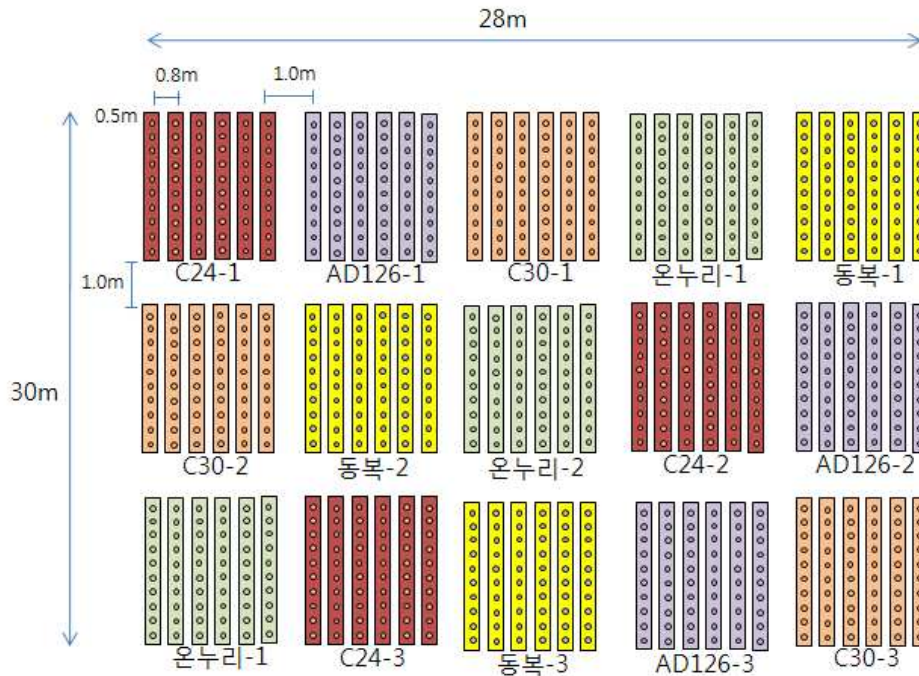


그림 3-1. *Bt* 양배추, 모본 및 참조품종의 포장실험 디자인(2011년)

2011년 7월 19~21일에 각 실험구 당 양배추 10개체 (식물 계통 당 총 30 개체)를 무작위로 선택하여 수확하였다. 수확한 *Bt* 양배추, 모본 및 참조품종의 표현 형질 비교는 가. 양배추의 표현형질 조사 방법을 따라 실시하였다.

질적 형질 비교 결과, *Bt* 양배추와 모본 간에는 차이가 없었고, *Bt* 양배추와 참조품종인 온누리, 동북의 형질 간에는 식물체의 바깥잎의 자세, 바깥잎 잎몸의 모양, 잎몸의 옆모습, 요철(크기 포함), 바깥잎 가장자리 말림의 유무, 구의 싸임 형태, 밀도, 구조 등에 차이가 있었다 (표 3-3).

양적 형질 비교 결과, *Bt* 양배추와 모본 간에는 모든 항목에서 유의한 차이를 보이지 않은 반면, 참조품종으로 쓰인 온누리, 동북의 형질과는 최대 너비, 바깥잎의 크기, 바깥잎의 잎자루의 길이, 구의 고개기와 키의 비율, 식물체의 건물중에서 유의한 차이를 보였다(표3-4).

표3-3. Bt 양배추(C24, C30)와 모본(AD126), 참조 품종 양배추의 질적 표현 형질비교(2011년)

질적 형질	계통				
	C24	C30	AD126	온누리	동북
식물체: 바깥 잎의 자세	서다	서다	약간 서다	눅다	눅다
바깥잎: 잎몸의 모양	도란형	도란형	도란형	원형	원형
바깥잎: 잎몸 윗면의 옆모습	볼록하다	볼록하다	볼록하다	오목하다	오목하다
바깥잎: 요철	중간	중간	중간	없거나 매우 약하다	없거나 매우 약하다
바깥잎: 요철의 크기	중간	중간	중간	작다	작다
바깥잎: 색(납질포함)	녹색	연두색	녹색	녹색	녹색
바깥잎: 색의 강도(intensity)	중간	중간	중간	중간	중간
바깥잎: 납질	중간	중간	중간	중간	중간
바깥잎: 가장자리 물결모양	중간	중간	중간	약하다	없거나 매우 약하다
바깥잎: 가장자리 말림	없다	없다	없다	있다	있다
구: 세로로 자른면의 모양	넓은 타원형	넓은 타원형	넓은 타원형	누운 타원형	누운 타원형
구: 세로로 자른면의 밑부분의 모양	볼록하다	볼록하다	볼록하다	볼록하다	볼록하다
구: 가장 큰 너비의 위치	중간	중간	중간	중간	중간
구: 싸임	싸여있다	싸여있다	싸여있다	약간 싸여있다	약간 싸여있다
구: 결구엽 가장자리 말림	없다	없다	없다	있다	없다
구: 결구엽의 색	연두색	연두색	연두색	녹색	녹색
구: 결구엽의 색의 강도	중간	중간	중간	중간	중간
구: 결구엽의 안토시아닌 착색	없거나 매우 약하다	없거나 매우 약하다	없거나 매우 약하다	없거나 매우 약하다	없거나 매우 약하다
구: 속색	흰색계통	흰색계통	흰색계통	흰색계통	흰색계통
구: 밀도	매우 뻥뻥하다	매우 뻥뻥하다	매우 뻥뻥하다	싱기다	중간
구: 속 구조	곱다	곱다	곱다	거칠다	거칠다

표 3-4. *Bt* 양배추(C24, C30)와 모본(AD126), 참조 품종 양배추의 양적 표현 형질 비교(2011년). 평균(표준오차)(n=30). 양배추 계통에 따른 효과는 분산 분석으로 검정하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 다중검정(Tukey's HSD 검정)을 실시하였다. 같은 행에서 서로 다른 알파벳 표시는 통계적으로 서로 차이가 있음을 의미한다($p < 0.05$).

양적형질	계통					F	p
	C24	C30	AD126	온누리	동북		
식물체 키 (cm)	20.2 (0.34)	20.9 (0.34)	20.9 (0.33)	21.8 (0.33)	22.9 (0.33)	2.22	0.159
식물체 최대너비 (cm)	44.7b (0.73)	46.3b (0.51)	43.3b (0.47)	70.5a (0.82)	75.0a (1.03)	125.97	<0.001
식물체 아래쪽 줄기의 길이 (cm)	3.30 (0.12)	3.70 (0.20)	3.77 (0.15)	4.95 (0.33)	5.03 (0.44)	1.25	0.363
바깥잎 크기 (cm)	22.0b (0.33)	22.7b (0.36)	21.7b (0.26)	35.1a (0.50)	37.8a (0.54)	156.27	<0.001
바깥잎 잎자루의 길이 (cm)	1.75b (0.24)	0.73b (0.20)	0.77b (0.17)	8.00a (0.20)	6.78a (0.26)	85.05	<0.001
구 키 (cm)	18.8 (0.29)	19.0 (0.27)	18.3 (0.28)	18.6 (0.18)	20.2 (0.32)	1.90	0.204
구 너비 (cm)	11.4b (0.22)	12.8b (0.19)	11.0b (0.24)	16.0a (0.33)	13.7ab (0.31)	11.13	0.002
구:고경이/키의 비율 (cm)	0.57b (0.01)	0.55b (0.01)	0.57b (0.01)	0.70a (0.01)	0.66a (0.01)	48.34	<0.001
구 무게 (g)	765.6 (36.7)	926.0 (34.4)	698.8 (35.1)	1068.0 (68.2)	891.7 (40.1)	1.62	0.261
건물중 (g)	54.8ab (2.36)	64.1ab (1.84)	48.5b (2.27)	84.5a (4.59)	76.7ab (3.51)	4.16	0.041

좁나방 내성 *Bt* 양배추의 시기별 성장 변화를 측정하기 위해, 시기에 따라 양배추를 수확하여 조직별로 생중량과 건물량을 측정하였다. 실험을 위한 전체 실험구의 면적은 23 m × 3 m였으며, 3개의 블록 (각 블록 면적: 7.6 m × 3 m)으로 나누어 총 15개의 실험구를 설치하였다. 각각의 실험구에 좁나방 내성 *Bt* 양배추 2계통(C24, C30)과 AD126을 각각 22 개체(11개체 × 2이랑)씩 정식하였고 멀칭 재배하였다(그림 3-2).

총 여섯 차례 (2011년 6월 3일, 6월 10일, 6월 17일, 6월 27일, 7월 1일, 7월 11일) 시료를 채취하였고, 시료 채취시 *Bt* 양배추와 AD126를 각각 뿌리까지 뽑아 세계 흔들어 흙을 털어내고 흐르는 물에 묻어있는 흙과 이물질들을 씻어낸 이후 무게를 측정하였다. 양배추의 잎은 결구가 되지 않은 잎의 경우 하나씩 떼어 낸 뒤에 합하여 측정하였으며, 결구는 칼로 넷으로 나누어 측정하였다. 줄기는 잎을 떼어내고 남은 것 중에서 뿌리를 떼어낸 부분을 줄기로 하여 측정하였다. 건물량은 생중량을 측정한 조직을 종이봉투에 담아 65°C에서 48 시간 동안 건조한 후 측정하였다. C30의 잎, 줄기 및 뿌리 무게가 AD126이나 C24에 비해 높게 나타났다(표3-5, 6, 7).

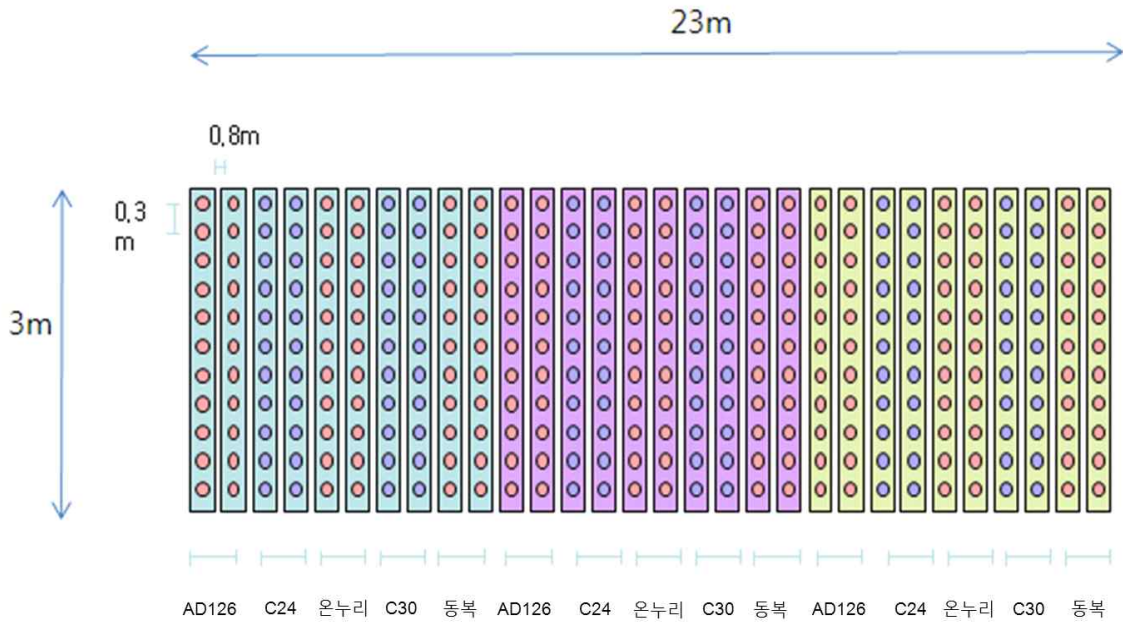


그림 3-2. 시기별 양배추 무게의 변화 조사를 위한 실험 디자인 (2011년)

표 3-5. 시기별 양배추 잎 무게(g)의 변화(2011년) 평균 (표준오차)

Sampling date	AD126		C24		C30	
	FW	DW	FW	DW	FW	DW
03-Jun	14.16 (1.81)	1.34 (0.14)	23.81 (2.14)	1.56 (0.22)	24.78 (1.51)	1.65 (0.10)
10-Jun	51.00 (5.83)	3.74 (0.46)	70.77 (9.55)	5.72 (0.81)	74.29 (5.67)	6.40 (0.45)
17-Jun	169.05 (19.00)	15.57 (1.74)	152.34 (18.72)	14.09 (1.79)	165.14 (1.75)	15.55 (0.37)
27-Jun	213.34 (35.13)	15.64 (2.71)	415.26 (44.47)	30.52 (3.35)	481.92 (52.92)	36.84 (2.68)
01-Jul	308.48 (48.96)	28.07 (3.93)	422.11 (83.52)	36.61 (6.84)	667.76 (59.62)	53.72 (3.74)
11-Jul	557.01 (112.39)	81.30 (6.88)	695.51 (144.07)	75.35 (15.43)	987.28 (158.57)	98.08 (12.81)

표 3-6. 시기별 양배추 줄기 무게(g)의 변화(2011년) 평균 (표준오차)

date	AD126		C24		C30	
	FW	DW	FW	DW	FW	DW
03-Jun	1.02 (0.14)	0.14 (0.01)	1.61 (0.09)	0.19 (0.01)	1.65 (0.12)	0.19 (0.02)
10-Jun	2.95 (0.41)	0.20 (0.03)	4.72 (0.80)	0.37 (0.07)	4.87 (0.59)	0.40 (0.05)
17-Jun	14.70 (2.00)	1.64 (0.18)	12.50 (1.70)	1.34 (0.16)	12.03 (0.36)	1.52 (0.07)
27-Jun	16.58 (3.08)	0.83 (0.22)	31.47 (3.39)	1.79 (0.28)	34.68 (3.21)	2.08 (0.21)
01-Jul	23.62 (3.47)	2.06 (0.30)	28.82 (5.45)	2.29 (0.48)	38.52 (3.42)	3.48 (0.39)
11-Jul	23.72 (3.46)	1.28 (0.24)	29.71 (5.16)	1.84 (0.35)	39.42 (6.02)	2.56 (0.38)

표 3-7. 시기별 양배추 뿌리 무게(g)의 변화(2011년) 평균 (표준오차)

Sampling date	AD126		C24		C30	
	FW	DW	FW	DW	FW	DW
03-Jun	2.58 (0.43)	0.22 (0.03)	2.22 (0.28)	0.28 (0.04)	3.54 (0.39)	0.40 (0.05)
10-Jun	2.85 (0.28)	0.25 (0.03)	3.17 (0.35)	0.37 (0.04)	4.65 (0.31)	0.48 (0.03)
17-Jun	8.08 (1.01)	1.22 (0.20)	6.11 (0.67)	0.85 (0.09)	10.46 (1.04)	1.53 (0.17)
27-Jun	8.82 (1.25)	0.65 (0.14)	14.22 (1.04)	1.02 (0.15)	15.21 (1.38)	1.38 (0.14)
01-Jul	13.81 (1.31)	1.58 (0.24)	16.55 (2.18)	2.36 (0.43)	23.37 (2.24)	4.32 (0.56)
11-Jul	15.93 (2.32)	1.55 (0.34)	19.45 (3.29)	2.44 (0.65)	28.31 (3.42)	4.47 (0.70)

다. 2012년도 실험

(주)농우바이오에서 2012년 7월 13일에 파종한 양배추를 수령하여 9월 7일에 한국생명공학연구원 격리포장에 정식하였다. 5 × 4 m 면적의 시험구 3개씩을 포장에 설치하였으며, 각 시험구의 간격은 1 m로 하였다. 각각의 시험구에 4줄의 이랑을 만들었으며, 양배추간 재식밀도를 100 × 50 cm로 하여 1이랑에 10주씩 4이랑에 정식하였다(그림3-3, 4). 포장시험기간 중 살균·살충제 처리는 하지 않았다.

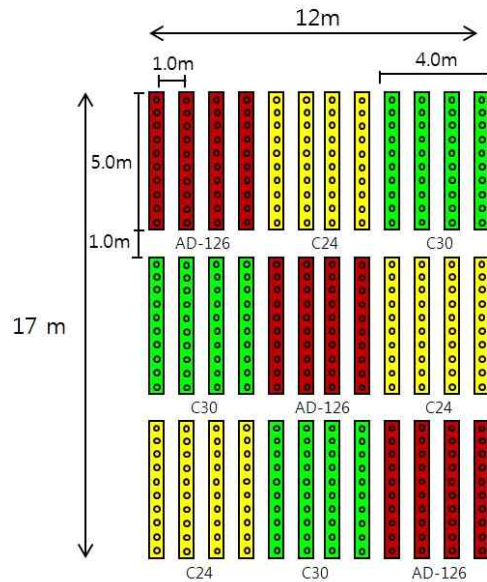


그림 3-3. Bt 양배추의 포장실험 디자인 (2012년)



그림 3-4. 한국생명공학연구원 격리포장에 정식한 양배추 (2012년)

양배추는 정식 후 76일 (2012년 11월 22일)에 수확하였으며 가. 양배추의 표현형질 조사 방법을 따라 형질을 평가하였다. AD126과 C24 및 C30의 농업형질은 분산 분석 결과 유의한 차이가 없었다($p>0.05$) (표3-8).

표 3-8. *CryIAcI* 양배추(C24, C30)와 모본의 농업형질평가(2012년) (평균 \pm 표준오차)

		AD126	C24	C30	<i>P</i>
식물체	키 (cm)	233.33 \pm 2.40	214.00 \pm 8.72	232.67 \pm 2.67	0.077
	최대너비 (cm)	454.00 \pm 1.02	434.00 \pm 13.32	430.00 \pm 24.11	0.597
	고갱이 (cm)	55.00 \pm 2.65	48.67 \pm 1.45	48.67 \pm 1.45	0.095
	바깥잎 크기 (cm)	244.67 \pm 1.33	235.33 \pm 10.04	242.33 \pm 5.24	0.606
	뿌리 무게 (g)	29.91 \pm 1.14	25.14 \pm 1.28	26.58 \pm 3.50	0.368
결구	키 (cm)	147.67 \pm 1.20	140.00 \pm 7.02	159.00 \pm 6.66	0.133
	너비 (cm)	150.33 \pm 2.85	137.67 \pm 5.49	141.67 \pm 1.45	0.118
	고갱이 / 키 (ratio)	0.24 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01	0.21 \pm 0.00	0.166
	무게 (g)	779.17 \pm 72.44	600.24 \pm 95.18	658.83 \pm 54.69	0.308
	건중량 (g)	123.44 \pm 16.51	84.21 \pm 24.86	74.55 \pm 7.81	0.202

라. 2013년도

C30과 AD126의 유묘를 (주)농우바이오로부터 분양받아 2013년 4월 25일에 한국생명공학연구원 격리포장에 정식하였다. 4 \times 35 m 면적의 시험구 5개를 포장에 조성하였으며, 각 시험구의 간격은 3 m로 하였다. 각각의 시험구에 5줄의 이랑을 만들었으며, 양배추간 재식밀도를 120 \times 50 cm로 하여 1이랑에 7주씩 2개의 이랑에 정식하였다(그림3-5). 포장시험기간 중 살균·살충제 처리는 하지 않았다.

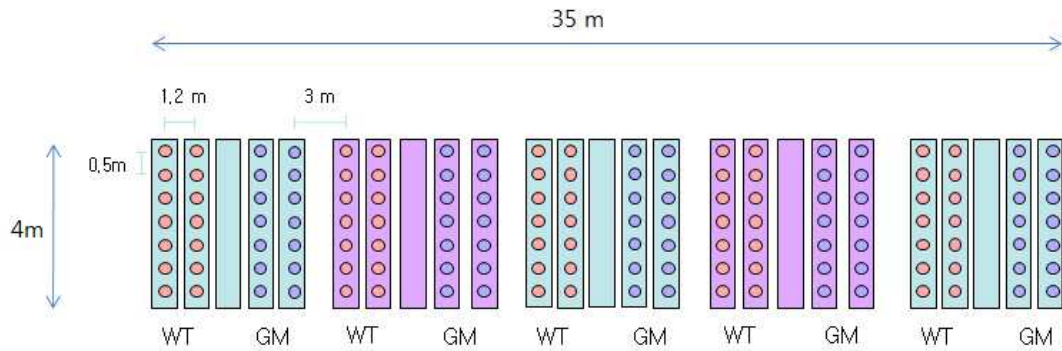


그림 3-5. 양배추 포장실험 디자인(2013년 5월)

총 5회(2013년 4월 25일, 5월 30일, 6월 10일, 6월 14일, 6월 27일)에 걸쳐 각각 아래와 같이 양배추의 성장단계 3, 5, 6, 8, 9 단계에 맞춰서 샘플링 하였으며 **가. 양배추의 표현형질 조사 방법**을 따라 농업형질을 평가하였다.

- Stage 3: 6 - 8 본엽 (이식 가능)
- Stage 5: Precupping, 13-19 엽
- Stage 6: Cupping, 20-26엽
- Stage 8: Head fill, 구 직경 10-20 cm
- Stage 9: Mature, 구 직경 15-30 cm

각 성장시기별로 모본과 C30사이에 농업형질의 유의한 차이는 관찰되지 않았다(표 3-9, 10).

표 3-9. *Cry1Ac1* 양배추(C30)와 모본(AD-126) 식물체의 형질(2013) (평균±표준오차, n=15)

Line	Growth stage	키 (cm)	최대너비 (cm)	바깥잎 크기 (cm)	생중량 (g)	뿌리무게 (g)
AD-126	Stage 3	130.20 ± 2.14	164.27 ± 4.91	92.40 ± 3.09	28.16 ± 2.33	3.15 ± 0.13
	Stage 5	210.90 ± 2.79	302.14 ± 3.34	188.80 ± 3.81	359.19 ± 24.23	15.02 ± 1.07
	Stage 6	213.33 ± 5.58	324.00 ± 12.45	202.00 ± 4.67	605.56 ± 35.83	27.16 ± 1.65
	Stage 8	206.67 ± 3.50	328.67 ± 9.10	211.33 ± 2.26	989.26 ± 26.38	30.78 ± 0.94
	Stage 9	229.33 ± 6.45	472.00 ± 10.25	219.00 ± 8.16	1759.7 ± 100.23	42.15 ± 3.11
C30	Stage 3	130.20 ± 2.14	164.27 ± 4.91	92.40 ± 3.09	28.16 ± 2.33	3.15 ± 0.13
	Stage 5	214.33 ± 2.49	288.27 ± 5.71	199.73 ± 2.15	360.67 ± 10.07	15.79 ± 0.67
	Stage 6	211.33 ± 2.91	326.67 ± 11.30	208.00 ± 8.14	679.79 ± 24.47	26.83 ± 1.34
	Stage 8	208.67 ± 5.33	334.67 ± 8.07	216.67 ± 2.36	944.82 ± 20.58	28.83 ± 1.81
	Stage 9	235.00 ± 8.50	467.33 ± 7.10	222.67 ± 4.52	1746.04 ± 82.25	42.07 ± 0.66

표 3-10. *Cry1Ac1* 양배추(C30)와 모본(AD-126) 결구의 형질(2013) (평균±표준오차, n=15)

Line	Growth stage	키 (cm)	최대너비 (cm)	고갱이/키 비율	생중량 (g)
AD-126	Stage 8	111.67 ± 1.39	116.33 ± 4.16	0.38 ± 0.01	453.97 ± 29.33
	Stage 9	140.33 ± 4.55	136.67 ± 2.79	0.39 ± 0.01	1196.44 ± 79.94
C-30	Stage 8	110.33 ± 3.74	112.00 ± 2.76	0.38 ± 0.02	429.30 ± 19.44
	Stage 9	139.33 ± 4.43	136.00 ± 1.80	0.40 ± 0.01	1201.73 ± 76.01

마. 2014년도 실험

좁나방 내성 *Bt* 양배추(C95)와 모본(AD126)을 농우바이오로부터 분양받아 사용하였다. 환경 방출 실험을 위한 전체 실험구의 면적은 18 m × 10 m 였으며, 이를 1 m 간격의 3개의 블록 (각 블록 면적: 4 m x 4 m)으로 나누어 총 6개의 실험구를 설치하였다(그림3-6). 각각의 실험 구에는 총 6개의 이랑을 만들었으며, 멀칭비닐을 이용하여 멀칭재배를 수행하였다. 한 개의 실험 구에 한 계통의 양배추 40개체(8개체 × 5이랑)를 정식하였다. 포장실험은 동일한 실험 디자인으로 봄과 가을에 각각 수행하였으며, 각 양배추는 2014년 5월 8일과 2014년 9월 29일에 정식하였다. *Bt* 양배추와 모본의 농업형질을 조사하기 위해 양배추 수확시기(2014년 7월 22일, 2014년 11월 27일)에 맞춰 각각의 블록 당 3개의 양배추씩 라인 당 총 9개의 양배추를 샘플링 하여 가. 양배추의 표현형질 조사 방법을 따라 농업형질을 평가하였다.



그림 3-6. 양배추 시험 포장 (2014년)

C95와 AD126의 농업형질 조사 결과 AD126의 외부잎의 크기, 생중량, 건중량이 더 낮게 나타 났으나, 결구의 길이, 직경, 무게에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 배추좁나방 저항성 *Bt* 양배추가 모본에 비해 해충 피해를 적게 받았기 때문에 무게에 차이가 난 것으로 판단된다(그 림3-7, 8).

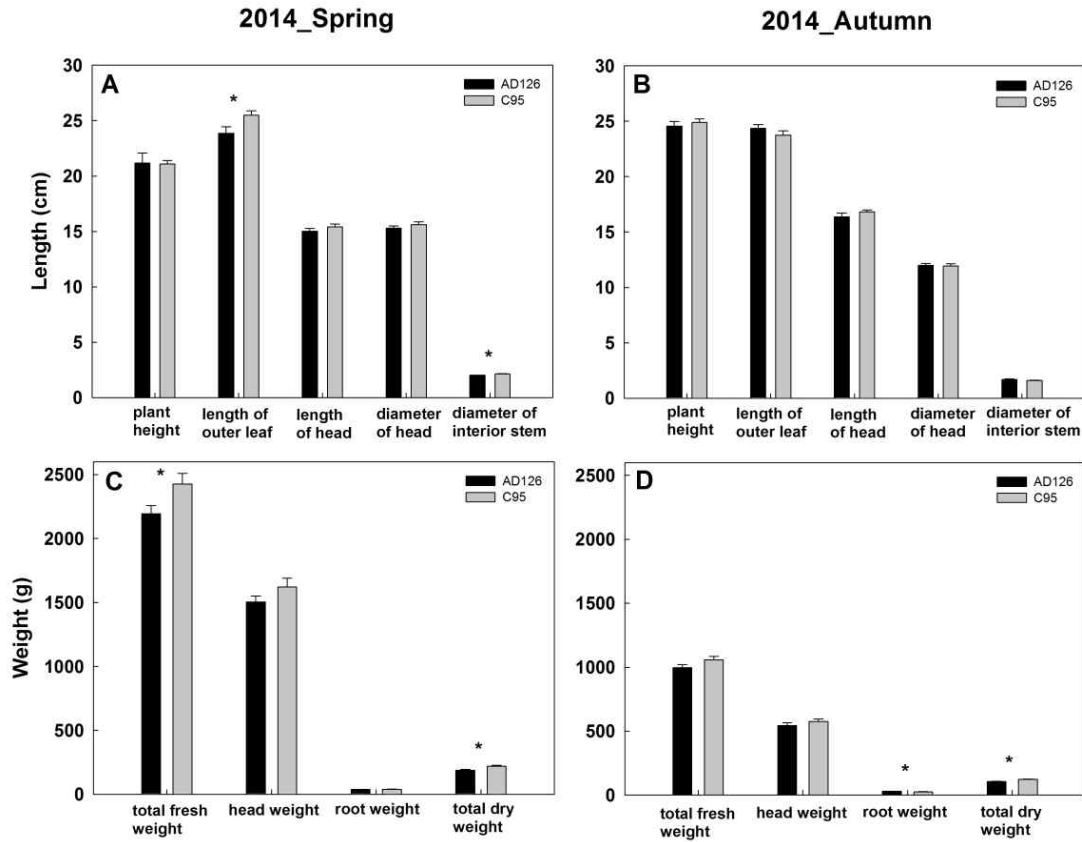


그림 3-7. 양배추 농업형질 비교(Student's t-test, *: $P < 0.05$)



그림 3-8. (좌) 모본(AD126)과 (우) *Bt* 양배추(C95)

2. 양배추 채배 토양의 물리화학적 특성 분석

가. 토양의 물리화학적 특성 분석법

토양시료는 모종삽을 이용하여 멀칭 비닐을 제거한 다음 이랑에 있는 흙을 약 20cm 깊이로 채취하였다. 채취한 토양은 실험실로 옮겨와 실온에서 7일간 음건하였고, 2 mm 체로 쳐 체를 통과한 토양을 실험에 사용하였다.

수분함량은 음건토양 약 10 g을 105°C 드라이오븐에서 24시간동안 건조시킨 뒤 무게를 측정하여 감소한 무게를 백분율로 환산하여 산출하였다. 토양 pH는 50 mL tube에 10 g의 토양과 20 mL의 증류수를 넣어(w/v = 1:2) 30분간 흔든 뒤 약 1 시간동안 정치시킨 다음 pH meter로 3회 측정하여 평균값을 산출하였다. 유기물함량은 토양 약 2 g을 600°C 작열로에서 6시간 동안 태운 뒤 무게를 측정하여 감소한 무게를 백분율로 환산하여 산출하였다.

토성은 비중계를 이용하여 분석하였다. 토양의 비중을 측정하기 이전에 1 L 메스실린더에 5% calgon 용액 100 mL을 넣고 증류수를 이용하여 총 부피를 1 L로 보정한 뒤 실온이 될 때까지 정치시킨 후 토양을 넣지 않은 상태의 용액의 비중(R_L)을 측정하였다. 그리고 캡이 있는 메스실린더에 토양 100 g을 넣고 5% calgon 용액과 300 mL의 증류수를 추가로 넣은 다음 16시간 동안 정치시켰다. 증류수를 이용하여 총 부피를 1 L로 맞춘 뒤 실온이 될 때까지 정치시켰다. 이후 메스실린더를 상하뒤집기를 20회 반복하였고, 40초 뒤 비중계를 이용하여 1차비중(R_{40s})을 측정하였다. 이때 거품이 생긴 경우 butanol 1방울을 떨어뜨려 거품을 제거한 뒤 측정하였다. 2차 비중(R_{2hr}) 측정을 2시간 후에 측정하였고, 다음 식에 의하여 sand, clay 및 silt의 비율을 계산하였다.

$$Sand(\%) = 100 - (R_{40s} - R_L) \times \frac{100}{\text{ovendried soil } Wt.}$$

$$Clay(\%) = (R_{2hr} - R_L) \times \frac{100}{\text{ovendried soil } Wt.}$$

$$Silt(\%) = 100 - (sand(\%) + clay(\%))$$

전질소, 유효인산, 치환성 칼륨의 함량은 서울대학교 농업생명과학대학 농생명과학공동기기원(NICEM)에 의뢰하여 분석하였다.

나. 2011년도 분석 결과

2011년 5월 20일, 각 시험구 당 세 개의 토양시료를 채취하였다. 가. 토양의 물리화학적 특성 분석법에 따라 토양의 물리화학적 특성을 분석하였다. 분석된 모든 항목에서 시험구 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(표3-11).

표 3-11. Bt 양배추, 모본 및 참조품종 양배추 재배 토양의 물리화학적 특성 (2011년) 평균 (표준오차)(n=3)

실험구	수분함량 (%)	pH	모래 (%)	점토 (%)	미사 (%)	유기물 함량 (%)	전질소 함량 (%)	유효 인산 (mg/kg)	치환성 칼륨 (mg/kg)
GM (C24)	1.72 (0.10)	6.6 (0.02)	66.4 (2.2)	12.9 (1.9)	20.7 (0.7)	5.20 (0.18)	0.190 (0.037)	1636.2 (532.1)	130.3 (41.9)
GM (C30)	1.89 (0.11)	6.6 (0.00)	67.4 (1.9)	10.5 (1.9)	22.1 (0.3)	5.28 (0.48)	0.177 (0.041)	1823.2 (561.7)	190.4 (85.3)
AD126	1.83 (0.13)	6.7 (0.04)	68.4 (1.3)	11.2 (1.3)	20.4 (0.0)	5.12 (0.29)	0.139 (0.045)	1201.3 (553.0)	118.8 (52.0)
온누리	1.60 (0.04)	6.5 (0.04)	65.4 (0.9)	12.5 (1.5)	22.0 (0.7)	4.86 (0.18)	0.228 (0.021)	2225.1 (248.8)	138.7 (12.3)
동북	1.78 (0.06)	6.7 (0.06)	66.7 (2.3)	11.5 (1.5)	21.7 (0.7)	5.43 (0.18)	0.212 (0.002)	1895.2 (77.5)	122.9 (7.9)

다. 2012년도 분석 결과

2012년 6월 4일에 시험구 토양 표층의 20 cm를 채취하였다. 가. 토양의 물리화학적 특성 분석법에 따라 토양 특성을 분석하였다. 시험구 토양은 중성의 양질사토(loamy sand)였으며, 물리화학적 특성은 표3-12와 같다.

표 3-12. 2012년 재배 토양의 물리화학적 특성 분석 결과(평균±표준오차, n=5)

항목	값
Water content (%)	2.06 ± 0.19
pH	6.97 ± 0.12
Sand (%)	79.89 ± 0.34
Clay (%)	3.06 ± 0.16
Silt (%)	17.05 ± 0.19
Organic matter content (%)	5.52 ± 0.15
Total-N (%)	0.14 ± 0.01
Available-P (mg/kg)	915.16 ± 56.14
Exchangeable-K (mg/kg)	152.40 ± 26.79

라. 2013년도 분석결과

2013년 6월 27일에 시험구에서 표토로부터 20cm 깊이까지의 토양을 5점 채취하였다. 가. 토양의 물리화학적 특성 분석법에 따라 토양 특성을 분석하였다. 양배추 시험구의 토양은 중성의 양질사토이며 물리화학적 특성은 표3-13과 같다.

표 3-13. 2013년 재배 토양의 물리화학적 특성 분석 결과(평균±표준오차, n=5)

항목	값
Water content (%)	2.06 ± 0.19
pH	6.97 ± 0.12
Sand (%)	79.89 ± 0.34
Clay (%)	3.06 ± 0.16
Silt (%)	17.05 ± 0.19
Soil texture	Loamy sand
Organic matter content (%)	5.52 ± 0.15
Total-N (%)	0.19 ± 0.01
Available-P (mg/kg)	99.82 ± 31.26
Exchangeable-K (mg/kg)	497.85 ± 58.13

3. 좁나방내성 *Bt* 양배추의 토양미생물에 대한 영향

가. T-RFLP 분석법

세균에 일반적으로 존재하는 16S ribosomal DNA region과 미생물의 다양성을 알아보는 지문 분석 방법(fingerprinting method) 중 민감도가 높고 분석시간이 비교적 짧은 T-RFLP를 이용하여 C24, C30과 모본인 AD126을 재배한 토양의 미생물 군집 구조를 조사함으로써 해충저항성 양배추가 토양미생물에 미치는 영향을 평가하였다. 근권토양은 2 mm 체를 쳐 통과시킨 후, 분석 시까지 -4°C에 보관하였다.

토양 0.8 g을 취하여 FastDNA SPIN Kit로 genomic DNA를 추출한 후, 세균을 검출할 수 있는 아래의 primer로 PCR을 수행하였다.

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(8F),
5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(1492R)

8F의 5'에는 형광 dye FAM으로 표지하였다. PCR로 증폭된 fragment는 polymorphism이 높은 제한효소 *Hae*III, *Hha*I로 잘라 ABI 3130의 Genemapper program으로 분석하였다. 분석된 수치는 PRIMER 6 (version 6.0, UK) 소프트웨어를 이용 ANOSIM (analysis of similarities)과 NMDS (non-metric multidimensional scaling) 방법을 통해 양배추 계통 간, 그리고 토양 채취 시기 간에 유의한 차이가 있는지 알아보았다.

나. 2011년도 실험

2011년에 실험구로부터 C24, C30, AD126 각각 3주씩 무작위로 선택하여 식물체를 토양에서 뽑았다. 총 6회 (6월 3일, 6월 10일, 6월 17일, 6월 27일, 7월 1일, 7월 15일) 시료를 채취하였다. 뿌리를 세계 흔들어 토양을 털어낸 뒤에도 뿌리에 붙어 남아있는 토양을 근권토양으로 간주하여 샘플링하였다. 가. T-RFLP 분석법에 따라 T-RFLP 분석을 실시하였다.

근권 토양 세균의 T-RFLP 프로파일에 대한 ANOSIM 분석 결과, 양배추 계통 간, 그리고 토

양채취 시기에 따라 T-RFLP 프로파일의 양상이 크게 다르지 않았는데 (표 3-14, 그림 3-10, 11), 이는 좁나방 내성 Bt 양배추나 모본 AD126의 근권 토양 미생물 군집이 크게 다르지 않음을 시사하며, 시기에 따라서도 큰 변화가 없음을 시사한다.

표 3-14. 양배추 근권 토양의 T-RFLP 프로파일의 ANOSIM 분석

	<i>HaeIII</i>		<i>HhaI</i>	
	Global R	p	Global R	p
Cabbage lines	-0.025	0.60	-0.111	0.95
Sampling time	0.043	0.21	0.043	0.24

다. 2012년도 실험

2012년에는 양배추의 성장단계에 따라 다음의 5개 단계의 양배추를 수확하여 토양미생물 군집을 분석하였다.

- Stage 3: 6 - 8 본엽 (이식 가능) (2012년 9월 19일)
- Stage 5: Precupping, 13-19 엽 (2012년 10월 4일)
- Stage 6: Cupping, 20-26엽 (2012년 10월 19일)
- Stage 8: Head fill, 구 직경 10-20 cm (2012년 10월 26일)
- Stage 9: Mature, 구 직경 15-30 cm (2012년 11월 21일)

각 시기에 시험구 당 3주의 식물을 무작위적으로 선택하고, 각 식물체를 토양에서 뽑아내어 뿌리에 붙은 큰 토양은 제거하였다. 근권토양은 Bagmixer (Interscience, France)로 교반하여 분리하였다. 근권토양은 동결 건조한 다음 -4°C에 보관하였다. 가. **T-RFLP 분석법**에 따라 T-RFLP 분석을 실시하였다.

ANOSIM 과 NMDS 분석 결과, 제한효소 Hha I 을 처리한 실험군에서 모본과 C24 사이에, C24와 C30 사이에 근권토양 세균 군집 구조의 차이가 관찰되었다(표3-15). 또한 제한효소 HaeIII를 처리한 실험군에서 모본과 C24 사이에 차이가 관찰되었다. 성장시기에 따른 차이 역시 관찰되었다(표 3-16).

표 3-15. 양배추 계통이 근권 세균의 T-RFLP 프로파일에 미치는 영향에 대한 ANOSIM 분석

	<i>Hae III</i>		<i>Hha I</i>	
	R statistic	<i>P</i>	R statistic	<i>P</i>
Global R	0.075	0.161	0.142	0.042
AD126, C24	0.2	0.009	0.237	0.010
AD126, C30	-0.059	0.673	0.052	0.341
C24, C30	0.096	0.164	0.2	0.002

표 3-16. 양배추 성장단계가 근권세균의 T-RFLP 프로파일에 미치는 영향에 대한 ANOSIM 분석

	<i>Hae</i> III		<i>Hha</i> I	
	R statistic	<i>P</i>	R statistic	<i>P</i>
Global R	0.076	0.14	0.051	0.241
Stage 3, 5	0.247	0.015	0.111	0.206
Stage 3, 6	-0.21	0.839	-0.259	0.912
Stage 3, 8	0.111	0.281	0.407	0.004
Stage 3, 9	-0.025	0.537	-0.198	0.864
Stage 5, 6	0.309	0.003	0.16	0.071
Stage 5, 8	-0.025	0.553	0.111	0.247
Stage 5, 9	0.272	0.021	0.16	0.139
Stage 6, 8	0.235	0.061	0.395	0.004
Stage 6, 9	-0.198	0.847	-0.21	0.865
Stage 8, 9	0.16	0.131	0.235	0.031

라. 2013년도

양배추의 성장단계에 따라 3, 5, 6, 8, 9 단계(각각 2013년 4월 25일, 5월 30일, 6월 10일, 6월 14일, 6월 27일에 해당)에 토양시료를 채취하였다. 각 성장단계마다 시험구당 3주의 식물을 무작위로 선택하여 뽑고 뿌리를 흔들어 토양을 제거하였다. 식물체의 세균을 sterile bag에 100ml의 증류수와 함께 넣어 Bagmixer (Interscience, France)로 교반한 뒤 뿌리와 근권 토양을 분리하였다. 분리한 토양을 freeze dryer로 동결 건조한 다음 -4℃에 보관하였다. 가. T-RFLP 분석법에 따라 T-RFLP 분석을 실시하였다.

ANOSIM 분석 결과, 양배추 계통에 따른 세균 군집 구조의 차이는 관찰되지 않았다(표 3-17). 반면, 성장단계에 따른 차이는 크게 관찰되었다(표3-18).

표 3-17. 양배추 근권 토양의 T-RFLP 프로파일의 계통별 ANOSIM 분석(2013년)

	<i>Hae</i> III		<i>Hha</i> I	
	R statistic	<i>P</i>	R statistic	<i>P</i>
AD-126, C-30	-0.02	0.831	0.026	0.091

표 3-18. 양배추 근권 토양의 T-RFLP 프로파일의 stage별 ANOSIM 분석(2013년)

	<i>Hae III</i>		<i>Hha I</i>	
	R statistic	<i>P</i>	R statistic	<i>P</i>
Global R	0.441	0.001	0.502	0.001
Stage 3, 5	0.398	0.001	0.316	0.001
Stage 3, 6	0.638	0.001	0.659	0.001
Stage 3, 8	0.666	0.001	0.687	0.001
Stage 3, 9	0.672	0.001	0.487	0.001
Stage 5, 6	0.383	0.001	0.599	0.001
Stage 5, 8	0.513	0.001	0.694	0.001
Stage 5, 9	0.435	0.001	0.438	0.001
Stage 6, 8	0.092	0.014	0.109	0.001
Stage 6, 9	0.372	0.001	0.570	0.001
Stage 8, 9	0.462	0.001	0.554	0.001

또한 T-RF의 NDMS 결과에서도 양배추 계통(GM vs. non-GM) 간의 차이는 관찰되지 않았지만, 성장단계에 따른 차이는 관찰되었다(그림3-9, 10). PERMANOVA 분석결과 또한 ANOSIM 결과와 유사하게 분석되었다(표 3-19).

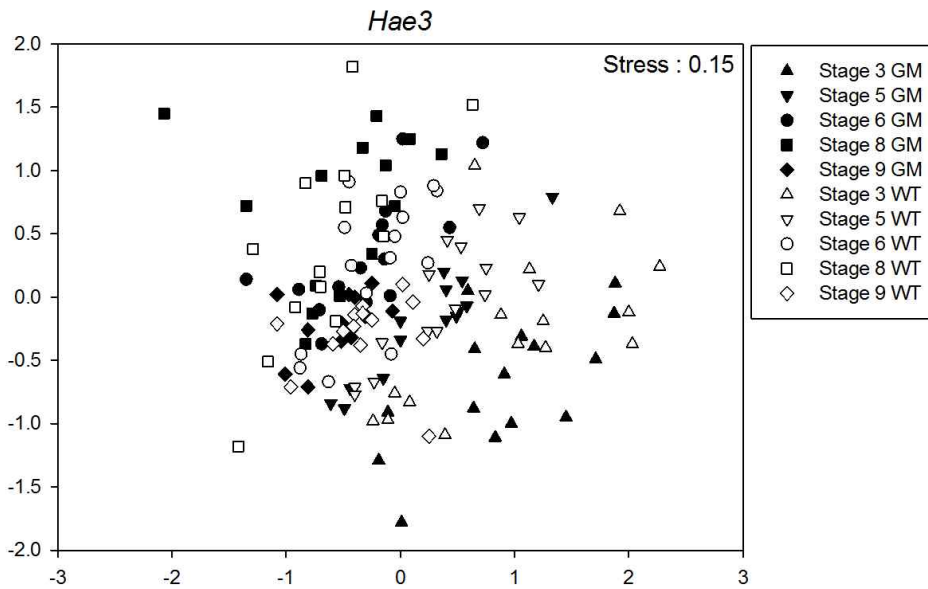


그림 3-9. 제한효소 HaeIII를 통해 얻은 GM과 모본 양배추의 근권세균 T-RF의 NMDS 분석(2013년)

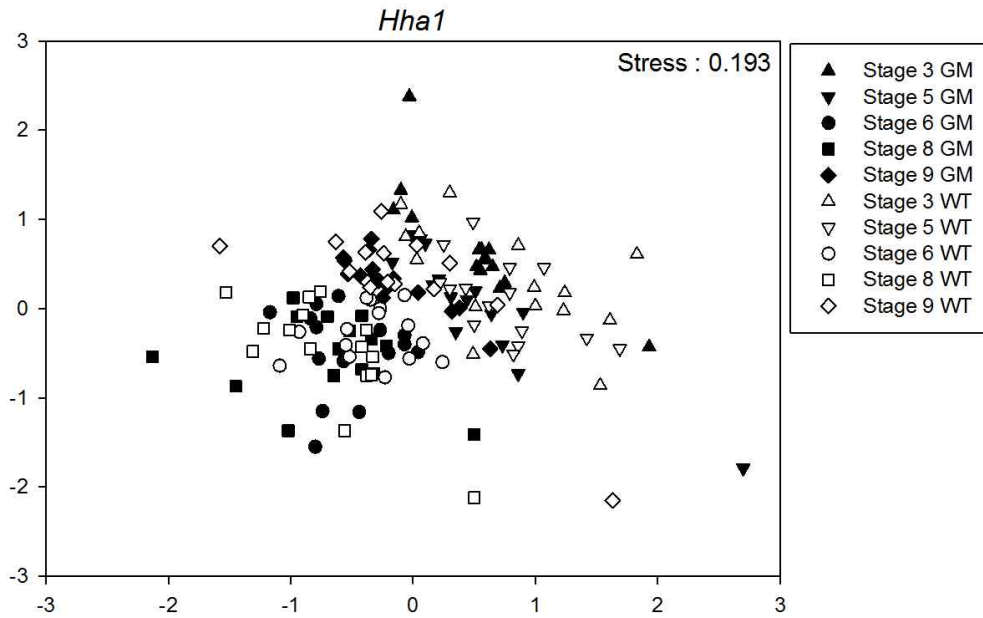


그림 3-10. 제한효소 HhaI을 통해 얻은 GM과 모본 양배추의 근권세균 T-RF의 NMDS 분석(2013년)

표 3-19. 양배추 근권의 세균 T-RF 프로파일의 PERMANOVA 결과(2013년)

T-RF	Source	df	F	p
digested with HaeIII	Growth stage	4	16.142	0.0001
	Genetic line	1	0.878	0.5207
	Growth stage × genetic line	4	0.934	0.5517
	Residual	136		
digested with HhaI	Growth stage	4	18.388	0.0001
	Genetic line	1	1.551	0.1188
	Growth stage × genetic line	4	1.281	0.116
	Residual	140		

제한효소 *HaeIII*를 사용하였을 때 다양성지수는 양배추 계통 간 유의한 차이가 없었지만, 성장 단계에 따라 풍부도, 균등도, Shannon 및 Simpson 다양성 지수 모두 유의한 차이가 있었다(표 3-20). 제한효소 *HhaI*을 사용하였을 때 다양성 지수는 양배추 계통에 의한 유의한 차이는 없었으며, 성장 단계에 따라 균등도에서 유의한 차이가 관찰되었다.

표 3-20. 제한효소 *HaeIII*와 *HhaI*을 사용하여 얻은 양배추 근권토양미생물의 T-RF에 대한 종풍부도(d), Pielou 균등도(J'), Shannon-Wiener 다양성 지수(H') 및 Simpson 다양성 지수($1-\lambda'$) 분석(2013년)

다양성 지수	Stage	양배추 계통 (평균(표준편차))			
		Digested with <i>HaeIII</i>		Digested with <i>HhaI</i>	
		AD-126	C30	AD-120	C30
d	3	3.91 (1.96)	3.99 (1.27)	1.95 (0.75)	2.47 (0.71)
	5	4.44 (1.60)	5.27 (1.90)	1.65 (0.57)	1.98 (0.94)
	6	5.24 (1.66)	5.13 (1.58)	2.63 (0.41)	2.15 (0.58)
	8	5.22 (1.67)	4.86 (1.65)	2.40 (0.66)	2.12 (0.68)
	9	5.77 (1.08)	6.16 (1.20)	2.27 (0.75)	2.31 (0.71)
J'	3	0.98 (0.00)	0.98 (0.01)	0.98 (0.01)	0.98 (0.02)
	5	0.99 (0.00)	0.99 (0.00)	0.98 (0.01)	0.98 (0.01)
	6	0.98 (0.01)	0.98 (0.01)	0.97 (0.00)	0.97 (0.01)
	8	0.97 (0.01)	0.98 (0.01)	0.95 (0.01)	0.96 (0.02)
	9	0.99 (0.01)	0.99 (0.00)	0.97 (0.01)	0.97 (0.01)
H'	3	3.24 (0.37)	3.24 (0.37)	2.46 (0.42)	2.72 (0.41)
	5	3.53 (0.44)	3.53 (0.44)	2.28 (0.39)	2.36 (0.76)
	6	3.49 (0.40)	3.49 (0.40)	2.83 (0.18)	2.59 (0.31)
	8	3.43 (0.37)	3.43 (0.37)	2.67 (0.32)	2.54 (0.33)
	9	3.77 (0.21)	3.70 (0.21)	2.59 (0.48)	2.65 (0.34)
$1-\lambda'$	3	0.95 (0.03)	0.96 (0.02)	0.91 (0.04)	0.92 (0.05)
	5	0.96 (0.01)	0.97 (0.02)	0.89 (0.04)	0.85 (0.23)
	6	0.97 (0.01)	0.96 (0.02)	0.94 (0.01)	0.92 (0.03)
	8	0.96 (0.01)	0.96 (0.01)	0.92 (0.03)	0.91 (0.03)
	9	0.97 (0.01)	0.98 (0.00)	0.91 (0.07)	0.92 (0.03)

4. *CryIacI* 단백질의 대량 발현

CryIacI 단백질을 대량 발현하여 후속 연구(곤충에 대한 영향, 토양미생물에 대한 영향)에 사용하고자 하였다. *CryIacI*의 단백질 정제는 수용성과 발현양이 일반 박테리아 단백질 발현용 벡터를 이용할 경우 현저하게 낮다. 이를 개선하기 위하여 여러 파트너 펩타이드와 샤페론 단백질을 함께 발현 시켜주는데 이때 tag와 함께 발현되는 *CryIacI* 단백질의 activity의 측정이 실험에 사용되기 전에 필수적으로 수반되어야한다. 본 실험에서는 pColdIII를 사용하여 *CryIacI*의 발현을 보았다. pColdIII 벡터는 Csp (Cold shock protein) promoter와 N-terminal 부위가 함께 발현되어 *CryIacI*을 발현시킨다(그림 3-11). pCold 벡터는 저온에서 발현 단백질의 5' UTR부위를 안정화시켜 단백질 발현을 효율적으로 수행하도록 하는 벡터이다.

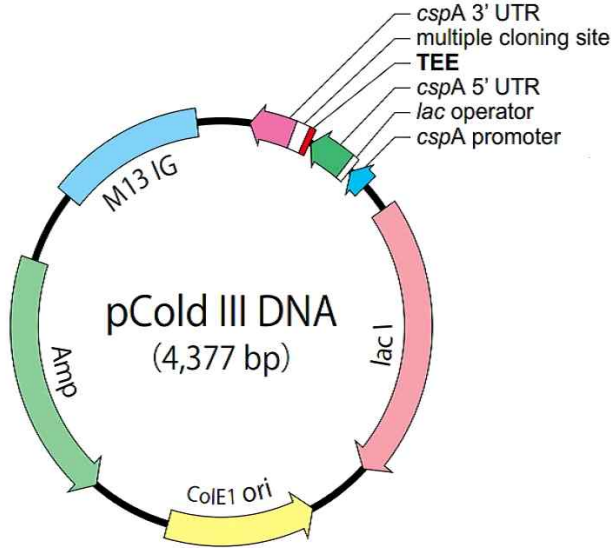


그림 3-11. pColdIII plasmid 모식도

Csp promoter와 N-terminal을 동시 발현하는 pColdIII 벡터에 *CryIAcI* 유전자를 삽입하였다. 먼저 Clontech Laboratories, inc.에서 구입한 In-Fusion HD Cloning enzyme를 사용하여 *CryIAcI* 유전자를 pColdIII 벡터의 NdeI site에 도입하였다. 단백질 정제를 위하여 N-terminal과 C-terminal부위에 각각 His tag를 포함 시켰고 *CryIAcI* 유전자의 증폭과 In-Fusion reaction을 위하여 pCold3_ *CryIAcI*_NHis_F, pCold3_ *CryIAcI*_NHis_R, pCold3_ *CryIAcI*_CHis_F, pCold3_ *CryIAcI*_CHis_R를 사용하여 PCR reaction을 수행하였다(표 3-21). In-Fusion method에 따라 pColdIII 벡터는 NdeI을 사용하여 linear형태로 만든 후에 증폭된 *CryIAcI*과 함께 In-Fusion reaction이 수행되었다.

표 3-21. 사용된 프라이머

Primer name	Sequence
pCold3_ <i>CryIAcI</i> _NHis_F	ATCATAAAGTGCATATGCATCATCATCATCATGACAACAACCC AAACATCAA
pCold3_ <i>CryIAcI</i> _NHis_R	GTACCGAGCTCCATATTAAGATTGTACTIONAGCC
pCold3_ <i>CryIAcI</i> _CHis_F	ATCATAAAGTGCATATGGACAACAACCCAAACATCAA
pCold3_ <i>CryIAcI</i> _CHis_R	GTACCGAGCTCCATATTAATGATGATGATGATGATGAAGATTGTAC TCAGCCTCAA

LB media 대신에 M9 minimum plate와 media을 사용하여 transformation 전 과정을 수행한 후 plasmid를 얻어 NdeI과 HindIII DNA restriction enzyme를 사용하여 *CryIAcI* insert와 plasmid의 size를 확인하고 이와 더불어 DNA sequencing을 수행하여 올바른 frame으로 insert가 삽입되었음을 확인하였다(그림 3-12). *CryIAcI* 단백질의 발현 유무를 확인하기 위하여 *CryIAcI*을 가지는 pColdIII벡터를 각각 BL21 DE3 pLysS competent cell에 transformation하여 M9 plate (ampicillin: 이하 amp)로부터 colony를 선별한 후 ampicillin을 포함하는 3 mL

M9 media에 접종하였다. 하루 동안 37°C에서 성장시킨 후에 100 mL M9 media (amp)에 접종하고 동일 온도에서 OD 600값이 0.4가 되도록 키운 후에 IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)를 0.5mM이 되도록 *CryIAcI* 단백질의 발현을 induction 시킨 후 ice에서 30분 간 cold shock을 주었다. 그 후 15°C에서 하루 배양한 후 IPTG induction 전 후의 샘플들을 각각 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis 하여 *CryIAcI*의 발현을 확인하였다. 그림3-15의 빨간 화살표처럼 *CryIAcI* 단백질의 발현을 확인할 수 있었다.

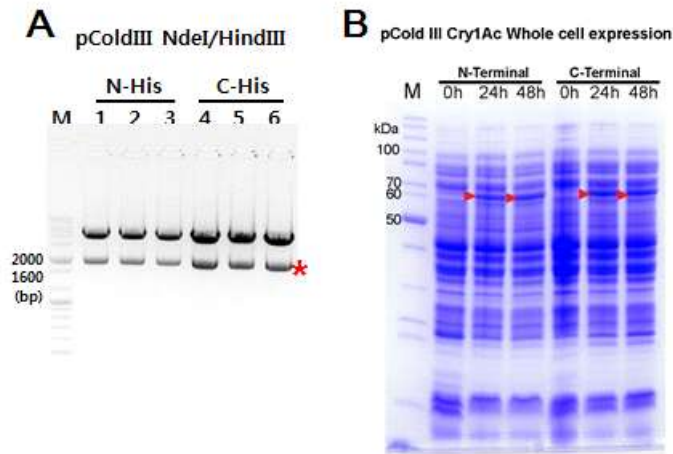


그림 3-12. pColdIII *CryIAcI*의 subcloning과 단백질 발현 측정 (A) pColdIII *CryIAcI* clone의 DNA restriction enzyme 분석 (B) *CryIAcI*의 단백질 발현 분석

5. *Bt* 양배추의 절지동물군집에 미치는 영향 평가

가. 2011년도 실험

한국생명공학연구원 LMO 격리포장에 *Bt* 양배추 두 계통 C24, C30 (T2)과 모본인 AD-126, 참조품종인 온누리, 동복을 정식하고, 이들 양배추에서 발견되는 절지동물을 조사하였다. 양배추는 2011년 4월 8일에 파종하였으며, 5월 17일에 *Bt* 양배추, 모본, 참조품종 각각 3개의 실험구를 만들어 정식하였다(그림 3-13).



그림 3-13. 한국생명공학연구원 격리포장에 정식한 양배추(2011년)

절지동물 군집 구조를 조사하기 위하여 각 실험구 내에서 동일한 성장 단계의 양배추 3개체를 무작위로 선정하여 각각의 양배추 개체에서 관찰되는 모든 절지동물의 밀도를 2011년 6월 3일부터 7월 15일까지 총 7회 (6월 3일, 6월 10일, 6월 17일, 6월 27일, 7월 1일, 7월 11일, 7월 15일) 조사하였으며, 관찰된 절지동물 종들은 종 수준까지 동정하였고, 종 수준까지 분류하기 어려운 종들은 과(family) 수준까지 동정하여 기록하였다.

종 분류 및 밀도 조사가 완료된 후 조사한 자료를 바탕으로 Species richness (d), Pielou's evenness (J), Shannon-Weiner diversity index (H')과 Simpson's diversity index ($1-\lambda$)의 4가지 종 다양성지수를 산출하였다. 산출한 다양성 지수들은 조사시기와 계통을 고정인자로 하여 이원 변량분석 (two-way ANOVA)을 통해 비교하였다. 각 계통에서 발견된 절지동물의 군집 구조를 비교하기 위하여, Bray-Curtis similarity에 기반한 non-metric multidimensional scaling (NMDS)과 Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)를 수행하여 조사시기 및 계통에 따른 차이가 있는지 알아보았다. Analysis of similarity (ANOSIM) 분석 또한 수행하여 각 집단 간의 차이가 있는지를 보완 판단하였다. 이원 변량 분석은 STATISTICA (version. 8.0)를 이용하였고 NMDS와 PERMANOVA 및 ANOSIM은 Primer 6 & Permanova+(version. 6.1.13)을 이용하였다.

Bt 양배추, 모본 AD126, 참조품종 온누리, 동북에서 발견된 양배추 개체 당 절지동물들의 종류와 수를 표 22, 23, 24, 25, 26에 나타내었다. 배추좀나방의 경우, 좀나방 내성 *Bt* 양배추 C30 계통에서 발견된 배추좀나방의 수가 모본 AD126에서 발견된 수 보다 적었다 (AD126에서 평균 밀도 2.26 ± 0.69 , C30에서 0.28 ± 0.11). 배추흰나비는 *Bt* 양배추와 모본에서 비슷한 수가 관찰되었다 (AD-126에서 평균밀도 1.83 ± 0.61 , C30에서 1.32 ± 0.56).

표 3-22. 2011년도에 모본(AD126)에서 발견된 절지동물의 종 풍부도 (Mean±SE).

Species	3 Jun	10 Jun	17 Jun	27 Jun	1 Jul	11 Jul	15 Jul	평균
<i>Pieris rapae</i>	0.22(0.22)	2.00(0.53)	2.56(0.44)	2.44(0.71)	4.67(0.94)	0.78(0.43)	0.11(0.11)	1.83(0.61)
<i>Plutella xylostella</i>	0.44(0.24)	0.56(0.29)	3.11(0.79)	3.78(1.41)	4.67(0.94)	1.11(0.81)	0.33(0.33)	2.26(0.69)
<i>Phyllotreta striolata</i>	-	-	-	0.33(0.33)	1.67(0.71)	2.00(0.58)	5.44(1.33)	1.35(0.75)
<i>Propylea japonica</i>	-	-	-	-	-	0.11(0.11)	-	0.02(0.02)
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	-	-	-	-	-	-	0.11(0.11)	0.02(0.02)
<i>Dolycoris baccarum</i>	-	0.11(0.11)	-	-	-	0.33(0.17)	-	0.07(0.05)
<i>Eurydema gebleri</i>	-	-	0.11(0.11)	-	1.00(0.58)	4.00(0.94)	0.78(0.22)	0.84(0.55)
<i>Harmonia axiridis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Agromizidae	0.22(0.15)	0.78(0.36)	1.22(0.36)	1.22(0.52)	0.11(0.11)	-	-	0.51(0.21)
Tingitidae	0.11(0.11)	-	-	-	-	-	-	0.02(0.02)
Coreidae	-	-	-	-	-	-	-	-
Aphid sp	0.33(0.24)	4.44(1.83)	14.78(2.83)	1.33(1.33)	0.44(0.44)	-	0.11(0.11)	3.06(2.04)

표 3-23. 2011년도에 온누리에서 발견된 절지동물의 종 풍부도 (Mean±SE).

Species	3 Jun	10 Jun	17 Jun	27 Jun	1 Jul	11 Jul	15 Jul	평균
<i>Pieris rapae</i>	1.00(0.29)	1.89(0.39)	5.00(0.82)	9.67(1.91)	9.89(1.42)	1.22(0.36)	0.22(0.15)	4.13(1.57)
<i>Plutella xylostella</i>	0.89(0.54)	-	4.78(0.92)	12.89(2.91)	10.11(2.51)	1.67(0.55)	-	4.33(1.97)
<i>Phyllotreta striolata</i>	-	-	0.67(0.24)	0.33(0.24)	3.22(0.81)	9.78(2.09)	27.78(5.14)	6.85(4.13)
<i>Propylea japonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	-	-	-	0.11(0.11)	-	-	-	0.02(0.02)
<i>Dolycoris baccarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eurydema gebleri</i>	-	-	-	0.22(0.15)	1.56(0.93)	0.78(0.40)	0.78(0.57)	0.48(0.22)
<i>Harmonia axiridis</i>	-	-	-	0.11(0.11)	-	-	-	0.02(0.02)
Agromizidae	0.22(0.15)	0.22(0.15)	0.33(0.24)	1.78(0.52)	-	-	-	0.36(0.24)
Tingitidae	-	-	-	-	-	-	-	-
Coreidae	-	-	-	-	-	-	-	-
Aphid sp	1.67(1.21)	11.89(2.14)	28.44(3.29)	20.78(9.78)	48.56(17.64)	9.56(9.56)	-	17.27(6.45)

표 3-24. 2011년도에 동북에서 발견된 절지동물의 종 풍부도 (Mean±SE).

Species	3 Jun	10 Jun	17 Jun	27 Jun	1 Jul	11 Jul	15 Jul	평균
<i>Pieris rapae</i>	0.67(0.33)	2.00(0.55)	5.89(1.15)	7.11(1.33)	7.44(1.39)	3.89(1.15)	0.22(0.15)	3.89(1.14)
<i>Plutella xylostella</i>	0.44(0.34)	1.00(0.44)	4.22(0.62)	9.33(1.56)	10.00(2.30)	1.00(0.33)	0.22(0.15)	3.74(1.61)
<i>Phyllotreta striolata</i>	-	-	0.44(0.18)	2.22(1.28)	3.44(0.97)	2.78(0.66)	23.11(5.99)	4.57(3.13)
<i>Propylea japonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	-	0.11(0.11)	-	-	-	-	-	0.02(0.02)
<i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dolycoris baccarum</i>	-	-	-	0.11(0.11)	0.78(0.40)	-	0.11(0.11)	0.14(0.11)
<i>Eurydema gebleri</i>	-	-	-	0.44(0.24)	1.00(0.47)	4.78(1.19)	2.11(0.98)	1.19(0.67)
<i>Harmonia axiridis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Agromizidae	0.11(0.11)	0.56(0.34)	0.78(0.28)	-	0.11(0.11)	-	-	0.22(0.12)
Tingitidae	-	-	-	-	-	-	-	-
Coreidae	-	-	-	-	-	-	0.11(0.11)	0.02(0.02)
Aphid sp	1.33(0.67)	16.11(10.83)	31.56(15.02)	12.00(5.45)	20.22(5.73)	2.67(2.67)	1.00(0.71)	12.13(4.33)

표 3-25. 2011년도에 *Bt* 양배추 C24 에서 발견된 절지동물의 종 풍부도 (Mean±SE).

Species	3 Jun	10 Jun	17 Jun	27 Jun	1 Jul	11 Jul	15 Jul	평균
<i>Pieris rapae</i>	0.67(0.29)	1.11(0.26)	1.78(0.46)	3.33(0.33)	5.00(0.60)	1.11(0.61)	0.56(0.24)	1.94(0.62)
<i>Plutella xylostella</i>	0.22(0.15)	-	1.11(0.54)	3.11(1.01)	3.89(1.11)	3.67(1.67)	0.44(0.24)	1.78(0.65)
<i>Phyllotreta striolata</i>	-	-	0.11(0.11)	0.11(0.11)	2.11(0.72)	-	4.22(1.40)	0.94(0.62)
<i>Propylea japonica</i>	-	-	-	-	-	-	0.11(0.11)	0.02(0.02)
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dolycoris baccarum</i>	-	-	-	-	-	0.33(0.33)	0.11(0.11)	0.06(0.05)
<i>Eurydema gebleri</i>	-	-	-	-	1.78(0.92)	1.89(0.73)	1.56(0.58)	0.75(0.35)
<i>Harmonia axyridis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Agromizidae	0.11(0.11)	0.67(0.33)	0.78(0.43)	0.78(0.46)	0.11(0.11)	-	-	0.35(0.14)
Tingitidae	-	-	-	-	-	-	-	-
Coreidae	-	-	-	-	-	-	-	-
Aphid sp	0.56(0.44)	1.44(0.44)	3.67(0.88)	13.22(9.22)	24.00(14.16)	6.00(4.52)	1.78(1.78)	7.24(3.23)

표 3-26. 2011년도에 *Bt* 양배추 C30 에서 발견된 절지동물의 종 풍부도 (Mean±SE).

Species	3 Jun	10 Jun	17 Jun	27 Jun	1 Jul	11 Jul	15 Jul	평균
<i>Pieris rapae</i>	0.67(0.29)	1.11(0.45)	1.22(0.36)	1.00(0.44)	4.56(0.82)	0.44(0.24)	0.22(0.22)	1.32(0.56)
<i>Plutella xylostella</i>	-	-	0.44(0.24)	0.44(0.34)	0.78(0.28)	0.22(0.22)	0.11(0.11)	0.28(0.11)
<i>Phyllotreta striolata</i>	-	-	0.11(0.11)	0.11(0.11)	-	3.00(0.69)	2.56(0.90)	0.83(0.51)
<i>Propylea japonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dolycoris baccarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eurydema gebleri</i>	-	-	-	0.56(0.56)	0.89(0.54)	5.11(1.64)	5.44(2.09)	1.71(0.93)
<i>Harmonia axyridis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Agromizidae	0.11(0.11)	1.00(0.37)	0.44(0.24)	0.56(0.38)	0.22(0.22)	-	-	0.33(0.14)
Tingitidae	-	-	-	-	-	-	-	-
Coreidae	-	-	-	-	-	-	0.11(0.11)	0.02(0.02)
Aphid sp	0.44(0.29)	4.67(0.94)	9.56(4.73)	17.11(7.82)	15.22(5.18)	12.44(12.44)	-	9.13(2.78)

절지동물의 종 다양도 지수는 이원변량 분석 결과 조사시기와 계통의 두 요인이 각각 모든 종 다양도 지수들에 유의한 영향을 주는 것으로 나타났고, 조사시기와 계통의 상호작용 효과는 나타나지 않았다 (표 3-27). NMDS (그림 3-14) 와 PERMANOVA (표 3-28) 분석결과 조사시기와 양배추 계통이 절지동물 군집에 유의한 영향을 미치는 것으로 나타났다. ANOSIM 분석으로 양배추 각 계통 간의 절지동물군집의 구조에 차이가 있는지 비교해본 결과, *Bt* 양배추 C24, C30, 모본 AD126과, 참조품종인 온누리, 동북 사이에는 절지동물 군집의 구조가 유의하게 차이가 있는 반면, 모본과 *Bt* 양배추 간에는 절지동물 군집의 구조에 큰 차이가 없었다 (표 3-29).

표 3-27. 2011년도에 발견된 절지동물의 종 다양성 지수 species richness (d), Pielou's evenness (J'), Shannon-Wiener diversity index (H'), and Simpson's diversity index ($1-\lambda'$) 의 이원변량 분석 결과

Sources	df	d	J'	H'	$1-\lambda'$
		F	F	F	F
조사시기	6	2.545*	5.164***	4.433***	4.545***
계통	4	2.518*	3.928**	2.896*	3.511*
조사시기 x 계통	24	0.949	0.988	1.211	0.375

(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

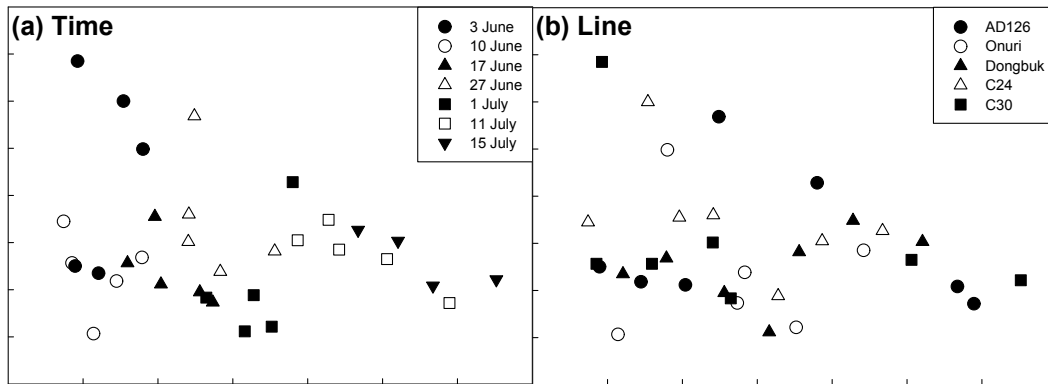


그림 3-14. Bray-Curtis similarity를 기반으로 분석한 절지동물 군집의 NMDS ordination 그래프(2011년). (a) 조사 시기에 따른 분석, (b) 계통에 따른 분석.

표 3-28. 2011년에 각 양배추 계통에서 발견된 절지동물군집들의 PERMANOVA 결과.

Source	df	F	P
조사시기	6	23.284	<0.001
계통	4	3.995	<0.001
조사시기 × 계통	24	1.204	0.194
Res	70		
Total	104		

표 3-29. 2011년에 각 양배추 계통에서 발견된 절지동물군집들의 ANOSIM 분석 결과

계통	R statistic	P
AD126, 온누리	0.299	0.002
AD126, 동북	0.159	0.041
AD126, C24	0.124	0.100
AD126, C30	0.108	0.103
온누리, 동북	0.106	0.130
온누리 C24	0.233	0.045
온누리, C30	0.455	0.001
동북, C24	0.159	0.064
동북, C30	0.270	0.003
C24, C30	0.138	0.124

나. 2012년도 실험

GM 양배추 (C24, C30 / T₃) 라인과 모본 AD126에서 발견되는 절지동물을 육안조사와 황색평판트랩 (150mm x 250mm, 그린 아그로텍)을 이용하여 관찰하였으며, 각 양배추 계통에서 관찰되는 절지동물의 밀도를 비교하였다. 양배추는 2012년 7월 13일에 파종하였으며, 2012년 9월 7일에 격리포장에 각 계통 당 3개의 실험구로 구성하여 정식하였다(그림3-15).



그림 3-15. GM 양배추 격리포장(2012년)

절지동물 군집구조의 조사를 위하여 각각의 실험구에서 동일한 성장단계에 있는 양배추 3주를 무작위로 선정하여 각각의 양배추에서 관찰되는 모든 절지동물의 밀도를 조사하였다. 육안조사는 2012년 9월 27일부터 7일 간격으로 11월 1일까지 총 6회 (9월 27일, 10월 4일, 10월 11일, 10월 18일, 10월 25일, 11월 1일) 수행하였으며, 황색평판트랩 채집은 10월 12일부터 11월 2일까지 총 4회 (10월 12일, 10월 19일, 10월 26일, 11월 2일) 수행하였다. 황색평판트랩을 통해 채집된 절지동물 종들은 종 수준까지 동정하였고, 종 수준까지 분류가 되지 않았었던 종은 과 수준까지 동정하여 기록하였다. 절지동물의 밀도조사 및 종의 분류가 완료된 후 곤충 군집 데이터로부터 Species richness, Pielou's evenness, Shannon-Weiner diversity index와 Simpson's diversity index의 4가지 종 다양성지수를 계산하였으며, 조사시기와 계통의 두 인자와 그들의 상호작용을 고정인자로 하여 반복측정분산분석(repeated measures ANOVA)을 수행하였다. 또한 곤충군집 데이터를 fourth-root 변환을 한 다음, Bray-curtis similarity를 구하여 non-metric multidimensional scaling (NMDS)과 Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)를 수행하여 절지동물 군집이 전체적으로 조사 시기 및 계통과 상호

작용에 의한 차이가 있는지 알아보았으며, 이때 Analysis of similarity (ANOSIM)를 같이 수행하여 각각의 계통 간에 절지동물군집의 차이가 있는지 비교하였다. 반복측정분산분석의 수행은 STATISTICA (version. 8.0)를 이용하였고 NMDS와 PERMANOVA 및 ANOSIM은 Primer 6 & Permanova+ (version. 6.1.13)을 이용하였다.

(1) 육안조사

육안조사결과 조사된 절지동물 밀도데이터를 통해 계산된 모든 종 다양도 지수는 조사 시기에 따라서는 유의한 영향을 받는 것으로 나타났지만, 양배추 계통에 의한 영향은 없었으며, 조사 시기와 양배추 계통간의 상호작용에 따른 차이도 나타나지 않았다(표3-30).

표 30. 2012년도에 발견된 절지동물의 종풍부도(d)와 균등도(J'), Shannon-Wiener 다양성 지수(H'), Simpson 다양성 지수($1-\lambda'$)의 반복측정 분산분석(RMANOVA). 평균(\pm 표준오차) (n=3).

다양도 지수	조사시기	양배추 계통			P-value	
		AD-126	C-24	C-30	시기	계통
d	9월 27일	2.13 (0.05)	1.84 (0.57)	1.36 (0.32)	0.026	0.342
	10월 4일	1.99 (0.19)	2.45 (0.18)	2.03 (0.29)		
	10월 11일	2.27 (0.47)	2.21 (0.27)	2.12 (0.26)		
	10월 18일	2.52 (0.09)	2.27 (0.28)	2.25 (0.10)		
	10월 25일	2.77 (0.11)	2.26 (0.20)	2.29 (0.05)		
	11월 1일	2.49 (0.10)	2.17 (0.17)	2.16 (0.19)		
J'	9월 27일	0.98 (0.01)	0.98 (0.00)	0.98 (0.01)	<0.001	0.282
	10월 4일	0.95 (0.02)	0.95 (0.01)	0.97 (0.01)		
	10월 11일	0.98 (0.01)	0.97 (0.01)	0.98 (0.00)		
	10월 18일	0.99 (0.00)	0.99 (0.00)	0.99 (0.00)		
	10월 25일	0.99 (0.00)	0.98 (0.00)	0.99 (0.00)		
	11월 1일	0.99 (0.00)	0.99 (0.00)	0.99 (0.00)		
H'	9월 27일	1.58 (0.01)	1.31 (0.35)	1.03 (0.20)	0.011	0.229
	10월 4일	1.58 (0.15)	1.79 (0.10)	1.54 (0.13)		
	10월 11일	1.68 (0.31)	1.66 (0.15)	1.62 (0.16)		
	10월 18일	1.82 (0.06)	1.63 (0.13)	1.65 (0.06)		
	10월 25일	1.97 (0.04)	1.63 (0.14)	1.66 (0.06)		
	11월 1일	1.83 (0.05)	1.58 (0.11)	1.58 (0.11)		
$1-\lambda'$	9월 27일	0.93 (0.01)	0.86 (0.08)	0.82 (0.07)	0.007	0.704
	10월 4일	0.87 (0.03)	0.91 (0.01)	0.90 (0.04)		
	10월 11일	0.91 (0.04)	0.91 (0.01)	0.92 (0.01)		
	10월 18일	0.95 (0.01)	0.94 (0.02)	0.94 (0.01)		
	10월 25일	0.96 (0.00)	0.94 (0.01)	0.95 (0.00)		
	11월 1일	0.95 (0.01)	0.94 (0.03)	0.94 (0.01)		

종 다양도 지수는 양배추의 계통에 따른 차이가 나타나지 않았지만, NMDS와 PERMANOVA의 결과에 따르면 본 실험에서 조사된 절지동물의 군집구조는 시간뿐만 아니라 양배추 계통에 따라서도 유의한 차이가 나타나는 것을 알 수 있었다(그림3-16, 표 3-31).

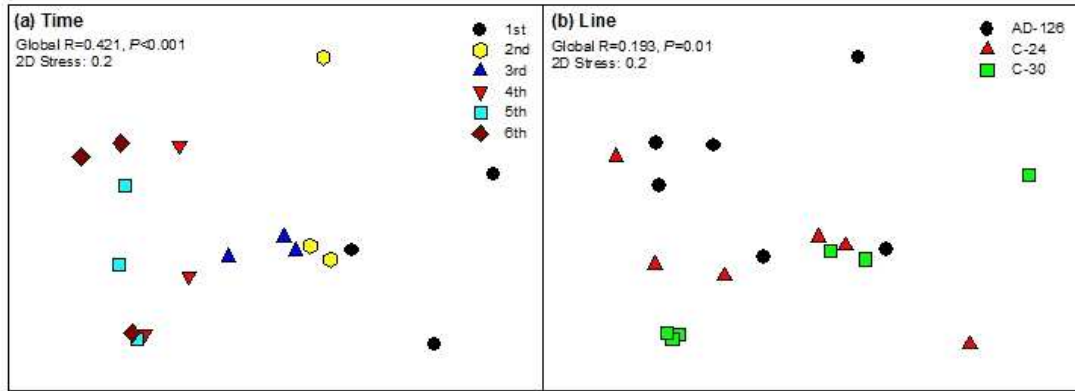


그림 3-16. Bray-Curtis similarity를 기반으로 분석한 절지동물 군집의 NMDS ordination 그래프(2012년). (a) 조사 시기에 따른 분석, (b) 양배추 계통에 따른 분석

표 3-31. 2012년에 각 양배추 계통에서 발견된 절지동물군집들의 PERMANOVA 결과

Source	df	F	P
Time	5	9.5015	<0.001
Line	2	4.9064	<0.001
Time × Line	10	0.5809	0.9266
Res	36		
Total	53		

양배추 각 계통간의 절지동물 군집의 차이를 알아보기 위해 ANOSIM을 수행하였는데, 모본인 AD126과 C24, C30 계통 간에 유의한 차이가 나타나는 것을 알 수 있었지만, 유전자변형 계통 간에는 차이가 나타나지 않았다(표 3-32).

표 3-32. 2012년에 각 양배추 계통에서 발견된 절지동물군집의 ANOSIM 분석 결과

Lines	R statistic	P
AD126, C24	0.222	0.007
AD126, C30	0.401	0.001
C24, C30	-0.025	0.57

앞의 결과를 통해 보여진 양배추 계통 간 절지동물 군집의 차이가 해충저항성 양배추가 표적 곤충인 배추좀나방(*Plutella xylostella*)과 배추흰나비(*Pieris rapae*)에 의해 나타난 것인지 검증하기 위하여 두 종의 밀도 데이터를 제외한 나머지 종들의 데이터를 적용하여 다양성 지수 산출과 군집구조 분석을 수행하였는데 그 결과 다양성 지수들에서는 조사 시기에 따른 차이만 나타났고 (표 3-33), NMDS와 PERMANOVA에서는 라인에 따른 절지동물 군집의 차이가 나타나지 않았으며, ANOSIM에서도 모본과 유전자변형 라인 간에 차이가 나타나지 않았다(그림

3-17, 표 3-34, 표 3-35). 또한 양배추 각 라인에서 나타난 배추좀나방의 시기별 밀도에서도 통계적으로 유의한 차이를 보였으며(RMANOVA, $P=0.009$), 배추흰나비 또한 통계적으로 유의하지는 않았지만(RMANOVA, $P=0.066$), AD126에서 배추흰나비 밀도가 높게 나타났다(그림 3-18).

표 3-33. 2012년에 발견된 절지동물의 종풍부도(d), Pielou 균등도(J'), Shannon-Wiener 다양도(H'), Simpson 다양도 지수($1-\lambda'$)의 반복측정 분산분석 (RMANOVA) (표적종을 제외한 데이터를 기반으로 산출함)

다양도 지수	조사시기	양배추 계통 (평균±표준오차)			유의성 (P)	
		AD126	C24	C30	시기	계통
d	9월 27일	1.79(0.06)	1.62(0.39)	1.24(0.23)	0.082	0.881
	10월 4일	1.52(0.20)	2.23(0.18)	2.03(0.29)		
	10월 11일	1.88(0.28)	1.98(0.17)	1.99(0.31)		
	10월 18일	1.92(0.14)	1.90(0.31)	2.13(0.02)		
	10월 25일	2.25(0.12)	1.78(0.04)	2.17(0.17)		
	11월 1일	1.96(0.11)	1.71(0.10)	2.04(0.24)		
J'	9월 27일	0.98(0.01)	0.98(0.01)	0.98(0.01)	<0.001	0.390
	10월 4일	0.94(0.02)	0.95(0.01)	0.97(0.01)		
	10월 11일	0.98(0.00)	0.97(0.01)	0.98(0.00)		
	10월 18일	0.99(0.01)	0.99(0.00)	0.99(0.00)		
	10월 25일	0.99(0.00)	0.98(0.01)	0.99(0.00)		
	11월 1일	0.99(0.00)	0.98(0.01)	0.99(0.00)		
H'	9월 27일	1.35(0.01)	1.20(0.26)	0.94(0.12)	0.013	0.881
	10월 4일	1.29(0.15)	1.67(0.10)	1.54(0.13)		
	10월 11일	1.47(0.20)	1.54(0.10)	1.55(0.19)		
	10월 18일	1.44(0.08)	1.42(0.16)	1.59(0.00)		
	10월 25일	1.65(0.06)	1.36(0.01)	1.59(0.12)		
	11월 1일	1.45(0.07)	1.27(0.09)	1.50(0.13)		
$1-\lambda'$	9월 27일	0.90(0.01)	0.85(0.07)	0.81(0.06)	0.010	0.828
	10월 4일	0.82(0.04)	0.89(0.02)	0.90(0.04)		
	10월 11일	0.89(0.03)	0.90(0.01)	0.91(0.02)		
	10월 18일	0.92(0.02)	0.91(0.04)	0.93(0.00)		
	10월 25일	0.94(0.01)	0.91(0.01)	0.95(0.01)		
	11월 1일	0.93(0.01)	0.90(0.00)	0.93(0.02)		

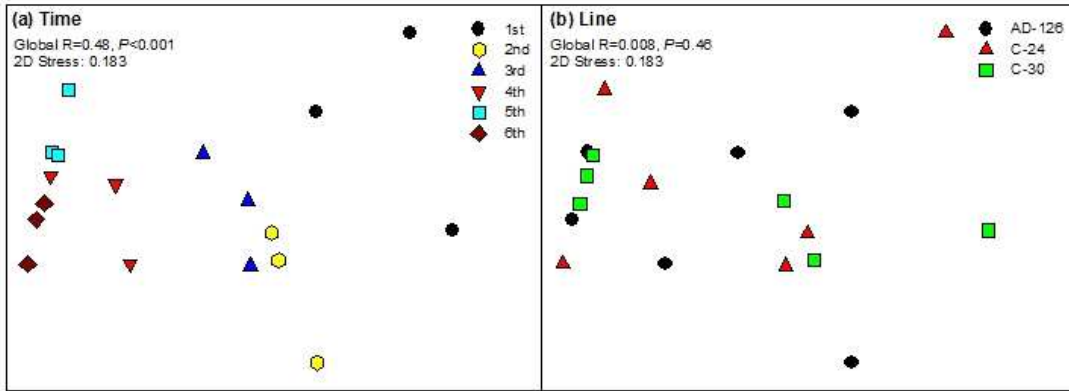


그림 3-17. Bray-Curtis similarity를 기반으로 분석한 절지동물 군집의 NMDS ordination 그래프(2012년). (a) 조사 시기에 따른 분석, (b) 계통에 따른 분석 (표적종을 제외한 데이터를 기반으로 산출함)

표 3-34. 2012년에 각 양배추 계통에서 발견된 절지동물군집들의 PERMANOVA 결과(표적종을 제외한 데이터를 기반으로 산출함)

Source	df	<i>F</i>	<i>P</i>
Time	5	11.773	<0.001
Line	2	0.567	0.705
Time × Line	10	0.868	0.636
Res	36		
Total	53		

표 3-35. 2012년에 각 양배추 계통에서 발견된 절지동물군집들의 ANOSIM 분석 결과(표적종을 제외한 데이터를 기반으로 산출함)

Lines	R statistic	<i>P</i>
AD126, C24	0.123	0.115
AD126, C30	-0.031	0.647
C24, C30	-0.019	0.552

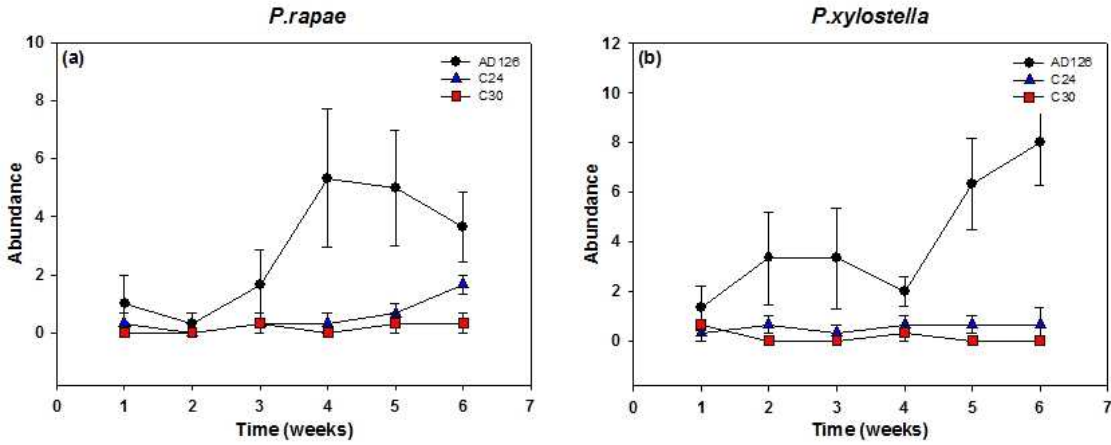


그림 3-18. 줌나방 내성 양배추와 모본 재배 포장에서 배추흰나비와 배추줍나방 밀도의 변화(2012년)

(2) 황색평판트랩 결과

황색평판트랩을 통해 채집하여 조사된 절지동물 밀도데이터를 통해 계산된 모든 종 다양도 지수는 조사 시기에 따라서는 유의한 영향을 받는 것으로 나타났고, 양배추 계통에 의해서는 Pielou 균등도(J')가 영향을 받았지만, 그 외의 지수들에서는 차이가 나타나지 않았으며 두 인자의 복합적 요인에 따른 차이는 나타나지 않았다(표 3-36).

표 3-36. 2012년에 황색평판트랩으로 포획한 절지동물의 종풍부도(d), Pielou 균등도 (J'), Shannon-Wiener 다양도 (H'), Simpson 다양도 지수 ($1-\lambda'$)의 반복측정 분산분석 (RMANOVA)

다양도 지수	조사시기	양배추 계통 (평균±표준오차)			유의성 (P)	
		AD-126	C-24	C-30	시기	계통
d	10월 12일	5.73(0.36)	5.60(0.24)	6.11(0.28)	<0.001	0.444
	10월 19일	5.74(0.33)	5.25(0.33)	5.12(0.29)		
	10월 26일	5.23(0.18)	4.67(0.15)	4.59(0.26)		
	11월 2일	5.15(0.17)	5.23(0.19)	5.04(0.28)		
J'	10월 12일	0.98(0.00)	0.98(0.00)	0.98(0.00)	<0.001	0.042
	10월 19일	0.99(0.00)	0.98(0.00)	0.98(0.00)		
	10월 26일	0.97(0.00)	0.97(0.00)	0.97(0.00)		
	11월 2일	0.98(0.00)	0.98(0.00)	0.97(0.00)		
H'	10월 12일	2.93(0.08)	2.91(0.05)	3.02(0.06)	<0.001	0.365
	10월 19일	2.96(0.08)	2.83(0.08)	2.82(0.07)		
	10월 26일	2.84(0.03)	2.70(0.04)	2.67(0.06)		
	11월 2일	2.85(0.04)	2.86(0.04)	2.80(0.07)		
$1-\lambda'$	10월 12일	0.98(0.00)	0.98(0.00)	0.98(0.00)	<0.001	0.223
	10월 19일	0.98(0.00)	0.97(0.00)	0.97(0.00)		
	10월 26일	0.97(0.00)	0.96(0.00)	0.96(0.00)		
	11월 2일	0.97(0.00)	0.97(0.00)	0.97(0.00)		

NMDS와 PERMANOVA의 결과에서는 앞서의 육안조사 결과와 마찬가지로 시기와 라인에

따른 유의한 절지동물 군집구조의 차이를 보였지만 ANOSIM에 따르면 모본과 유전자변형 라인뿐만 아니라 유전자변형 라인 간 (C24, C30)라인 간에도 절지동물 군집의 차이가 나타나는 것을 알 수 있었다(그림 3-19, 표 3-37, 38).

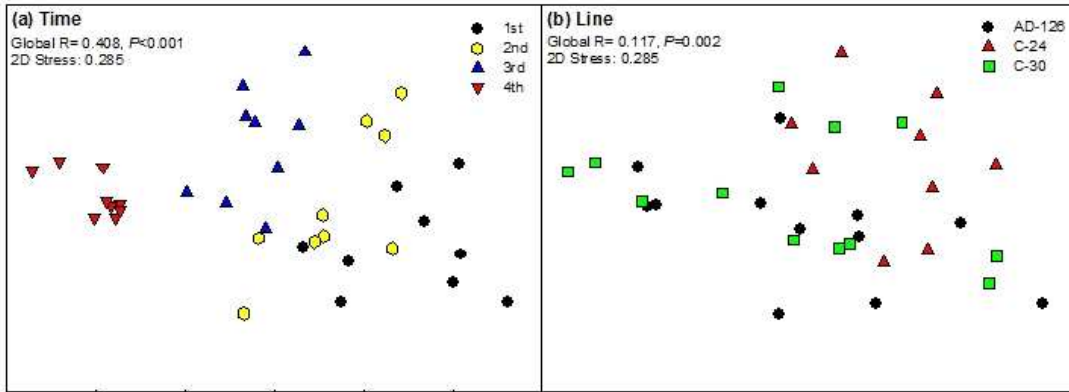


그림 3-19. Bray-Curtis similarity를 기반으로 분석한 2012년에 황색평판트랩으로 포획한 절지동물 군집의 NMDS ordination 그래프. (a) 조사 시기에 따른 분석, (b) 계통에 따른 분석

표 3-37. 2012년에 황색평판트랩으로 포획한 절지동물 군집의 PERMANOVA 결과

Source	df	F	P
Time	3	6.4594	<0.001
Line	2	1.9523	0.005
Time × Line	6	1.2293	
Res	60		
Total	71		

표 3-38. 2012년에 황색평판트랩으로 포획한 절지동물 군집의 ANOSIM 분석 결과

Lines	R statistic	P
AD126, C24	0.099	0.04
AD126, C30	0.146	0.01
C24, C30	0.097	0.05

황색평판트랩을 통한 절지동물 군집 조사결과도 육안조사결과와 마찬가지로 앞의 결과를 통해 보여진 양배추 라인 간 절지동물 군집의 차이가 해충저항성 양배추가 표적으로 하는 배추좀나방(*Plutella xylostella*)과 배추흰나비(*Pieris rapae*)에 의해 나타난 것인지 검증하기 위하여 두 종의 밀도 데이터를 제외한 나머지 종들의 데이터를 적용하여 다양성 지수 산출과 군집구조 분석을 수행하였는데 그 결과 다양성 지수들에서는 조사 시기에 따른 차이만 나타났고, NMDS와 PERMANOVA에서는 육안조사 결과와는 달리 라인에 따른 절지동물 군집의 차이가 여전히 나타나는 것을 확인 할 수 있었으며, ANOSIM에서도 모본과 유전자변형 라인

뿐만 아니라 유전자변형 라인 간 에서도 차이가 나타나는 것을 알 수 있었다(그림3-20, 표 3-39, 40, 41). 양배추 각 라인에서 나타난 배추좀나방의 시기별 밀도에서는 모본과 유전자 변형라인간의 유의한 차이가 나타났지만 (RMANOVA, $P=0.045$) 배추흰나비는 밀도의 양배추 라인 간 차이는 나타나지 않았다(그림 3-21). 한편 비표적 초식자인 진딧물과와 총채벌레과의 라인과 시기별 밀도의 변화를 살펴보았을 때, 진딧물과는 라인에 따른 차이가 나타나지 않았고, 총채벌레과는 라인에 따른 차이가 나타났지만(RMANOVA, $P=0.044$), AD126라인보다 오히려 유전자변형라인인 C24라인에서 더 높은 밀도를 보였다(그림3-22).

표 3-39. 2012년에 황색평판트랩으로 포획한 절지동물의 종풍부도(d), Pielou 균등도 (J'), Shannon-Wiener 다양도(H'), Simpson 다양도 지수($1-\lambda'$)의 반복측정 분산분석(RMANOVA) (표적종을 제외한 데이터를 기반으로 산출함)

다양도 지수	조사시기	양배추 계통 (평균±표준오차)			P-value	
		AD-126	C-24	C-30	시기	계통
d	10월 12일	5.53(0.37)	5.45(0.20)	5.96(0.26)	<0.001	0.541
	10월 19일	5.56(0.31)	5.09(0.32)	5.04(0.29)		
	10월 26일	5.07(0.14)	4.63(0.18)	4.43(0.23)		
	11월 2일	5.00(0.15)	5.04(0.18)	4.88(0.30)		
J'	10월 12일	0.98(0.00)	0.98(0.00)	0.98(0.00)	<0.001	0.085
	10월 19일	0.98(0.00)	0.98(0.00)	0.98(0.00)		
	10월 26일	0.97(0.00)	0.97(0.00)	0.97(0.00)		
	11월 2일	0.98(0.00)	0.98(0.00)	0.97(0.00)		
H'	10월 12일	2.89(0.09)	2.88(0.04)	2.99(0.06)	<0.001	0.486
	10월 19일	2.92(0.08)	2.79(0.08)	2.79(0.07)		
	10월 26일	2.80(0.03)	2.69(0.05)	2.63(0.06)		
	11월 2일	2.82(0.04)	2.82(0.04)	2.76(0.08)		
$1-\lambda'$	10월 12일	0.97(0.00)	0.98(0.00)	0.98(0.00)	<0.001	0.352
	10월 19일	0.98(0.00)	0.97(0.00)	0.97(0.00)		
	10월 26일	0.97(0.00)	0.96(0.00)	0.96(0.00)		
	11월 2일	0.97(0.00)	0.97(0.00)	0.96(0.00)		

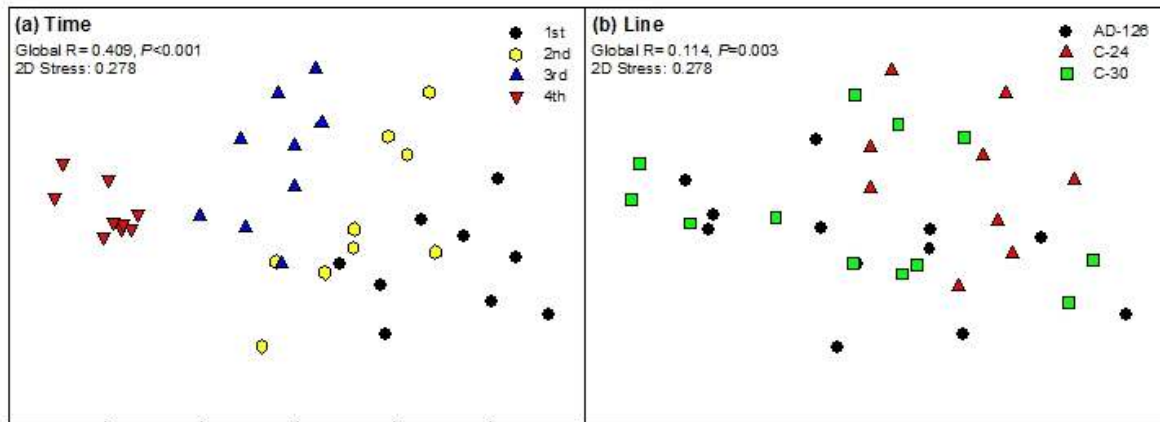


그림 3-20. Bray-Curtis similarity를 기반으로 분석한 2012년에 황색평판트랩으로 포획한 절지동물 군집의 NMDS ordination 그래프. (a) 조사 시기에 따른 분석, (b) 계통에 따른 분석 (표적종을 제외한 데이터를 기반으로 산출함)

표 3-40. 2012년에 황색평판트랩으로 포획한 절지동물 군집의 PERMANOVA 결과 (표적종을 제외한 데이터를 기반으로 산출함)

Source	df	<i>F</i>	<i>P</i>
Time	3	6.695	<0.001
Line	2	1.871	0.008
Time × Line	6	1.232	0.102
Res	60		
Total	71		

표 3-41. 2012년에 황색평판트랩으로 포획한 절지동물 군집의 ANOSIM 분석 결과 (표적종을 제외한 데이터를 기반으로 산출함)

Lines	R statistic	<i>P</i>
AD126, C24	0.105	0.025
AD126, C30	0.128	0.014
C24, C30	0.109	0.033

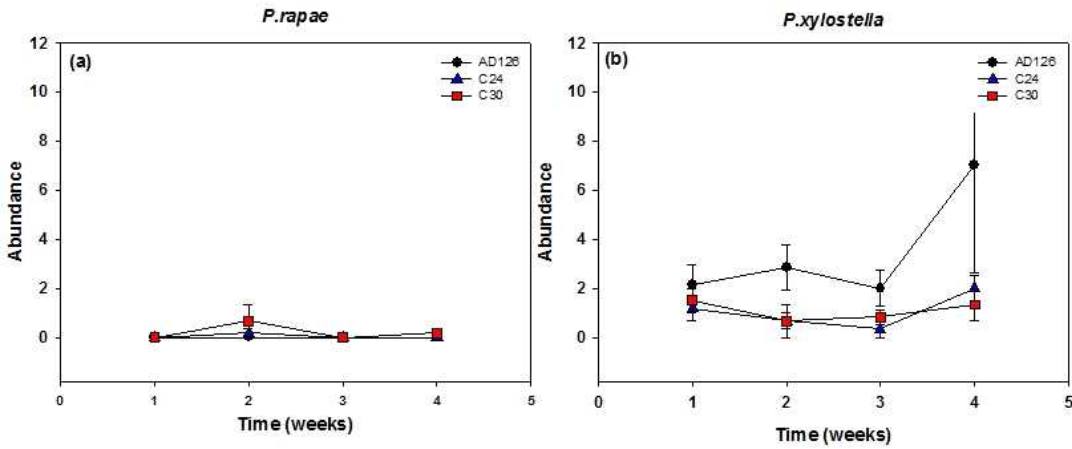


그림 3-21. 줌나방 내성 양배추와 모본재배 포장에서 배추흰나비와 배추줍나방의 시기별 밀도의 변화 (2012년 황색평판트랩)

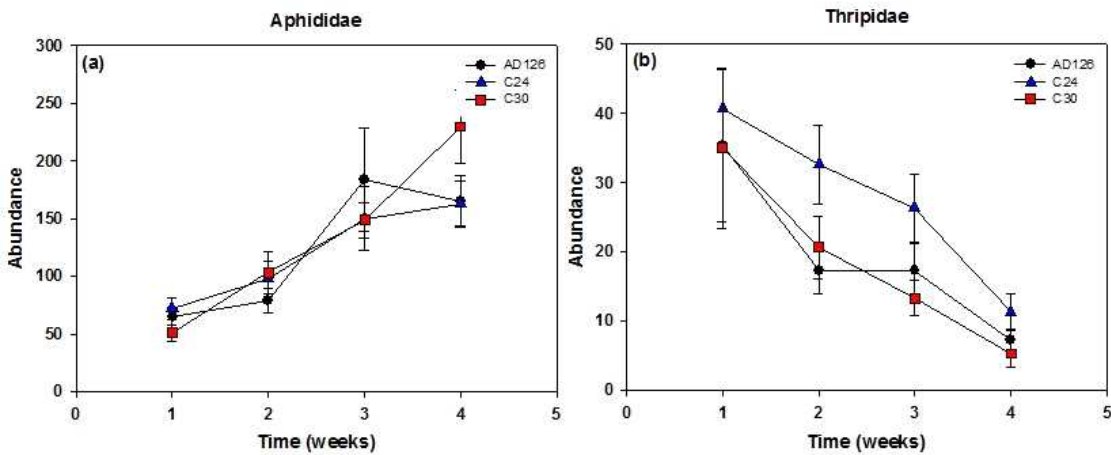


그림 3-22. 줌나방 내성 양배추와 모본 양배추 포장에서의 진딧물과와 총채벌레과의 시기별 밀도의 변화 (2012년 황색평판트랩)

이 결과들을 종합하여 볼 때, 육안조사를 통해 수행된 절지동물의 군집 구조의 양배추 라인 간 차이는 표적 종인 배추줍나방과 배추흰나비에 의해 나타나는 것을 알 수 있었으며, 이는 유전자변형 양배추는 배추줍나방과 배추흰나비의 유충의 밀도에 영향을 주었기 때문이라는 것을 알 수 있었고, 그 외의 비표적 종에게는 유전자변형 양배추가 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 주로 성체가 채집된 황색평판트랩 결과에서는 배추줍나방의 밀도는 모본과 유전자변형 라인 간의 차이가 나타났지만 배추흰나비에서는 차이가 나타나지 않았는데 이는 상대적으로 비행능력이 미약한 배추줍나방은 해충저항성 양배추 라인의 영향을 받지 않은 모본에서 우화한 다수의 유충들이 주변의 트랩에 채집된 것이고, 배추흰나비는 활발한 비행능력을 이용하여 우화 후 트랩에 채집되지 않고 이동한 것으로 사료된다.

다. 2013년도

C30과 모본인 AD126 품종에서 발견되는 절지동물의 밀도를 육안조사와 황색평판트랩(150mm

x 250mm, 그린아그로텍)을 이용하여 비교하였다. 절지동물의 밀도는 2013년 봄과 가을에 각각 수행하였다. 봄 조사 시에는 양배추를 2013년 4월 25일에 정식하였고, 가을 조사 시에는 2013년 9월 30일에 정식하였다. 두 조사 모두 양배추 계통 각각 5개의 반복 시험구로 구성하였다 (그림 3-23).

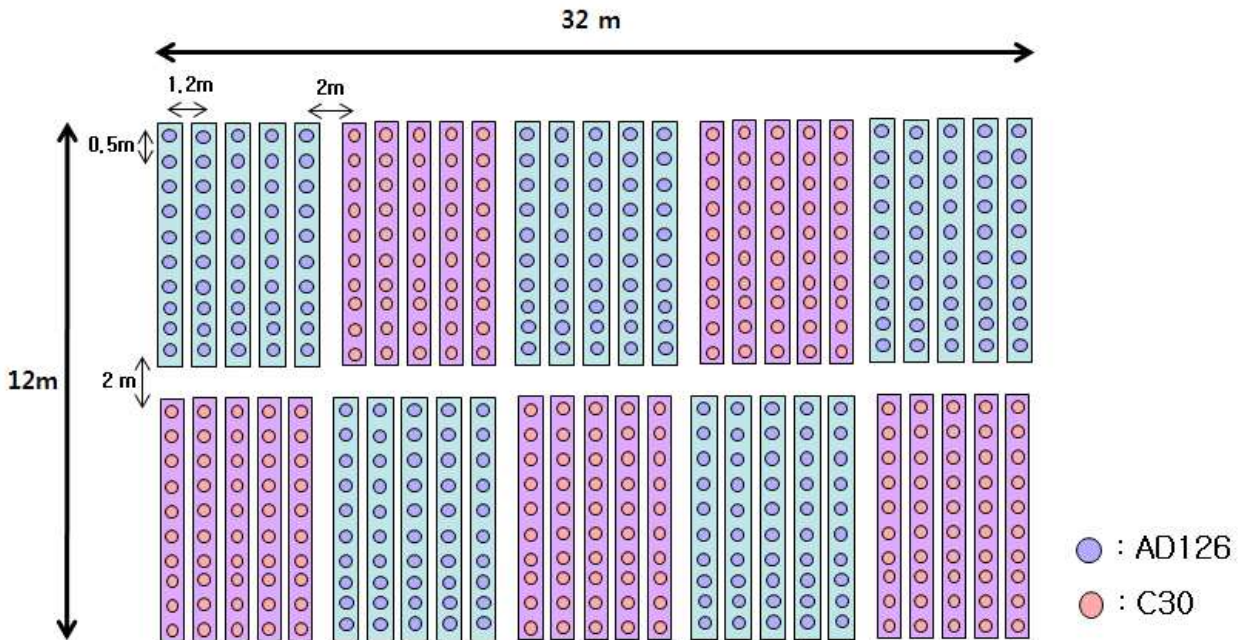


그림 3-23. 양배추 시험구 디자인 및 시험구 전경 (2013년)

절지동물 군집구조의 조사를 위하여 각각의 양배추에서 관찰되는 절지동물의 종과 밀도를 조사하기 위하여 봄 조사 때에는 2013년 5월 23일부터 7일 간격으로 6월 28일까지 총 6회 육안 조사와 황색평판트랩 채집을 수행하였고, 가을 조사 때에는 2013년 10월 11일부터 11월 15일

까지 7일 간격으로 총 6회 육안조사와 황색평판트랩 채집을 수행하였다. 육안조사와 황색평판트랩을 통해 채집된 절지동물 종들은 종 수준까지 동정하였고, 종 수준까지 분류가 되지 않았던 종은 과 수준까지 동정하여 기록하였다. 절지동물의 밀도조사 및 종의 분류가 완료된 후 곤충 군집 데이터로부터 Species richness (d), Pielou's evenness (J'), Shannon-Weiner diversity index (H')과 Simpson's diversity index ($1-\lambda'$)의 4가지 종 다양성지수를 계산하였으며, 조사시기와 양배추 계통의 두 인자와 그들의 상호작용을 고정인자로 하여 반복측정분산분석(repeated measures ANOVA)을 수행하였다. 그리고 각 양배추 계통에서 시기별로 변화하는 표적종 배추좀나방과 배추흰나비의 밀도를 다양성지수의 분석방법과 마찬가지로 조사시기와 계통의 두 인자와 그들의 상호작용을 고정인자로 하여 반복측정분산분석 (repeated measures ANOVA)을 수행하였다. 또한 표적종의 데이터를 제외한 나머지 비표적 절지동물 군집 데이터를 fourth-root 변환을 한 다음, Bray-curtis similarity를 구하여 non-metric multidimensional scaling (NMDS)과 Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)를 수행하여 비표적 절지동물 군집이 샘플링 시기 및 양배추 계통과 상호작용에 의한 차이가 있는지 알아보았다. 반복측정분산분석의 수행은 STATISTICA (version. 8.0)를 이용하였고 NMDS와 PERMANOVA는 Primer 6 & Permanova+ (version. 6.1.13)을 이용하였다.

(1) 봄 조사

(가) 육안조사

2013년 봄의 육안조사 결과 배추흰나비와 배추좀나방 모두 유전자변형 계통인 C30에서 모본인 AD126에 비해 낮은 밀도를 보여 모본과 유전자 변형 계통 간의 유의한 차이가 나타남을 알 수 있었다(RMANOVA, $P < 0.001$) (그림3-24).

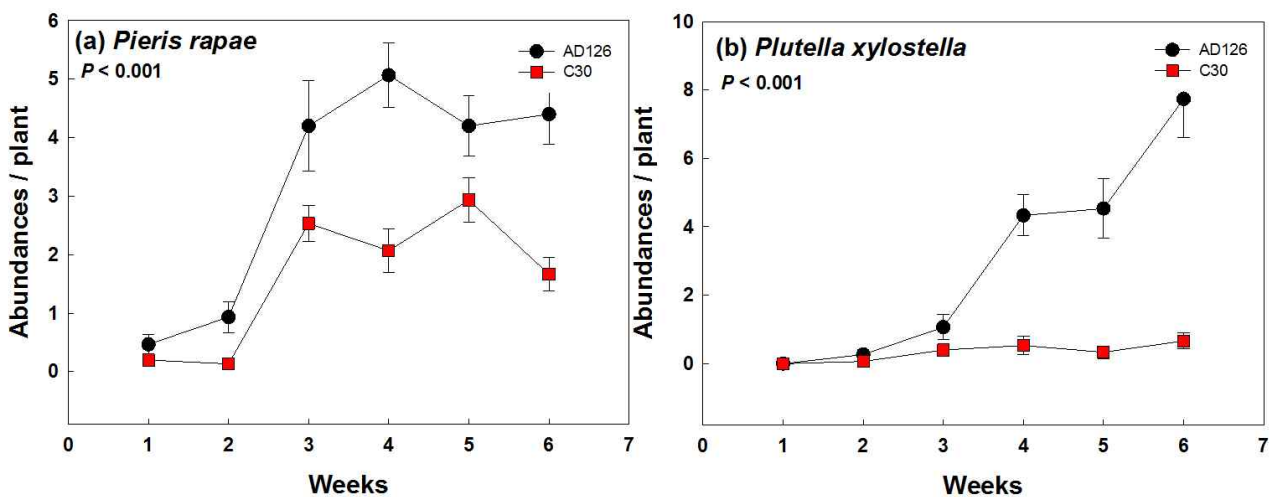


그림 3-24. 2013년 봄에 육안으로 관찰한 (a) 배추흰나비와 (b) 배추좀나방 밀도의 변화. AD126: 모본, C30: GM 양배추. 평균(±표준오차) (n=15)

비표적 절지동물의 밀도 데이터를 이용하여 계산한 종 다양성 지수는 조사 시기에 따라서는 유의한 영향을 받는 것으로 나타났지만, 양배추 계통에 의한 영향은 없었으며, 조사 시기와 양

배추 계통간의 상호작용에 따른 차이도 나타나지 않았다(표3-42).

표 3-42. 2013년 봄에 육안으로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 종풍부도(d), Pielou 균등도 (J'), Shannon-Wiener 다양성(H'), Simpson 다양성 지수($1-\lambda'$)의 반복측정 분산분석 (RMANOVA) 평균(\pm 표준오차) (n=3)

다양성 지수	조사시기	양배추 계통 (평균 \pm 표준오차)		유의성 (P)	
		AD126 (모본)	C30 (GM)	시기	계통
d	5월 23일	1.70 (0.18)	1.45 (0.23)	<0.001	0.983
	5월 30일	1.72 (0.22)	1.57 (0.11)		
	6월 7일	1.68 (0.33)	1.67 (0.20)		
	6월 15일	2.01 (0.23)	1.89 (0.12)		
	6월 22일	2.34 (0.23)	3.01 (0.23)		
	6월 28일	2.19 (0.07)	2.42 (0.22)		
	J'	5월 23일	0.76 (0.05)		
5월 30일		0.60 (0.06)	0.62 (0.05)		
6월 7일		0.48 (0.11)	0.57 (0.03)		
6월 15일		0.55 (0.08)	0.57 (0.07)		
6월 22일		0.78 (0.01)	0.86 (0.04)		
6월 28일		0.76 (0.08)	0.80 (0.04)		
H'		5월 23일	0.96 (0.14)	0.91 (0.22)	<0.001
	5월 30일	0.96 (0.10)	1.04 (0.11)		
	6월 7일	0.86 (0.26)	0.99 (0.04)		
	6월 15일	1.06 (0.17)	1.13 (0.15)		
	6월 22일	1.47 (0.05)	1.73 (0.04)		
	6월 28일	1.50 (0.14)	1.65 (0.06)		
	$1-\lambda'$	5월 23일	0.70 (0.04)	0.56 (0.16)	
5월 30일		0.53 (0.06)	0.56 (0.07)		
6월 7일		0.42 (0.14)	0.50 (0.02)		
6월 15일		0.51 (0.09)	0.54 (0.08)		
6월 22일		0.78 (0.03)	0.89 (0.03)		
6월 28일		0.76 (0.07)	0.81 (0.03)		

NMDS와 PERMANOVA의 결과에서도 다양성 지수의 결과와 마찬가지로 비표적 절지동물의 군집구조는 시간에 의한 영향을 받았지만 (PERMANOVA, $P < 0.001$), 양배추 계통에 따라서는 영향을 받지 않았다(그림3-25, 표3-42).

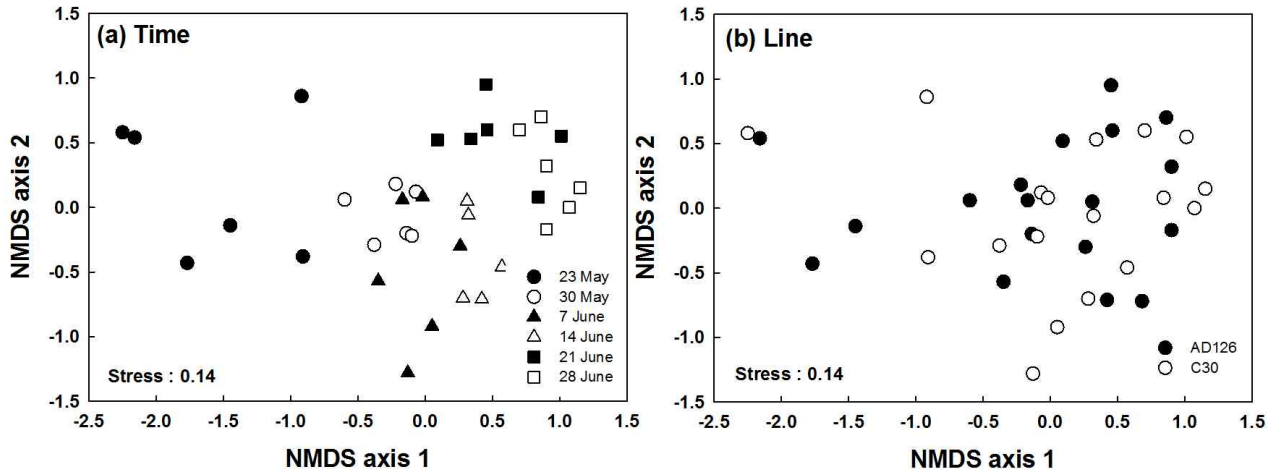


그림 3-25. 2013년 봄에 육안으로 관찰한 비표적 절지동물 군집 구조의 NMDS 분석.
 (a) 조사 시기에 따른 분석, (b) 양배추 계통에 따른 분석.

표 3-42. 2013년 봄에 육안으로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 PERMANOVA 분석

Source	df	<i>F</i>	<i>P</i>
Time	5	11.79	0.0001
Line	1	2.08	0.1297
Time × Line	5	0.79	0.6655
Residual	24		

(나) 황색평판트랩 조사

2013년 봄의 황색평판트랩 조사 결과 양배추 각 라인에서 나타난 배추좀나방의 시기별 밀도에서는 유전자변형라인인 C30에서 모본라인인 AD126에 비해 낮은 밀도를 보여 모본과 유전자 변형라인간의 유의한 차이가 나타남을 알 수 있었지만 (RMANOVA, $P = 0.006$), 배추흰나비의 경우 황색평판트랩에 극히 적은 수가 채집되어 라인간의 유의한 차이가 나타나지 않았다 (그림3-26).

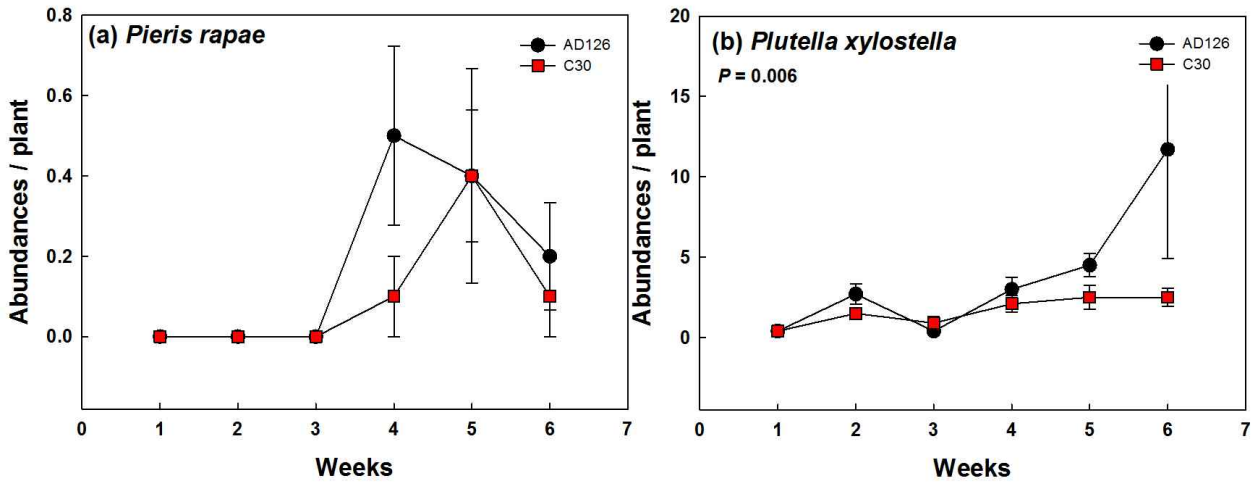


그림 3-26. 2013년 봄에 평판트랩으로 관찰한 (a) 배추흰나비와 (b) 배추좀나방 밀도의 변화 평균(\pm 표준오차) (n=10)

비표적 절지동물의 밀도데이터를 통해 계산된 종 다양성 지수는 2013년 봄의 육안조사와 마찬가지로 조사 시기에 따라서는 유의한 영향을 받는 것으로 나타났지만, 양배추 계통에 의한 영향은 없었으며, 조사 시기와 양배추 계통간의 상호작용에 따른 차이도 나타나지 않았다(표 3-43).

표 3-43. 2013년 봄에 평판트랩을 통해 관찰한 비표적 절지동물 군집의 종풍부도(d), Pielou 균등도(J'), Shannon-Wiener 다양성(H'), Simpson 다양성 지수($1-\lambda'$)의 반복 측정 분산분석 (RMANOVA) 평균(\pm 표준오차) ($n=10$)

다양성 지수	조사시기	양배추 계통 (평균 \pm 표준오차)		유의성 (P)	
		AD126	C30	시기	계통
d	5월 23일	2.77 (0.13)	2.92 (0.15)	<0.001	0.983
	5월 30일	2.89 (0.13)	2.74 (0.17)		
	6월 7일	3.39 (0.13)	3.37 (0.14)		
	6월 15일	2.89 (0.16)	2.74 (0.14)		
	6월 22일	3.00 (0.15)	3.20 (0.11)		
	6월 28일	2.93 (0.15)	2.91 (0.16)		
	J'	5월 23일	0.46 (0.02)		
5월 30일		0.47 (0.03)	0.41 (0.03)		
6월 7일		0.55 (0.01)	0.53 (0.01)		
6월 15일		0.59 (0.03)	0.60 (0.01)		
6월 22일		0.49 (0.01)	0.49 (0.02)		
6월 28일		0.43 (0.02)	0.48 (0.02)		
H'		5월 23일	1.29 (0.05)	1.43 (0.13)	<0.001
	5월 30일	1.37 (0.08)	1.19 (0.09)		
	6월 7일	1.70 (0.03)	1.61 (0.04)		
	6월 15일	1.70 (0.07)	1.69 (0.05)		
	6월 22일	1.46 (0.05)	1.50 (0.07)		
	6월 28일	1.27 (0.06)	1.42 (0.07)		
	$1-\lambda'$	5월 23일	0.53 (0.03)	0.58 (0.05)	
5월 30일		0.53 (0.04)	0.47 (0.04)		
6월 7일		0.70 (0.01)	0.67 (0.02)		
6월 15일		0.73 (0.02)	0.73 (0.01)		
6월 22일		0.61 (0.02)	0.61 (0.03)		
6월 28일		0.52 (0.03)	0.58 (0.03)		

NMDS와 PERMANOVA의 결과에서도 다양성 지수의 결과와 마찬가지로 비표적 절지동물의 군집구조는 시간에 의한 영향을 받았지만 (PERMANOVA, $P<0.001$), 양배추 계통에 따라서는 영향을 받지 않았다(그림 3-27, 표 3-44).

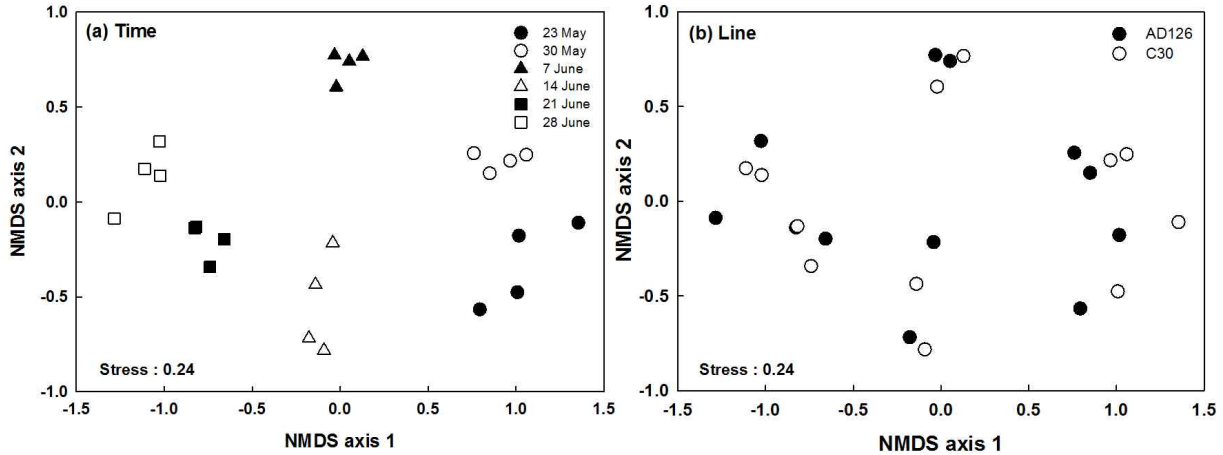


그림 3-27. 2013년 봄에 평판트랩으로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 NMDS 분석. (a) 조사 시기에 따른 분석, (b) 양배추 계통에 따른 분석

표 3-44. 2013년 봄에 평판트랩으로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 PERMANOVA 분석

Source	df	F	P
Time	5	18.03	0.0001
Line	1	0.58	0.8205
Time × Line	5	0.55	0.9890
Residual	108		

(2) 가을 조사

(가) 육안조사

2013년 가을의 육안조사 결과 양배추 각 라인에서 나타난 배추흰나비와 배추좀나방의 시기별 밀도에서는 두 종 모두 유전자변형라인인 C30에서 모본라인인 AD126에 비해 낮은 밀도를 보여 모본과 유전자 변형라인간의 유의한 차이가 나타남을 알 수 있었다(RMANOVA, $P < 0.001$)(그림 3-28).

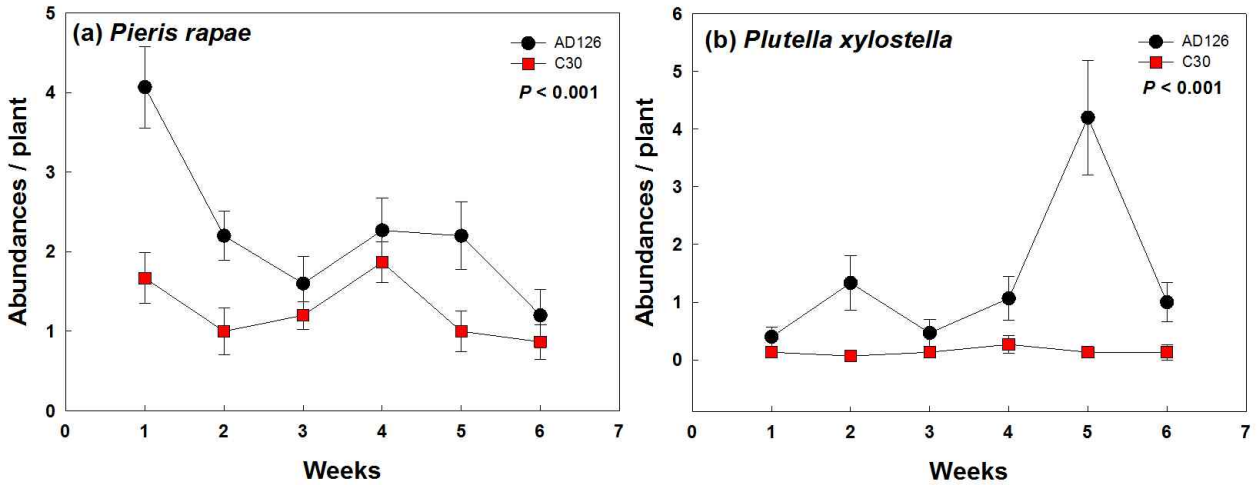


그림 3-28. 2013년 가을에 육안으로 관찰한 (a) 배추흰나비와 (b) 배추좀나방의 밀도 변화. 평균(±표준오차) (n=15).

비표적 절지동물의 밀도데이터를 통해 계산된 모든 종 다양성 지수(종 풍부도, Pielou 균등도, Shannon-Weiner 다양성 지수와 Simpson 다양성 지수)는 조사 시기에 따라서는 유의한 영향을 받는 것으로 나타났지만, 양배추 계통에 의한 영향은 없었으며, 조사 시기와 양배추 계통간의 상호작용에 따른 차이도 나타나지 않았다(표 3-45).

표 3-45. 2013년 가을에 육안으로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 종풍부도(d), Pielou 균등도 (J'), Shannon-Wiener 다양성 지수(H'), Simpson 다양성 지수($1-\lambda'$)의 반복측정 분산분석 (RMANOVA). 평균(\pm 표준오차) (n=3).

다양성 지수	조사시기	양배추 계통 (평균 \pm 표준오차)		유의성 (P)	
		AD126	C30	시기	계통
d	10월 11일	1.02 (0.02)	1.34 (0.20)	<0.001	0.467
	10월 18일	1.91 (0.35)	1.02 (0.45)		
	10월 25일	0.96 (0.15)	1.39 (0.23)		
	11월 1일	1.24 (0.37)	1.12 (0.32)		
	11월 8일	1.62 (0.28)	1.23 (0.26)		
	11월 15일	4.07 (1.16)	3.07 (0.85)		
	J'	10월 11일	0.47 (0.13)		
10월 18일		0.60 (0.02)	0.34 (0.06)		
10월 25일		0.83 (0.08)	0.62 (0.06)		
11월 1일		0.43 (0.12)	0.49 (0.04)		
11월 8일		0.51 (0.12)	0.48 (0.10)		
11월 15일		0.87 (0.06)	0.89 (0.03)		
H'		10월 11일	0.63 (0.20)	0.64 (0.17)	0.017
	10월 18일	1.03 (0.03)	0.45 (0.20)		
	10월 25일	0.92 (0.12)	0.87 (0.05)		
	11월 1일	0.64 (0.21)	0.67 (0.10)		
	11월 8일	0.73 (0.15)	0.62 (0.14)		
	11월 15일	1.16 (0.14)	1.15 (0.05)		
	$1-\lambda'$	10월 11일	0.37 (0.13)	0.40 (0.13)	
10월 18일		0.59 (0.02)	0.23 (0.10)		
10월 25일		0.61 (0.01)	0.52 (0.05)		
11월 1일		0.37 (0.15)	0.37 (0.06)		
11월 8일		0.45 (0.15)	0.35 (0.10)		
11월 15일		1.33 (0.41)	1.10 (0.14)		

NMDS와 PERMANOVA의 결과에서도 다양성 지수의 결과와 마찬가지로 비표적 절지동물의 군집구조는 시간에 의한 영향을 받았지만 (PERMANOVA, $P < 0.001$), 양배추 계통에 따라서는 영향을 받지 않음을 알 수 있었다(그림 3-29, 표 3-46).

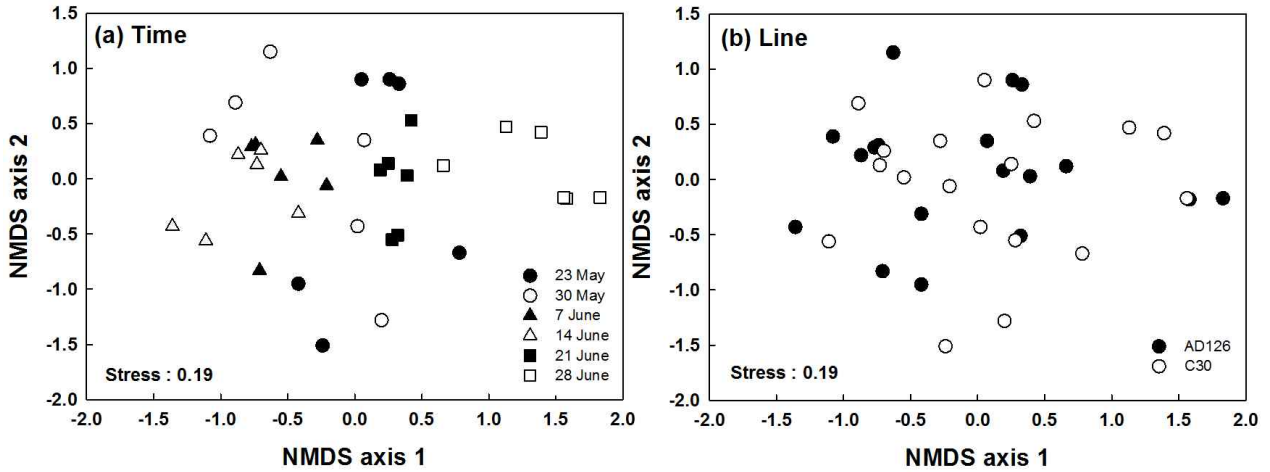


그림 3-29. 2013년 가을에 육안조사로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 NMDS 분석. (a) 조사 시기에 따른 분석, (b) 양배추 계통에 따른 분석

표 3-46. 2013년 가을에 육안조사로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 PERMANOVA 분석

Source	df	F	P
Time	5	8.32	0.0001
Line	1	1.33	0.2965
Time × Line	5	0.65	0.7757
Residual	24		

(나) 황색평판트랩 조사

2013년 가을의 황색평판트랩 조사 결과 양배추 각 라인에서 나타난 배추좀나방의 시기별 밀도에서는 유전자변형라인인 C30에서 모본라인인 AD126에 비해 낮은 밀도를 보여 모본과 유전자 변형라인간의 유의한 차이가 나타남을 알 수 있었지만 (RMANOVA, $P = 0.003$), 배추흰나비의 경우 2013년 봄 조사 때와 마찬가지로 황색평판트랩에 극히 적은 수가 채집되어 라인간의 유의한 차이가 나타나지 않았다(그림 3-30).

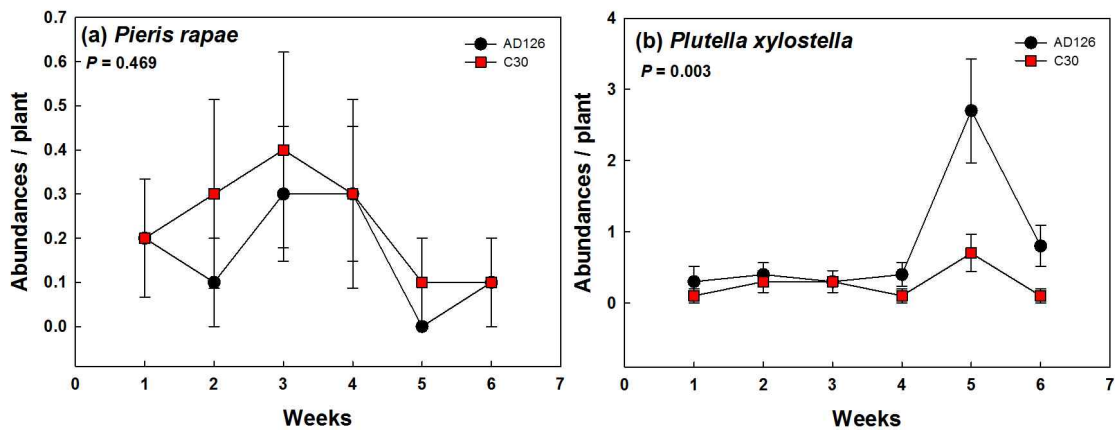


그림 3-30. 2013년 가을에 평판트랩으로 관찰한 (a) 배추흰나비와 (b) 배추좀나방 밀도의 변화. 평균(±표준오차) (n=10).

비표적 절지동물의 밀도데이터를 통해 계산된 모든 종 다양성 지수는 조사 시기에 따라서는 유의한 영향을 받는 것으로 나타났지만, 양배추 계통에 의한 영향은 없었으며, 조사 시기와 양배추 계통간의 상호작용에 따른 차이도 나타나지 않았다(표3-47).

표 3-47. 2013년 가을에 평판트랩으로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 종풍부도(d), Pielou 균등도(J'), Shannon-Wiener 다양성 지수(H'), Simpson 다양성 지수($1-\lambda'$)의 반복측정 분산분석 (RMANOVA). 평균(\pm 표준오차) (n=10).

다양성 지수	조사시기	양배추 계통 (평균 \pm 표준오차)		유의성 (P)	
		AD126	C30	시기	계통
d	10월 11일	2.88 (0.12)	2.95 (0.16)	<0.001	0.714
	10월 18일	2.97 (0.15)	2.88 (0.12)		
	10월 25일	3.06 (0.16)	3.13 (0.19)		
	11월 1일	2.94 (0.13)	2.75 (0.18)		
	11월 8일	2.68 (0.17)	2.71 (0.14)		
	11월 15일	1.93 (0.20)	2.28 (0.14)		
J'	10월 11일	0.63 (0.02)	0.71 (0.02)	<0.001	0.539
	10월 18일	0.69 (0.03)	0.71 (0.02)		
	10월 25일	0.64 (0.02)	0.64 (0.04)		
	11월 1일	0.54 (0.05)	0.50 (0.04)		
	11월 8일	0.59 (0.05)	0.57 (0.03)		
	11월 15일	0.63 (0.03)	0.70 (0.03)		
H'	10월 11일	1.78 (0.06)	1.99 (0.08)	<0.001	0.489
	10월 18일	1.93 (0.08)	1.95 (0.05)		
	10월 25일	1.80 (0.07)	1.80 (0.11)		
	11월 1일	1.51 (0.13)	1.35 (0.10)		
	11월 8일	1.57 (0.13)	1.52 (0.07)		
	11월 15일	1.36 (0.10)	1.62 (0.09)		
$1-\lambda'$	10월 11일	0.75 (0.02)	0.79 (0.02)	<0.001	0.589
	10월 18일	0.77 (0.03)	0.79 (0.01)		
	10월 25일	0.72 (0.02)	0.72 (0.04)		
	11월 1일	0.59 (0.05)	0.54 (0.05)		
	11월 8일	0.62 (0.05)	0.61 (0.03)		
	11월 15일	0.61 (0.04)	0.70 (0.03)		

NMDS와 PERMANOVA의 결과에서도 다양성 지수의 결과와 마찬가지로 비표적 절지동물의 군집구조는 시간에 의한 영향을 받았지만 (PERMANOVA, $P < 0.001$), 양배추 계통에 따라서는 영향을 받지 않았다(그림3-31, 표3-48).

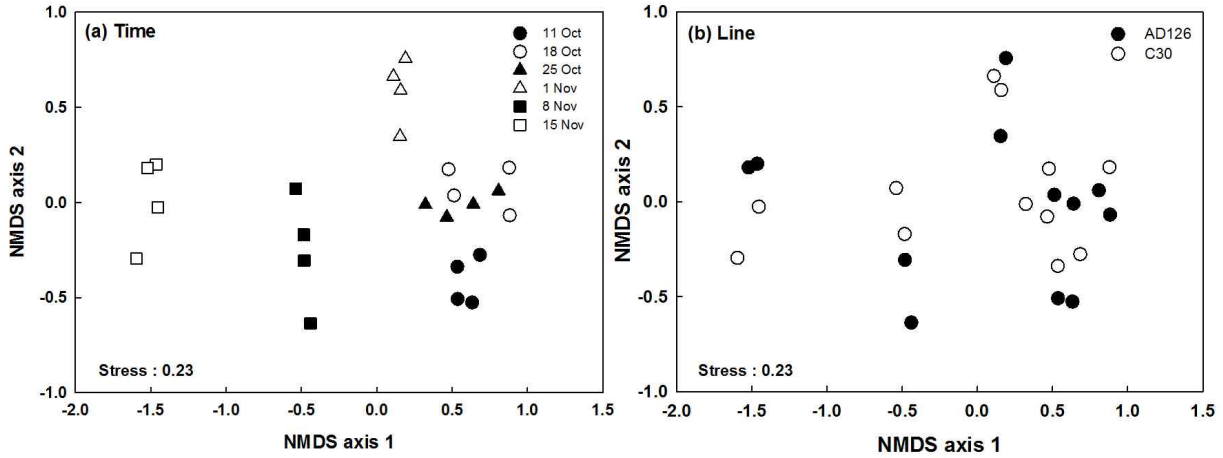


그림 3-31. 2013년 가을에 평판트랩으로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 NMDS 분석. (a) 조사 시기에 따른 분석, (b) 양배추 계통에 따른 분석

표 3-48. 2013년 가을에 평판트랩으로 관찰한 비표적 절지동물 군집의 PERMANOVA 분석

Source	df	F	P
Time	5	16.53	0.0001
Line	1	1.42	0.1848
Time × Line	5	1.38	0.0570
Res	108		

2013년 봄과 가을의 육안조사 및 황색평판트랩의 조사결과들을 살펴보면, 살충성 단백질인 *Cry1AcI*을 발현하는 C30 양배추는 모본작물인 AD126에 비해 효과적으로 두 종의 표적해충인 배추흰나비와 배추좀나방을 방제하는 것을 알 수 있었으며, 그중 배추좀나방에 더 효율적으로 작용하는 것을 알 수 있었다. 표적종의 밀도변화 양상은 육안조사와 황색평판트랩 채집 두 가지의 방법 중 육안조사가 더 효율적으로 모니터링 할 수 있음을 알 수 있었으며, 그 이유는 황색평판트랩은 비행성을 갖게되는 배추흰나비와 배추좀나방 성체를 효과적으로 채집할 수 없었기 때문이고, 또한 비행중에 채집된 것이기 때문에 포획된 개체가 황색평판트랩이 설치된 해당 시험구에서 우화한 것인지 확인할 수도 없다. 그러므로 표적종의 모니터링은 황색평판트랩보다는 육안조사방법을 이용하는 것이 더욱 효율적이라 할 수 있다.

다음으로 비표적 절지동물들의 밀도데이터를 통하여 분석한 다양성 지수와 군집구조의 분포를 시각적으로 보여주는 NMDS, 그리고 특정 인자가 곤충의 군집에 영향을 미치는지 통계적으로 보여주는 PERMANOVA 결과들을 살펴보면, 비표적 절지동물의 군집은 시기에 의해 강한 영향을 받았지만, 양배추 라인에 따라서는 영향을 받지 않았다. 결국 표적종을 제외한 비표적 절지동물은 밀도의 측면으로 보았을 때 살충성 단백질 발현 양배추의 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

6. *Bt* 양배추의 비표적 생물체에 미치는 영향 평가

가. 파밤나방 (*Spodoptera exigua*)

좀나방 내성 *Bt* 양배추가 파밤나방 (*Spodoptera exigua*)의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실내 실험을 시행하였다. 플라스틱 통 (직경x높이: 12x9 cm)에 필터페이퍼(9 cm)를 깔 후, 비슷한 크기의 양배추 잎 (*Bt* 양배추 C30 혹은 모본 AD126) 한 장을 넣고 파밤나방 애벌레 (1-2 day old) 세 마리를 페인트 붓으로 조심스럽게 양배추 잎 위에 올려 놓았다 (n=21). 플라스틱 통은 애벌레들이 달아나지 않도록 (통기를 위한 구멍을 만들은) 뚜껑을 덮었으며, 약 25±1°C, 습도 50±5% 낮밤 길이 16:8 (L:D) h 로 유지되는 항온항습실 안에서 유지하면서 매일 모니터링 하여, 각 애벌레들이 용화하고 우화 할 때 까지 관찰하였다.

실험에 사용된 양배추는 과종 후 60-80 일 지난 개체들을 사용하였으며, 처음 일주일 간은 이틀에 한 번 애벌레에게 새 잎을 제공하였고, 이후에는 날마다 새 잎을 제공하였다. 실험 시작 후 14일 이후에는 용화를 돕기 위하여 플라스틱 통에 상토 (원예용, 부농(주)) (높이 약 2cm)를 깔은 후 필터페이퍼를 위에 얹은 후 잎을 넣었다. 대부분의 애벌레는 상토 속에서 고치를 만들고 용화하였다.

용화한 개체들은 용화한 뒤 3-4 일 후, 고치를 상토로부터 다른 필터페이퍼를 깔은 플라스틱 통이나 페트리 디쉬 (9 cm)로 옮긴 뒤, 용을 고치로부터 분리하여 용의 무게를 재었다. 무게를 재 용은 우화할 때까지 지속적으로 모니터링 하였다. 우화할 때 까지 걸린 기간은 세 마리 중 가장 먼저 우화한 개체를 기준으로 계산하였으며, 우화시까지 걸린 기간을 구한 개체의 무게를 용의 무게로 이용하였다. 두 마리 이상의 개체가 같은 날 우화한 경우는 개체들의 용의 무게를 평균하여 평균값을 이용하였다.

실험결과, 배추좀나방 내성 *Bt* 양배추 (C30) 잎을 먹고 자란 파밤나방의 생장이 모본의 잎을 먹고 자란 애벌레들 보다 늦었다 (t-Test; t=3.29, p<0.01) (표 49). 또한 *Bt* 양배추 잎 (C30)을 먹고 자란 애벌레들의 용의 무게가 모본 잎을 먹고 자란 애벌레들의 용의 무게에 비해 상대적으로 덜 나감을 관찰하였다 (t-Test; t=5.19, p<0.0001). 이상의 결과는 배추좀나방 내성 *Bt* 양배추가 파밤나방의 생장에도 어느 정도 부정적인 영향을 미침을 시사한다.

표 3-49. 좀나방 내성 *Bt* 양배추와 모본 AD126에서의 파밤나방 (*Spodoptera exigua*) 생장 기간 및 용(pupae) 무게

	AD126	C30
Development time (days)	18.90±0.18	20.05±0.30
Pupae weight (mg)	105.72±1.91	89.87±2.38

나. 복숭아혹진딧물 (*Myzus persicae*)

좀나방 내성 *Bt* 양배추가 복숭아혹진딧물에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 아크릴 케이지 (30x30x30 혹은 30x30x35 cm) 안에 AD126, C30 각 두 개체씩 (대각선으로 같은 계통의 식물을 배치) 위치시킨 후, 복숭아혹진딧물 (*Myzus persicae*) 성충 10마리를 넣고 72시간 후 각 식물체에 낳은 약충의 수를 세었다 (n=13).

또한, 진딧물의 performance (parameter: development time and an intrinsic rate of increase)

를 측정하기 위하여, AD126, C30 각각의 개체 당 세 마리의 성충진딧물을 접종 시킨 후, 24시간 뒤 성충진딧물과, 세 마리의 어린 약충을 제외한 나머지 약충들을 제거하였다. 세 마리의 약충은 3일 뒤에 다시 한 마리만 남기고 제거하였으며, 남겨진 한 마리는 성충이 될 때까지 모니터링 하였다. r_m (the intrinsic rate of increase)은 성충이 된 후 번식을 시작할 때까지 걸린 기간만큼의 기간 동안 지속적으로 성충을 더 모니터링 하여 그 기간 동안 생산한 총 약충의 수를 구하여 계산하였다 (n=15). Development time은 아래와 같이 정의하였으며, r_m 은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Development time (D)} = \text{time taken from birth to final moult}$$

$$r_m \text{ (an intrinsic rate of increase)} = 0.74 * \ln(Md/T)$$

Md: reproductive output per female during period equal to T

T: the time from birth to onset of reproduction

0.74: correction factor

AD-126, C30은 파종 후 30-40일 지난 유식물을 화분(직경 9 cm)에 상토 (원예용 상토, 부농(주))를 이용하여 옮겨 심은 후 십여 일 (40-50일) 지난 개체 (잎의 수 8-10개)을 이용하였고, 진딧물은 성충이 된 후 3-4일이 지나 reproduction이 가능한 개체들을 이용하였다. 실험은 약 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 낮밤 길이 16:8 (L:D) h 로 유지되는 항온항습실에서 실시하였다.

실험결과, 복숭아 흑진딧물 성충이 72시간동안 낳은 약충의 수는 AD126, C30에서 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 (GLM-quasipoisson, $t=0.24$, $p=0.81$) (표 3-50), 이는 복숭아 흑진딧물이 번식을 위한 기주 선택 시 AD126 과 C30을 구별하지 않았음을 시사한다.

표 3-50. 좁나방 내성 *Bt* 양배추와 모본 AD126에서 복숭아흑진딧물 (*Myzus persicae*)이 72 시간동안 생산한 약충 (nymphs)의 수 (n=13)

	AD126	C30
Offspring deposited over 72 h	21.85±1.78	22.54±2.18

또한, AD-126과 C30에서 복숭아 흑진딧물의 development time이나 r_m 역시 유사함을 알 수 있었으며 (development time: Wilcoxon rank sum test, $W=127$, $p=0.48$; r_m : t-Test $t=1.15$, $p=0.26$) (표 3-51), 이는 AD126, C30이 복숭아 흑진딧물의 기주의 질 (quality) 측면에서 큰 차이가 없음을 시사한다.

표 3-51. 좁나방 내성 *Bt* 양배추와 모본 AD126에서 측정한 복숭아흑진딧물(*Myzus persicae*) performance parameters. n=13 for D, n=15 for r_m .

	AD126	C30
D(development time)	5.80±0.17	5.93±0.12
r_m (intrinsic rate of increase)	0.67±0.13	0.84±0.07

이상의 두 실험의 결과로 볼 때, *CryIAc1* 단백질이 삽입된 좀나방 내성 *Bt* 양배추 C30이 복숭아혹진딧물에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. 이 연구 결과는 한국응용곤충학회지에 논문으로 게재하였다(남기정 등, 2014. *Bt* 양배추가 복숭아혹진딧물의 발육과 기주선택에 미치는 영향. 한국응용곤충학회지 53:193-197).

다. 별늑대거미 (*Pardosa astrigera*)

Bt 양배추가 비표적 포식자인 별늑대거미(*Pardosa astrigera*)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *Bt* 양배추를 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)에 먹이로 공급하여 *Bt* 독소를 초파리에 노출 시키고 체내에 *Bt* 독소를 보유하게 된 초파리를 별늑대거미에게 공급하여 이들의 생활사적 특징 및 생존, 성장을 기록하여 비교하였다.



그림 3-32. 채집한 알집을 보유한 별늑대거미 암컷 성체

이를 위하여 2013년 7월 말 알집을 보유한 별늑대거미의 암컷 성체(그림 3-32)를 한국생명공학연구원 LMO 격리포장에서 20마리 채집하였고 곤충 사육실 (16:8 L:D, 26±2, 60±5% RH)에서 사육하여 별늑대거미 유체를 부화시켰다. 부화된 별늑대거미 유체는 초파리용 시험관에서 사육하였으며(그림3-33), 각각의 시험관에 원예용 상토를 3cm 깊이로 채워 습도를 유지시켰다. 이때 알집에서 부화한 별늑대거미 유체는 스스로 초파리를 포식할 수 없으므로 하나의 시험관에 3마리의 별늑대거미 유체를 넣어 서로 포식하게 하여 1마리의 3령 별늑대거미 유체를 선별하여 실험을 진행하였다.



그림 3-33. 별늑대거미 사육 시스템

별늑대거미의 먹이가 되는 초파리에 *Bt* 독소를 노출시키기 위하여 일반적으로 사용되는 초파리의 배지에 동결건조하여 분말화 한 *Bt* 양배추와 모본 양배추를 1:1의 비율 (초파리배지 : 양배추)로 mix하여 초파리를 사육하였고, *Bt* 양배추가 포함된 초파리군과 모본 양배추가 포함된 초파리군의 2그룹으로 나누어 별늑대거미를 사육하여 생활사적 특성을 비교하였다. 생활사적 특성 (령기 간 탈피간격, 생존률)은 별늑대거미가 사망하거나 성체가 될 때 까지 진행하였으며, 생활사적 특성 조사가 끝난 별늑대거미는 해부현미경 하에서 다음과 같은 형태를 측정하였다 (그림 3-34).

- 머리가슴의 폭(Carapace width)
- 머리가슴의 길이(Carapace length)
- 머리가슴지수(Carapace index, Carapace width/Carapace length × 100)
- 왼쪽 다리경절 길이
- 무게(fresh weight)



그림 3-34. 별늑대거미의 크기 측정

측정이 끝난 별늑대거미 성체와 *Bt* 양배추와 모본양배추가 혼합된 2가지 그룹의 초파리 배지, 각각의 배지에서 자란 초파리를 동결건조 한 후 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하여 *Bt* 단백질의 양을 측정하였다. 별늑대거미의 처리군 별 령기 간 발육 기간과 크기 차이의 비교는 Student's t-test를 수행하였고, 생존률의 차이의 비교는 Log-rank

test를 수행하여 통계적 유의성을 검증 하였으며, 이를 위해 STATISTICA (version. 8.0)를 이용하였다.

(1) *Cry1Ac1* 단백질의 양 측정

ELISA를 수행하여 *Cry1Ac1*의 농도를 분석한 결과 *Bt* 양배추를 섞은 초파리배지와 이를 먹이로 한 초파리는 유의하게 *Cry1Ac1* 단백질이 검출되는 것을 알 수 있었으며, 또한 *Bt* 양배추에 노출된 초파리를 먹이로 한 별늑대거미에서도 *Cry1Ac1*이 검출되는 것을 확인할 수 있었다(그림 3-35).

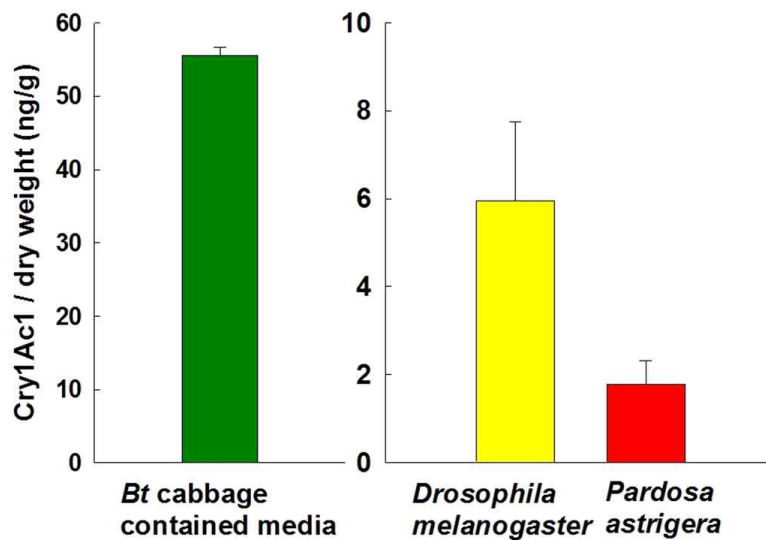


그림 3-35. *Bt* 양배추가 포함된 초파리배지, *Bt*-배지에서 자란 초파리, *Bt*-배지에서 성장한 초파리를 섭취한 별늑대거미의 *Bt* 단백질 농도(ELISA 결과).

(2) 별늑대거미의 생활사적 특성 및 크기 조사

별늑대거미의 생활사적 특성을 알아본 결과 각 life stage 별 발육기간은 *Bt* 양배추 (C30)와 모본 양배추 (AD126) 간에 유의한 차이는 보이지 않았으며(표3-11), 생존률에서도 처리군 간 유의한 차이가 나타나지 않았으며 또한 처리군 간 별늑대거미의 생존률 및 크기에서도 차이를 보이지 않았다(그림 3-36, 표 3-52, 53).

표 3-52. 별늑대거미의 처리군 별 령기 간 발육기간(Student's t-test, mean±se)

Development time	AD126	C30	<i>P</i>
3 rd instar	6.23 (0.29) (n=30)	6.83 (0.29) (n=29)	0.156
4 th instar	11.50 (0.63) (n=30)	10.86 (0.43) (n=29)	0.409
5 th instar	11.87 (0.39) (n=30)	12.07 (0.52) (n=29)	0.758
6 th instar	16.3 (0.74) (n=30)	15.04 (0.68) (n=27)	0.228
7 th instar	18.5 (1.08) (n=10)	16.75 (0.59) (n=26)	0.248
3 rd instar to adult	52.14 (1.00) (n=28)	50.08 (1.19) (n=26)	0.118

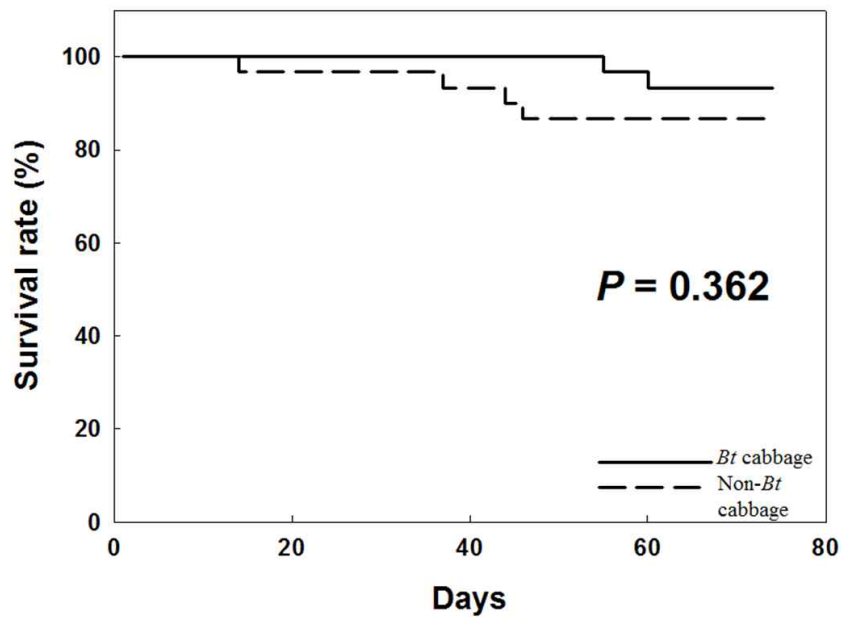


그림 3-36. 처리군 별 별늑대거미의 생존률(Log-rank test)

표 3-53. 별늑대거미의 처리군 별 크기(Student's t-test, mean±se)

Characteristics	AD126 (n=28)	C30 (n=26)	<i>P</i>
Fresh weight (mg)	23.80 (0.60)	24.40 (0.80)	0.501
Crapace width (mm)	2.23 (0.02)	2.19 (0.02)	0.261
Carapace length (mm)	2.90 (0.03)	2.85 (0.03)	0.386
Carapace index	76.95 (0.47)	76.79 (0.60)	0.828
Tibia length	2.38 (0.04)	2.33 (0.04)	0.489

요약하면, 별늑대거미는 *Bt* toxin에 노출된 초파리의 섭취를 통해 *Bt* toxin이 체내에 들어갔으며, 그럼에도 불구하고 성장의 정도를 반영하는 령기 간 발육기간과 크기, 그리고 생존에 영향을 받지 않는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 결과를 토대로 보았을 때 비표적 포식자인 별늑대거미는 *Cry1Ac1* 발현 양배추에 부정적인 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.

라. 톡토기 (*Paronychiurus kimi*)

좁나방 내성 *Bt* 양배추에서 발현하는 *Cry1Ac1*단백질이 비표적 토양절지동물인 톡토기 (*Paronychiurus kimi*)(그림3-37)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 gene cloning의 과정을 통해 대량발현된 *Cry1Ac1*단백질을 톡토기의 먹이가 되는 Brewer's yeast에 특정 농도가 되도록 만든 후 톡토기에 먹이로 공급하면서 생활사적 특성 및 성장의 차이를 조사하였다.



그림 3-37. *Paronychiurus kimi*

2014년 10월 고려대학교 조기종 교수 연구팀으로부터 실험대상종인 *P.kimi*를 분양받았다. 톡토기의 증식을 위해 plaster of paris (석고붕대용 분말), 활성 charcoal, 증류수를 4:1:4의 비율로 섞어서 플라스틱 페트리디쉬 (9.5cm 직경) 에 0.5cm 높이로 부은 후 상온에서 굳혀 사용하였다. 이들은 톡토기의 활력이 가장 안정적인 것으로 알려진 온도 ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$)와 습도 (상대습도 95%; 밀봉된 페트리디쉬 안의 상대습도)로 조정된 항온장치에서 사육하며, 사육 중에는 항상 빛이 들어오지 않게 한다. 먹이로는 Brewer's yeast를 증류수에 녹여 사용하며 1주에 2회 공급하였다. 2015년 3월까지 톡토기를 증식하면서 동일 연령의 성체 그룹을 만들었고, 이들로부터 알을 받아 부화시키고, 부화한지 5일된 동일연령의 톡토기 약충을 대상으로 실험을 시작하였다. 동일연령의 톡토기 약충은 각각의 처리군 별로 20마리씩 페트리디쉬에 접종하여 5반복이 되도록 하여 실험을 진행하였으며, 이때 처리구의 먹이조건은 표 3-54 와 같이 하였다.

표 3-54. *P. kimi*의 먹이 조건 (Brewer's yeast에 포함된 *Cry1Ac1*의 농도)

Treatments	<i>Cry1Ac1</i> concentration	비고
대조구	0 ng/g	
처리구 1	100 ng/g	좁나방 내성 <i>Bt</i> 양배추의 <i>Cry1Ac1</i> 발현량 범위를 기준으로 하였음.
처리구 2	200 ng/g	
처리구 3	1000 ng/g	

실험은 총 84일 간 진행하였으며, 먹이는 1주에 2회씩 공급하였고, 이때 각각의 페트리디쉬에 살아남은 툭토기의 수를 기록하였다. 툭토기의 성장률을 알아보기 위해 1주일에 1회씩 페트리디쉬 안에 있는 툭토기를 무작위로 10마리 선택하여 해부현미경에 마운트된 디지털카메라 (excope X3, Korea)를 이용하여 각각의 개체의 길이를 측정하였다. 툭토기의 처리군 별 크기 차이의 비교는 반복측정분산분석 (Repeated measures ANOVA)을 수행하였고, 생존률의 차이의 비교는 생존분석 (Comparing multiple samples)을 수행하여 통계적 유의성을 검증 하였으며, 이를 위해 STATISTICA (version. 8.0)를 이용하였다.

(1) *Cry1Ac1* 단백질의 양 측정

ELISA를 수행하여 툭토기 체내의 *Cry1Ac1*의 농도를 분석한 결과 *Cry1Ac1*단백질이 포함된 먹이를 먹은 툭토기 군에서는 *Cry1Ac1* 단백질이 검출되는 것을 알 수 있었다(그림3-38).

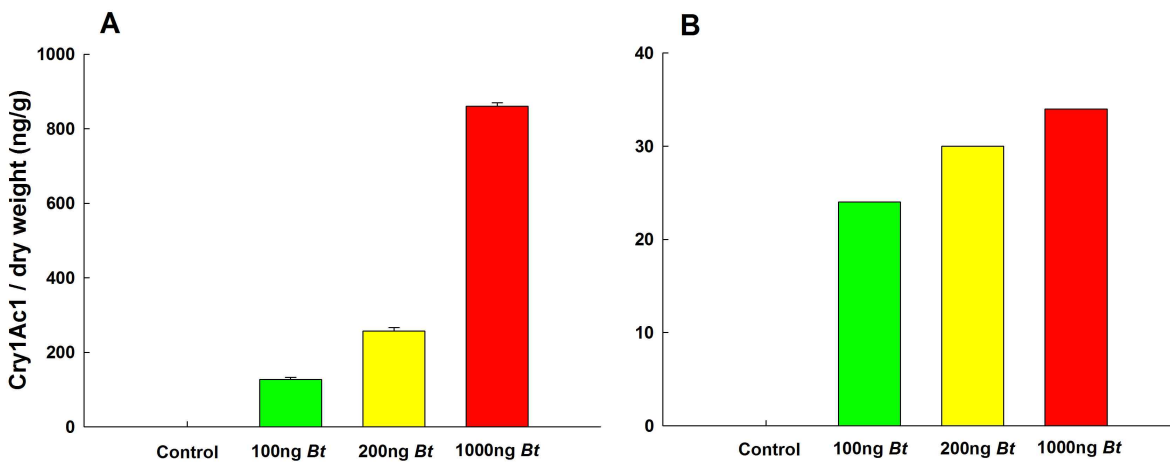


그림 3-38. ELISA 분석을 통한 *Cry1Ac1* 단백질이 포함된 툭토기 먹이와 각 처리군별 먹이를 섭취한 툭토기의 체내 *Cry1Ac1* 단백질의 농도 (좌측: 툭토기 먹이, 우측: 툭토기 체내).

(2) *P. kimi*의 생활사적 특성 및 크기 조사

툭토기의 생활사적 특성을 알아보기 위해 각 *Cry1Ac1* 단백질 처리 농도별 툭토기의 생존률을 알아본 결과 시험기간은 84일 기준으로 약 40-50%의 생존률을 보였으며, 처리군 간의 유의한 차이는 나타나지 않았다 (그림3-39). *P. kimi*의 성장률의 결과에서도 *Cry1Ac1*단백질은 *P. kimi*의 성장에 부정적인 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(그림3-40).

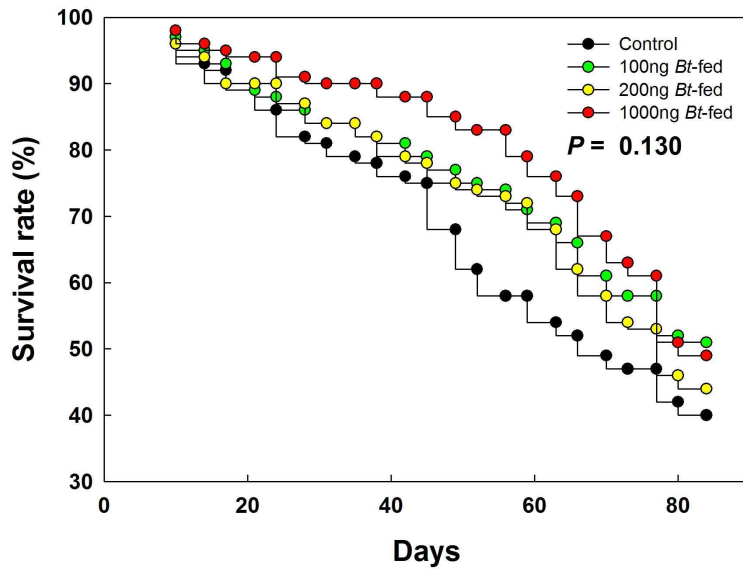


그림 3-39. 처리군 별 *P. kimi*의 생존률(Log-rank test)

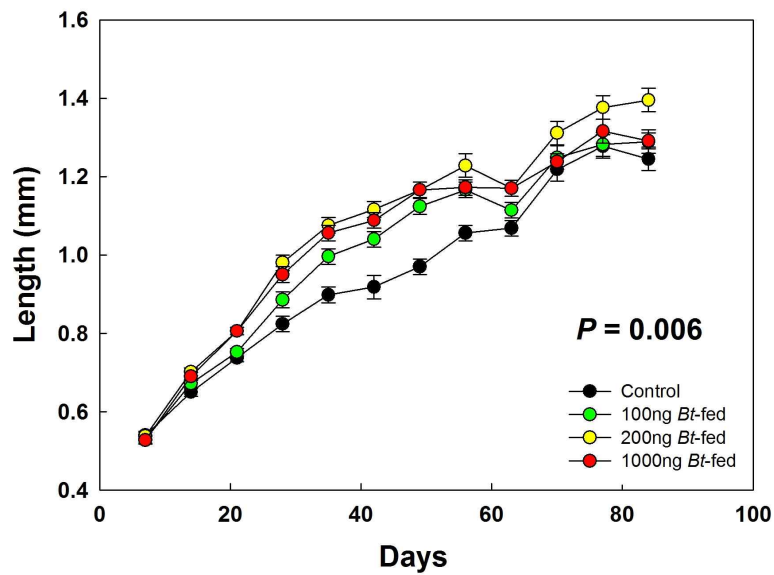


그림 3-40. *P. kimi*의 처리군 별 성장률(repeated measures ANOVA, mean±se)

마. 물벼룩(*Ceriodaphnia quadrangular*)

*Cry1AcI*단백질이 비표적 수생생물인 물벼룩(*Ceriodaphnia quadrangular*)(그림3-41)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 gene cloning의 과정을 통해 대량발현된 *Cry1AcI*단백질을 물벼룩의 생활환경이 되는 M4배지 (OECD, 2004, 표3-55)에 노출시켜 시간별 생사여부와 성장률을 기록하였다.



그림 3-41. *Ceriodaphnia quadrangularis*

표 3-55. 물벼룩 배양용 M4배지의 조성

시약	증류수 이용 1L 제조시 필요량 (mg)	혼합액 제조: 좌측 농도 의 용액과 다음의 양 (mL)을 증류수에 섞어 제조	배양액 최종 농도
H ₃ BO ₃	57,190	1.0	2.86
MnCl ₂ , 4H ₂ O	7,210	1.0	0.361
LiCl	6,120	1.0	0.306
RbCl	1,420	1.0	0.071
SrCl ₂ , 6H ₂ O	3,040	1.0	0.152
NaBr	320	1.0	0.016
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	1,260	1.0	0.063
CuCl ₂ , 2H ₂ O	335	1.0	0.017
ZnCl ₂	260	1.0	0.013
CoCl ₂ , 6H ₂ O	200	1.0	0.010
KI	65	1.0	0.0033
Na ₂ SeO ₃	43.8	1.0	0.0022
NH ₄ VO ₃	11.5	1.0	0.00058
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O*	5,000	1.0	2.5
FeSO ₄ , 7H ₂ O	1,991	1.0	1.0

*개별적으로 제조 후 즉시 가압멸균 (autoclave 수행)

실험은 총 11일간 진행되었으며, 대상 실험종인 물벼룩(*Ceriodaphnia quadrangularis*, 그림 44) 과 물벼룩의 먹이가 되는 클로렐라(*Chlorella vulgaris*)는 한국해양미세조류은행(KMMCC)에서 분양받았다. 사육조건은 수온 20-22°C, 광조건 16:8 L:D에서 사육하였고, 먹이로는 순수 배양한 클로렐라를 이틀간격으로 1회 공급하였으며, 물벼룩의 시험용수인 M4배지를 4배 희석한 후 사용 전 2시간 이상 강하게 폭기 시킨 후 사용하였다. 동일연령의 *C. quadrangularis*를 얻기 위해 알을 보유한 성숙한 *C. quadrangularis* 약 100-150마리를 4배 희석된 M4배지가 담긴 500ml 비이커로 옮긴 후 24시간동안 산란을 유도한 후, 물벼룩 성체를 분리하였고, 물벼룩 성체를 분리

한 후 24시간동안 새로 태어난 물벼룩 유체를 안정시킨 다음 1마리씩 12 well plate (Falcon 사)에 한 마리씩 접종하였다 (그림 3-42). 이때 각각의 well에는 4ml의 4배 희석된 M4배지를 넣었고, *Bt* 처리구에는 *CryIAcI*의 농도가 600ng/ml이 되도록 하였다. 클로렐라 (*C. vulgaris*)는 이틀에 1회 먹이로 공급하였다. 물벼룩의 생존률을 알아보기 위해 24시간 간격으로 각각의 well에 있는 물벼룩의 생사 여부를 기록 하였다. 생사의 판단은 well을 조용히 움직이고 15초간 움직임이 없는 개체가 있을 때, 이를 해부현미경으로 관찰하여 촉각 및 후복부의 움직임이 없을 경우 죽은 개체로 판단하였다. 물벼룩의 성장률을 기록하기 위해 2일에 1회씩 각각의 12 well plate 안에있는 물벼룩들을 무작위로 4마리씩 총 12마리 선택하여 해부현미경에 마운트된 디지털카메라(excope X3, Korea)를 이용하여 각각의 개체의 길이를 측정하였다. 물벼룩의 처리군 별 크기 차이의 비교는 반복측정분산분석 (Repeated measures ANOVA)을 수행하였고, 생존률의 차이의 비교는 생존분석 (Log-rank test)을 수행하여 통계적 유의성을 검증 하였으며, 이를 위해 STATISTICA (version. 8.0)를 이용하였다.

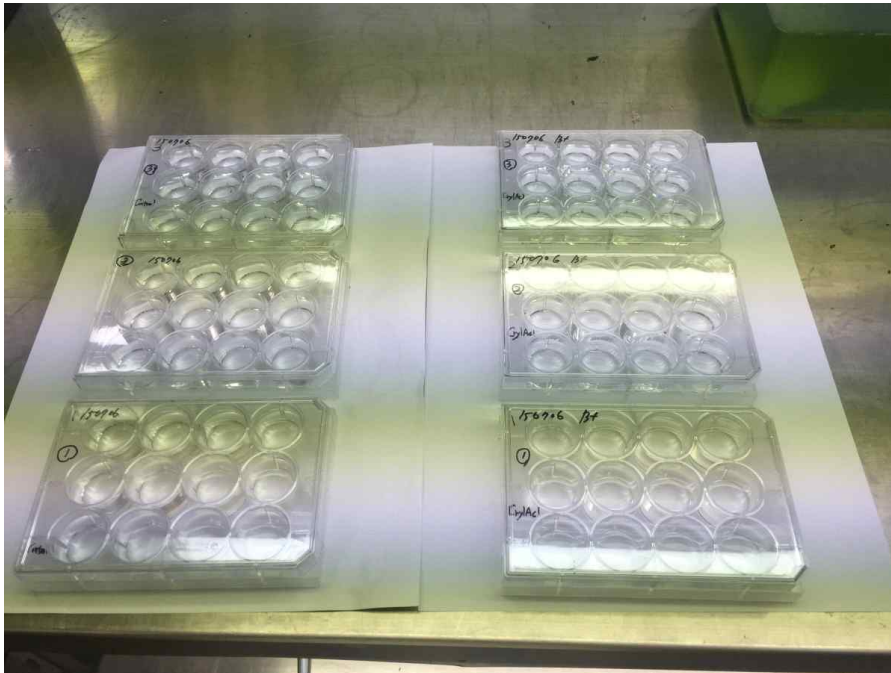


그림 3-42. 물벼룩 실험

(1) *C. quadrangular*의 생존 및 성장률 조사

CryIAcI 단백질이 물벼룩의 생활사적 특성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 처리군 별 물벼룩의 생존률을 비교 한 결과 급성독성 시험의 기준이 되는 초기 48시간까지는 시험구와 대조구 모두 약 90%정도의 생존률을 보여 *CryIAcI*단백질에 대한 급성독성은 일어나지 않음을 알 수 있었으며 (그림 3-43), 시험이 끝나는 약 11일 경과시에는 두 처리군 모두 약 50-60%의 생존률을 보여 *CryIAcI*단백질이 이들의 생존에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 성장률의 결과에서도 *CryIAcI*단백질은 *C. quadrangular*의 성장에 부정적인 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다 (그림 3-44).

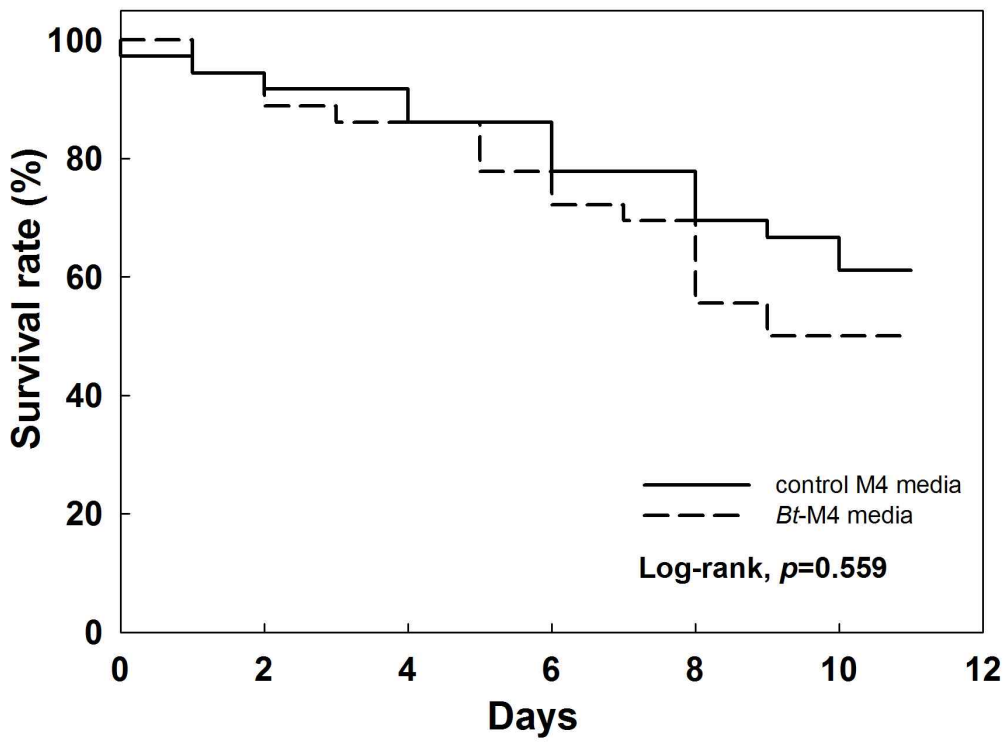


그림 3-43. 처리군 별 *C. quadrangular*의 생존률(Log-rank test)

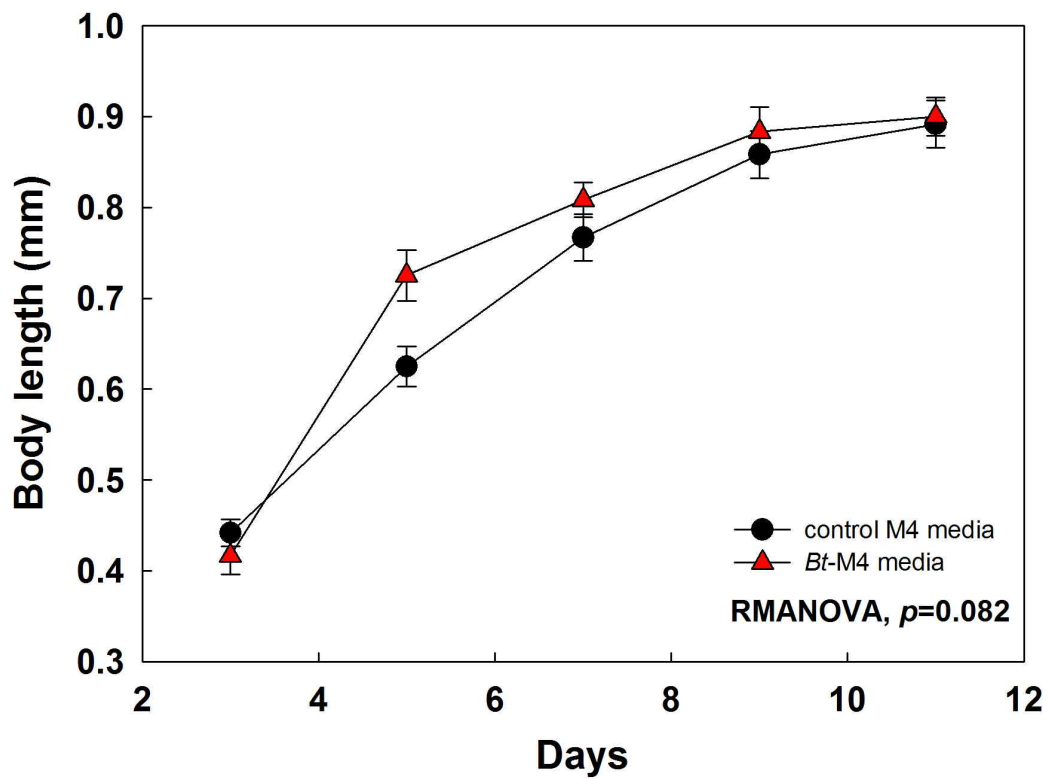


그림 3-44. 처리군 별 *C. quadrangular*의 성장률(repeated measures ANOVA, mean±se)

7. *Bt* 양배추 야외포장에서 서식하는 절지동물의 *CryIAcI* 단백질 발현량 분석

좁나방 내성 *Bt* 양배추포장에서 서식하는 초식자, 포식자, 기생자를 포함한 절지동물들이 직접, 또는 간접적으로 실제 포장 환경에서 얼마만큼의 *CryIAcI*단백질이 노출되는지 알아보기 위해 2014년 봄과 가을에 한국생명공학연구원 LMO격리포장에서 양배추의 생육기간 동안 시기별로 *Bt* 양배추 잎과 양배추 포장에서 관찰되는 절지동물을 채집하여 *CryIAcI*단백질의 농도를 분석하였다. 채집한 절지동물과 *Bt* 양배추 잎은 동결건조 한 후 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하여 *Bt* 단백질의 양을 측정하였다. 조사결과 좁나방 내성 *Bt* 양배추 잎은 시기에 따라 *CryIAcI*단백질의 발현량이 변화하는 것을 알 수 있었으며, 특히 봄과 가을 모두 양배추 생육 초기에서 높은 양의 *CryIAcI*단백질이 발현하다가 시간이 지나면서 점차 감소하여 200-300 ng/g 수준으로 유지되는 것을 확인하였다 (그림3-45).

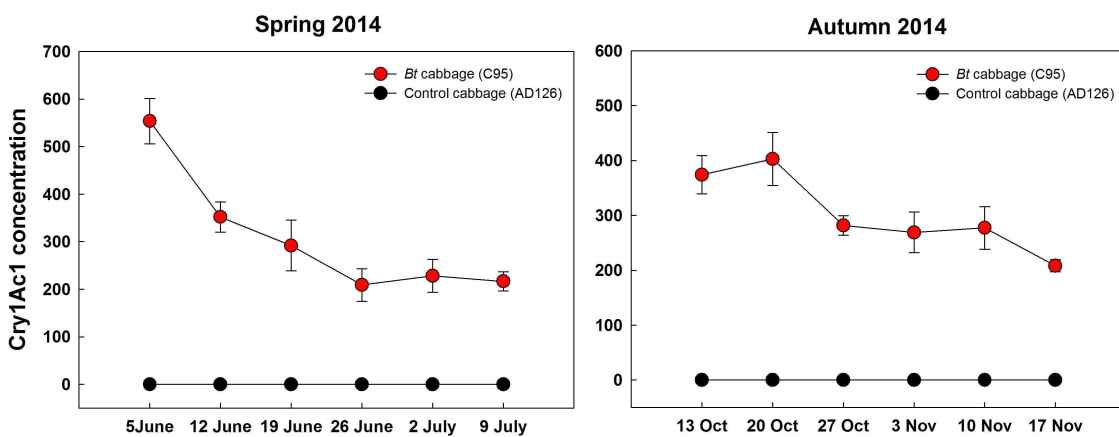


그림 3-45. 2014년 포장에서 좁나방내성 양배추의 시기별 *CryIAcI* 단백질 발현량

절지동물은 총 7목, 14과, 16종이 채집되었으며, 각 절지동물 종별 *CryIAcI* 단백질 발현량을 살펴보면, 애긴노린재, 꼬마납생이무당벌레, 청딱지개미반날개와 고치벌과, 풀잠자리과의 종에서는 *CryIAcI*이 검출되지 않았다. 하지만 초식자에 속하는 노린재목, 메뚜기목, 나비목의 종들에서는 *CryIAcI* 단백질이 검출되었으며, 특히 나비목 초식자인 배추흰나비, 도둑나방, 양배추은무늬밤나방에서는 상대적으로 높은 농도의 *CryIAcI*단백질이 검출되었다 (표3-56, 57). 또한 포식자인 거미목의 종들과 딱정벌레목의 종에서도 *CryIAcI*단백질이 검출되었으며, 이는 먹이사슬을 통한 간접적인 *Bt* 단백질의 이동이 일어나는 것으로 판단할 수 있다.

표 3-56. *Bt* 양배추 포장에서 2014년 봄에 채집된 절지동물의 시기별 *Cry1Ac1* 단백질 발현량

Order	Family	Species	Korean name	Mean <i>Cry1Ac1</i> concentration (ng/g DW)					
				5 Jun	12 Jun	19 Jun	26 Jun	3 Jul	10 Jul
Araneae	Araneidae	Not identified	왕거미과	n.c.	n.c.	3.0556	n.c.	n.c.	n.c.
	Erigonidae	Not identified	애집시거미과	n.c.	n.c.	9.72	n.c.	n.c.	n.c.
	Thomisidae	Not identified	강충거미과	5.556	n.c.	n.c.	0	0	n.c.
Coleoptera	Carabidae	<i>Tachyuralaetifica</i>	넥점꼬마강변먼지벌레	n.c.	n.c.	13.056	n.c.	10.556	8.056
	Coccinellidae	<i>Harmonia axyridis</i>	무당벌레	6.389	n.c.	n.c.	n.c.	5.139	n.c.
		<i>Propylea japonica</i>	꼬마남생이무당벌레	n.c.	n.c.	0	n.c.	n.c.	n.c.
Staphylinidae	<i>Paederusfuscipes</i>	청딱지개미반날개	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	0	n.c.	
Hemiptera	Lygaeidae	<i>Nysiusplebejus</i>	애긴노린재	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	0
	Pentatomidae	<i>Eurydemagebleri</i>	북쪽비단노린재	4.815	n.c.	8.889	n.c.	15.138	n.c.
Hymenoptera	Braconidae	Not identified	고치벌과	n.c.	n.c.	0	0	n.c.	n.c.
Lepidoptera	Noctuidae	<i>Mamestrabrassicae</i>	도둑나방	n.c.	n.c.	57.639	36.389	57.452	64.396
	Pieridae	<i>Pierisrapae</i>	배추흰나비	203.611	72.222	48.889	11.806	n.c.	29.722
	Plutellidae	<i>Plutellaxylostella</i>	배추좀나방	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	12.222	n.c.
Neuroptera	Chrysopidae	Not identified	풀잠자리과	0	0	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Orthoptera	Gryllotalpidae	<i>Gryllotalpaorientalis</i>	땅강아지	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	6.111	n.c.

*n.c. - not collected

표 3-57. *Bt* 양배추 포장에서 2014년 가을에 채집된 절지동물의 시기별 *Cry1Ac1* 단백질 발현량

Order	Family	Species	Korean name	Mean <i>Cry1Ac1</i> concentration (ng/g DW)					
				13 Oct	20 Oct	27 Oct	3 Nov	10 Nov	17 Nov
Araneae	Araneidae	Not identified	왕거미과	n.c.	n.c.	2.727	n.c.	n.c.	n.c.
	Erigonidae	Not identified	애집시거미과	n.c.	n.c.	7.273	10.909	n.c.	n.c.
	Thomisidae	Not identified	강충거미과	1.818	0	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Harmonia axyridis</i>	무당벌레	2.727	5.455	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	Staphylinidae	<i>Paederusfuscipes</i>	청딱지개미반날개	n.c.	0	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Hemiptera	Lygaeidae	<i>Nysiusplebejus</i>	애긴노린재	n.c.	n.c.	0	0	0	0
	Pentatomidae	<i>Eurydemagebleri</i>	북쪽비단노린재	n.c.	6.364	4.545	n.c.	n.c.	n.c.
Lepidoptera	Noctuidae	<i>Mamestrabrassicae</i>	도둑나방	66.061	57.727	n.c.	30.909	66.97	58.182
		<i>Trichoplusiani</i>	양배추은무늬밤나방	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	37.273	40.909
	Pieridae	<i>Pierisrapae</i>	배추흰나비	78.788	54.848	25.152	18.788	n.c.	n.c.

*n.c. - not collected

8. *Bt* 양배추의 화분특성 조사

화분립의 크기 측정을 위하여 2011년 5월 2일에 농우바이오 격리포장에서 재배중인 *Bt* 양배추 (TC21 : 2개체, TC22 : 4개체, TC12 : 2개체, 비닐하우스 재배)와 모본인 WT 양배추(#3059 :

2개체, 유리온실 재배)를 선택하여 실험에 사용하였다. 선택된 개체 당 꽃을 2-4개씩 고르고 각각의 꽃에서 화분을 취하여 하나의 프레파라트를 만들어 실험하였다. Slide glass 위에 Lugol 용액(Fluka 62650)을 1-2방울 떨어뜨린 후 그 위에 모아진 화분을 넣고 잘 섞어주고 3-5분 정도 염색하였다. 염색된 화분은 cover glass를 덮어 광학현미경(Olympus BX41)으로 화분을 관찰하였다. 관찰된 화분 중 형태가 분명하게 나타난 것들을 골라 촬영하고, 현미경용 스케일바를 사용하여 크기를 측정해 주었다. 개체 당 10개씩의 화분립을 대상으로 극축의 길이 (PL: polar axis length)와 적도면의 지름(ED: equatorial diameter)을 측정하여 크기를 비교하였다(그림 3-46).

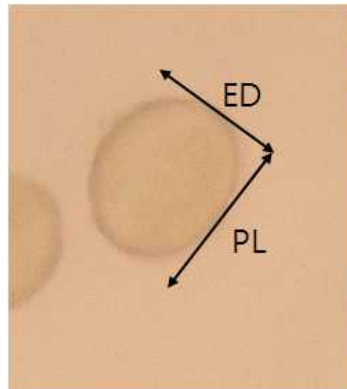


그림 3-46. 양배추 화분립의 모양과 측정 위치(PL: polar axis length, ED: equatorial diameter)

화분립의 크기 데이터는 양배추의 종류, 개체, 꽃의 3가지 요소가 순서대로 속해 있는 구조이기 때문에, 이를 고려하기 위해 3수준 위계적 분산분석 (three-level hierarchical ANOVA)를 수행하였다. 분석결과 극축의 길이와 적도면의 지름은 TC21, TC22, TC24, wild-type의 4 종류 간에 통계적으로 유의한 차이가 뚜렷하게 나타났다(표3-58). 극축의 길이는 TC22가 가장 길었고 wild-type, TC21, TC24 순으로 감소하였다(그림3-47). 반면, 적도면의 지름은 TC21이 가장 길었고, TC22, TC24, wild-type 순으로 감소하였다.

표 3-58. 극축의 길이와 적도면의 지름 데이터의 위계적 분산 분석을 통한 양배추의 종류 (type), 개체 (plant), 꽃 (flower)에 대한 유의성 검정 결과

Source	df	Length of polar axis		Equatorial diameter	
		F ratio	P value	F ratio	P value
type	3	12.6806	< 0.0001	5.6852	0.0008
plant[type]	6	9.0798	< 0.0001	5.3517	< 0.0001
flower[type, plant]	25	27.0458	< 0.0001	12.1250	< 0.0001

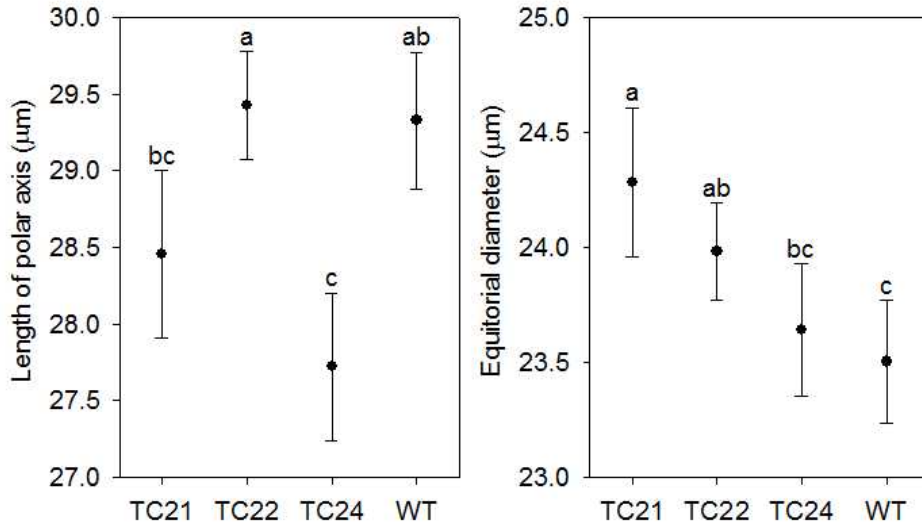


그림 3-47. TC21, TC22, TC24, WT(wild-type) 양배추의 극축의 길이와 적도면의 지름 비교 (평균과 95%신뢰구간, 같은 문자는 Tukey's HSD 검정 결과 유의한 차이가 없음을 나타냄)

화분 염성도를 이용한 활력을 측정하기 위하여 2011년 4월 26일에 농우바이오 격리포장에서 재배중인 *Bt* 양배추(TC 21 : 2개체, TC22 : 4개체, TC12 : 2개체, 비닐하우스 재배)와 모본인 WT 양배추(#3059 : 2개체, 유리온실 재배)를 이용하여 실험에 사용하였다. 선택된 개체 당 4개의 꽃을 취하여 각각의 꽃을 반복으로 하여 프레파라트를 만들어 실험하였다. Slide glass 위에 ppp-test 용액[Peroxidase indicator reagent, Sigma 390-1 1 vial, 3% hydrogen peroxide 200 μ l, 5ml Trizmal 6.3 buffer (Sigma 903C) in 45 ml deionized water] 1-2방울을 떨어뜨리고 그 위에 모아진 화분을 넣어 잘 섞어 주었다. 3-5분정도 화분을 염색하고, 염색된 화분은 cover glass를 덮어 광학현미경(Olympus BX41)을 사용하여 관찰하였다. 염성도는 약 300개 정도의 화분립을 대상으로 측정하였으며, 활력을 가진 화분은 완전한 검은색으로, 활력을 잃거나 손상된 화분은 연한 갈색이나 손상된 모습으로 보였다(그림3-48).



그림 3-48. 염성도 테스트를 이용한 화분 활력

화분의 염성도 데이터는 양배추의 종류와 각 종류에 속한 개체를 고정요인으로, 각 꽃에서 나온 화분의 개수를 공변량(covariate)으로 두어 분산분석을 수행하였다. 그 결과 염성도는 TC21, TC22, TC24, wild-type 간의 유의한 차이가 있었고 ($P < 0.0001$, 표59), wild-type이 다른 종류에 비해 염성도가 컸다(그림3-49). 따라서 화분의 활력은 wild-type이 형질전환 계통보다 높게 나타났다.

표 3-59. 염성도 데이터의 분산 분석을 통한 양배추의 종류 (type)와 개체 (plant), 공변량인 화분 개수 (npol)에 대한 유의성 검정 결과

Source	df	<i>F</i> ratio	<i>P</i> value
type	3	11.5248	< 0.0001
plant[type]	6	0.9638	0.4667
npol	1	2.0407	0.1638

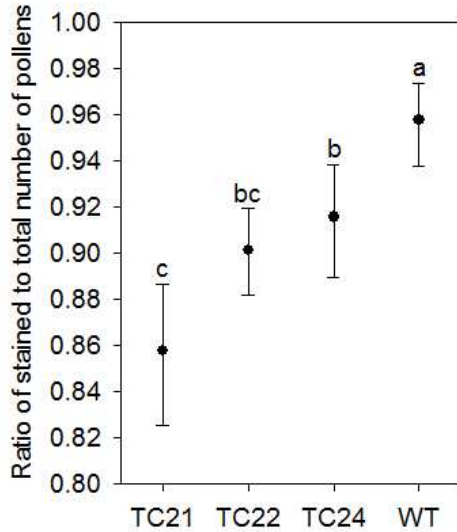


그림 3-49. TC21, TC22, TC24, WT(wild-type) 양배추의 염성도 비교 (평균과 95%신뢰구간, 같은 문자는 Tukey's HSD 검정 결과 유의한 차이가 없음을 나타냄).

9. Bt 양배추의 유전자 이동성 평가

(주)농우바이오에서 양배추의 개화를 유도하기 위하여 2012년 겨울에 GM 양배추C30 계통과, 모본 126 계통의 춘화 처리를 하였으며, 각각 35주와 36주를 분양받아 실험에 사용하였다. 분양받은 유묘는 2013년 4월 25일에 한국생명공학연구원 격리포장에 정식하였으며, 시험구 전체를 망실로 덮어 화분매개곤충이 시험구 외부의 교잡가능한 동종 또는 근연종 식물로 화분을 전달하는 것을 방지하였다. 망실을 설치한 뒤 화분매개 곤충인 서양뒤영벌 (꽃부니호박벌, 그린아그로텍) 1봉군을 망실 내에 두어 화분매개를 유도하였다(그림3-50).

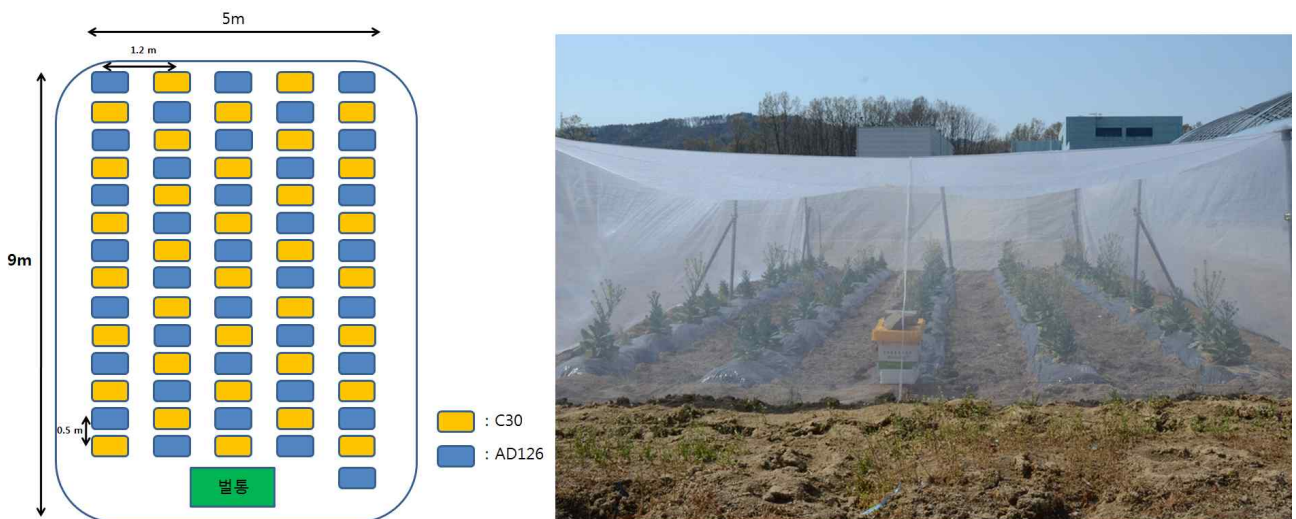


그림 3-50. 유전자이동성 평가 포장 디자인 및 전경

시험기간 동안 서양뒤영벌은 활발한 화분매개활동을 보였다(그림3-51). 3개월 간 실험한 뒤 2013년 7월 25일에 모본 양배추인 AD126으로부터 각 식물체별로 종자를 수확하였으며, 실험에 사용한 GM 양배추와 서양뒤영벌은 폐기처리 하였다.



그림 3-51. 양배추 꽃의 화분매개활동을 하는 서양뒤영벌.

수확된 종자는 격리온실로 가져와 4×8포트에 파종하여 2주간 발아시켰다(그림3-52). 발아한 모든 개체들을 sampling 하였고, MP Biomedical사의 FastDNA KIT을 사용하여 gDNA를 추출 하였다.



그림 3-52. 수확한 모본 양배추 종자의 파종

양배추 특이적인 내재유전자인 cruciferin gene의 검출을 위한 primer인 *Bnc1*과 GM 양배추에 도입된 *Cry1Ac1* 유전자의 primer (바이오니아 제작)를 이용하여 PCR을 수행하였다(표3-60). 각각의 양배추 시료로부터 추출한 gDNA를 주형으로 사용하여 95℃에서 3분, [95℃에서 1분, 58℃에서 40초, 72℃에서 1분]×34회, 72℃에서 10분 조건으로 primer 2쌍을 분석하여 밴드의 유무를 확인하였다(그림 53).

표 3-60. 양배추 특이 내재유전자인 *Bnc1*과 GM 특이 유전자인 *Cry1Ac1* 검출을 위한 primer 염기서열

Primer	이름	염기서열
<i>BnC1</i>	BnC1-F	GCTCTGGTGTCTCCTTTGTA
	BnC1-R	CTGAACCTTAAAGATCACGAA
<i>Cry1Ac1</i>	<i>Cry1Ac1</i> -F	AACAATGGGATAGCTGTGGT
	<i>Cry1Ac1</i> -R	GACAACAACCCAAACATCAA

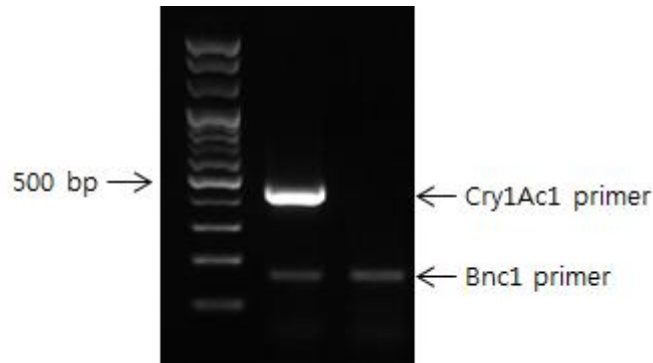


그림 3-53. *Bnc1*과 *Cry1Ac1* 유전자의 PCR 결과.

GM 양배추로부터 모본으로 유전자 이동이 일어난 시료의 경우 PCR 분석 결과 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었다(그림 3-54).

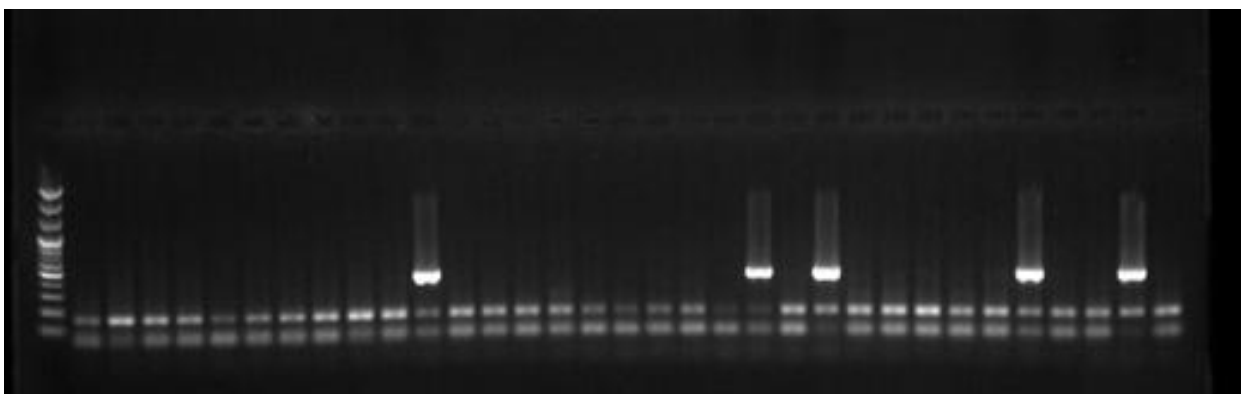


그림 3-54. *Bt* 양배추 유전자 이동 실험에서 일부 시료의 *Cry1Ac1* 유전자 검출 결과

총 36개의 AD126양배추로부터 1,519개의 종자를 얻었으며, 이 중 878개가 발아하였다. 이들의 gDNA를 추출하여 PCR 해본 결과 *Cry1Ac1* 유전자가 확인된 시료는 총 168개로, 유전자이동 비율은 19.7%였다(표 3-61).

표 61. GM 양배추로부터 모본으로의 유전자이동 실험 결과

AD126 식물체 번호	수확한 종자 수	발아한 종자 수 (gDNA 샘플 수)	<i>Cry1Ac1</i> 유전자가 검출된 시료 수
1	13	6	1
2	33	13	4
3	62	35	10
4	0	0	0
5	48	25	4
6	70	37	6
7	0	0	0
8	43	22	5
9	114	74	12
10	98	56	14
11	34	26	9
12	112	80	11
13	53	20	3
14	31	22	5
15	72	60	14
16	50	9	1
17	121	84	18
18	24	6	1
19	18	7	2
20	71	36	3
21	17	11	2
22	84	68	9
23	3	3	0
24	13	2	1
25	24	5	0
26	33	28	9
27	45	26	4
28	30	21	2
29	52	27	3
30	13	1	0
31	15	9	5
32	84	42	6
33	3	0	0
34	1	0	0
35	31	17	4
36	4	0	0
총 개수	1519	878	168

이 연구 결과는 충남대 농업과학연구에 논문으로 게재하였다(김영중 등 2014. 유전자변형 양배추로부터 비유전자변형 모본으로의 유전자 이동성. 충남대학교 농업과학연구 41:157-161).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

과제 최종 목표 및 주요내용	달성도(%)
1. CryIAc1 유전자를 이용한 GM양배추를 개발 및 배추좀나방내성 GM양배추 확보	100
-유전자 벡터 제작	100
-양배추 재분화 및 형질전환체 개발 착수	100
-양배추 형질전환 체계 확립과 형질전환체 선발	100
-독립적인GM양배추 확보 및 대량 개발	100
-PCR을 이용한 분자 유전학적 확인	100
-형질전환체 immunostrip을 통한 단백질 검정	100
-배추좀나방 chamber 사육방법 구축 및 내충성 양배추 feeding test	100
-GM양배추 T세대의 하우스 선발	100
-배추좀나방 실외모니터링	100
2. 좀나방내성 GM양배추 계통의 분자 유전학적 분석	
-단일 copy의 도입유전자가 형질전환 된 후 우량 event의 선발	100
-도입 유전자 삽입 위치분석을 통한 우량 event의 선발	100
-우량 event에 삽입 된 transgene의 염기서열 온전성 분석	100
-양배추 특이적인 내부양성 대조유전자 발굴 및 이를 이용한 정성 분석 kit 개발	100
-형질전환시 비의도적 유전자 변이 및 삽입 가능성 분석	100
-도입 유전자의 유전적 안정성 및 인접 유전자의 비의도적 발현 변화 여부	100
3.GM 양배추의 환경위해성 평가	100
- GM양배추와 모본간의 농업형질 조사	100
- 잡초화가능성 평가	100
- 농업 특성 평가	100
- 토양 미생물상변동평가	100
- 곤충상변동 평가	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구성과 및 활용 계획

1. 연구성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	0						1		
	달성	1								
2차 년도	목표								3	
	달성								1	
3차 년도	목표	2						1	2	
	달성									
4차 년도	목표							3	2	
	달성								2	
5차 년도	목표		2			1		3	2	
	달성							1		
계	목표	2	2			1		8	9	
	달성	1						1	3	

- * *CryIAc* 유전자로 형질전환된 배추좀나방 저항성 양배추 및 이의 제조 방법, 2010.07 PCT 출원, 이로 개발된 내충성 양배추 세대진전 개발
- * *CryIAc* 유전자의 *bar* 유전자 선발을 통한 내충성 양배추는 특허 출원 예정 혹은 논문 투고 예정(농우바이오 양배추 개발 관련 결과)
- * 논문 성과에서는 Effects of transgenic cabbage expressing *CryIAcI* protein on the survival and growth of wolf spider *Pardosa astrigera* L. Koch (Araneae: Lycosidae) 제목으로 투고중
- * 본 연구 수행으로 발생한 연구 성과에 대해서 환경위해성 평가 과정과, 유전자 위치 분석 및 세대 안정성 등 다양한 결과는 향후 논문 투고하겠음

논문성과(SCI 1건, 비SCI 3건)

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No .)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2012	A molecular framework for risk assessment of a virus-tolerant transgenic pepper line	백인순	정순천	외 8인	Journal of Crop Science and Biotechnology	15:107-115	국내	비SCI

2014	<i>Bt</i> 양배추가 복숭아혹진딧물의 발육과 기주선택에 미치는 영향	남기정	김창기	외 7인	한국응용곤충학회지	53:193-197	국내	비SCI
2015	Effects of transgenic cabbage expressing <i>CryIAC1</i> protein on the survival and growth of wolf spider <i>Pardosa astrigera</i> L. Koch (Araneae: Lycosidae)	김영중	김창기	외 2인	Ecotoxicology and Environmental Safety	투고중	국외	SCI
2015	Effects of transgenic cabbage expressing <i>CryIAC1</i> protein on target pests and the non-target arthropod community under field condition	김영중	김창기	외 4인	Journal of Asia-Pacific Entomology	2015.8.5 on line In press	국외	비SCI

특허성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010.7	Cabbage-moth-resistant cabbage transformed by the <i>cryIac</i> gene, and method for producing same (EN)	한지학외	PCT	PCT/KR2010/004818 WO2011031006 A3					

인력활용 양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2	1	1			1	1	1		1

* 한국생명공학연구원 김창기박사팀 김영중(서울대, 2016년 2월 박사학위 예정),

* 농우바이오 한지학박사팀 김보민(충북대, 2015년 2월 석사학위 취득)

2. 연구 성과 활용 계획

가. 내충성 GM양배추의 계통을 새로운 유전자원으로 활용

나. 내충성 GM양배추의 계통은 event로서 환경·인체위해성 평가연구에 활용

다. 3년 뒤 단계사업 후속연구로 환경·인체위해성 심사청구 준비

- 라. 내충성 GM양배추 종자의 품종 개발에 활용
- 마. GM종자 해외 시장 개척을 위한 기본 인프라 확충에 활용
- 바. 수출용 내충성 GM종자 품종 상품화에 이용
- 사. 배추좁나방 저항성 GM브로콜리 등 여러 십자화과 작물 개발에 활용

3. 기대성과

가. 기술적 측면

- (1) 배추좁나방 저항성 GM양배추 개발은 국내 최초
- (2) GM양배추의 위해성평가 연구자료가 귀중한 자산이 됨
- (3) 향후 다른유전자를 이용한 GM양배추가 개발될 때 이용되면 십자화가 작물 경우 참고가능
- (3) GM양배추 계통육성 기술의 축적
- (4) Chamber내 애벌레 사육기술 및 접종 기술의 축적
- (5) 국내 특허 출원
- (6) 친환경적 농업 환경 조성

나. 경제적 · 산업적 측면

- (1) 본 과제 결과로는 내충성 품종의 위해성평가 전 단계까지 완성됨
- (2) 양배추는 marketing value가 매우 높은 세계 5대 채소 중에 하나임으로 신제품이면 상업화 가치가 매우 큼
- (3) 인도와 중국에서 재배하는 양배추는 전 세계 30%이고 두 나라는 GMO 재배 지역이므로 이 지역에 GM양배추의 틈새시장을 개척할 수 있으며, 현재 연작장해와 기후변화로 내병충성 품종의 요구도가 증가하고 있음
- (4) 친환경농업을 통한 고품질 양배추로 농가 소득 증진
- (5) 안전한 먹거리에 대한 소비자의 신뢰 증진 및 안전 유통구조 확보
- (6) 타작물 해충에 대한 내충성 품종 개발에 시너지 효과 확보
- (7) 과제기간이 끝나는 5년 이후가 품종화가 되면 수입대체 뿐만 아니라 나아가 수출에도 기여할 예정

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

인류가 창궐한 농업역사에서 생명공학작물(GM작물)이 종자시장과 생산물시장에 미치는 영향은 매우 크며 농가에 빠르게 파급되고 있다. 농업생명공학 응용을 위한 국제서비스(ISAAA)의 발표(2015)에 의하면 생명공학작물의 재배면적은 1996년 170만ha에서 2014년 181.5백만ha로 약 100배 증가하였다. 또한 전 세계적으로 28개국에서 1800만 명에 이르는 농민이 GM작물을 경작하고 있으며 2014년 GM작물 총 경작면적은 세계 총 작물경작지의 약 10%에 달하고 있다. 총 12작물(옥수수, 콩, 면화, 유채, 사탕수수, 알팔파, 파파야, 호박, 토마토, 피만, 포플라, 가지)이 재배되고 있으며 특히 콩의 82%; 면화의 68%; 옥수수의 30%, 캐놀라의 25%가 GMO이다. 국가마다 다르지만 미국에서 생산하는 콩과 옥수수 약 95%는 GM작물이며 GM작물의 특성은 제초제저항성, 곤충저항성, 바이러스저항성, 아밀로스프리 등이며 특히 제초제저항성과 곤충저항성 형질이 같이 들어가 있는 경우가 늘고 있다(stacking). 전체 GM 종자시장은 1996년 0.93억불에서 2014년 157억불로 성장하였으며 전체 종자시장(약 450억불)의 35%에 해당되어 인류 역사상 농업에 특정 기술이 이렇게 빠르게 적용되는 경우는 없었으며 수확량 증가와 농약절감에 지대한 역할을 하고 있다. 또한 채소인 호박, 토마토, 피만 GM채소는 재배허가를 받았지만 실제로 GM종자가 유통되고 있지는 않으나 2013년서 부터 GM가지가 처음으로 방글라데시에서 소량 재배 중에 있다.

앞으로 인도에서 *Bt* 가지가, 필리핀에서는 Golden rice, 중국에서는 *Bt* 옥수수와 *Bt* 벼를 기대하고 있다. 이외에도 다국적기업에서는 향후 10여년 후에 출시하려는 유용 GM작물 개발에 열을 올리고 있는데 Monsanto의 정책 중에 하나는 2030년에 생산량 2배에 비료, 물은 1/3만 사용하는 작물을 개발하는 것이다. 이렇게 되면 친환경 농업 및 인류 식량해결에 합당한 방안이 됨으로 GM작물의 선호도가 높아질 것으로 사료 된다.

Bt 유전자인 CryI 계통의 유전자를 사용하는 해충저항성 GM 작물의 재배 면적은 세계적으로 꾸준히 증가하고 있으며, 또한 해충저항성과 제초제 저항성 GM 작물의 후대교배종의 재배 면적도 꾸준히 증가하고 있다. 2013년 현재 해충저항성 관련 수입 승인 event 건수는 60여 종류에 달한다. 계속적으로 *Bt* 내충성 연구개발은 진행중이다. 또한 국내의 경우는 아직 GM작물 개발 중에 심사청구를 하고 있는 작물이 없다. 차세대바이오그린 사업이 진행 중이며, 서울대의 제연호교수 연구팀에서 *Bt* 유전자의 대한 연구가 활발히 진행 중이며, *Bt* 내충성 배추 개발을 경희대 박영두교수 연구팀에서 수행중이다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

3000만원 이상 고가 장비 구입 등 해당사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행 실적

- 안전 관리는 연구소 내 안전담당자가 안전관리 규정하에 한 달에 한번 교육 실시
- 안전에 대한 실험실 매뉴얼은 각 실험실에 배치되어 있으며 기록 중
- 연구소 안전담당자는 일 년에 2차례 정규교육 받고 있음
- 폐기물, 유기용매, 안전규정에 있어서 분리 처리 화합물 등은 별도로 용역회사 수거 처리
- 격리하우스 재배시험에 따른 안전 규칙 및 규정을 준수하여 재배하고 폐기 식물체 처리함
- 실험실내 배양체와 petridish 등 일체는 autoclave한 다음 1년에 분기별 4회 용역회사가 수거우 소각 처리 시행
- 각 실험실에는 보안장치가 되어 있어 연구원만 출입가능
- hood 설치와 유기용매 보관실은 별도로 배치하고 있음

제 9 장 참고문헌

FAO STAT. 2012. 세계 양배추 재배면적 및 수확량
한국종자협회. 2013. 우리나라 채소 종자 현황

Carpenter JE. 2011. Impacts of GM crops on biodiversity. *GM Crops* 2: 7-23

Crickmore N. 2005. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. *Trends Microbiol.* 13: 347-3350

Hofte H. Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev* 53:242-255

Jin RG, Liu YB, Tabahnic BE, Borthakur D 2000) Development of transgenic cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for insect resistance by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *In Vitro Cell Dev Bio Plant* 36:231-237

Johnson C. Bishop AH, Turner CL. 1998. Isolation and activity of strain of *Bacillus thuringiensis* toxin to larvae of the housefly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflies (Diptera: Calliphoridae). *J Invertebr Pathol* 71: 138-144

Kim CK, Chung JD. 1998. Expression of proteinase inhibitor II gene in transgenic flowering cabbage, *Brassica oleracea* var. *acephala* DC. *Korean J Plant Tissue Culture* 25: 95-98

Kim YH, Kim HJ, Lee SH, Lee SH. 2008. Effects of Bt transgenic chinese cabbage pollen expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on the non-target insect *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombyxidae) larvae. *J Asia-pacif Entomol* 11:107-110

Lee SY, Kim ST, Jung JK, Lee JH. 2014. A comparison of spider communities in Bt and non-Bt rice fields. *Environ Entomol* 43: 819-827

Naranjo SE. 2009. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. *CAB Rev Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour* 4:No.011

Park BS, Nam SH, Cho HS, Kim JS, Jin YM, Kim HI, Je YH. 2000. Synthetic insecticidal CryIAC1 gene *Korean Soc Breeding Sci.* 32:356-357

Roh JY, Chio JY. Ming SL, Jin BR. Je YH. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. 2007. *J Microbiol. Biotechnol* 17: 547-559

Romeis J, Meissle M, Bigler F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat Biotechnol* 24:63-71

Sarjeet SG. 1995. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Toxins *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 69-74

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.