

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001424-01

GM 유채와 벼트그래스의 환경위해성평가 및 안전관리 기술개발

(Development of Technology for Environmental Risk
Assesment and Biosafety Management of the Genetically
Modified Rape and Grass)

(주)에프앤피 부설 기술연구소

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “GM 유채와 벤틀그래스의 환경위해성평가 및 안전관리 기술개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 일

주관연구기관명 : (주)에프앤피 부설기술연구소

주관연구책임자 : 김 신 제

세부연구책임자 : 이 순 봉

협동연구기관명 : 국립농업과학원

협동연구책임자 : 이 범 규

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 김 창 기

요 약 문

I. 제 목

- GM 유채와 벤투그래스의 환경위해성평가 및 안전관리 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 국내 GM 작물 개발 연구가 진행되고 있음에도 불구하고 아직까지 상업화 단계에 이르지 못한 원인에는 강력한 승인 규제, 소비자의 부정적 인식, 연구 기술 및 인프라 부족 등과 함께 안전성평가를 위한 가이드라인 부재에 따른 안전성평가 연구의 어려움이 있음
- 바이오안전성의정서의 국내이행법인 ‘유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률’(LMO법)이 2008년부터 시행됨에 따라, 유전자변형(genetically modified, GM) 작물의 개발·생산·수입·수출·유통 등 개발부터 유통까지의 모든 단계에서 규제가 진행되고 있음
- 형질전환 작물은 기능 검정 뿐 아니라 환경위해성평가를 위한포장실험은 반드시 필요함. GM 작물의 환경방출실험 승인을 위해 도입유전자의 이동가능성 및 방지대책 등의 안전 관리대책이 요구되며 포장근처에 교잡 가능한 동종 또는 근연 야생종의 분포 조사 및 해당 식물과 교배가 가능한 식물의 식생을 최소한으로 제한할 수 있는 조치가 필요함
- 본 연구에서는 GM 유채와 벤투그래스의 포장실험 중에 환경방출실험 및 도입유전자의 확산을 방지하기 위한 모니터링 기법을 개발하고자 함

III. 연구개발 내용 및 범위

- 유전자변형 식물의 유전자 도입여부, 도입위치 및 주변서열 분석, 도입 유전자의 복제수, 세대 간 안정성 및 발현을 확인하고 도입유전자의 검출 및 발현의 확인 방법 정립함. 또한 GM 유채와 벤투그래스의 생육특성을 조사하고 동종 및 이종간의 교잡율을 조사함으로써 환경방출실험 실시
- Bioinformatic tool을 이용한 GM 유채 및 벤투그래스의 형질전환에 사용된 vector의 구성에 관한 염기서열을 분석하고 기능성유전자의 *in-silico* 분석을 통한 multiplex PCR 조건을 확립함으로써 GM 유채 및 벤투그래스의 고감도 분석법 확립 및 GM 작물 검증을 위한 분석법 개발
- GM 유채와 잔디 유전자변형작물의 환경위해성평가 가이드라인 개발 및 GM 유채와 잔디 개발의 효율적 안전관리 방안과 환경위해성평가 지침 제공을 위해 OECD, 바이오안전성의정서 당사국 총회 등 국제기구의 지침서를 분석하고, 기존 국내 승인된 국외 GM 작물 심사서를 분석하여 참고하였으며, 국내에서 안전성평가 중인 내용과 국내외 관련 논문, 서적 등을 분석. 또한 GM 작물의 환경위해성평가 연구 지원을 위한 외국 우수 전문서적의 번역서를 제작하여 연구에 활용
- GM 유채와 벤투그래스의 포장실험 중에 GM 유채나 벤투그래스가 토양미생물 군집 구조에 미치는 영향을 분석하고, 토양미생물로의 수평유전자전이 가능성을 평가. 또한 화분의 특성 및 화분 비산 거리를 조사하고, 격리포장 주변에서 교잡가능한 종을 대상으로 도입유전자 확산에 대한 모니터링을 수행함으로써 최종적으로 GM 작물의 포장실험시 사용할 수 있는 모니터링 지침서를 제안

IV. 연구개발결과

- AtBG1 유전자가 도입된 GM 유채 및 벤투그래스의 형질전환 과정과 선발라인의 표현형적 특성과 동종 및 이종간의 교잡율을 통한 환경방출실험을 실시하였음. 또한 선발된 AtBG1 도입 GM 유채 및 벤투그래스에 대한 분자생물학적 분석을 통하여 유전자 도입 여부, 도입 유전자 수, 유전자 발현 여부 등을 확인하여, 선발된 라인들이 하나의 transgene을 지님과 도입 유전자들의 안정된 발현을 증명하였음
- 벡터의 일반적인 구성 및 염기서열을 NCBI로부터 확보하여 CaMV35S, Ubiquitin, RD29A 등의 promoter와 PPT, Hygromycin, Kanamycin 등 항생제 저항성 유전자, AtBG1 등 본연구에서 사용한 유전자에 대한 각각의 염기서열의 상동성을 분석하여 기능 유전자내의 unique한 primer 제작하였음. 이를 이용하여 AtBG1, GUS, PPT, 35S promoter, Actin을 이용한 4조합 및 5조합의 multiplex PCR 조건을 확립하여 GM 고감도 분석법을 개발하여 LMO 포장주변 식물체를 모니터링 하였음. 또한 형질전환 진단키트용 항체 제작을 위해 Bar gene을 과발현벡터에 삽입한 후 Bar-His protein을 주사한 토끼의 항체를 사용하여 basta 저항성 식물체에서 감응을 확인하였음
- GM 유채와 벤투그래스의 환경위해성평가 가이드라인을 개발을 위해 작물별, 도입 유전자별(형질별), 도입 지역별 등의 GM 작물 안전성평가에 대한 기본 사항 및 문제형성 및 선택, 유채와 벤투그래스의 생물학적 특성 등 기본사항을 분석하여 기술함으로써 안전성평가 연구자가 각 상황에 맞게 응용하여 연구를 지원할 수 있도록 하였음. 또한 안전성평가 연구 지원을 위하여 안전성평가 관련 국제기구의 동향과 전문 번역서를 편찬하여 연구에 활용할 수 있도록 하였음
- GM 유채나 벤투그래스로부터 토양미생물로의 수평유전자전이는 관찰되지 않았으며 GM 유채는 토양미생물군집 구조에 영향을 주지 않았지만 GM 벤투그래스는 토양미생물 군집 구조를 유의하게 변화시켰음. 격리포장을 중심으로 반경 1 km 이내에서 유채와 교잡가능한 종을 대상으로 유전자이동 여부를 모니터링하였지만, 교잡이 확인된 개체는 없었음. GM 벤투그래스는 조사 기간 내내 개화를 하지 않았으므로, 주변에 교잡가능한 종을 대상으로 분포 여부만 조사하였음. 최종적으로 포장실험의 안전관리에 활용하고자 GM 유채와 벤투그래스의 모니터링 지침서를 개발하였음

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- GM 유채와 잔디의 안전성 평가로 인한 품종출원이 가능하며 이는 바이오매스 증산 및 에너지 원자재로 공급 가능함. 또한 GM 유채와 잔디의 과학적 안전성 확보로 유사 연구개발의 활성화를 꾀하고 방출실험 결과를 통한 비식용 유채와 잔디의 산업화 기반 마련
- 본 연구에서 도출된 결과는 시책건의 또는 지침서, 안내서 등으로 제안하여 많은 관련 연구자들이 활용할 수 있도록 추진 예정이며, 개발된 지침서는 교재화하여 관련 대학, 연구소 등에 배포하여 GM 작물 개발연구를 지원할 예정임. 또한 농업생명공학과 관련된 정보 사이트(농업생명공학 홈페이지, GMO 실용화사업단 홈페이지, 한국바이오안전성정보센터 등)에 업로드하여 관련 연구자를 지원할 예정임
- 본 과제를 통해 개발한 모니터링 지침서는 국내 전문학술지에 게재하여 관련 연구를 수행하는 연구자들이 GM 작물의 환경방출실험시 안전관리에 활용할 수 있도록 할 계획임

SUMMARY

After the first genetically modified (GM) crop was developed and commercialized in 1996, the amount of land being cultivated for GM crops has increased all over the world. In 2011, 29 countries planted commercialized GM crops, with the total cultivation area reaching 160 million hectares, a 94-fold increase compared to that in 1996. The global market value of GM seeds also increased to 11.2 billion dollar in 2011. Although many kind of GM crops were developed in institutes, universities, and companies, there are no commercialized GM crop in Korea. One of the main factor of GMOs commercialization is the environmental risk assessment.

1. We studied the environmental risks of GM oilseed rape and bentgrass inserted the AtBG1 gene. We confirmed insertion site, number of copies and expression of the gene in GM oilseed rape and bentgrass by molecular analysis. We investigated stable characteristic of integrated gene at the next generation. In addition to we invested phenotypical characteristic and ratio of crossing between GM and non-GM in intra/inter species.

2. We searched the sequences consisted plant-transformation vector, promoter (CaMV35S, Ubiquitin, RD29A etc), antibiotics resistant gene (PPT, Hygromycin, and Kanamycin resistance) and AtBG1 gene (in this study) from NCBI. And then we designed gene specific primer using analysis of these sequences, respectably. For high accuracy analysis, we developed multiplex PCR method using multiple primers of AtBG1, GUS, PPT, 35S promoter, Actin. And we monitored transgene escape in 0.5m, 1m and 9m from GM plants. Also we made antibodies using rabbits for development of diagnosis kit of transgenic plants, performed antibodies test in basta resistant plants.

3. We developed the guideline of GM canola and bentgrass to support GMO safety evaluation researchers. Firstly we analyzed the outline of risk assessment, and investigated the environmental risk assessment of abiotic stress resistance crops. The problem formulation and option assessment of GM canola and bentgrass was also analyzed to developed the guidelines. For supporting the researchers, we investigated the global trends of GMO Environmental Risk Assessment, and published translated handbooks.

4. We studied the effects of GM oilseed rape and bentgrass on soil microbial communities, the possibility of horizontal gene transfer from GM oilseed rape and bentgrass to soil microorganisms, the pollen characteristics, the possible transgene escape from GM crops during field trials. One of the main concerns in the field trials of GM crops is the transgene escape from GM crops to conventional crops or weedy (wild) relatives via pollen dispersal. The management of field trials is therefore aimed at the detection and prevention of hybridization between GM crops and their closely related species around the field. We determined the monitoring area according to the recommended isolation distances for maintaining the varietal purities, then we chose target species using literature search of plant species reproductively compatible with oilseed rapes. Then, we monitored transgene escape from GM oilseed rapes to *B. napus*, *B. juncea* and *B. oleracea* up to 1.3 km from the isolated field. Transgene escape from GM oilseed rapes to compatible species was not detected in our study. We suggest a guide for the monitoring of GM crops during field trials.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the research project	7
Section 1. Purpose of the research	7
Section 2. Necessities of the research	8
Section 3. Effect to relevant fields	13
Chapter 2. The current status of the research in domestic and overseas	15
Section 1. Abroad	15
Section 2. Domestic	17
Chapter 3. The scope and results of the research project	19
Section 1. Environmental risk assesment of the genetically modified oilseed rape and bentgrass	19
Section 2. Development of technology for high accuracy analysis of GM oilseed rape and bentgrass	88
Section 3. Development of guide line for environmental risk assesment of the GM oilseed rape and bentgrass	107
Section 4. Development of technology for biosafety management of the GM oilseed rape and bentgrass	175
Chapter 4. Object Accomplishment and Contribution	218
Section 1. Object Accomplishment	218
Section 2. Contribution	220
Chapter 5. Application plans	222
Chapter 7. Reference	224

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	7
제 1절 연구개발의 목적	7
제 2절 연구개발의 필요성	8
제 3절 연구개발에 따른 기대성과	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	15
제 1절 국외의 기술개발 현황	15
제 2절 국내의 기술개발 현황	17
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	19
제 1절 GM 유채와 벤투그래스의 환경방출실험 및 평가	19
제 1항. 이론적, 실험적 연구방법	19
제 2항. 연구내용 및 연구결과	19
제 2절 GM 작물의 고감도 분석법 표준화 및 검정방법 개발	88
제 1항. 이론적, 실험적 연구방법	88
제 2항. 연구내용 및 연구결과	88
제 3절 유채와 벤투그래스의 환경위해성평가 가이드라인 개발	107
제 1항. 이론적, 실험적 연구방법	107
제 2항. 연구내용 및 연구결과	107
제 4절 GM 유채와 벤투그래스의 모니터링 기법 개발	175
제 1항. 이론적, 실험적 연구방법	175
제 2항. 연구내용 및 연구결과	175
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	218
제 1절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표 달성도	218
제 2절 관련분야에의 기여도	220
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	222
제 6 장 참고문헌	224

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

1. 최종연구목표

- 가. GM 유채와 벤투그래스의 환경방출실험 및 평가
- 나. GM 작물 검증을 위한 고감도 분석법 개발
- 다. GM 작물의 환경위해성평가 가이드라인 개발
- 라. GM 작물의 사후 모니터링을 위한 기법 개발

2. 연구분야별 목적

가. GM 유채와 벤투그래스의 환경방출실험 및 평가

- GM 유채와 벤투그래스 이벤트의 환경방출실험 실시 및 평가를 위하여 동종, 근연종 및 타종간의 교배가능성을 조사하고자 함
- GM 유채와 벤투그래스 이벤트들의 선발과정을 포함하여 분자생물학적 분석과 생육특성을 비롯한 생리적, 형태적, 농업적 특성 등의 표현형질을 조사·분석하고자 함
- GM 유채와 벤투그래스의 단백질 특성을 분석하고 독성 및 알레르기 검정

나. GM 작물 검증을 위한 고감도 분석법 개발

- Bioinformatic tool을 이용한 GM 유채 및 벤투그래스의 형질전환에 사용된 벡터의 구성에 관한 염기서열 분석
- 기능성 유전자의 in-silico 분석을 통한 primer 제작 및 최적 PCR 조건 확립으로 GM 작물 검증을 위한 고감도 분석법 개발

다. GM 유채와 벤투그래스의 안전관리 지침 개발 및 환경위해성평가 가이드라인 개발

- 유전자변형생물체 위해성평가의 기본적 원칙 중 하나는 작물, 도입형질, 방출환경에 따라서 유전자변형물체의 위해성이 다르기 때문에 사안별로 접근해야 하기 때문에 본 연구에서는 작물에 대해서는 유채와 벤투그래스, 도입형질에 대해서는 스트레스 내성, 방출환경에 대해서는 연구개발을 위한 격리포장 등의 제한적 방출을 대상으로 함
- 사안별 접근방식은 위해성평가와 관리의 일반적인 개념, 원칙과 실제상황에 기초를 두고 기존의 위해성평가와 관리에 대한 과학적, 규제적 측면의 성과들을 수집정리한 후 유채와 벤투그래스에 적용할 수 있는 모델과 이행지침을 도출하고자 함
- 유전자변형 작물의 위해성평가와 위해성관리의 개념, 원칙과 고려사항들을 기술하고, 나아가서 스트레스 내성 유전자변형 유채와 벤투그래스의 환경위해성평가 모형(안)을 개발하고, 연구개발 단계의 안전관리 요소를 제시

라. GM 작물의 사후 모니터링을 위한 기법 개발

- 실험실이나 온실 등 밀폐조건을 벗어난 포장실험에서 안전관리의 핵심은 격리포장 외부 식물체로의 도입유전자의 이동가능성을 최소한으로 제한하는데 있음
- 본 연구에서는 GM 유채와 벤토그라스의 포장실험 중에 도입유전자의 확산을 방지하기 위한 모니터링 기법을 개발하고자 함

제 2절 연구개발의 필요성

1. 사회 경제적 측면

- “유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률” (LMO법, 2008. 1. 1) 시행으로 안전성이 확보된 GMO에 대해서만 국가간 이동 (수출·입)이 가능해짐
- GM 작물의 재배면적은 1996년 1.7백만 ha에서 2000년 44.2백만 ha로 25배 증가하였으며, 2011년에는 160백만 ha로 94배로 증가하였음 (ISAAA, 2012)
- 세계 종자교역 시장에서 차지하는 비중 또한 급속한 확대되어 세계 종자시장에서 GM종자가 차지하는 비중은 2003년 44억 달러에서 2010년에는 112억 달러로 신장하여 전체 시장의 1/3을 차지하였고, 2015년에는 200억 달러로 증가 될 것으로 전망되어지고 있음 (ISAAA, 2012)
- GMO 환경방출실험은 매년증가 (2007년 : 미국 12,929건, 프랑스 573, 영국 232, 일본 74) 증가하고 있으나, 국내에서는 GMO 환경방출실험 및 재배생산 실적은 전무
- 세계적으로 유전자변형작물의 상업적 재배는 14년째 접어들고 있으며, 2007년 재배면적은 1억 1,140만 ha로 세계 경작지 면적의 8%를 점유하였음 (ISAAA, 2008)
- 2007년 재배된 총 1억1,430만 ha의 생명공학 재배면적 중 중 약 9%에 해당하는 1,120만 ha에서 재배된 작물이 바이오연료 생산에 사용되었으며 그 중 90% 이상은 미국에 분포하였음
- 2007년 미국에서는 700만 ha에서 재배된 GM 옥수수가 에탄올 생산에 사용되었으며, 약 340만 ha에서 재배된 생명공학 콩과 약 1만 ha에서 재배된 GM 카놀라 (유채)가 바이오 디젤 생산에 사용되어, 총 1,040만 ha에서 재배된 GM 작물이 바이오 연료 생산에 사용된 것으로 추정됨
- 2007년 브라질에서는 75만 ha에서 재배된 RR® 콩이 바이오 디젤 생산에 사용되었으며 캐나다에서는 약 45,000 ha에서 재배된 GM 카놀라 (유채)가 바이오 디젤 생산에 사용되어, 세계적으로 총 1,120만 ha에서 재배된 GM작물이 바이오 연료생산에 사용되었음 [ISAAA briefs 37- 2007 (국제 농업 생명공학 정보센터)]
- 미국과 캐나다에서 재배된 바이오 에너지용 카놀라 (유채)의 경우 전체 바이오에너지용 GM 작물의 0.1% 인 1.045,000 ha에서 재배된 것으로 보고됨 (그림 1)

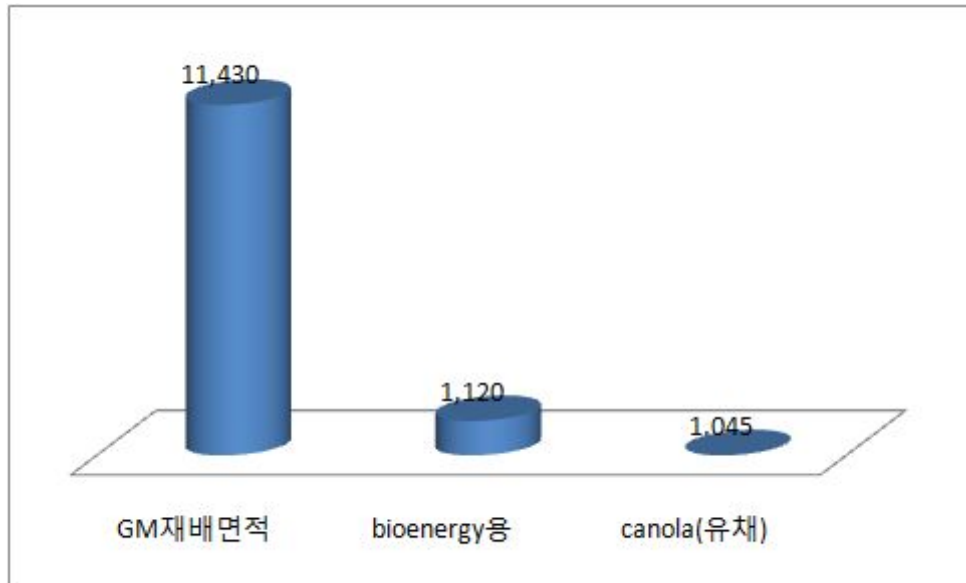


그림 1. GM 총 재배 면적대비 바이오 디젤용 GM 카놀라 (유채) 재배 면적 (단위 : 백만 ha)
ISAAA briefs 37- 2007 (국제 농업 생명공학 정보센터)

- 세계의 유전자변형 작물 종자시장은 2007년 67억 달러를 기록하였으며, 매년 10%의 성장률을 보이고 있음 (GIA, 2008). 3대 GM 작물의 종자시장 크기는 작물별로는 콩, 옥수수, 면화의 순이며, 형질별로는 제초제저항성, 해충저항성과 이들의 후대교배종임. 현재 산업화가 성공한 작물은 대부분 제1세대 작물임
- 매년 세계 GM 작물의 재배면적이 증가하고 있으며, 개발완료 또는 진행중인 GM 작물의 조기 활용하기위한 안전성 확보체계 마련이 시급함

2. 기술적 측면

- 국내에서 많은 GM 작물 개발 연구가 진행되고 있음에도 불구하고 아직까지 상업화 단계에 이르지 못한 원인에는 강력한 승인 규제, 소비자의 부정적 인식, 연구 기술 및 인프라 부족 등 여러 원인이 있으나 그 중 한 원인으로 안전성평가를 위한 가이드라인 부재로 안전성평가 연구가 어려움
- 안전성평가는 내용적으로는 대상 생명공학작물의 위해성을 적절한 비교구와 비교하여 과학적으로, 상대적으로, 사안별로 평가하는 과정이며, 형식적으로는 위해성심사 통과를 목적으로 심사에 필요한 자료를 생성하는 과정으로 정의됨
- 위해성평가는 규제의 측면에서 의정서, Codex Alimentarius, OECD 등 국제적인 협의에서 다루어진 주제였으며, 그 협의는 각국의 규제체계 확립에 영향을 주어왔음. 그 동안의 노력으로 화합물과 구별되는 LMO에 독특한 비교접근법 즉, 실질적 동등성과 친숙성 개념이 개발되었으며, 사안별 평가가 강조되어 왔음
- 이행의 측면에서는 LM 작물의 개발사인 농업생명공학회사를 중심으로 위해성평가가 수행되어 왔으며, 제1세대 형질인 제초제저항성과 해충저항성에 대해서는 많은 실험실, 온실, 포장시험을 거치면서 평가에 대한 경험을 축적하였음

- 현재 제초제저항성 또는 해충저항성 이외의 다른 형질(산업용, 의약품생산용 등)을 도입한 작물이 개발되고 있으며, 작물 이외의 다른 형태의 LMO 즉, 나무 또는 어류가 개발될 것으로 보임. 위해성평가가 사안별로 수행되어야 하기 때문에 이들의 개발은 위해성평가 수행의 측면에서 새로운 도전이 될 것임
- GM 작물의 산업화 체계는 유전자개발, 이벤트육성, 위해성평가, 위해성심사, 품종보호출원으로 구분할 수 있는데, 대부분의 국가가 GM 작물의 재배 및 유통 전 위해성심사를 의무화하고 있어 위해성심사 동향은 향후 GM 작물의 산업화를 예측하는데 단서를 제공함
- 1992년부터 2007년까지 총 19작물 110종이 승인되었으며, 이중 단일이벤트는 87종 (바이오안전성백서, 2008). 후대교배종 23종은 2000년 이후 개발된 것으로 증가 추세에 있음 (그림 2)
- 최근 승인된 이벤트는 제 2세대 이상의 GM 작물에 해당되며, 주로 해충 및 제초제저항성이 등록되었으나, 새로이 목적별 GM 작물 (스트레스내성, 영양기능 강화, 바이오 원자재)이 개발되고 있으므로 기존의 각 작물별로 수행되어야 하는 위해성평가에 새로운 기준이 필요하게 됨
- 실제로 위해성평가는 막대한 비용을 요구하며 - Kalaitzandonakes 등은 생명공학작물의 생물안전성 규제비용을 6-15 백만불로 추산한 바 있음 - 분자생물학, 작물학, 식물생리학, 유전학, 생태학 등 여러 학문분야의 지식과 기술을 필요로 하는 종합적 특성을 가지고 있어서, 공공연구기관, 대학, 중소기업 또는 시장의 크기가 작은 작물의 경우 별도의 실용화 장애요인으로 작용할 수 있음

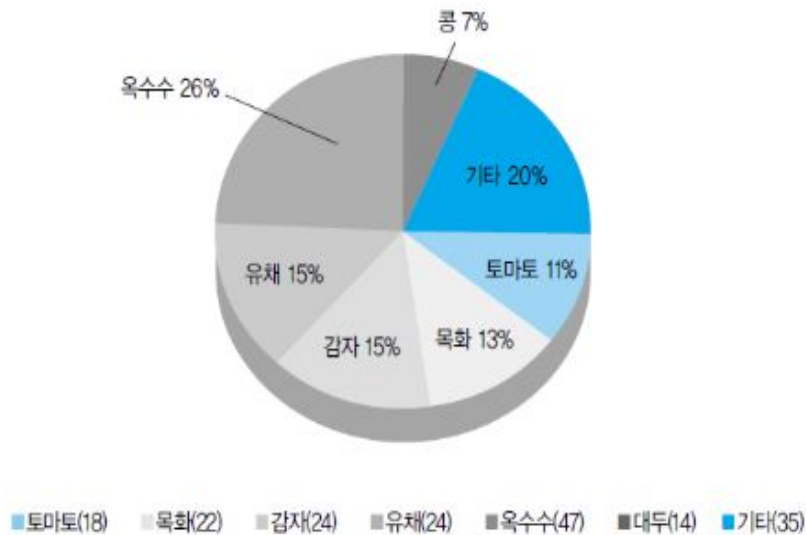


그림 2. 세계 18개국 식용, 사료용, 재배용, 기타용으로 승인된 GMO 심사현황 [출처: 바이오안전성 백서, 2008]

- 따라서 국내 개발 GM 작물이 승인된 사례가 없다는 국내 상황에서 이러한 고비용의 방대한 작업을 효율적으로 진행하기 위해서 위해성평가자에게 1) 위해성평가의 원리 및 특성, 2) 위해성평가 결과에 대한 종합적 해석, 3) 위해성평가 요소에 대한 기존 지식과 그 한계, 4) 위해성평가에 대한 최근 연구 동향, 5) 위해성평가 관련 규제 및 국제 동향에 대한 이해가 필수적임
- 환경 위해성 평가의 가이드라인 개발은 OECD의 생명공학규제조화작업반에서 수용생물체 20여종에 대한 기술합의서를 개발해 왔으나 국가간의 이해관계로 인해 새로운 형질에 대한 가이드라인 개발은 진행되지 않음
- 국내에는 ‘유전자변형작물의 환경위해성평가 가이드라인: 일반론 (2005)과 ‘유전자변형작물의 환경위해성평가 가이드라인: 제초제저항성’ (2006, 농촌진흥청)이 개발되었으나, 국내의 상황을 고려한 온실 및 격리 포장에 대한 가이드라인이 개발된 사례가 없음
- LMO법이 시행됨에 따라 형질전환 생물체의 개발에 대한 실내 실험실, 온실 및 격리포장에서의 실험이 추가됨에 따라 국내 연구 및 환경 등의 상황을 고려한 이행 가능한 안전관리 지침의 개발이 필요함
- 국내 GM 작물의 연구개발도 식용을 넘어서서 비식용 분야에서도 추진되고 있으며, 안전성을 확보한 연구 및 제품 (작물)의 개발을 위한 안전관리 지침 및 환경위해성평가 가이드라인이 필요함
- (주) 에프엔피에서 개발한 GM 유채와 잔디의 환경위해성 평가는 비식용으로서 바이오디젤의 원료로 개발이 가능하며 환경방출실험 모델로 사용 가능함
- 비식용의 환경방출실험을 통해 얻어질 결과를 바탕으로 국내 환경위해성 심사 가이드라인 개발 및 모니터링을 통해 GM 유채와 잔디의 유전자 이동과 영향성을 점검하고 안전성을 확보하고자함

3. 국가적 기반산업으로 개발 필요성

- “유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률” (LMO법, 2008. 1. 1) 시행으로 안전성이 확보된 GMO에 대해서만 국가간 이동 (수출·입) 및 재배가 가능해짐
- LMO법은 개발된 GM 작물의 국가간 이동의 장벽이면서 동시에 안정성이 확보된 작물의 경우 해외수출이 가능해 짐에 따라 기회이기도 함
- 국내의 경우 대량의 GM 작물 재배에 대한 부적지 이므로 해외수출용 작물과 바이오에너지 원자재로의 개발을 위한 대규모 실험이 이루어지고 있으나, 환경방출실험 등이 이루어지지 않고 있음
- 세계의 주요 GMO 작물의 채택율은 콩의 경우 70%, 면화는 46%이상을 차지하고 있으며, 옥수수, 유채의 순으로 나타나고 있음 (그림 3)
- 따라서 제도적 장치를 조속히 마련함으로써 개발 GM 작물의 산업화를 통한 환경과 에너지 문제의 해결 방법을 제시할 수 있음

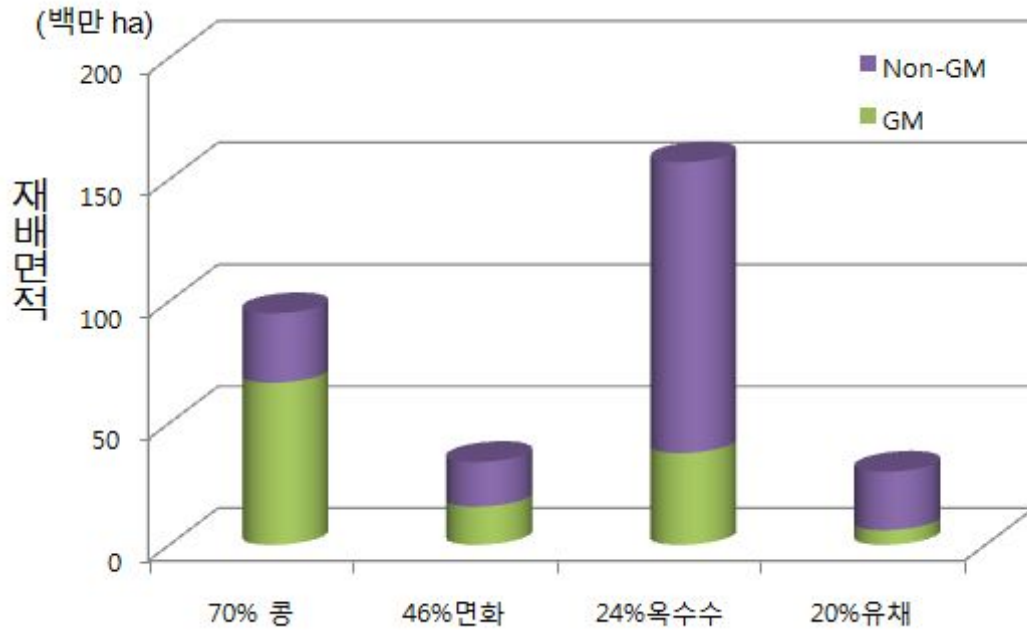


그림 3. 세계 주요 GM 작물 재택율 [출처: ISAAA briefs 39-2008 (국제농업생명공학 정보센터)]

- 교토의정서 (2005. 2. 16) 발효에 따른 각국의 온실가스 배출량의 배출권 매매는 세계 산업의 변화를 가져오고, 세계은행의 경우 이러한 탄소 배출량 삭감 프로젝트에 투자하는 PCF (Prototype Carbon Fund)를 실시하는 등, 온실가스 배출을 감소시킬 수 있는 연구개발이 활발해 지고 있음
- PCF는 캐나다, 일본 등 6개 정부와 17개 민간 기업으로 구성되어 있으며, 1억 8,000만 달러의 예산을 보유하고 있으며 (자료 일본 정책은행 2004), 네덜란드 (4,000만 달러), 벨기에 Dexia와 유럽부흥개발은행이 4,000만 유로의 펀드를 조성하는 등 세계각지에서 탄소 펀드 조성이 활발히 이루어지고 있음
- 온실가스중 이산화탄소량을 가장 많이 감소시키고 있는 것은 광합성을 이용하는 녹색식물이며, 국내의 경우 “녹색성장” 정책에 따라 활발히 연구되고 있음
- 온실가스 배출과 더불어 문제가 되는 에너지 또한 화석연료의 고갈에 따라 차세대 에너지원의 확보 방법으로 GM 작물 (옥수수, 콩, 유채 등)을 이용한 바이오메스 (Biomass) 증대 기술은 온실가스와 에너지 문제를 동시에 해결할 수 있는 유일한 방법임
- 온실효과에 의한 이상기후의 발생은 녹색식물의 성장을 어렵게 하고 있으며 이의 해결방안으로서 형질전환을 통한 환경저항성 식물의 개발이 유일한 해결책임
- 국내 GM 작물의 개발은 비식용 작물을 이용한 탄소 배출권 확보 및 바이오 에너지 원자재 분야에서도 추진되고 있으며 이들의 산업화를 위해 안전성을 확보한 작물 개발을 위한 안전관리 지침 및 환경위해성평가 가이드라인이 필요함
- (주) 에프엔피에서 개발한 GM 유채와 잔디의 환경위해성 평가는 비식용으로서 바이오디젤 등 바이오 연료의 원자재로 개발이 가능하며 GM 작물의 환경방출실험 모델로 적합함

- 비식용 GM 작물을 대상으로 환경방출실험에서 얻어질 결과를 바탕으로 국내 환경위해성 심사 가이드라인 개발 및 모니터링을 통해 GM 유체와 잔디의 유전자 이동과 생태계에 미치는 영향을 평가하고 안전성을 확보하고자함
- 본 과제에서 도출된 연구결과는 바이오원자재 확보를 위한 해외시장 개척으로 에너지 안보에 대한 대비와 탄소배출권 확보 등 미래의 국가 기반산업으로 성장하는 원동력이 될 것임

제 3절 연구개발에 따른 기대성과

1. 기술적 측면

- GM 유체와 벤프그래스 개발의 효율적 안전관리 방안과 환경위해성 심사 지침 제공으로 국내 GM 작물의 산업화 및 GMO 안전성에 대한 과학적 신뢰성 제고
- 비식용 또는 수출용 GMO 개발을 위한 안전성 평가 및 관리기술 개발 가이드라인 제시
- GM 작물의 조기 실용화 및 국가의 LMO 안전관리 정책지원, 비식용 GM 작물을 이용한 바이오 에너지 원료 생산 및 산업적 활용 기반 마련으로 GM 작물 개발을 통한 산업적 활용 연구의 활성화
- 미국의 경우 잔디는 종자시장에서 옥수수 다음 위치를 점하는 매우 높은 경제성을 지니며, 비식용이고 영양번식이 가능한 작물로서 형질 고정애 장기간이 소요되지 않고 대량번식이 가능하기 때문에 유전공학적 우량 품종 육성의 적절한 대상 작물임. 또한 최근 증가되고 있는 골프장이나 축구장과 같은 레저 및 스포츠산업을 비롯한 사회 전반에서 잔디의 양적 요구가 급격히 증가하고 있음
- 따라서 잔디관련 사업규모가 크게 확대되고 있어 고품질의 잔디품종 개발이 요구되며 이러한 잔디의 수요증가와 경제성을 고려한다면 생명공학기법을 이용한 고부가가치 잔디품종 개발은 농가의 소득증대와 국내 수입대체 또는 수출품목으로 주요하게 부각될 수 있을 것임
- 본 과제의 제초제 저항성 유전자(bar)와 활성 ABA 생산 유전자(AtBG1)를 도입시킨 Bentgrass 잔디는 제초제 저항성, 왜소성, 내건성 및 내염성을 동시에 지니는 생명공학 잔디로서 여러 장점을 지님
- 제초제 저항성은 잔디 재배 및 관리에 사용되는 잡초 및 병충해 방제를 위한 농약 사용을 줄여 환경오염을 감소시킬 수 있는 환경친화적 잔디품종의 특성을 부여할 수 있으며, 왜소성과 내건성은 잦은 잔디깎이와 관수를 줄여 유지관리비용을 획기적으로 줄일 수 있는 잔디품종이 될 수 있음. 또한 내염성은 바다 주변의 많은 골프장, 공원 등에서 이용될 수 있는 이점을 줄 수 있음
- 따라서 bar와 AtBG1이 도입된 제초제저항성, 왜소성, 내건성, 내염성 잔디품종은 고부가가치 생명공학 잔디 품종으로 향후 잔디 시장에 유효한 경제적 품종이 될 수 있을 것으로 여겨짐
- GM작물의 고감도 유전자 검사법을 제시함으로써 형질전환체 감별법을 상품화하고 환경안

전성을 고려한 GM 작물의 위해성평가 능력 형성으로 환경위해성평가 체계 구축 및 GM 개발 실용화를 위한 기술적 비용 절감

- GM 작물 상업화를 통한 경제적 가치 창출 및 국가위상 제고

2. 산업적 측면

- 개발된 GM 작물의 조기 산업화 기반 마련
- 제초제 저항성을 포함한 GM 잔디는 제초제 사용량과 빈도를 감소시켜 비용과 노동력을 절감하고 환경오염을 감소
- GM 작물의 실용화는 미래시장 개척과 생명공학 기법을 이용한 고부가가치 창출
- GM 작물 개발의 국제 경쟁력 확보와 기술적 우위 점유
- GM 작물의 사후 모니터링 기술개발로 GM 작물의 안정적 사후 관리방안 및 관리 가능
- GM 작물의 환경위해성 가이드라인 개발로 개발완료 또는 개발중인 GM 작물의 심사신청 활성화
- 고감도 분석법 개발로 GM 작물 검정이 용이
- 2000년 이후의 세계의 이상기후로 인한 작물의 생산량 감소로 환경 저항성 종자의 수요는 늘고 있으며 특히 아시아와 아프리카의 사막화현상이 두드러지면서 사막화 방지를 위한 내건성 GM 유채의 등장은 경제적 파급 효과 뿐만 아니라 환경보전에도 이바지할 수 있음
- 아프리카 대륙의 북부와 남아메리카 브라질의 아마존 농장의 사막화 진행으로 인한 기후이상 그리고 중국북부와 내몽고 초원지역의 사막화가 심각해짐에 따라 발생된 황사로 인한 중국 동북부를 비롯한 한국까지 영향을 주고 있는 상황임
- 따라서, 내건성 유채는 사막화 방지뿐만 아니라 바이오 디젤을 생산할 수 있는 원자재로서 경제성을 가지고 있음
- 내건성 잔디의 경우 한지형잔디인 벤투그라스종에 내건성 및 왜소성을 가진 복합형질을 가지고 있어 재배 및 관리의 용이성이 큼
- 내건성잔디의 경우 건조지역의 골프장 그린에 이용이 가능하며, 제초제 저항성을 가지고 있어 노약 사용의 회수 줄임과 동시에 왜소성으로 인한 관리의 용이성으로 인해 잔디 수입의 대체 효과 및 산업화 가능성이 높음

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국외 기술개발 현황

- 기후변화 및 바이오에너지에 대한 수용 증가로 세계적으로 바이오에너지 원자재를 확보하기 위한 국가적인 정책 목표를 설정하고 해외시장 개척 등 적극적인 개발이 이루어짐
- 2009년 4월 기준으로 24개국에서 식용, 사료용, 재배용 및 기타용으로 승인 받은 이벤트수는 195건 집계되었음 (한국바이오안전성정보센터, 2009)
- GM bentgrass의 특허 등록은 미국의 경우 2008년도에 2건의 등록을 확인되었고, GM 유채의 개발은 현재까지 24개 품종이 LMO 승인이 되어있고, 주로 식용 (19)과 사료용 (24건) 그리고 재배용 (14)건이며 이중 재배용은 바이오 디젤의 원료를 목적으로 미국과 캐나다에서 약 105만 ha 의 면적에서 재배되었음 (2007 ISAAA)
- 주요 GM 작물의 도입 유전자를 살펴보면 제초제저항성과 해충저항성 유전자를 도입하였으나 환경저항성 유전자의 도입은 보고되지 않으므로, 본 연구진에서 개발된 GM 유채의 환경위해성 평가를 통해 품종 출원함으로써 기술적 우위를 점할 수 있을 것으로 생각됨
- KISTI 『글로벌동향브리핑 (GTB), 2008』에 따르면 바이오연료의 생산이 전세계 식량가격을 75%까지 증가시키는 원인이 되고 있다는 주장이 제기됨으로써 식량과 경합하지 않는 원료를 이용한 바이오연료의 생산이 요구되기 때문에 복합형질을 가진 GM 유채의 개발은 비식용으로서 사막화 방지를 위한 녹화사업과 바이오 디젤 생산을 가능하게 하는 산업화 모델이 될 수 있음
- 세계의 이상기후로 인한 재배지역의 감소와 인구증가로 인한 식량문제의 해결을 위해 GMO는 하나의 해결 방법이며 동시에 GMO식품의 안전성에 대한 요구도 또한 증가하고 있음. GMO의 개발이 2000년 이후 식량증대를 위해 급격히 증가하고 있으며, 최근에는 바이오매스 증대를 통한 대체에너지 작물 개발을 위한 GMO 개발이 급격히 증가하고 있음
- GM 작물 개발의 최고 선진국인 미국은 다국적기업을 통해 GM 작물 개발 기술 및 시장을 독점하고 있는 상황이며, 유럽, 호주, 일본 등 선진국에서는 기업, 대학, 정부 연구소 등을 통해 GM 작물 개발에 노력하고 있음
- 최근 GM 작물 개발 후발국인 중국, 인도, 브라질 등 개발도상국들은 정부의 강력한 지원을 통해 정부주도의 GM 작물 개발 및 상업화 추진 중에 있으며 중국은 '09년 자국에서 개발한 해충저항성 벼 및 사료용 옥수수수를 승인하여 상업화를 목적으로 진행 중임
- 인도는 기존 해충저항성 목화의 상업화 이후 '09년에는 자국 기술로 개발한 해충저항성 가지를 개발하여 승인하였고 최근 브라질은 '11년 바이러스저항성 콩을 개발·승인하였으며 바이러스 방제를 통해 900-1,800만 명분의 수량 증대 기대함
- GM 작물의 환경방출실험에서 도입유전자의 이동가능성을 평가하는 연구로 영국에서 수행한 격리포장실험에서 Scheffler 등(1993)은 교잡율이 GM 유채로부터 47m 떨어진 거리에서 0.00033%에 불과함을 보고하였지만, 중국에서 연구된 격리포장실험에서는 225m²의 면적에

GM 유채를 정식하고 유전자이동성을 조사하였을 때 최대 2000m에서도 0.0061%의 빈도로 교잡이 가능함이 관찰되었음 (Cai 등 2008). 호주에서는 대규모 면적(25 - 100 ha)의 유채 재배지에서 도입유전자 이동가능 거리를 조사하였을 때 그 거리가 3km에 이를 수 있음이 보고된 바 있음 (Rieger 등 2002). 유채의 유전자이동성에 대한 대부분의 연구에서 GM 유채로부터 10m 이내 거리에서 대부분의 교잡이 이루어지지만 상당히 낮은 수준의 비율일지라도 먼 거리까지 교잡이 가능함을 보여주고 있음 (Hüsken과 Dietz-Pfeilstetter 2007).

- 유채의 경우 Scheffler와 Dale (1994)은 *Brassica rapa*, *B. juncea*, *B. adpressa*, *Raphanus raphanistrum*이 유채와 방임수분이 가능하다고 판단하고 있으며, Ford 등 (2006)은 교잡율은 매우 낮지만 유채와 야생 *Brassica oleracea*와의 방임수분도 가능함을 밝힌 바 있음
- FitzJohn 등 (2007)에 의하면 전세계적으로 총 23종이 유채와 교잡이 가능함이 보고되어 있는데, 유채를 웅성배우체로 하여 교잡을 하였을 때에는 동속으로 *B. carinata*, *B. juncea*, *B. maurorum*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. rapa* 등 6개 종이, 이속으로는 *Diplotaxis erucoides*, *D. muralis*, *Hirschfeldia incana*, *Raphanus sativus*, *Sinapis arvensis* 등 5종이 있음
- GM 작물의 위해성 평가 지침과 관련하여 OECD, UNEP 등 국제기구를 중심으로 GM 작물의 위해성평가 지침서 개발이 진행 중임
- 위해성평가에서 크게 고려하는 사항은 수용생물체의 생물학, 도입유전자 및 형질, 유전자 도입과정(형질전환)의 비의도적 영향, 수용환경으로 구분함. 환경위해성평가 가이드라인의 개발에 가장 많이 기여한 국제기구는 OECD로 OECD의 생명공학규제조화작업반(Working Group on the Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology)에서는 주로 첫 번째 고려사항인 수용생물체의 생물학에 관심을 가져왔으며 현재까지 20여 종의 식물 종의 생물학에 대한 기술합의서를 개발하였음. 그러나 이 작업반은 국가간의 합의를 중시하기 때문에 상당히 느리게 진행되는 특성이 있으며 새로운 형질의 위해성평가에 대한 작업은 현재 진행되고 있지 않음. 즉, OECD 작업반의 가이드라인 자료는 선행적 대응을 기대하기 어려운 실정임
- 바이오안전성의정서 제15조와 부속서III에서는 LMO의 환경 및 인체에 미칠수 있는 부정적 영향을 식별하고 평가를 위한 위해성평가 규정을 제시하고 있음. 제4차 당사국총회에서는 위해성평가의 특수한 측면에 대한 추가적인 지침의 필요성을 고려하여 “위해성평가 및 관리 기술전문가그룹(Ad Hoc Technical Expert Group on Risk Assessment and Risk Management, AHTEG)”을 설치하고 open-ended 온라인포럼과 AHTEG 회의를 개최하기로 2008년 5월 결정하였음. 2008년 11월부터 2009년 2월까지 진행된 온라인포럼 회의를 통해 위해성평가와 관리에 있어서 다음과 같은 특수 부분에 대한 추가 지침의 개발과 이를 위한 실행계획을 권고하였음: 1)LM어류, 수목, 미생물 및 의약품생산식물, 2)후대교배종, 3)특수 수용환경, 4)방출 사후 모니터링, LMO 환경방출의 장기 영향.
- 현재까지 3차 AHTEG 회의 및 open-ended 온라인포럼을 통해 “위해성평가 로드맵”과 “LMO 위해성평가 가이드라인”을 개발되었으며¹⁾, 이 가이드라인은 앞으로의 온라인포럼, AHTEG 회의, 지역 컨퍼런스를 통해 지속적으로 개선될 예정임²⁾

1) 현재까지 개발된 가이드라인은 2011년 9월 수정본이며 위해성평가 로드맵과 특수 LMO(후대교배종, 환경스트레스저항성, LM 모기)에 대한 위해성평가 가이드라인으로 구성됨.

2) 2012년 가이드라인 개발 관련 회의 일정 : 온라인포럼(1. 23-2. 3), 온라인 지역 컨퍼런스(2. 27-3. 30), 4차 AHTEG 회의(5. 7-11), 제6차 당사국총회(10. 1-5).

제 2 절 국내 기술개발 동향

○ 국내에서는 ‘유전자변형작물의 환경위해성평가 가이드라인: 일반론’과 ‘유전자변형작물의 환경위해성평가 가이드라인: 제초제저항성’이 개발되었으며, 그 세부 내용은 다음과 같음

- 『유전자변형작물의 환경위해성평가 가이드라인: 일반론』(2005, 농촌진흥청): 본 가이드라인은 위해성평가의 개념과 일반적 원리를 기술하고, 우리나라의 유전자변형작물 환경위해성평가 심사제도를 개괄한 후, 심사지침에서 규정하고 있는 평가항목에 따라 심사제출자료 작성 방법을 예시를 들어 설명하고 있음. 본 가이드라인은 위해성평가의 일반적인 사항을 습득하는데 유용할 것으로 판단됨. 바이오안전성의정서의 국내 이행법인 ‘유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법’과 그 통합고시에서 일부 평가항목과 형식이 개정되었으므로 본 가이드라인도 이를 반영하여 개정할 필요가 있음

<p>목차</p> <p>제1장 서론</p> <p>제2장 위해성평가의 개념과 일반적 원리</p> <p>제3장</p> <p>제4장 환경위해성평가 심사자료 작성시 고려사항</p> <p>제5장 국외 환경위해성평가 가이드라인 현황</p> <p>제6장 참고문헌</p> <p>부록</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 바이오안전성의정서의 환경위해성평가 관련 조항 2. 유전자변형농산물의환경위해성평가심사지침 3. 유전자변형농산물전문가심사위원회운영규칙

- 『유전자변형작물의 환경위해성평가 가이드라인: 제초제저항성』(2006, 농촌진흥청): 본 가이드라인은 대표적인 제1세대 유전자변형작물의 형질인 제초제저항성에 대한 위해성평가를 다루고 있음. 보다 과학적인 접근을 위하여 기존 위해성평가 및 심사동향을 개관하고, 위해성평가의 전략적 측면을 고찰한 후, 제초제저항성 GM 작물의 환경위해성평가의 주요 항목과 방법을 기술하고 있음

<p>목차</p> <p>제1장 서론</p> <p>제2장 위해성평가 및 심사 동향</p> <p>제3장 위해성평가 전략</p> <p>제4장 제초제저항성 GM 작물의 환경위해성평가</p> <p>제5장 결론</p> <p>부록</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제초제저항성 GM 작물 환경위해성 심사 사례 2. GM 작물 환경위해성평가 연구 동향

- 온실 및 격리포장의 안전관리에 대한 지침은 국내 상황을 고려하여 개발된 사례가 없음

실정임. 다만 그 전단계로서 선행국의 자료를 번역·발간한 사례가 있음 (『유전자변형 작물 개발을 위한 온실 및 격리포장 관리 자료집』(농촌진흥청, 2005))

- GM 작물의 환경방출실험에서 도입유전자의 이동가능성을 평가하는 연구는 국내에서도 다수 보고되어 있지만 (Lee 등 2007, Bae 등 2008, Kim 등 2008, Kim 등 2009a, 2009b, Chun 등 2011), 환경방출실험의 안전관리를 목적으로 격리포장 외부로의 도입유전자 이동가능성을 모니터링하는 연구는 국내에서는 Bae 등(2008)이 격리포장을 중심으로 3km 반경에서 제초제저항성 들잔디 (*Zoysia japonica*) 도입유전자의 이동가능성을 모니터링한 연구가 유일함
- GM 작물의 위해성 평가 지침과 관련하여 농촌진흥청에서 GM 벼 및 고추를 대상으로 GMO 안전관리 SOP 작성 연구과제를 2011년부터 진행중이며 국립환경과학원에서 GM 작물 환경위해성평가를 위한 비표적 생물체의 기준 마련 연구과제가 진행중임 (2011년 결과 도출 예정)
- 국내의 경우 농진청, 대학, 연구소 등에서 다양한 GM 작물이 개발 중에 있으나 **아직까지 상업화 승인된 GM 작물은 없는 실정임**. 2011년 현재 국내 GM 작물 개발 현황을 살펴보면, 농진청에서 안전성평가 3작물 5종, 고정계통 육성 8작물 23종을 개발 중에 있으며, 전남대, 명지대, 서울대 등 대학에서 5작물 13종(안전성평가 4작물 6종, 고정계통육성 3작물 7종), 한국생명공학연구소에서 2작물 4종(고정계통 육성 2작물 4종), 기업체인 (주)에프엔피와 농우에서 4작물 5종(안전성평가 4작물 4종, 고정계통육성 1작물 1종)을 개발 중에 있음

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 GM 유채와 벤투그래스의 환경방출실험 및 평가

제 1항. 이론적, 실험적 연구방법

1. 형질전환 식물의 분자생물학적 검정
 - 유전자변형 식물의 유전자 도입여부, 도입위치 및 주변서열 분석
 - 도입 유전자의 복제수, 세대 간 안정성 및 발현확인
 - 도입유전자의 검출 및 발현의 확인 방법 정립
2. GM 유채와 벤투그래스의 생육특성을 비롯한 생리적, 형태적, 농업적 특성 비교
 - 야생형과 GM 유채 및 잔디 재배지의 무기성분 비교분석
 - 종자의 물리적 특성 비교 : 신장, 꽃대길이, 종자길이, 종자의 넓이, 무게, 자연발아율 등
 - 잔디의 피복율, 내건성 내염성 조사
3. 개발된 GM 유채와 벤투그래스의 환경방출실험 및 평가
 - (주)에프엔피의 허가된 유전자 변형 생물체 노지재배포장에서 수행
 - 동종 교배가능성 조사
 - 근연종 및 타종간의 교배가능성 조사
 - 유채 및 잔디의 화분 비산 등을 고려한 교배가능성 조사
4. GM 유채 및 벤투그래스의 단백질 특성 분석
 - 독성 및 알레르기 검정

제 2항. 연구내용 및 연구결과

1. GM유채 (Event #; FnPBnTg2802)의 특성

가. GM유채 (Event #; FnPBnTg2802)의 개발 및 선발과정

- 유채 형질전환에 사용한 유전자는 식물의 ABA 준위를 조절하는 β -glucosidase 1 (BG1) 유전자로 애기장대에서 cloning되었으며 (AtBG1), 수분손실 억제와 건조내성 등의 생리적 특성이 확인되었음 (Cell, 2006)
- GM유채의 개발을 위해 AtBG1 유전자를 Agrobacterium-mediated transformation 방법을 이용하여 형질전환 (그림 1)
- 유채 형질전환체 선발은 항생제가 포함된 선발배지에서 기관분화된 개체를 1차 선발하고 2차 선발은 벡터 구성요소 (AtBG1, PPT, Promoter 등) specific 염기서열을 이용한 분자생물학적 검정을 이용하였음

- 1, 2차 검정에서 AtBG1 유전자의 형질전환이 확인된 개체는 순화 후 온실에서 세대진전 및 증식을 통해 종자를 수확하였으며, 세대진전 (T₁, T₂) 과정에서도 항생제 (그림 2) 및 분자생물학적 segregation 검정을 바탕으로 세대를 고정하였음
- GM 유체에 도입된 유전자 발현분석은 AtGB1-specific primer를 이용한 RT-PCR 또는 HA-antibody를 이용한 western 분석을 통하여 확인하였음 (그림 3)

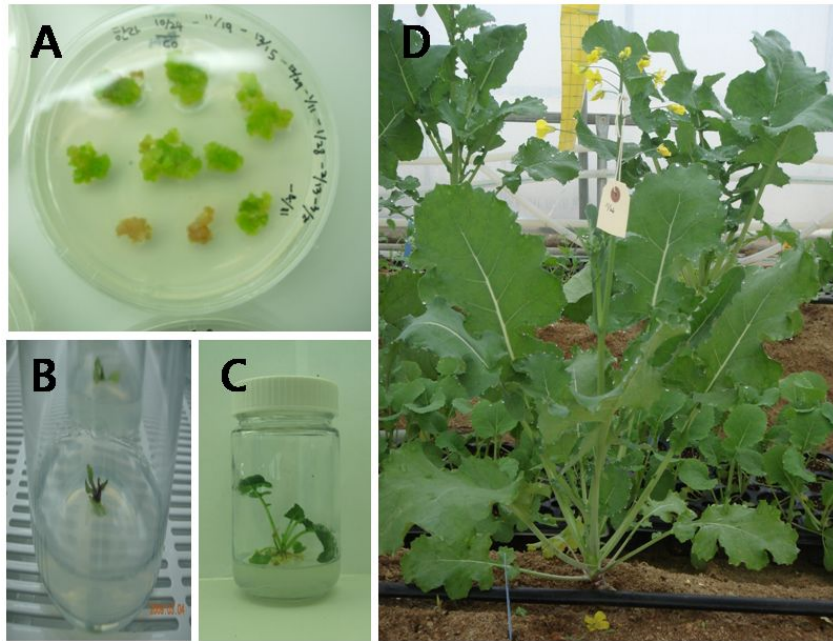


그림 1. Agrobacterium을 이용한 유체 형질전환체 개발과정. A; Agrobacterium과 공동배양된 explant를 항생제가 포함된 배지에 치상, B, C; Explant로부터 기관 (shoot and root) 분화, D; 순화된 형질전환 유체



그림 2. 유체 EVENT의 선발 및 세대진전 과정에서 항생제 저항성 유전자를 이용한 형태학적 segregation 분석

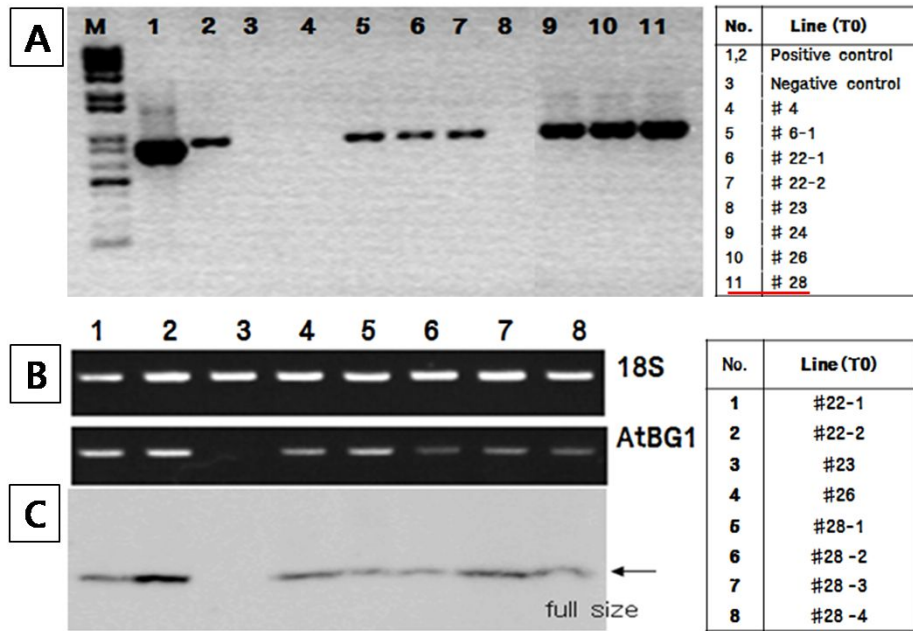


그림 3. 형질전환 유체의 선발 및 유전자 발현 검정에서 EVENT로 이용한 FnPBnTg2802는 모두 형질전환체로 확인. A; 벡터 specific 염기서열을 이용한 형질전환체 1차 검정, B; 목표유전자 AtBG1을 이용한 RT-PCR 검정, C; AtBG1 유전자 C-terminal에 삽입된 HA-tag을 이용한 western 분석

- 유전자가 안정적으로 발현되는 것이 확인된 개체는 (주) 에프엔피의 실험포장에서 세대진전을 진행하여 현재 T2세대가 확보되었으며 균일한 형질을 나타내는 개체를 증식하였음 (그림 4)

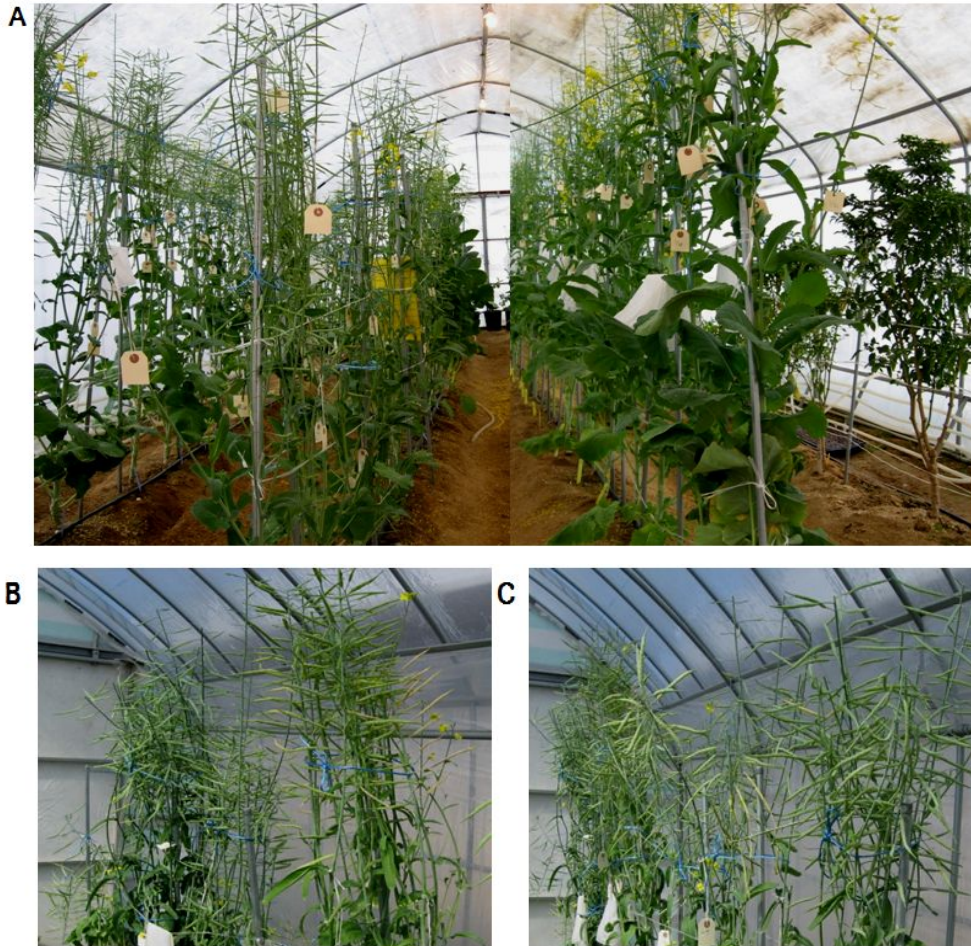


그림 4. GM 유채 T₂ 세대의 증식을 위한 실험포장 재배 (A)와 각 개체별 형태생리학 (일반외형, 개화시기 및 종자의 발달 등) 특성 (B, C)이 균일한 개체 고정

나. GM유채 (Event #; FnPBnTg2802)의 분자생물학적 분석

1) GM유채의 도입유전자 확인

- 본 과제에서 사용한 GM유채 (Event # FnPBnTg2802)는 AtBG1 유전자를 Agrobacterium-mediated transformation 방법으로 형질전환하였음
- 형질전환에 사용한 벡터는 그림 4와 같이 옥수수의 Ubiquitin promoter에 의해 AtBG1 유전자 발현이 조절되고, AtBG1 유전자 말단에 유전자발현을 확인할 수 있는 HA-tag을 삽입하였음
- 형질전환에 사용한 벡터를 full sequencing 하여 vector map을 작성 하였으며, 용역과제에서 수행한 sequencing map 및 restriction map과 비교한 결과, 두 벡터의 염기서열 정보가 일치하였음 (그림 5)

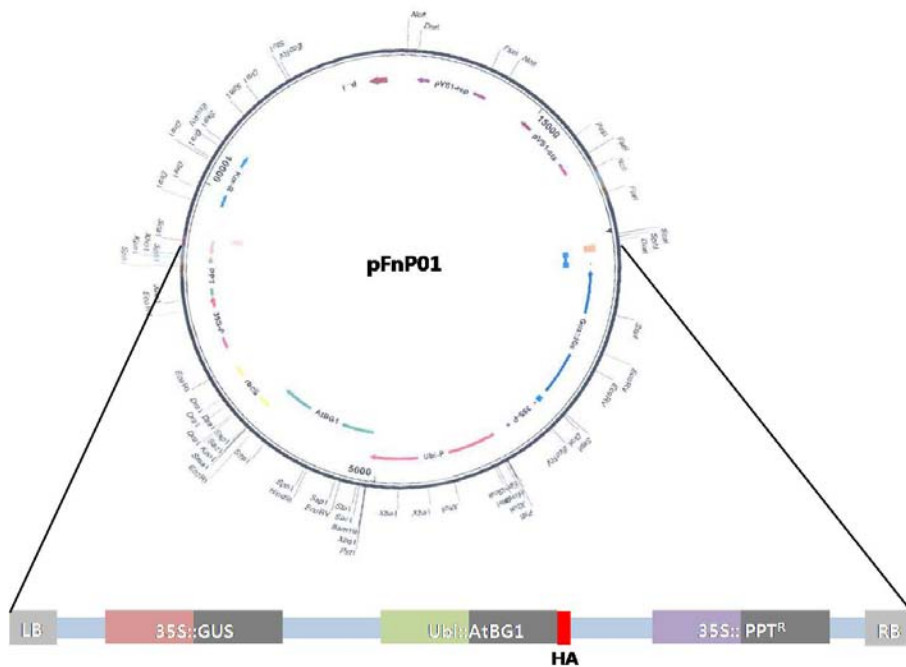


그림 5. 유채 형질전환에 사용한 벡터의 염기서열 분석 및 cis-acting element의 구조

2) 유전자의 도입 위치 및 주변서열

- 유채 EVENT (FnPBnTg2802)에서 형질전환 유전자의 insertion site를 확인하기 위해 형질전환 벡터 specific 염기서열을 이용하여 primer를 제작한 후 inverse PCR (iPCR)을 수행하였음 (그림 6)

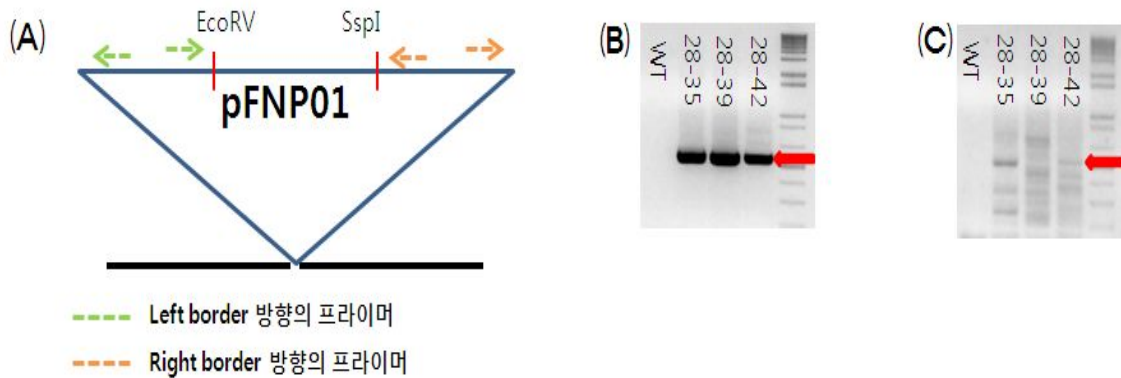
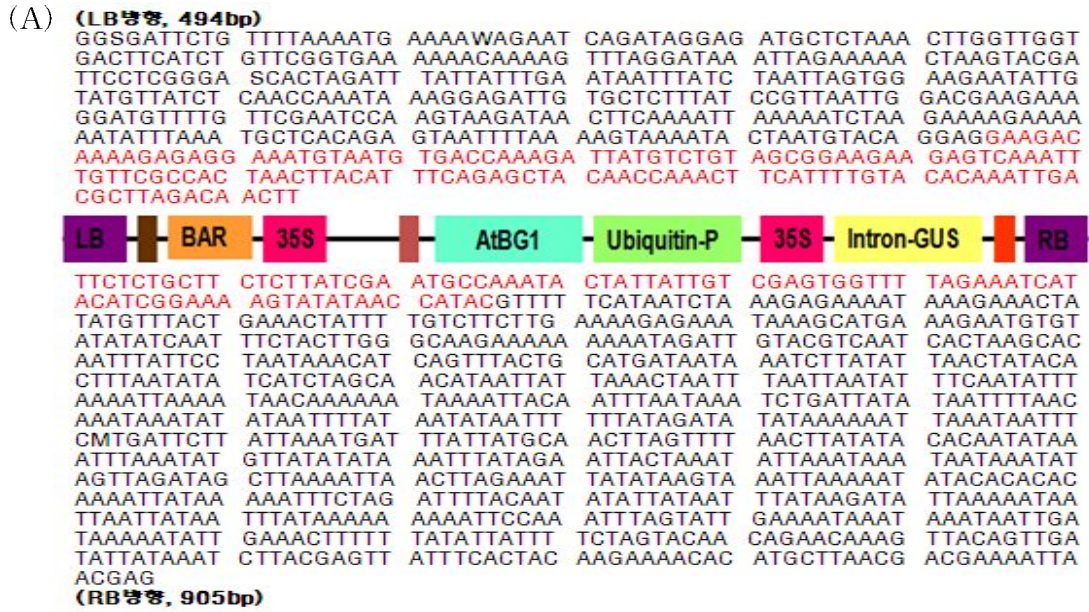


그림 6. 유채 EVENT의 insertion site의 확인을 위한 inverse PCR 프라이머 모식도 (A) 및 Right border 방향 (B) 및 Left border 방향 (C)의 iPCR 결과

- iPCR 수행으로 확보된 insertion site의 주변 염기서열을 분석하였으며 총 1,257bp를 확보하였음. Blast search한 결과 left border 방향의 67bp만이 애기장대의 chromosome 3번과 73%의 homology를 보였음 (그림 7)
- 그러나 homology를 보이는 region이 너무 짧고 1,257bp를 확인했음에도 일치하는 유전자 염기서열이 검색되지 않았음



(B) *Arabidopsis thaliana* genomic DNA, chromosome 3, P1 clone: MIL23

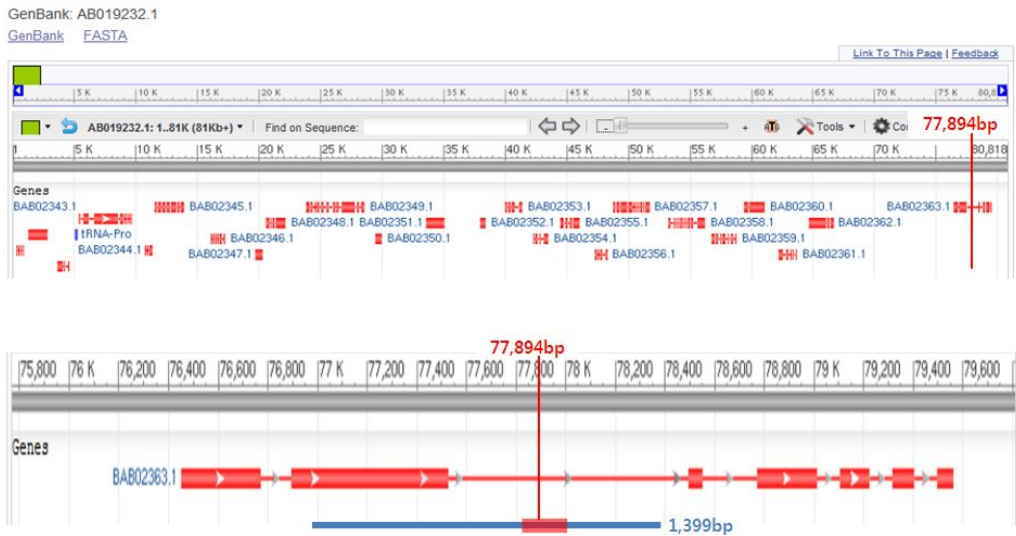


그림 7. (A)는 유체 GM2802로부터 확보된 insertion site의 염기서열정보로 붉은색 염기들은 Blast search하여 검색된 애기장대의 chromosome 3번과 73%의 homology를 보인 영역임. (B)는 검색된 유전자(붉은선)와 GM 유체의 삽입부위 주변 염기서열(파란선)의 모식도로 상기 유전자와 일치하지 않으며 유전자가 존재하지 않는 위치에 삽입되었음을 확인하였음

- 획득한 염기서열이 insertion site의 flanking 염기서열인지를 확인하기 위해 EVENT로부터 획득된 염기서열과 벡터 specific 염기서열을 이용한 PCR 검정 결과, 두 염기서열이 같은 위치에 존재함을 확인하였으며 최종적으로 유체 EVENT의 insertion site를 확인하였음 (그림 8)
- 또한 이를 이용하여 GM 및 Non-GM의 유전자형을 분석할 수 있는 분자마커로의 활용이 가능하였음. 이는 GM을 이용한 교배육종시 육종기간을 단축하고 육종효율을 높일 수 있음

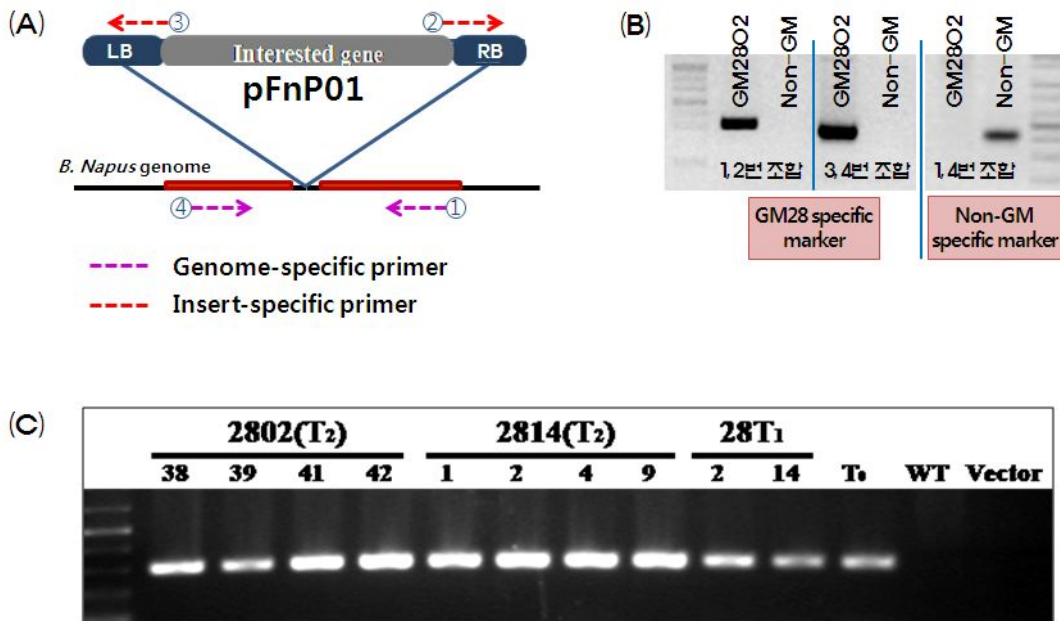


그림 8. Insertion site 검정을 위한 PCR 프라이머 모식도 (A)와 그 결과 (B), 선발된 T1 및 T2 세대의 DNA 분석결과 (C)

3) 도입유전자의 세대 간 안정적 유전 및 발현 확인 결과

- 유채 EVENT에서 도입된 목표유전자의 안정적인 발현을 조사하기 위해서 각 세대 (T0, T1, T2 and T3)가 진전되는 단계마다 항생제 segregation 및 PCR 검정 그리고 Western 분석을 통해 검정하였음
- 유채 EVENT의 도입유전자는 세대가 진전되어도 안정적으로 발현되고 있음이 확인되었음 (그림 9)

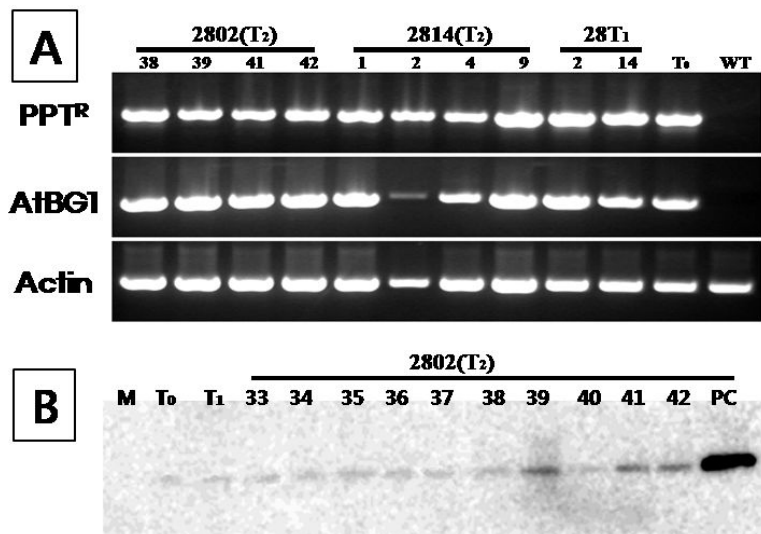


그림 9. 유채 EVENT의 세대진전 후 (T₂) 도입된 목표 유전자의 안정적인 발현 검정. A; 목표 유전자 AtBG1의 RT-PCR에 의한 발현 검정, B; HA-tag을 이용한 western blot으로 목표 단백질의 안정적인 발현 확인

- 상기 그림 8의 GM28 및 Non-GM specific marker를 이용하여 GM28-T1 세대에서 DNA 분석을 수행한 결과 homo 및 hetero의 구분이 가능하였음 (그림 10)
- GM28 및 Non-GM 특이마커 분석결과 2802 (T2)의 후대가 모두 homogeneous함을 확인하였으며 RT-PCR로 AtBG1 발현여부도 확인하였음 (그림 11)

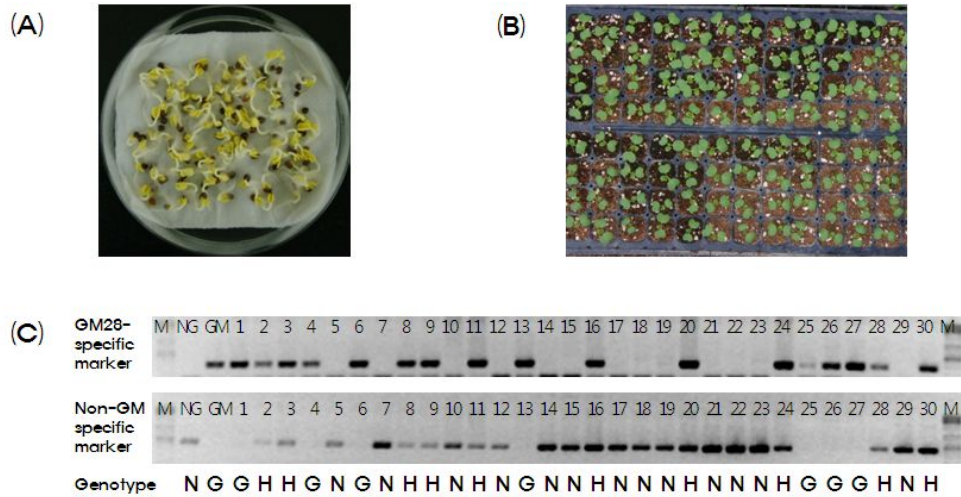


그림 10. 유채 형질전환체 GM28T₀-T₁ 세대 96개체(A, B)를 GM28 및 Non-GM 특이마커로 스크리닝한 결과 (C) homo 및 hetero의 구분이 가능하였음

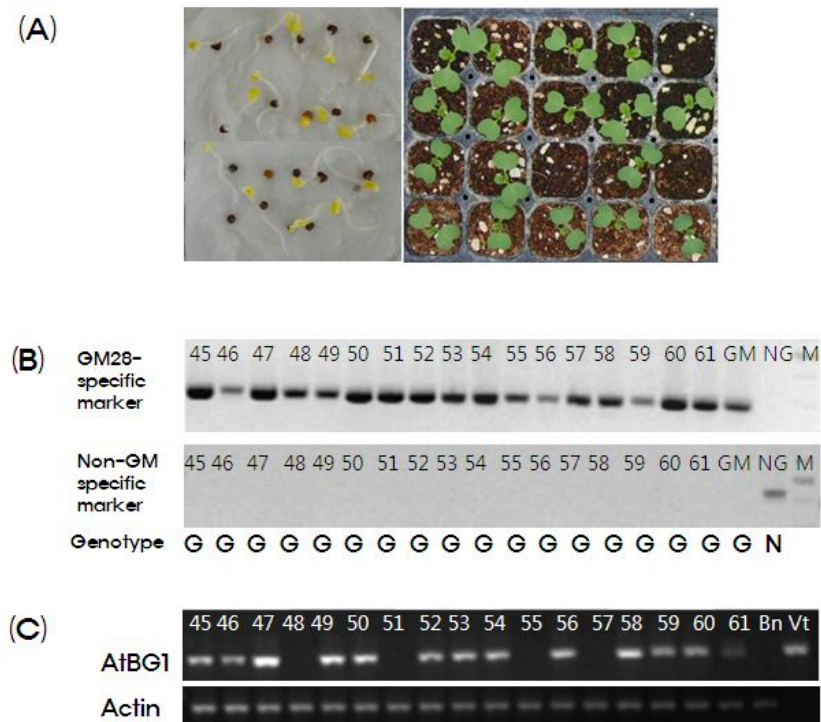


그림 11. 유채 GM28T₀₀₂T₁-T₂ 세대 17개체 (A)를 GM28 및 Non-GM 특이마커로 스크리닝 (B)하였으며 RT-PCR을 수행하였음 (C)

- 유채 GM28T0-2T1-T2 세대 9개체에 대하여 western blot 수행하여 유전자의 안정적인 발현을 확인하였음 (그림 12)
- 유채 GM28T0-2T1-47T2-T3 세대 10개체에 대하여 GM28 및 Non-GM 특이마커 분석과 RT-PCR을 수행한 결과 10개체 모두 GM homo의 유전자형을 보유하고 있었으며 GM28T0-2T1-47T2를 포함한 T2세대에서의 AtBG1 발현 또한 확인되었음 (그림 13)

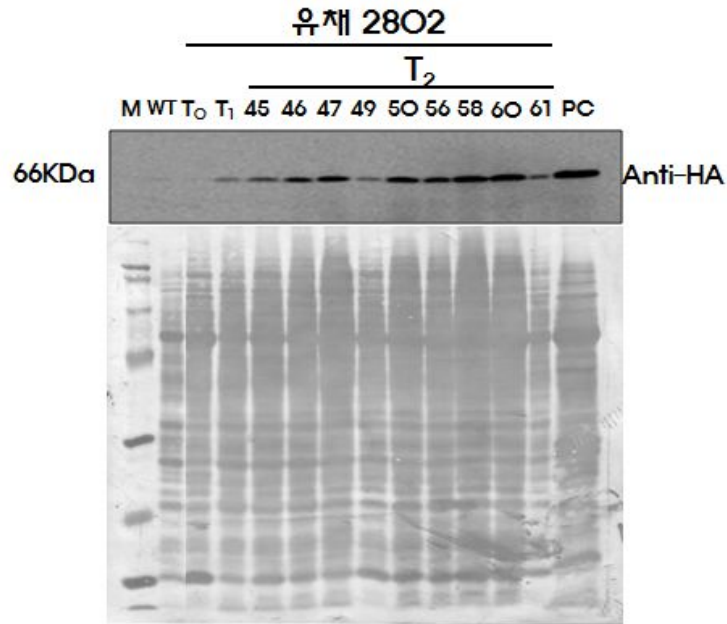


그림 12. 유채 GM28T0-2T1-T2 세대에서 western blot을 수행한 결과

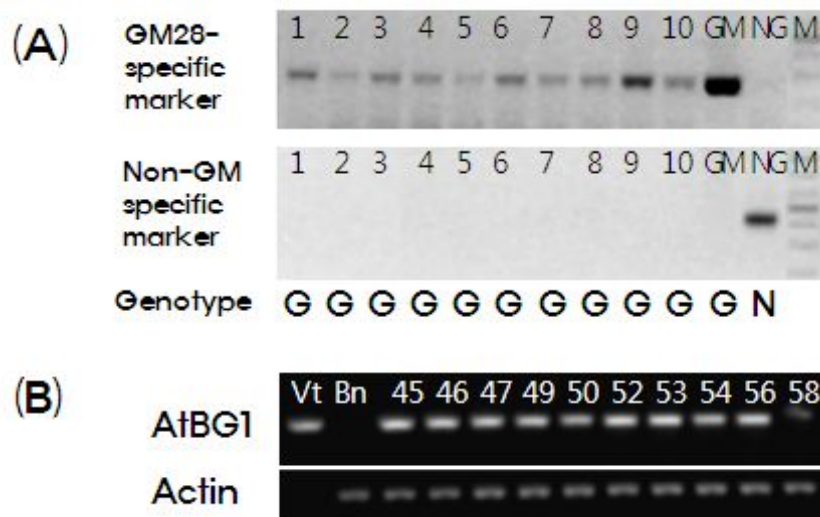


그림 13. 유채 GM28T0-2T1-47T2-T3 세대 10개체를 GM28 및 Non-GM 특이마커로 스크리닝 (A) 및 T3 10라인에 대하여 RT-PCR 수행 결과 (B). (GM: 형질전환식물체, NG: Wild type, Vt: vector control, Bn: wild type 유채)

다. GM유채와 벤트그래스의 생물학적 특성: 형태적, 생리적 특성

1) 유채 EVENT (Event #; FnPBnTg2802)의 농업적 특성

- 유채 EVENT (Event #; FnPBnTg2802)의 변형 후 개선된 특성을 조사하기 위해 형질전환에 사용한 대조구 (제주한라)와 비교하여 파종에서 개화까지의 생육상태를 비교분석하였음 (그림 13)
- 유채 EVENT의 농업형질은 건조내성과 제초제 저항성을 제외한 나머지 형질은 대조구와 유의차를 보이지 않았음



그림 13. 유채 EVENT의 저온감응도 및 개화시기 비교. FnPBnTg2802의 경우 처음개화가 약 5일 정도 대조구와 차이가 있었으나 85% 이상 개화되는 시점에서는 유의차가 나타나지 않았음

2) 유채 EVENT (Event #; FnPBnTg2802)의 건조내성 특성

- 유채 EVENT (Event #; FnPBnTg2802)의 변형 후 개선된 특성은 목표 유전자의 발현에 의한 건조내성임
- 따라서 유채 EVENT와 대조구의 건조내성을 검정하기 위해 정식 후 단수 및 개화 후 단수를 통해 건조내성을 검정하였음
- 정식 후 건조내성 검정을 위해 정식 10일부터 단수를 시작하여 생육상태, 개화, 꼬투리 결실 등을 관찰한 결과, EVENT는 단수 상태에서도 개화 및 꼬투리 결실이 충실하였으며, 65일 단수에서도 종자 수확이 가능하였음 (그림 14)
- 반면에 대조구는 개화가 극히 불량하고 단수 65일에도 소수의 개체만이 개화하였으나 꼬투리 결실이 불량하여 종자를 생산하지 못하였음
- 개화 후 단수의 경우도 EVENT는 단수 후에도 꼬투리 및 종자의 수확이 가능하였으나, 대조구는 꼬투리 및 종자 수확이 불량하였음 (그림 15)

라. GM유채의 환경방출실험

1) 1년차 (2009년)

가) 환경방출실험을 위한 노지재배포장 조성

- GM유채의 노지재배포장 실험은 (주)에프엔피의 LMO 노지재배포장 (유전자 변형 생물체 개발 실험 승인 제 2008-26호, 연구시설설치·운영신고 제 LML08-314, 315, 1056호)에서 수행하였음
- GM유채 및 벤트그래스의 환경방출실험포장은 다음과 같이 3그룹으로 나누어 수행 (그림 16-18)
 - Type I 포장; 동종 교배용 (정식 간격 0.5m)
 - Type II 포장; 동종 및 근연종 교배용 (정식간격 1m)
 - Type III 포장; 근연종 및 타종간의 교배가능성 조사 (반경 3m, 6m, 9m)

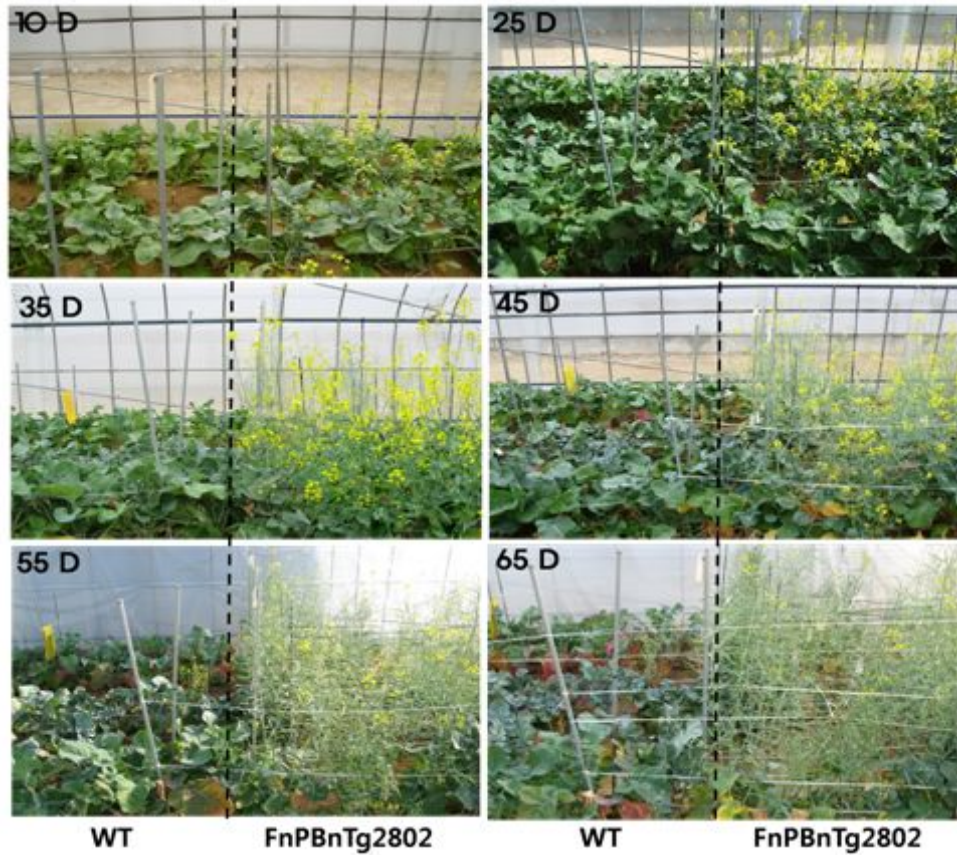


그림 14. 유채 EVENT와 대조구의 정식 후 단수에 따른 건조내성의 특성 비교. EVENT의 경우 단수 조건에서도 개화 및 꼬투리 성장에 영향이 적어 종자 생산이 가능



그림 15. 개화 후 단수조건에서 EVENT와 대조구의 생육 비교. EVENT는 개화 후 단수조건에서도 꼬투리 및 종자 수확이 가능하였으나 대조구는 꽃이 시들어 종자 생산이 불가능하였음

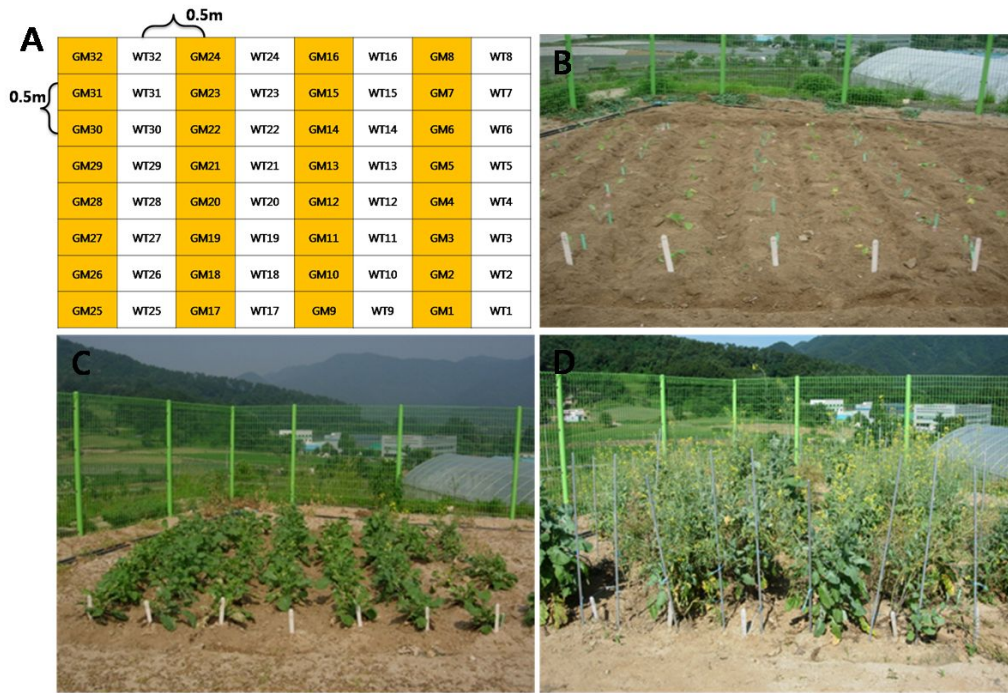


그림 16. 환경방출실험 포장 Type I. A; 정식 모식도, B; 정식 후 2일, C; 정식 후 32일, D; 정식 후 67일 후 포장 및 유채 생육

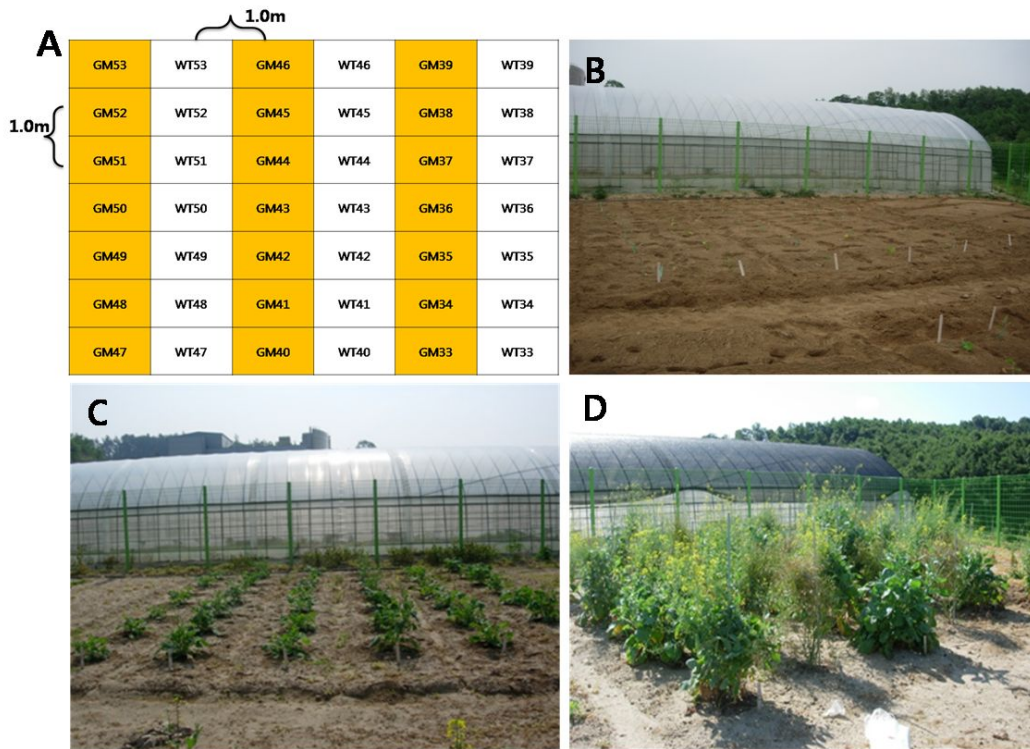


그림 17. 환경방출실험 포장 Type II. A; 정식 모식도, B; 정식 후 2일, C; 정식 후 32일, D; 정식 후 67일 후 포장 및 유채 생육



그림 18. 환경방출실험 포장 Type III. 정식 30일 후 전경

나) 유채 EVENT (Event #; FnPBnTg2802)의 생육특성 비교

- 자엽크기, 클로로필 함량, 광합성율 등의 조사를 통하여 유채 EVENT와 대조구의 이산화탄소 고정능력을 비교한 결과 형질전환체와 대조구간에 유의성이 없었음 (표 1)
- 유채 EVENT의 종자와 관련된 특성은 대조구와 비교하여 표 2에 제시하였음

표 1. EVENT와 대조구의 생리적인 특성 비교. 엽록소 및 광합성 능력에서 EVENT와 대조구간의 유의차가 없음

구분	WT	FnPBnTg2802
Chl a ($\mu\text{g}/\text{Cm}^2$)	13.7±0.9	15.6±0.1
광합성율(ΔVPM)	10.0±3.3	10.3±1.2
자엽 크기(mm)	22.3±0.4	22.7±0.6

표 2. EVENT와 대조구의 종자 특성 비교에서 EVENT가 헵당 종자수가 다소 많았으며 꼬투리의 길이도 길어 종자 수량이 다소 증가하였음

구분	WT	FnPBnTg2802
종자무게 (천립중 g)	3.4±1.9	3.6±0.2
꼬투리당 종자 수	16.2±0.7	19±2.1
꼬투리 길이 (mm)	58.0±1.4	67.2±3.1

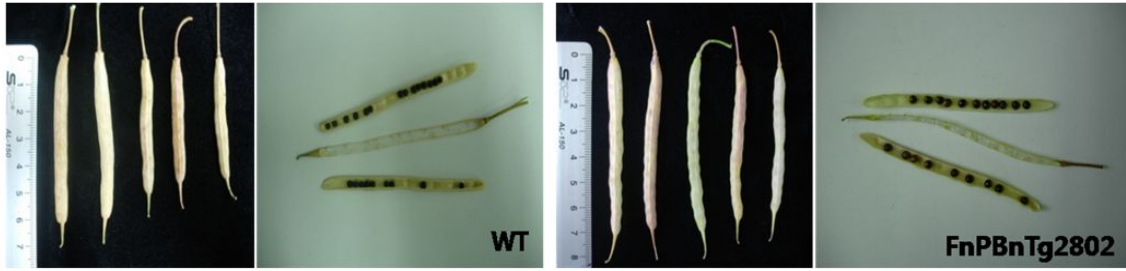


그림 19. EVENT와 대조구의 꼬투리 길이 및 종자 수량 비교. EVENT가 대조구에 비하여 꼬투리 길이가 길고 종자수량이 다소 많음

- 그 외의 중요한 재배 환경에 미치는 영향으로 토양 미생물에 미치는 영향을 조사하기 위해 제 2협동과제에서 EVENT 재배지의 미생물상을 분석하였음(그림 20)
- 토양미생물에 미치는 영향과 지역 적응성 시험을 위한 포장 (농촌진흥청, 수원)에 정식된 EVNENT의 불출대장을 작성하여 관리하였으며, GM 식물체 운반차량의 표시 및 물질양도 각서를 통하여 식물체의 이동을 관리하였음 (그림 21, 22)

GM32	WT32	GM24	WT24	GM16	WT16	GM8	WT8
GM31	WT31	GM23	WT23	GM15	WT15	GM7	WT7
GM30	WT30	GM22	WT22	GM14	WT14	GM6	WT6
GM29	WT29	GM21	WT21	GM13	WT13	GM5	WT5
GM28	WT28	GM20	WT20	GM12	WT12	GM4	WT4
GM27	WT27	GM19	WT19	GM11	WT11	GM3	WT3
GM26	WT26	GM18	WT18	GM10	WT10	GM2	WT2
GM25	WT25	GM17	WT17	GM9	WT9	GM1	WT1

그림 20. 토양 미생물의 유전자 이동에 관찰 실험을 위한 시료 채취. 밝은 하늘색; 정식 후 1차 시료 채취, 노란색; 정식 후 30일 후 시료 채취, 붉은색; 정식 후 60일 후 시료 채취 (제 2협동과제)

물질양도각서
(Material Transfer Agreement; MTA)

본 물질양도각서는 (주)에프엔피 (이하 "갑" 이라고 한다.)와 한국생명·학연구원 김창기 (이하 "을" 이라고 한다.) 사이에 2009년 6월 일자: 아래와 같이 체결되었다.

- 아 래 -

"갑"과 "을"은 2009년 농림수산식품부지원 "GM 유채와 잔디의 환경위해: 평가 및 안전관리 기술 개발" 과제의 성공적인 수행을 위한 연구목적으: AtBG1 유전자 삽입된 형질전환 유채 (Event # FP2814)와 대조구로 한라유 채를 첨부와 같이 양도함에 있어 다음과 같이 물질양도각서를 체결한다.

- "을"은 "갑"에게 받은 형질전환 유채를 연구 및 실험목적으로만 사용하며, "갑"은 "을"에게 필요한 재배 및 관리정보를 제공하여 "을"이 원활한 연구결과를 도출할 수 있도록 적극 협력한다.
- "을"은 AtBG1 유전자가 도입된 형질전환 유채를 연구 및 실험 목적 이외에는 사용할 수 없으며, 연구 및 실험과정에서 "유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률" 시행령 제 24조 및 제 25조와 "유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률" 통합고시안 제4장 등 관련 법령에 따라 관리하여야 한다.
- "을"은 "갑"에게서 받은 형질전환 유채를 입고대장에 기록하고 식물체의 사용일지와 사용목적을 기록하여 보관하여야 하며, 종자가 없는 영양생장기의 식물체는 관련 법령이 정하는 기준에 따라 폐기처분하고 이를 대장에 기록하여야 한다
- 생식생장 후 생산된 종자는 포장내 및 외부로 방출할 수 없으며 모두 "갑"에게 반환하여야 하며, "갑"은 "을"에게서 받은 종자를 입고대장에 기록하여 관리하여야 한다.

5. "갑"과 "을"은 연구 및 실험목적으로 실험재료의 상호 공유함에 있어 상대방과 유기적인 협력하여 연구재료의 유실이나 외부로 비의도적인 방출을 엄중히 경계하여야 한다.

6. "갑"과 "을"은 상호 협력을 추진하는 과정에서 직접 또는 간접적으로 확보한 상대방에 관한 모든 정보는 대외비로 취급하며, 외부에 정보공개가 필요한 경우 반드시 상대방의 승인 하에 공개한다.

본 물질양도각서는 원본 2부를 작성하여 양 당사자가 서명하고 각각 보관한다.

2009년 6월 18일

(갑) 주 소 : 충북 증평군 도안면 노암리 230-1
 소 속 : (주)에프엔피
 대 표 자 : 김 신 제
 연 락 처 : 043) 836-1761

(을) 주 소 : 충북 청원군 오창읍 양청리 685-1
 소 속 : 한국생명공학연구원 바이오평가센터
 연구책임자 : 김 창 기
 연 락 처 : 043) 240-6543

* 첨부 : 유채 형질전환체 목록

구 분	Event Number	Remarks
한라유채	20 plants	
AtBG1 형질전환 유채	30 plants	

물질양도각서
(Material Transfer Agreement; MTA)

본 물질양도각서는 (주)에프엔피 (이하 "갑" 이라고 한다.)와 한국생명·학연구원 김창기 (이하 "을" 이라고 한다.) 사이에 2009년 11월 26 일자로 아래와 같이 체결되었다.

- 아 래 -

"갑"과 "을"은 2009년 농림수산식품부지원 "GM 유채와 잔디의 환경위해성 평가 및 안전관리 기술 개발" 과제의 성공적인 수행을 위한 연구목적으: AtBG1 유전자 삽입된 형질전환 유채 (Event # FP2802)와 대조구로 한라유 채를 첨부와 같이 양도함에 있어 다음과 같이 물질양도각서를 체결한다.

- "을"은 "갑"에게 받은 형질전환 유채를 연구 및 실험목적으로만 사용하며, "갑"은 "을"에게 필요한 재배 및 관리정보를 제공하여 "을"이 원활한 연구결과를 도출할 수 있도록 적극 협력한다.
- "을"은 AtBG1 유전자가 도입된 형질전환 유채를 연구 및 실험 목적 이외에는 사용할 수 없으며, 연구 및 실험과정에서 "유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률" 시행령 제 24조 및 제 25조와 "유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률" 통합고시안 제4장 등 관련 법령에 따라 관리하여야 한다.
- "을"은 "갑"에게서 받은 형질전환 유채를 입고대장에 기록하고 식물체의 사용일지와 사용목적을 기록하여 보관하여야 하며, 종자가 없는 영양생장기의 식물체는 관련 법령이 정하는 기준에 따라 폐기처분하고 이를 대장에 기록하여야 한다
- 생식생장 후 생산된 종자는 포장내 및 외부로 방출할 수 없으며 모두 "갑"에게 반환하여야 하며, "갑"은 "을"에게서 받은 종자를 입고대장에 기록하여 관리하여야 한다.

5. "갑"과 "을"은 연구 및 실험목적으로 실험재료의 상호 공유함에 있어 상대방과 유기적인 협력하여 연구재료의 유실이나 외부로 비의도적인 방출을 엄중히 경계하여야 한다.

6. "갑"과 "을"은 상호 협력을 추진하는 과정에서 직접 또는 간접적으로 확보한 상대방에 관한 모든 정보는 대외비로 취급하며, 외부에 정보공개가 필요한 경우 반드시 상대방의 승인 하에 공개한다.

본 물질양도각서는 원본 2부를 작성하여 양 당사자가 서명하고 각각 보관한다.

2009년 11월 26일

(갑) 주 소 : 충북 증평군 도안면 노암리 230-1
 소 속 : (주)에프엔피
 대 표 자 : 김 신 제
 연 락 처 : 043) 836-1761

(을) 주 소 : 충북 청원군 오창읍 양청리 685-1
 소 속 : 한국생명공학연구원 바이오평가센터
 연구책임자 : 김 창 기
 연 락 처 : 043) 240-6543

* 첨부 : 유채 형질전환체 목록

구 분	Event Number	Remarks
한라유채	16 plants	
AtBG1 형질전환 유채	16 plants	

그림 21. 토양 미생물에 미치는 영향과 교배율을 조사하기 위한 시료채취 및 외부포장 (생명공학연구원)에 정식된 EVENT의 물질양도 각서

식물(LMO) 외부 불출대장

파종/저온/정식	Name	개체수	날짜	용도	양도 및 정식한 사람	비고
090317/090515	fnp2802	4	090527	환경위해성평가용 샘플링	김도형	WT4개 함께 샘플링
090317/090516/090613	fnp2814	30	090618	토양미생물균집조사용 및 분류검토사	김도형	WT20개 함께 샘플링
090317/090516/090625	fnp2814	29	090625	토양미생물균집조사용 및 분류검토사	김도형	WT17개 정적
090518/090617/090625	fnp2802	12	090625	"	"	"
090317/090515	fnp2802	4	090626	유체 작물 sampling	김도형, 김숙경, 김희영	WT4, GM4
091023	fnp2802	4	09/17/24	"	"	"
091102	fnp2802	16	091126	리얼리안들 실험	한현생, 김관석, 김승기	WT(Hanna) 16개



그림 22. 토양 미생에 미치는 영향 및 지역적응성 검정을 위해 외부 포장에 정식된 EVENT의 관리. 외부로 유출되는 EVENT의 수량, 용도, 인수자를 기록하고, 운반차량은 LMO 운반 차량표지가 설치된 차량을 이용하여 운반

다) 교배율 조사

- 환경방출실험 포장 Type I, II, III에서 GM 유채와 대조구간의 자연 교잡율을 확인한 결과 Type I의 동종간에 21-28%의 교잡율을 보였으며 Type II의 동종 및 근연종간에 12-14%의 자연교잡율을 보였음. 그러나 Type III의 근연종 및 타종간에는 교잡이 발생하지 않았음 (표 3)

표 3. 환경방출실험 Type I, II, III의 실험 포장에서의 EVENT와 대조구 간의 교잡율

교잡율 (%)	WT	FnPBnTg2802
Type I	21.7±5.3*	28.3±3.8
Type II	12.3±4.4	14.1±4.6
Type III	0	0

2) 2년차 (2010년)

가) 환경방출실험을 위한 재배포장 조성

(1) 하우스를 이용한 북부지역 재배포장 조성

- 우리나라 북부지역 포장으로 경기도 수원시 농촌진흥청 LMO 포장 내 하우스 사용 (그림 23, 그림 24)
- 실험내용은 지역별 (우리나라 북부), 거리별 교배율, 생육 특성에 관하여 실시하였음
- 포장 실험 기간: 2009. 02. 03에 파종하여 2010. 06. 21에 채종하였음



그림 23. 북부지역에서 생물학적 특성조사에 이용한 수원 농촌진흥청 LMO 포장 외부 전경



그림 24. 북부 지역에서 수원 LMO 포장 내부. 좌; Type I, 우; Type II

- 포장 구성: 북부 지역에 위치한 수원 LMO 포장에 각각 WT (제주한라) 40구역 x 5립 = 200립과 GM (Event 2802) 40구역 x 5립 = 200립을 직파함 (그림 25, 26)

GM32	WT32	GM24	WT24	GM16	WT16	GM8	WT8	GM40	WT40	GM36	WT36
GM31	WT31	GM23	WT23	GM15	WT15	GM7	WT7				
GM30	WT30	GM22	WT22	GM14	WT14	GM6	WT6	GM39	WT39	GM35	WT35
GM29	WT29	GM21	WT21	GM13	WT13	GM5	WT5				
GM28	WT28	GM20	WT20	GM12	WT12	GM4	WT4	GM38	WT38	GM34	WT34
GM27	WT27	GM19	WT19	GM11	WT11	GM3	WT3				
GM26	WT26	GM18	WT18	GM10	WT10	GM2	WT2	GM37	WT37	GM33	WT33
GM25	WT25	GM17	WT17	GM9	WT9	GM1	WT1				

그림 25. 수원 LMO 포장의 파종 모식도. Type I 은 0.5m 간격으로 구성, Type II 는 1.0m간격으로 구성하였음

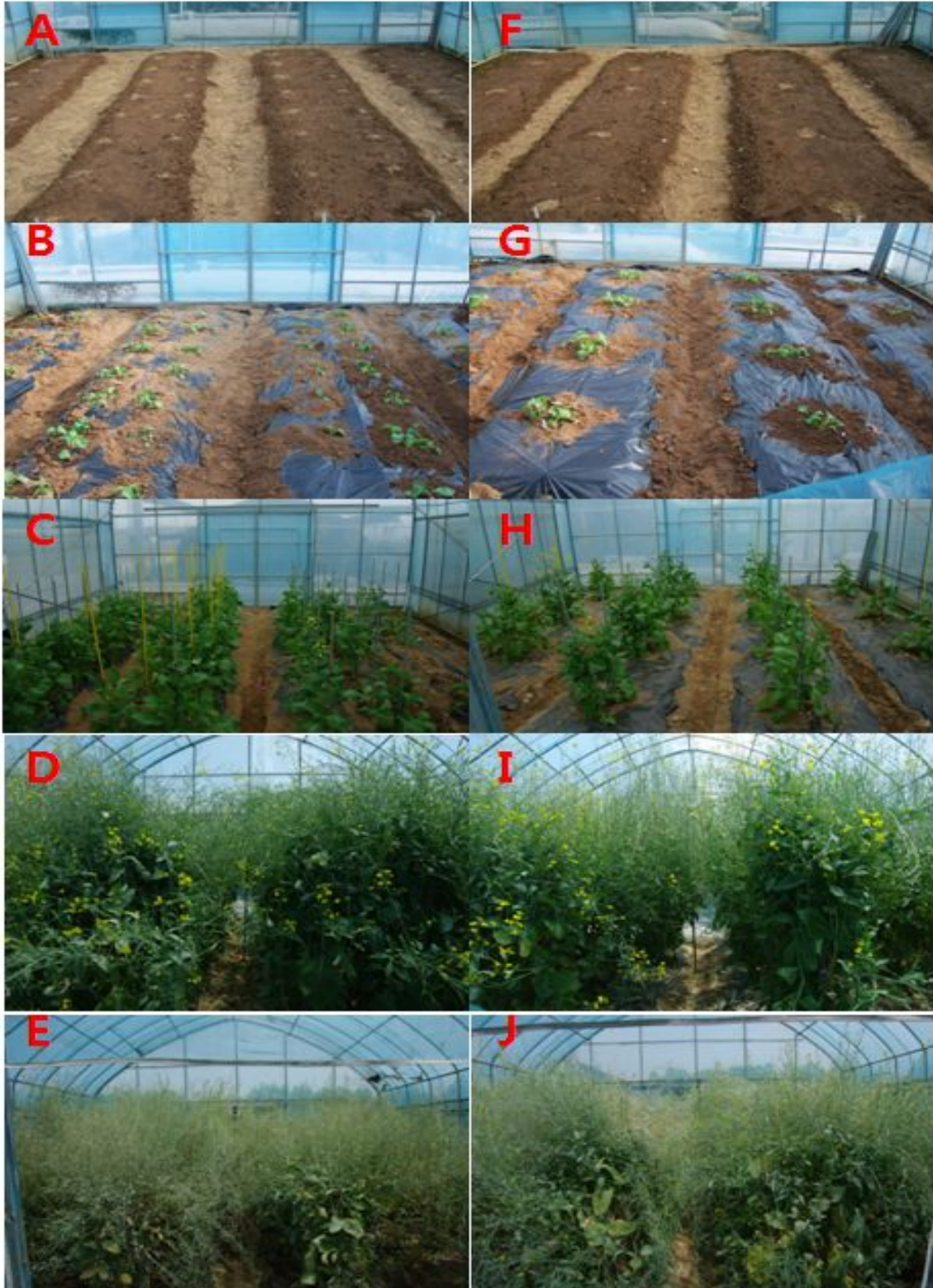


그림 26. 수원 LMO포장에서 생육 중인 대조구와 Event 2802의 기간별 특성(좌측 Type I, 우측 Type II). A, F; 파종당일, B, G; 파종 54일째, C, H; 파종 172일째, D, I; 파종 228일째, E, J; 파종 242일째 채종당일 모습

(2) 하우스를 이용한 중부지역 재배포장 조성

- 우리나라 중부지역 포장 시설로는 (주)에프엔피에 조성된 LMO 포장에서 생물학적 특성 검증 실험과 교배율 측정 실험을 수행하였음 (그림 27)



그림 27. 중부지역 LMO 포장에서 (증평포장 내부) 개화율과 채종 및 결실수 조사

(3) 노지재배 시설을 이용한 중부지역 재배포장 조성

- 충북 증평에 위치한 (주) 에프엔피에 조성된 LMO 포장에서 Type I, II, III을 구성하였음 (그림 28)
- 실험내용은 지역별 (우리나라 중부), 거리별 교배율, 생육 특성에 관하여 실시하였음
- 기간: 2010. 03. 26 파종, 저온처리 2010. 04. 02 (20일간), 채종 2010. 06. 21.
- 중부지역에 위치한 충북 증평 LMO 포장에 Type I WT 28개체, Event2802 28개체, Type II의 경우 WT 18개체, Event 2802 18개체 그리고 Type III의 경우 WT 114개체, Event 2802 70 개체, 배추 99개체, 춘채 97개체, 갓 99개체를 포트에 파종, 저온처리 (20일처리)하여 그림 29와 같이 정식하여 수행함

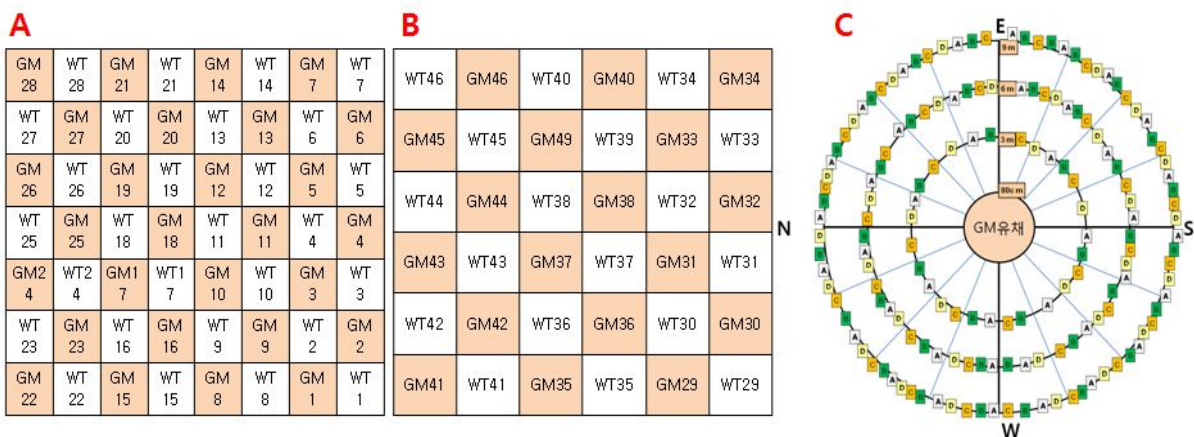


그림 28. 노지 재배 포장에서 Type별 정식 모식도. A; Type I WT과 Event 2802의 정식간격 0.5m, B; Type II WT과 Event 2802의 정식간격 1.0m, C; Type III WT 및 십자화과 식물과 Event 2802의 정식 간격 3, 6, 9m.



그림 29. 노지재배 실험을 위한 증평 LMO 포장 좌측 Type I, 가운데 Type II, 우측 Type III, A; 유채 정식 (2010. 04. 22), B; 파종 73일째, 정식 47일째, C; 파종 114일째, 정식 88일째

(4) 노지재배 시설을 이용한 남부지역 재배포장 조성

- 우리나라 남부지역에서의 생육 특성 조사는 김제 성덕면에 LMO 포장에서 진행
- 2010년 김제 LMO 노지 포장에 대한 승인을 받았고 김제 포장을 그림 32와 같이 구성하여 진행 (그림 30, 31)
- 실험내용은 지역별, 생육 특성 및 거리에 따른 교배율에 관하여 실시하였음
- 기간: 2010. 10. 21 파종, 1차 정식 2010. 12. 09, 2차 정식 2011. 02. 11

(A)

[별지 제26호서지]			
유전자변형생물체개발·실험승인서			
신청인 (시험연구기관)	①상 호 (주)에프엔피	②승 인 번호 제 2010-67호	제 2010-67호
주 소	충북 증평군 도안면 노할리 230-1번지		
대표자 성명	김 신 제	전화 번호	043-836-1751-2
제 목	다량한 작물 형질전환체 제조 (신유) 유치 1286m ³		
승인 구 기 간	2010년 12월 31일 ~ 2011년 12월 30일		
승인 구 책 임 자	직 위	책임연구원	
	성 명	윤 길 영	
	주 소	충북 증평군 도안면 화성리 해누리아파트 705호	
승인 구 시 설	전화 번호	043-836-1752	이메일 주소 kilyoung@efpco.com
	시설 등록번호	안전관리등급 BL-P1	
승인 구 시 설	주 소	전북 김제시 성덕면 석동리 20-17번지	
	생물안전 관리책임자	소 속	성 명
승인 구 시 설	유()	무()	윤 길 영
	승인 구 조 건	포장시험 등 환경방출과 관련된 실험 승인기간은 승인일로부터 1년	
<p>「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」 제22조제3항, 동법 시행령 제23조제7항 및 동법 시행규칙 제14조제5항의 규정에 따라 위와 같이 유전자변형 생물체의 개발·실험을 승인합니다.</p> <p>2010년 12월 31일</p> <p>농촌진흥청</p>			

210m×297m(일반용지 60kg/m²)

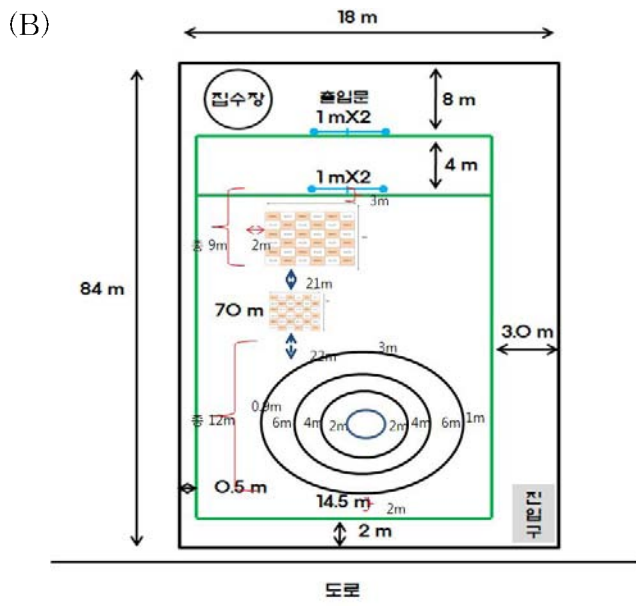


그림 30. 김제 LMO 노지 포장 시설 승인서 (A)와 김제 LMO 포장 구성도 (B)



Type I

Type II

Type III

그림 31. 남부지역 (김제 포장): WT 160개, GM 116개, 완도 갓 99개, 배추 99개, 춘채 97개
(2011. 02. 11 사진)

(5) 노지재배 시설을 이용한 해외 재배포장 조성

- 해외포장으로 몽골 북서쪽에 위치한 도노이 포장에서 Type I, II, III을 구성하여 실험하였음 (그림 32, 33)
- 도노이 포장의 환경: 고도 1,767m, 위도 47.5도, 강수량 200m-400m, 식물이 생육할 수 있는 여름철 최저/최고 온도는 각각 3/18℃
(참고: 우리나라의 중부지역의 고도 : 34.5m, 위도 37° 연평균 강수량이 1100m~1400m, 온도는 10-16℃ 로 우리나라에 비해 식물이 자라기 어려운 환경임)
- 실험 내용은 해외 건조 지역의 생육 특성과 거리에 따른 교배율을 조사
- 기간: 2010. 05. 23 직파 ~ 2010. 10. 10 채종

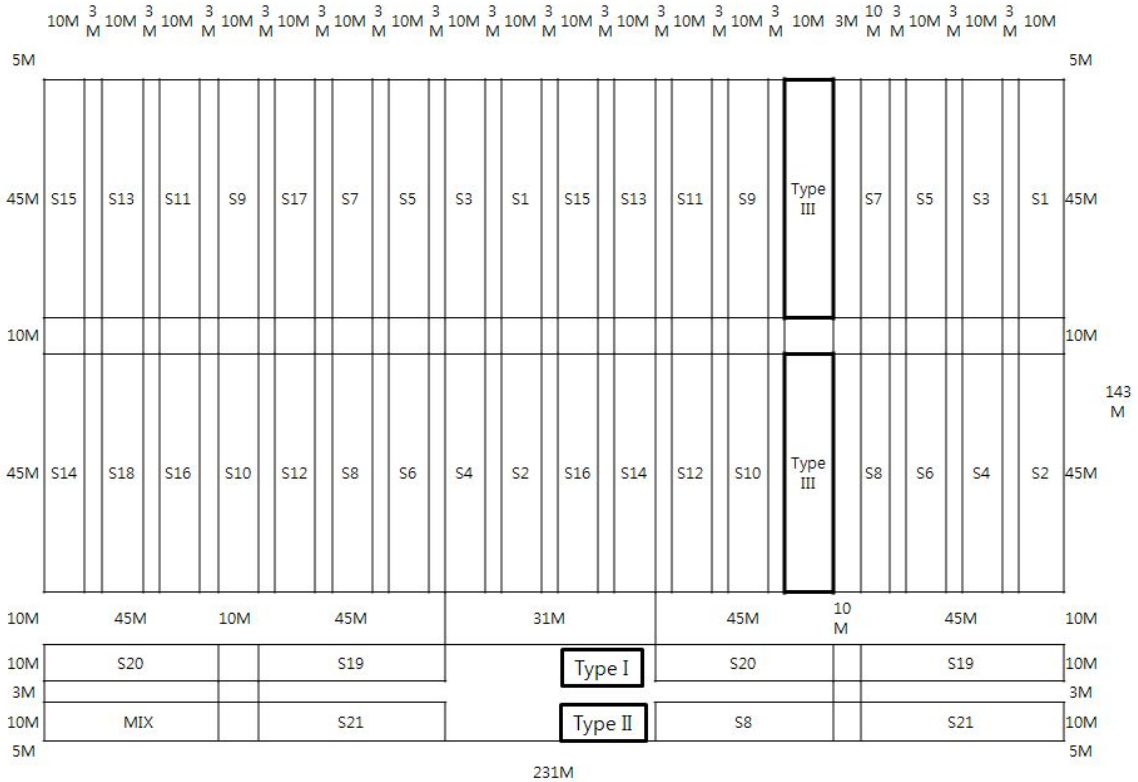


그림 32. 거리에 따른 교배율 검정을 위한 해외 포장 모식도 (몽골 도노이 포장)



Type I

Type II

Type III

그림 33. 몽골 도노이 포장에 생육 중인 대조구(WT)과 Event 2802(GM). Type I, II은 WT 25개, GM 25개 Type III는 GM을 줄뿌림 직파 (파종 124일째 모습 2010. 09. 27사진)

나) 유채 EVENT (Event #; FnPBnTg2802)의 생육특성 비교

- Event 2802의 개선된 특성을 조사하기 위해 형질전환에 사용한 대조구 (제주한라)와 함께 하우스 및 노지포장에서 파종에서 개화까지 걸리는 기간 (그림 34)과 파종에서 채종까지 걸리는 기간 (그림 35)을 비교하였음
- 지역과 재배조건에 따른 WT 과 Event 2802 유채의 개화일을 비교한 결과 재배조건에 따라서 개화일수는 차이가 나타났으나 개체간의 유의차는 발견되지 않았음
- 수원지역에서 개화가 늦은 이유는 하우스에 직파하여 겨울 동안 하우스내에서 저온 감응이 약했기 때문으로 판단 됨

- WT와 Event 2802 유체의 채종일을 비교한 결과 개화까지의 기간과 마찬가지로 재배 조건에 따라 채종일이 다른 것을 알 수 있음
- 수원 LMO포장에서는 하우스 재배 조건에 따른 영양생장 기간이 길어져 상대적으로 생식생장이 늦게 나타난 것으로 판단됨

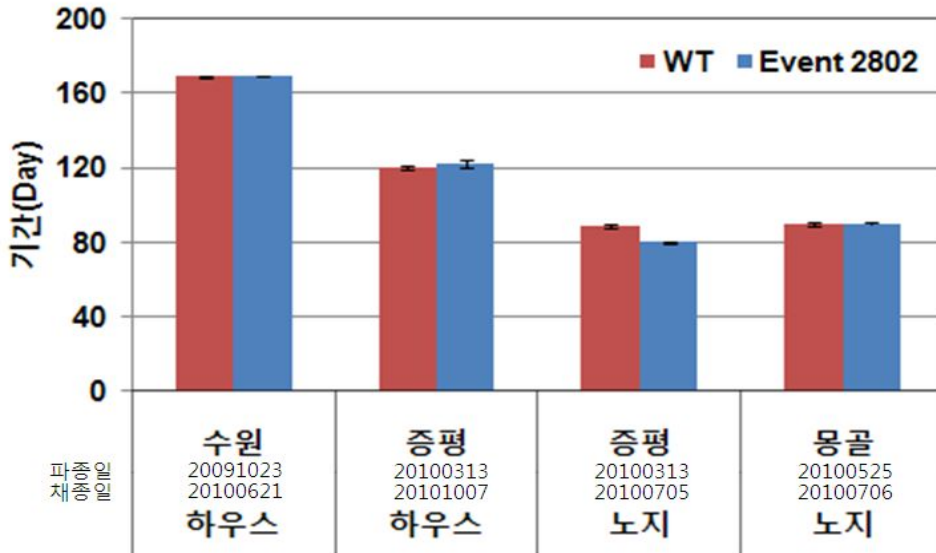


그림 34. 지역 및 재배 조건에 따른 생육 특성 (파종에서 개화까지 걸리는 기간)

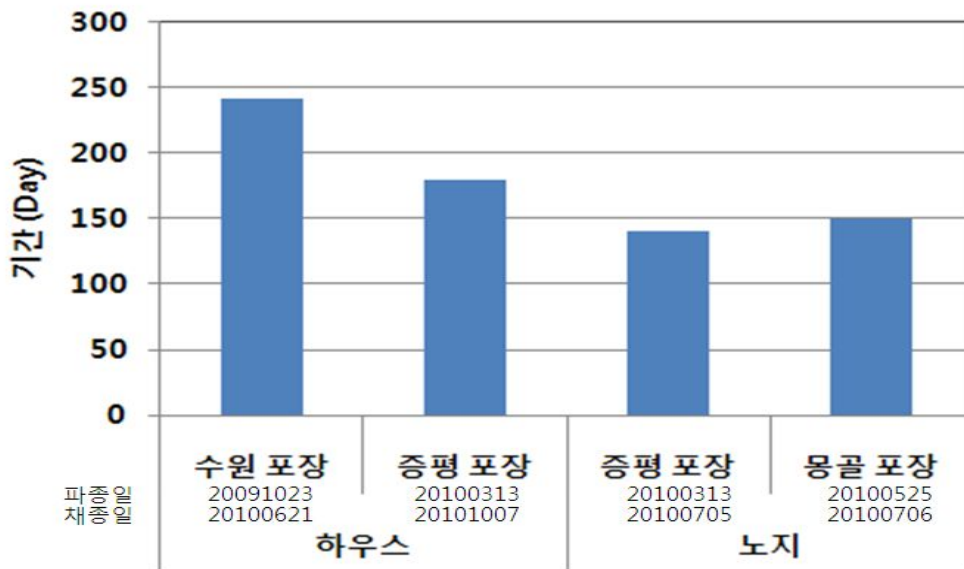


그림 35. 지역 및 재배 조건에 따른 생육비교 (파종에서 채종까지 걸리는 기간)

- 직파한 개체의 생육지역에 따른 생존율을 수원 LMO 포장의 경우, WT은 92.5%, Event 2802은 95%로 나타나 대조구와 Event 2802간의 유의차가 없었음
- 포트에 파종하여 인위적으로 저온 처리 후 정식한 증평 LMO 포장의 개화율 조사결과 WT은 71.7%, Event 2802는 100% 나타나 저온 감응이 차이가 있는 것으로 나타났음

- 지역에 따른 분지형은 모든 지역, 모든 유체가 III형으로 지역별, 개체 간 차이가 없었음 (그림 36)
- 경장 (cm)은 유체 전체 길이를 측정된 것이며 하우스와 노지에서의 차이가 나타났으나 WT과 Event 2802 유체간의 유의차는 없음 (그림 37)

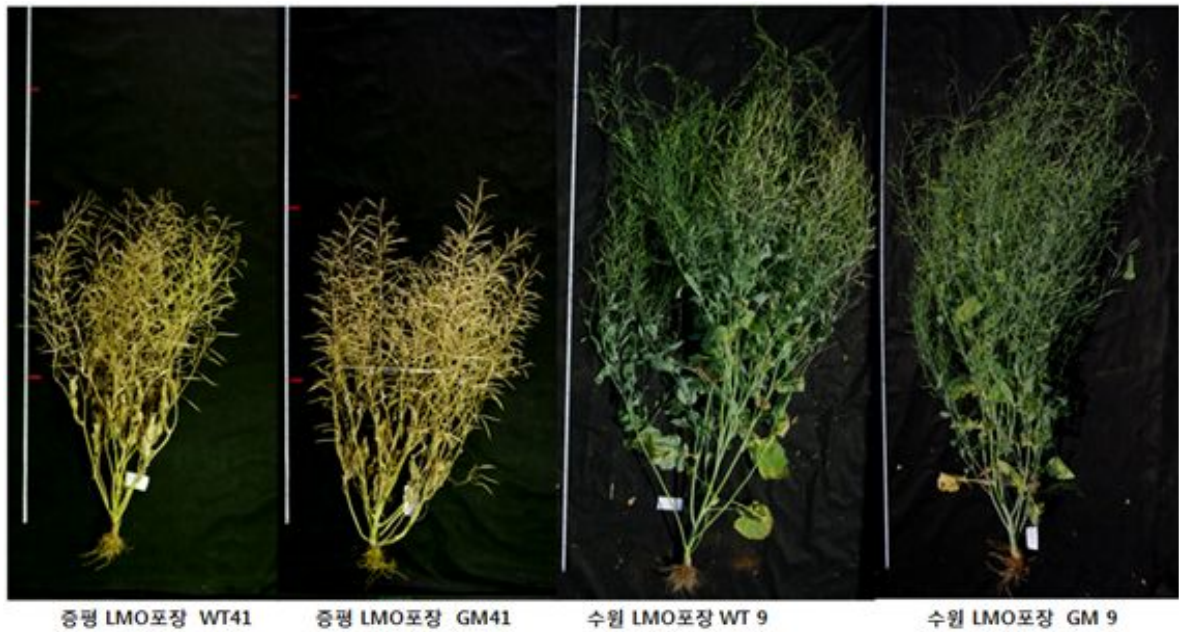


그림 36. 지역에 따른 분지형 우측 2개 증평 포장, 좌측 2개 수원 포장

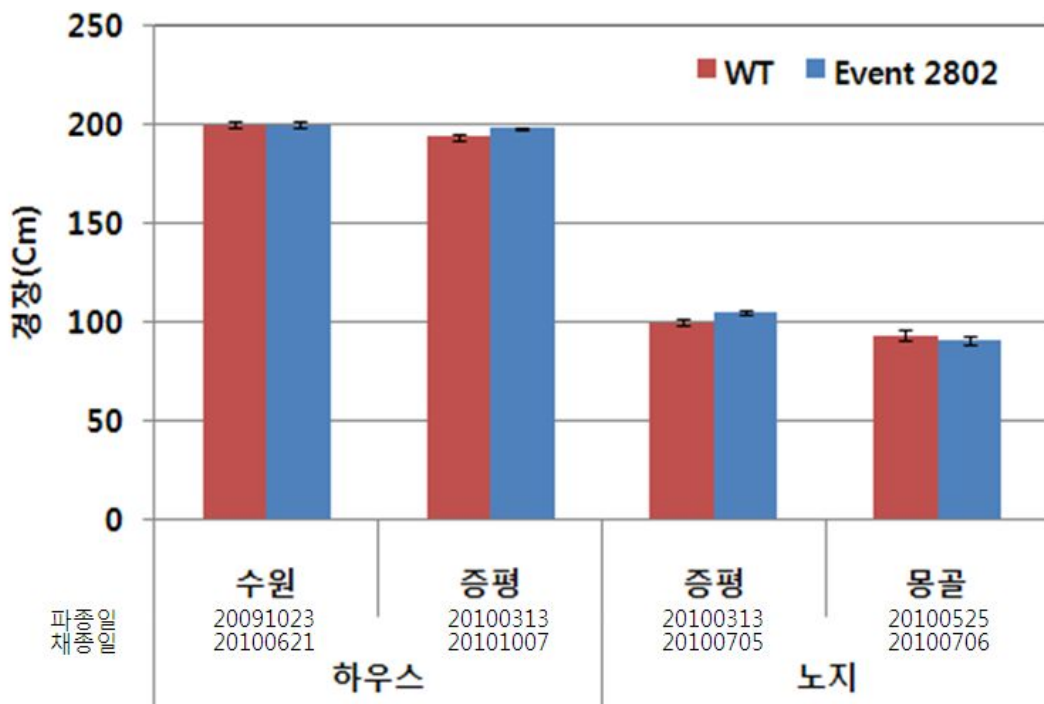


그림 37. 지역별 및 재배조건에 따른 각 유체의 경장(전체 길이)

- WT과 GM 유체의 농업적 특성 중 각 개체의 체중량을 측정한 결과, 포장에 따라 다소 변이를 보였음 (그림 38)
- 지역의 환경에 따라 종자량이 달라지는 이유는 비교적 시비관리나 관수가 잘된 시설에서 재배했던 수원 포장의 유체에서는 WT의 체중량이 많은 반면 노지 포장인 증평 포장과 몽골에서는 관수 시설이나 시비가 불량했기 때문에 Event 2802의 종자량이 다소 증가된 것으로 판단 됨
- 이러한 이유는 Event 2802의 는 건조 및 척박한 환경에서 내성을 갖기 때문으로 판단 됨
- 각 포장에서의 WT, Event 2802(GM)의 협장(cm)와 1협 입수조사 (표4, 그림 39)

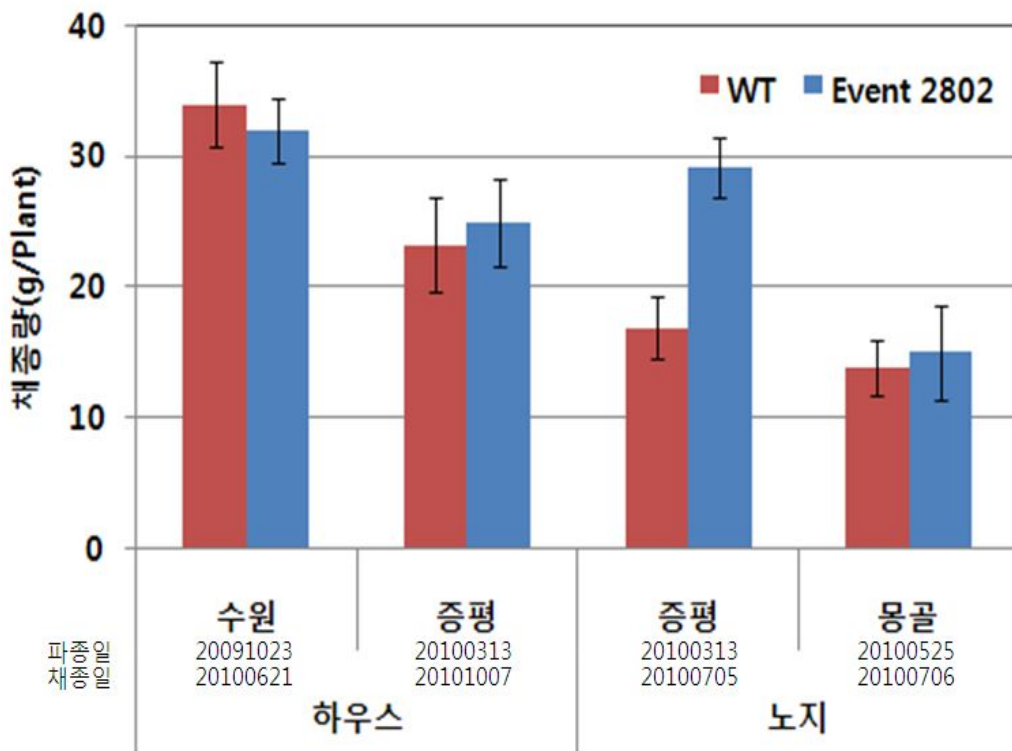


그림 38. 하우스와 노지 포장에서의 대조구(WT)와 Event 2802의 개체당 체중량.

표4. 지역별 대조구와 Event 2802의 협장 및 1협 입수 측정

구분	수원 LMO포장(북부)		증평 LMO포장(중부)		몽골 LMO포장(해외)	
	WT	GM	WT	GM	WT	GM
협장(Cm)	6.8±0.3	7.2±0.4	5.7±0.6	7.2±0.2	6.0±0.2	6.3±0.3
1협 입수	20.0±2.2	19.3±2.6	20.0±1.7	23.5±2.9	15.4±2.4	18.5±2.8

- 협장은 꼬투리 길이를 측정한 것으로 대부분 6cm 내외로 WT과 GM간 큰 유의차가 없거나 Event 2802의 꼬투리가 다소 길음
- 1협 입수는 한 꼬투리 당 결실된 종자수를 나타내는 것으로 수확량을 나타내는 지표임. 이것 또한 지역 간의 차이는 없고, WT, Event 2802 유채 간이 차이도 적은 것을 볼 수 있음

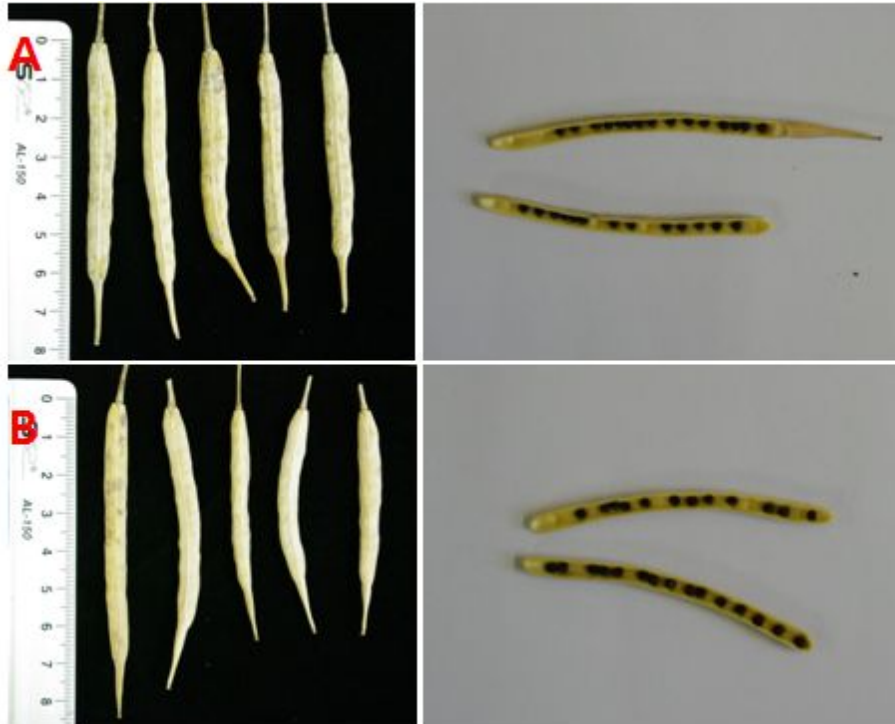


그림 39. 수원 포장에서 WT 23번(A)과 Event 2802 23번(B)의 꼬투리와 종자

다) 교배율 조사

- 각 지역에서 거리에 따른 WT과 Event 2802의 교잡율과 십자화과 식물체와의 교잡율 조사를 위해 채종을 완료하여 각 개체별 정상 종자를 PPT 배지에 100립 (10Bt x10ea)을 치상 후 발아된 상태를 보고 교잡율을 측정하였음 (표 5, 그림 40, 41)

표 5. 각 실험 지역과 거리에 따른 교배율 조사

구 분	Type I	Type II	Type III		
			3m	6m	9m
WT의 교잡율(%)	0.5m	1.0m	3m	6m	9m
북부지역 (수원)	7.3±3.8	3.0±3.0	-	-	-
중부지역 (증평)	29.2±7.3	21.3±3.8	1.2±4.5	0	0
해외 (몽골)	19.0±2.3	12.2±1.7	0	0	0

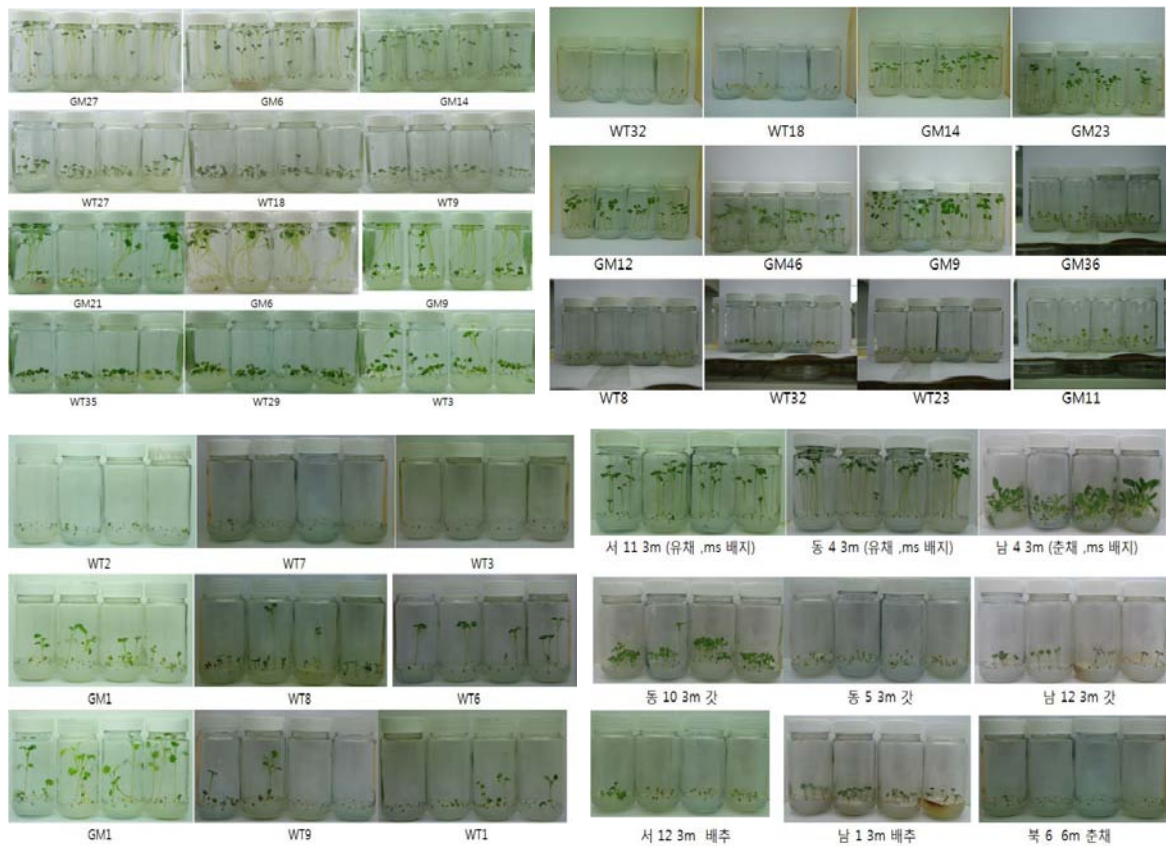


그림 40. 교배율 검정을 위해 PPT가 포함된 배지에 파종 후 10일된 유채

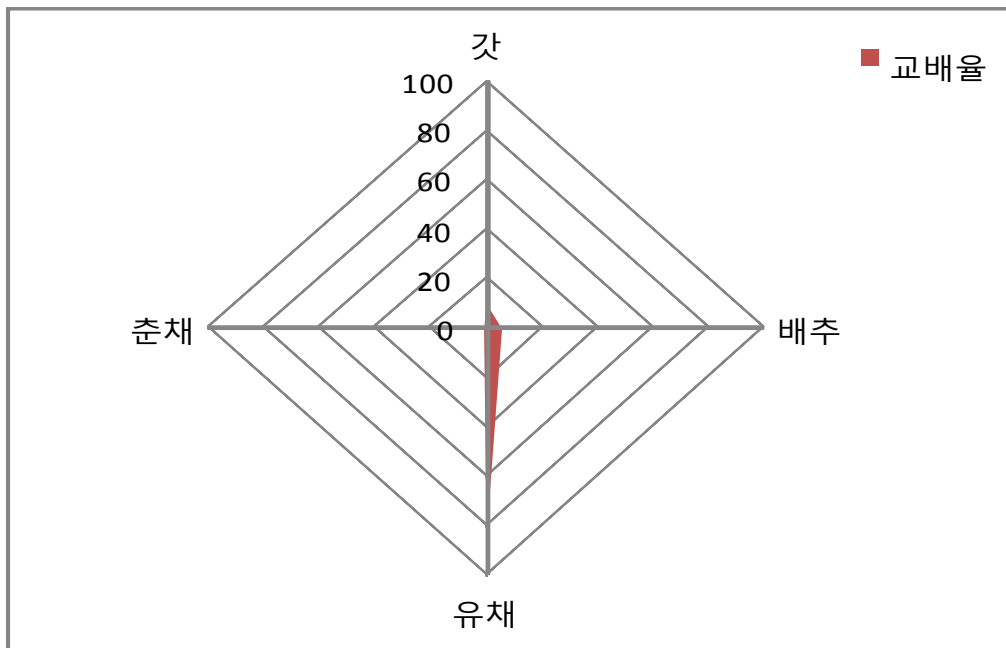


그림 41. Type III 포장에서 교배된 십자화과 작물과의 교배율. 노지 상태에서는 유채를 제외한 개체는 교배 확률이 매우 낮은 것으로 확인 됨

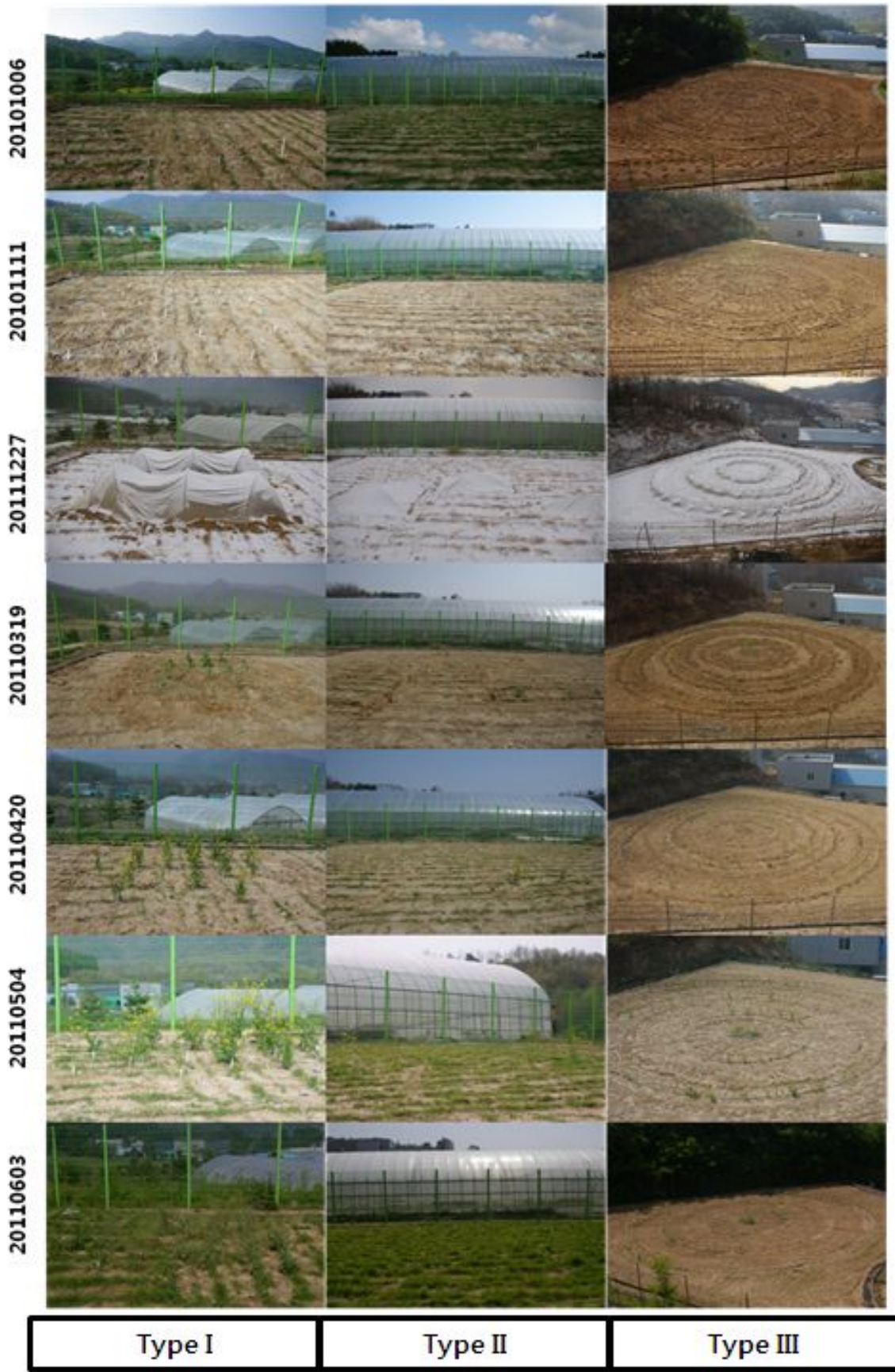


그림 43. 중평 LMO 포장에서 연구진행한 Type I, II, III의 파종기부터 기간별 생육상태

(2) 하우스를 이용한 남부지역 재배포장 조성

- 남부지역에서의 생육 특성 조사는 김제 성덕면에 LMO 포장에서 진행하였음 (그림 44)
- 실험내용은 지역별, 거리별 교배율, 생육 특성에 관하여 실시하였음
- 기간: 2010. 10. 21부터 2011. 06. 15까지 포장 활용
- 남부지역에 위치한 김제 LMO 포장에 Type I WT 18개체, Event2802 18개체, Type II의 경우 WT 18개체, Event 2802 18개체 그리고 Type III의 경우 유채, 갓, 배추, 춘채를 각 62개체씩 정식하였음 (그림 43)
 - Type I (50cm 간격) : GM 18개, WT 18개 교차로 50cm씩 정식 (6개x6개)
 - Type II (1m 간격) : GM 18개, WT 18개 교차로 1m씩 정식 (6개x6개)
 - Type III (2, 4, 8m간격) : 2m=(2x3.14x2m)x100/30cm간격 42개체
 4m=(2x3.14x4m)x100/30cm간격 83개체
 6m=(2x3.14x6m)x100/30cm간격 125개체
- 김제 LMO 포장에서의 재배관리는 아래와 같이 진행되었음
 - 2010년 10월 21일 종자 파종
 - 2010년 12월 09일 1차 정식 및 짚으로 멀칭
 - 2011년 02월 11일 2차 정식 및 방풍망 설치
 - 2011년 03월 17일 저온으로 고사된 유채 보식
 - 2011년 06월 15일 수확 및 채종
- 김제포장의 경우 2010년 10월 21일 파종 후 자연상태에서 재배되었으며 2011년 6월 채종 후 생육특성을 비교하였음 (그림 45)



그림 44. 남부지역에 위치한 김제 LMO 포장의 위치 및 모식도

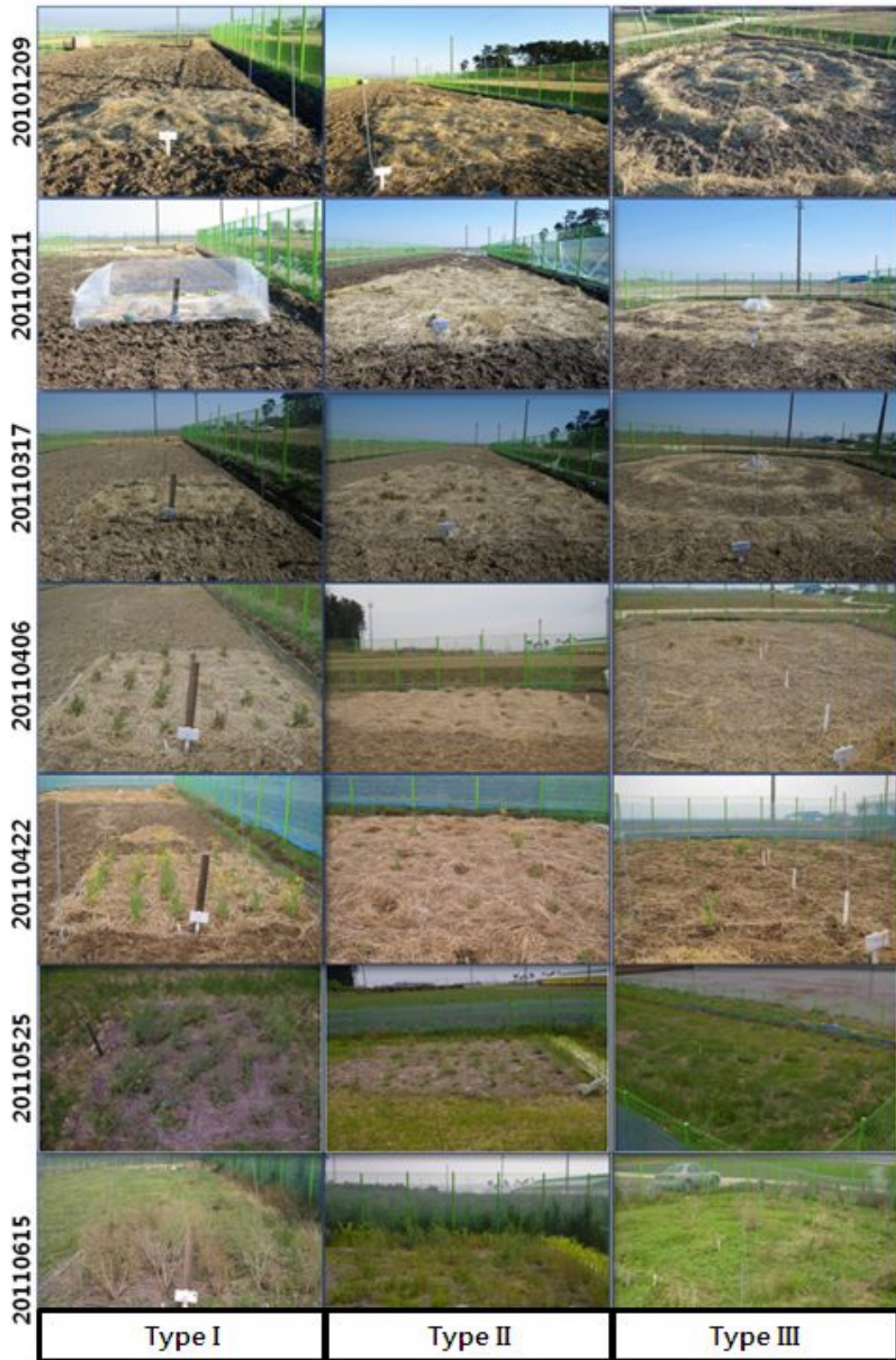


그림 45. 김제 LMO 포장에서 연구진행한 Type I, II, III의 파종기부터 기간별 생육상태

(3) LMO 포장 관리

- 김제 및 증평의 LMO 실험포장은 (주)에프엔피의 LMO 포장단지 매뉴얼에 따라 출입시 출입대장을 작성하고 보관하였음 (그림 46)

(A) 김제 연구 포장 출입대장

일시	시간	성명	업무 내용	비고
2013.10.20	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.21	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.22	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.23	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.24	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.25	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.26	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.27	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.28	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.29	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.30	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.31	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	

(B) 증평 연구 포장 출입대장

일시	시간	성명	업무 내용	비고
2013.10.20	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.21	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.22	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.23	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.24	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.25	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.26	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.27	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.28	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.29	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.30	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.31	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	

일시	시간	성명	업무 내용	비고
2013.10.20	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.21	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.22	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.23	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.24	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.25	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.26	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.27	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.28	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.29	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.30	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	
2013.10.31	09:30	김제연구팀	실험포장 관리	

그림 46. LMO 실험포장 관리를 위한 출입대장 작성

나) 유채 EVENT (Event #; FnPbNtG2802)의 생육특성 비교

- 3년차에도 2년차에 계속하여 Event 2802의 특성을 조사하였음. 국내 중부와 남부지역의 노지에서 개화일을 조사하였으며 종자생산량과 밀접한 꼬투리 길이 (협장), 꼬투리당 종자수 (1협 결실수) 및 개체당 종자량을 조사하였음
- 증평노지포장에서 재배된 대조구와 GM 유채의 개화일까지의 기간을 조사한 결과 180-185일 정도로 두 실험구간의 차이가 없었음 (그림 47, 48, 49)
- 증평 노지포장에서 수확된 종자의 협장은 대조구가 $6.5 \pm 0.6 \text{mm}$, GM 유채가 $7.1 \pm 0.2 \text{mm}$ 로 실험구간 유의차가 인정되지 않았으나 1협결실수 및 개체당 종자량은 대조구인 WT 유채와 GM 유채간에 차이가 있었음
- 1협결실수는 GM 유채에서 평균 4.9개가 많았으며 개체당 종자량 또한 GM 유채에서 9.1g 더 많은 것으로 조사되었음. 이는 재배환경을 조절할 수 없는 노지에서 GM 유채의 불량환경 적응력이 더 좋기 때문으로 판단됨 (표 6, 그림 50)

(A)



(B)

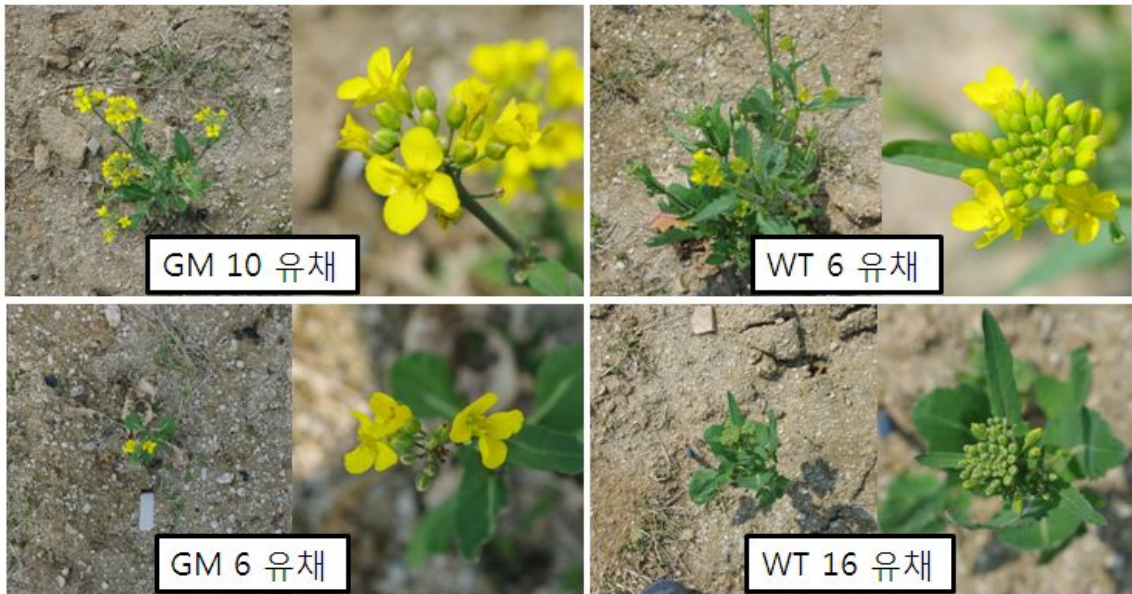


그림 47. 증평 LMO 포장 Type II의 식재 및 개화모습. 대조구와 GM 유채간의 개화기까지의 생육일수에 차이는 없었음

(A)



(B)

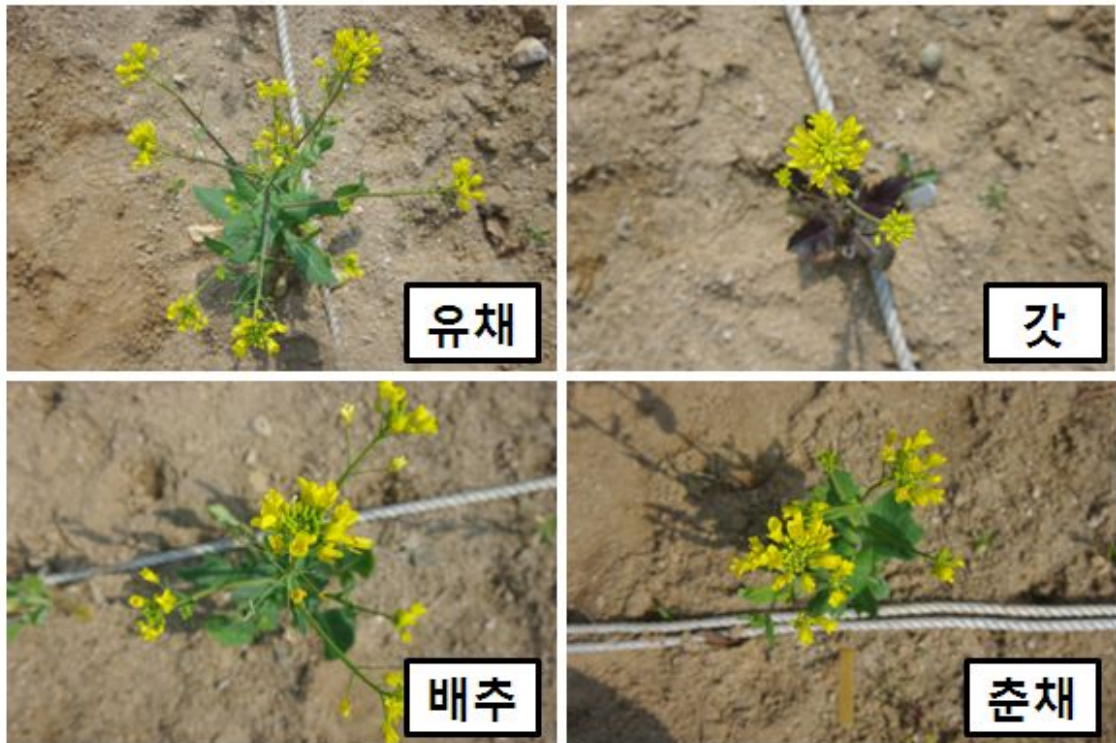


그림 48. 증평 LMO 포장 Type III의 식재 및 개화모습. 대조구와 GM 유채간의 개화기까지의 생육일수에 차이는 없었음

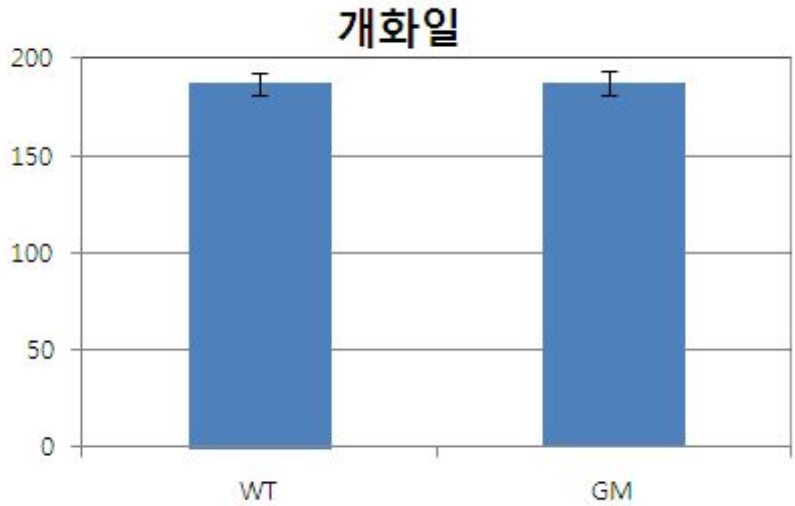


그림 49. 증평 LMO 포장에서의 개화일 조사결과 대조구와 GM 유채간에 차이가 없었음

표 6. 증평 LMO 포장에서의 생육조사표

구분	WT	GM
협장 (mm)	6.5±0.6	7.1±0.2
1협결실수 (ea)	21.3±2.5	26.2±0.7
개체당 종자량 (g)	13.7±3.2	22.8±4.0

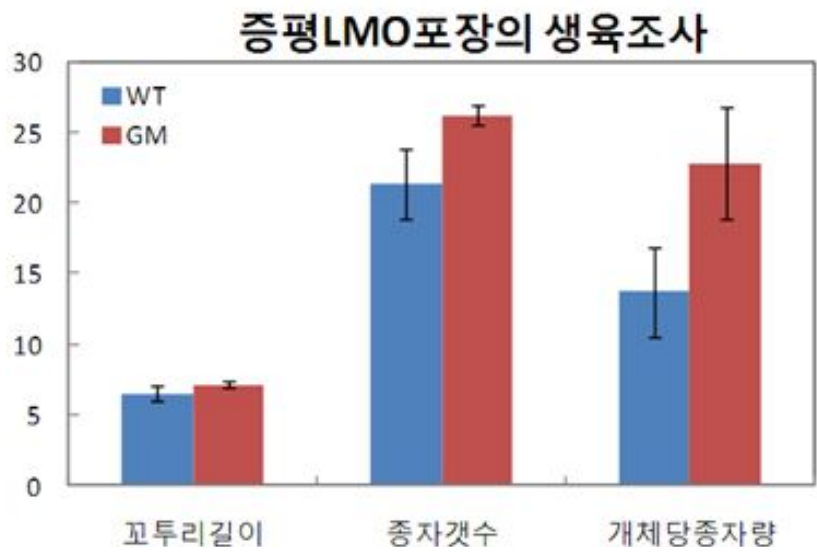


그림 50. 증평 LMO 포장에서의 생육조사

- 김제 노지포장에서 재배된 대조구와 GM 유채의 협장 및 1협결실수를 조사한 결과 유의성이 없었음. 그러나 종자의 개체당 종자량의 경우 GM 유채가 약 65% 더 많았으며 이들은 95% 신뢰수준에서 유의차가 인정되었음. 이는 GM 유채가 불량환경에 대한 내성이 더 좋기 때문으로 판단됨 (표 7, 그림 51)

표 6. 김제 LMO 포장에서의 생육조사표

구분	WT	GM
협장(mm)	5.8±0.2	5.9±0.1
1협결실수(ea)	18.5±1.1	16.4±1.9
개체당 종자량(g)	11.9±2.5	19.7±0.7

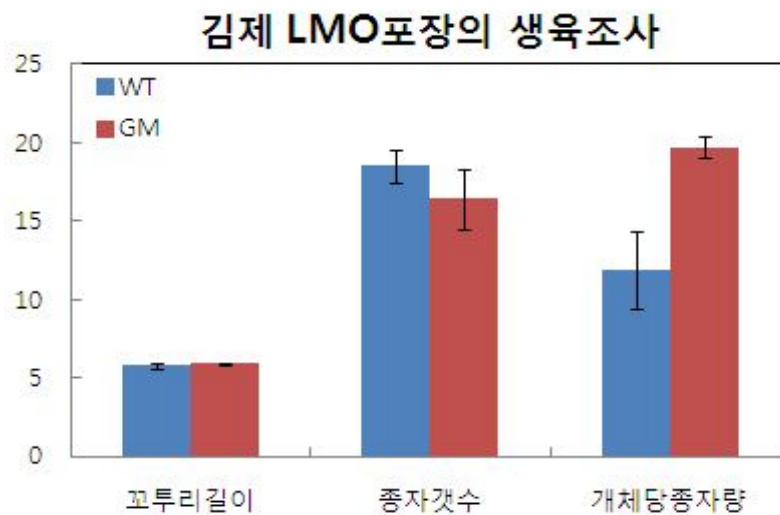


그림 51. 김제 LMO 포장에서의 생육조사

다) 교배율 조사

- 각 지역에서 거리에 따른 WT과 Event 2802의 교잡율과 십자화과 식물체와의 교잡율 조사를 위해 증평 LMO 포장에서 채종을 완료하여 각 개체별 정상 종자를 PPT 배지에 100립 (10Bt x10ea)을 치상 후 발아된 상태를 보고 교잡율을 측정하였음 (그림 52)

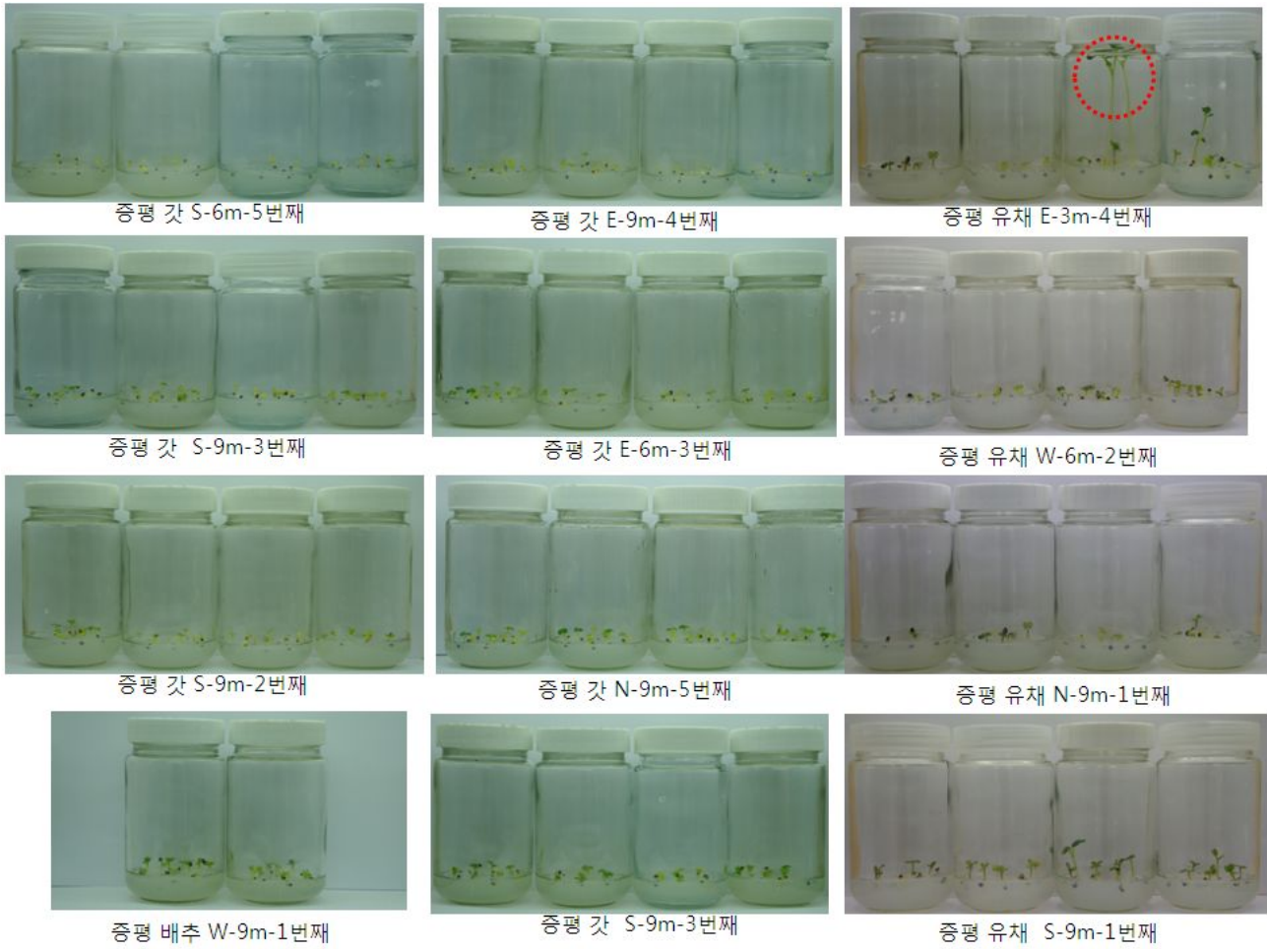


그림 52. 중평 LMO 포장에서 유채 교잡율을 확인을 위하여 채종한 종자를 PPT 배지에 치장한 모습

- 중평 LMO 포장에서 동종간의 교잡율을 조사한 결과 식재거리 0.5m에서 24±3.3%를, 식재거리 1m에서 13±1.5%의 교잡율이 확인되었음 (표 7)
- 중평 LMO 포장의 동종간에 식재거리 3m에서는 0.8-1.6%, 식재거리 6m에서는 0.4%의 교잡율이 확인되었으나 9m에서는 교잡이 확인되지 않았음 (그림 53)
- 중평 LMO 포장에서 이종간 교잡율을 조사한 결과 식재거리 6m 내에서는 갓, 춘채 등 이종간에 0.5-3.8%의 교잡율이 확인되었으나 9m에서는 교잡이 확인되지 않음 (표 8)

표 7. 중평 LMO 포장에서의 동종간 교잡율 조사표 (Type I, II)

중평	Type I	Type II
	0.5m	1m
교잡율 (%)	24±3.3	13±1.5

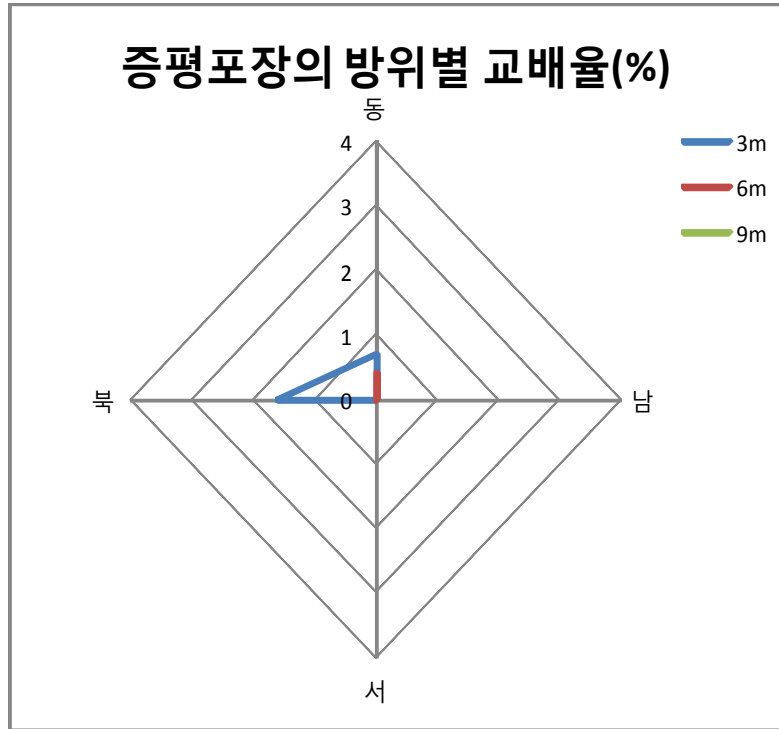


그림 53. 증평 LMO 포장 동종간의 방위별 교배율

표 8. 증평 LMO 포장에서 동종 및 이종간의 교잡율 조사표 (Type III)

Type III 교잡율 (%)	3m				6m				9m			
	갓	배추	유채	춘채	갓	배추	유채	춘채	갓	배추	유채	춘채
동쪽전체	0	-	0.8	2.8	0	-	0.4	1.7	0	-	0	0
서쪽전체	0.8	0	0	3.8	0	0	0	0	0	0	0	0
남쪽전체	0	0	0	1.2	0	-	0	0.9	0	0	0	0
북쪽전체	0	-	1.6	1.8	0.8	-	0	0.5	0	-	0	0

- 각 지역에서 거리에 따른 WT과 Event 2802의 교잡율과 십자화과 식물체와의 교잡율 조사를 위해 김제 LMO 포장에서 채종을 완료하여 각 개체별 정상 종자를 PPT 배지에 100립 (10Bt x10ea)을 치상 후 발아된 상태를 보고 교잡율을 측정하였음 (그림 54)

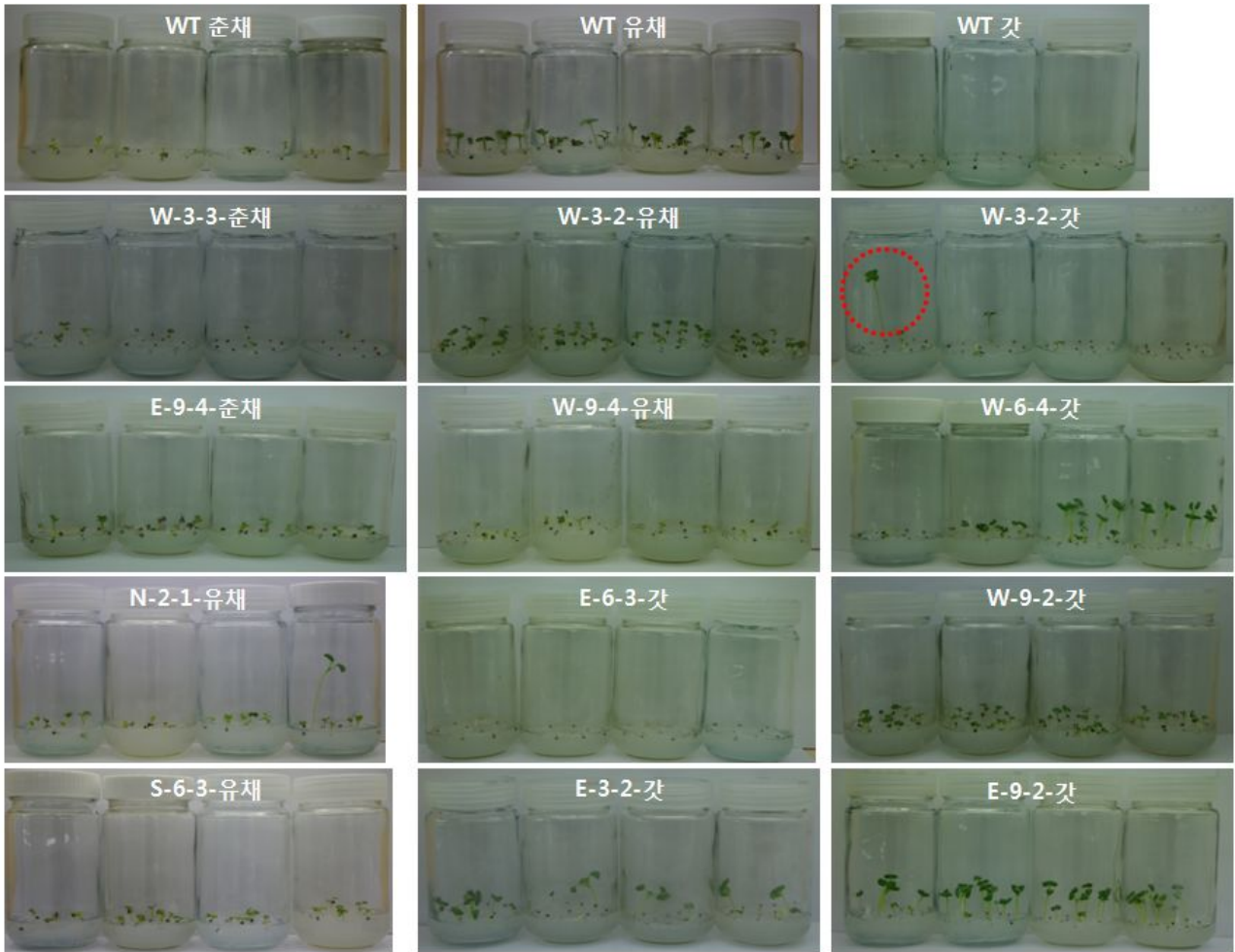


그림 54. 김제 LMO 포장에서 유채 교잡율 확인을 위하여 채종한 종자를 PPT 배지에 치장한 모습

- 김제 LMO 포장에서 동종간의 교잡율을 조사한 결과 식재거리 0.5m에서 $14.2 \pm 2.7\%$ 를, 식재거리 1m에서 $6.5 \pm 1.7\%$ 의 교잡율이 확인되었음 (표 9)
- 김제 LMO 포장의 동종간에 식재거리 2m에서는 0.1%, 식재거리 4m에서는 0%, 식재거리 6m에서는 0.4%의 교잡율이 확인되었음 (그림 55)
- 김제 LMO 포장에서 이종간 교잡율을 조사한 결과 식재거리 6m 내에서 갓, 배추 등 이종간에 0.1-0.3%의 교잡율이 확인되었음 (표 10)

표 9. 김제 LMO 포장에서의 동종간 교잡율 조사표 (Type I, II)

김제	Type I	Type II
	0.5m	1m
교배율 (%)	14.2±2.7	6.5±1.7

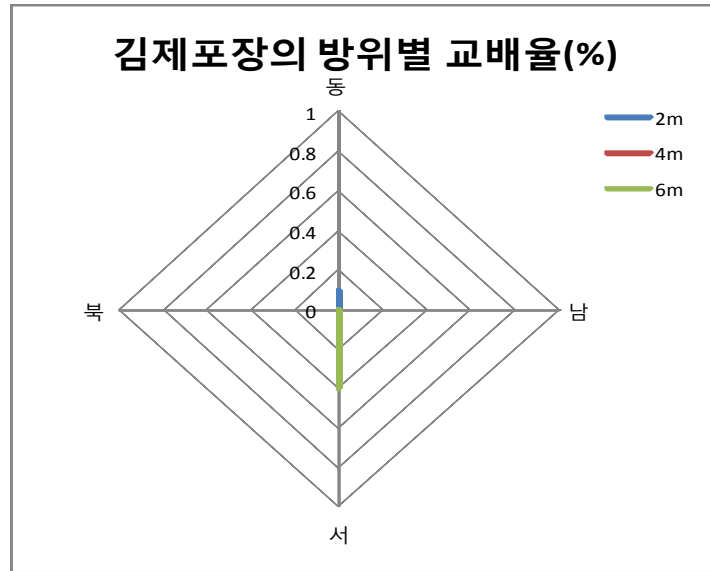


그림 55. 김제 LMO 포장 동종간의 방위별 교배율

표 10. 김제 LMO 포장에서 동종 및 이종간의 교잡율 조사표 (Type III)

Type III 교배율 (%)	2m				4m				6m			
	갓	배추	유채	춘채	갓	배추	유채	춘채	갓	배추	유채	춘채
동쪽전체	-	-	0.1%	0	-	-	0	-	-	0.2%	0	-
서쪽전체	0.3%	-	0	-	-	0.1%	0	-	0	-	0.4%	-
남쪽전체	0	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-
북쪽전체	-	-	0	-	-	-	0	-	0.3%	-	0	-

마. 환경위해성 곤충상 실험

- 환경위해성 곤충상 실험을 위해 충북대학교 농업생명과학대학 식물학과 곤충독성 연구실에서 배추좀나방의 알과 유충, 케이스 3개, 배추 8포트를 분양받음
- 25℃가 유지되는 growth chamber에서 광조건을 명조건 16시간, 암조건 8시간으로 조절하여 연구수행 함 (그림 56)
- 곤충상 실험은 배추좀나방 애벌레의 식생량 및 기주에 따른 산란량을 조사하였음
- 배추좀나방 2령충을 대조구 한라유채와 GM 2802 유채의 잎이 들어있는 10개의 플레이트에 5마리씩 접종하여 총 100마리의 유충이 유채잎 섭취시 생존율과 식생정도를 비교하였음 (그림 57)
- 실험에 사용된 유채잎은 파종 후 153일 생육시킨 유채의 연한 잎을 사용하였으며 접종 3일 후 식생량을 조사하였음



그림 56. 환경위해성 곤충상 실험을 위해 분양받은 배추좀나방의 알과 유충, 케이스 및 배추

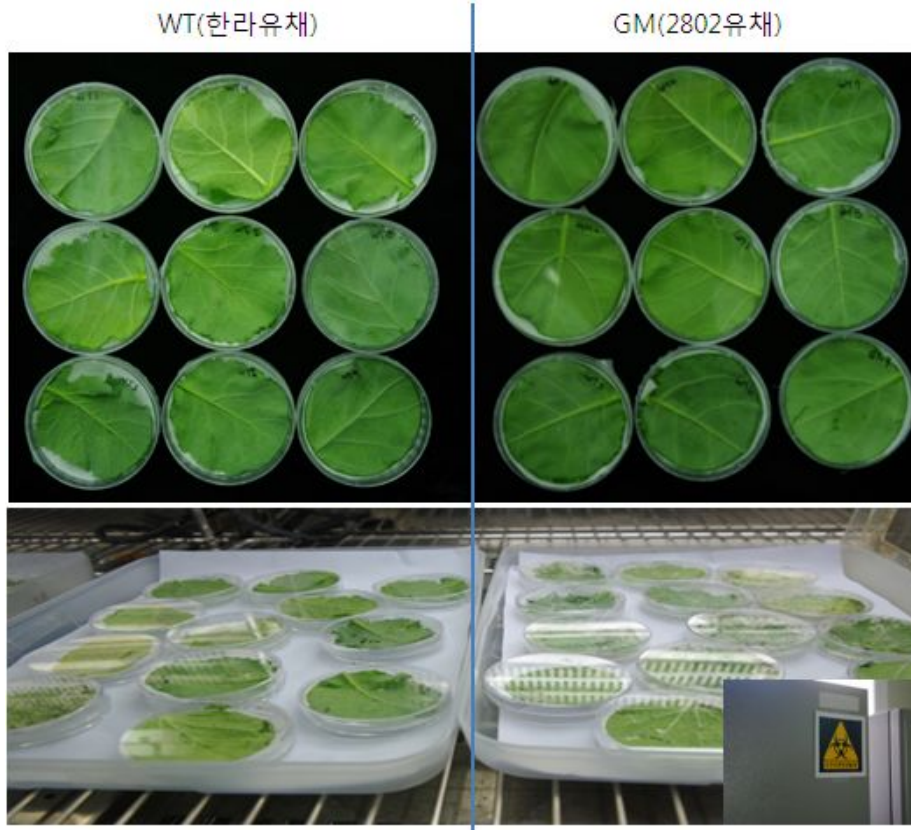


그림 57. 환경위해성 곤충상 실험을 위해 grwth chamber에서 실험 수행

- 배추좀나방 애벌레의 식생량 조사 결과 대조구의 식생전 잎의 평균 무게는 0.557g, 식생후 잎의 평균무게는 0.459g으로 0.098g이 감소하였으며 GM 유채의 식생전 잎의 평균무게는 0.511g, 식생후 잎의 평균무게는 0.400g으로 0.111g 감소하였음 (그림 58). 대조구 및 GM 유채 간의 식색량은 95% 신뢰수준에서 유의성이 인정되지 않았음 (P-value 0.455, 그림 59)

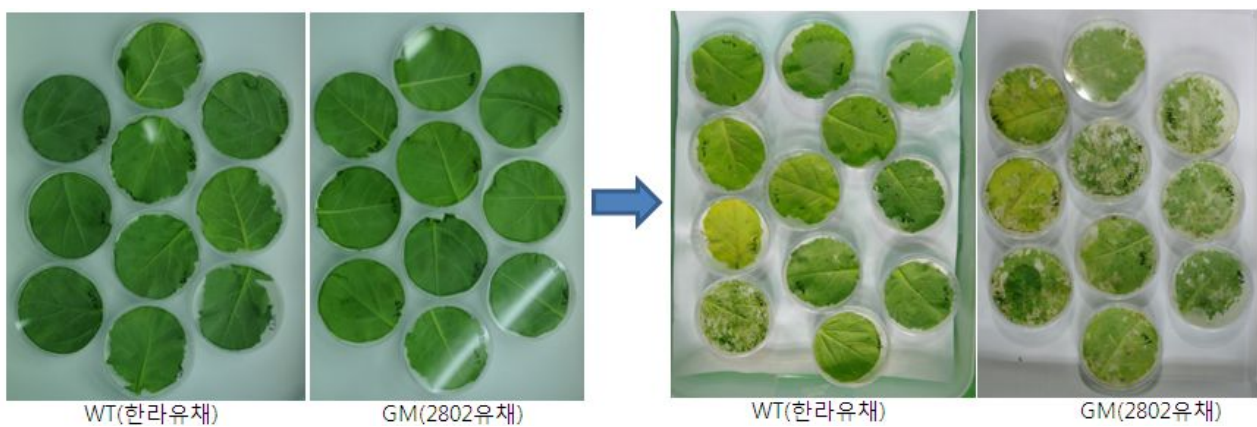


그림 58. 배추좀나방 애벌레의 식생전·후의 유채잎의 변화

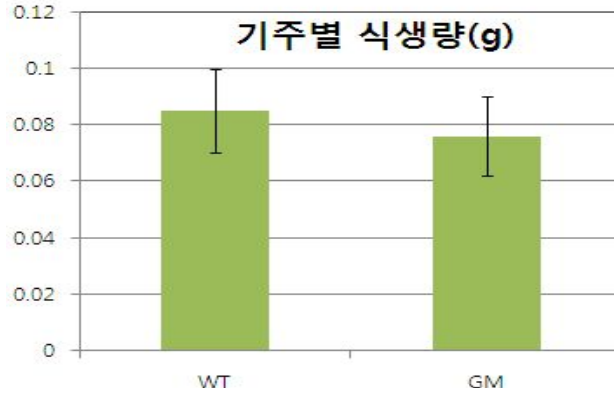


그림 59. 배추좁나방 에벌레에 의한 유채잎의 식생량 정도 (잎 무게 측정시 자연적으로 증발된 무게도 포함)

- 배추좁나방의 기주에 따른 산란량을 조사한 결과 대조구에서는 평균 24개, GM 유채에서는 평균 28개 정도의 산란량을 보였으며 이들은 95% 신뢰수준에서 유의성이 인정되지 않았음 (P-value 0.747, 그림 60, 61)
- 기주에 따른 산란량의 경우 대조구의 오차범위가 크고 실험의 반복수가 적어 추가실험이 요구됨

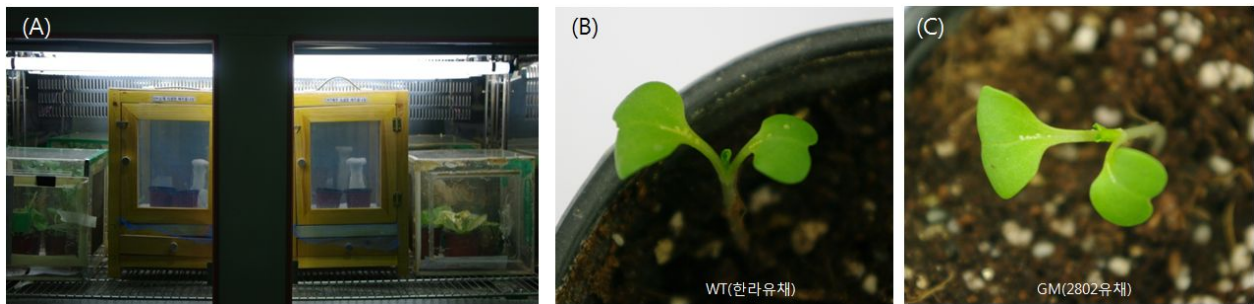


그림 60. 기주에 따른 산란량 조사를 위한 실험환경 (A) 및 대조구 (B)와 GM (B) 기주에서의 산란모습

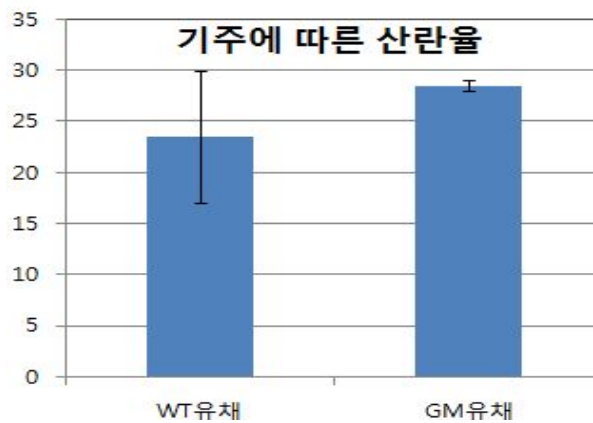


그림 61. 기주에 따른 산란율 조사결과 두 실험구 간의 유의성은 없었으나 대조구의 오차범위가 넓고 반복수가 많지 않기 때문에 추가실험이 요구됨

2. GM 벤틀그래스의 특성

가. 선발과정

1) 형질전환에 사용된 운반체 (Vector)

- 현재의 AtBG1 유전자를 벤틀그래스 벤틀그래스로 도입시킬 때 사용한 벡터는 pCAMBIA3301을 backbone으로 하여 Ubiquitin promoter(P_{ubi})와 Arabcs transcriptional terminator를 HindIII와 EcoRI을 이용하여 삽입시킨 벡터(이하 “pIG2”로 표기)를 이용하였음 (그림 62)
- AtBG1 유전자는 pIG2 벡터 내의 promoter와 terminator 사이에 BamHI과 SmaI을 이용하여 클로닝 되었음 (이하 “pIG2-AtBG1”으로 표기)
- pIG2-AtBG1 vector는 총 15432bp로 이루어져 있으며, 전체 염기서열을 MS word파일로 작성하였음 (주관기관에 제출 완료)

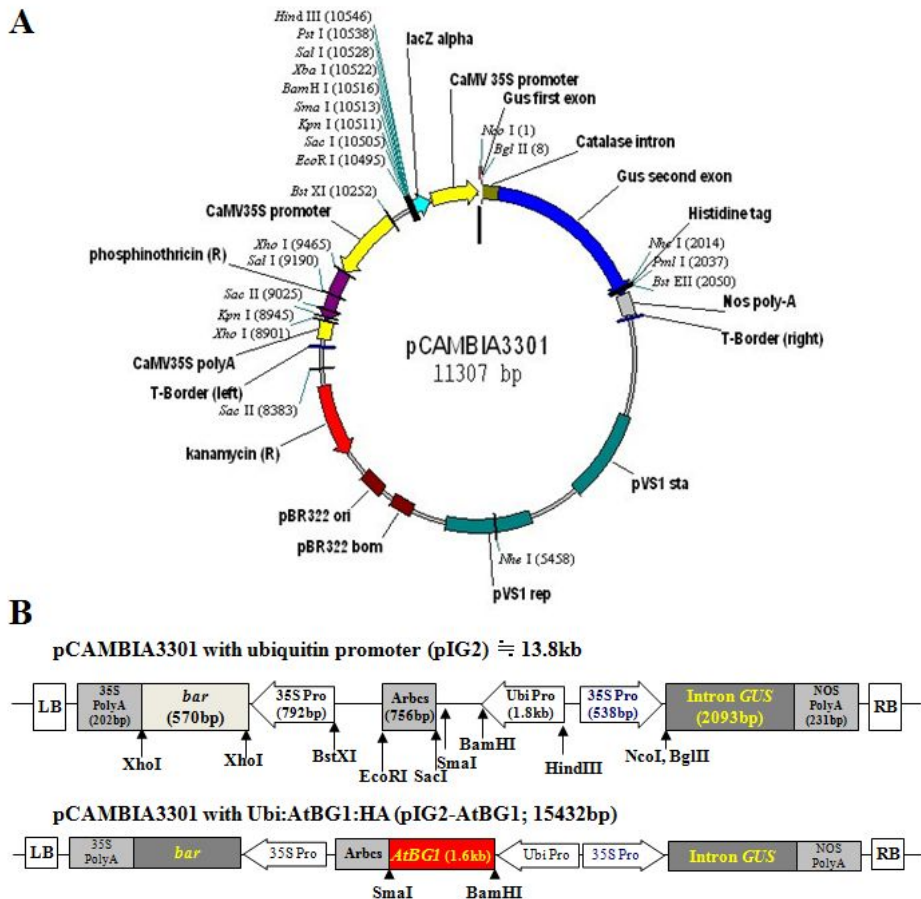


그림 62. AtBG1 유전자 도입을 위한 vector construct. A, pCAMBIA3301 vector. B, pIG2 및 pIG2-AtBG1 vector의 T-DNA region. pIG2-AtBG1 vector의 전체 sequence map(15432bp)을 작성하여 주관기관에 제출하였다.

- pIG2-AtBG1 내의 AtBG1 유전자는 애기장대 형질전환에 사용된 construct로 C-terminal end에 HA-affinity tag이 붙어 있으며 이것은 AtBG1 단백질을 확인하기 위해 이용될 수 있음 (그림 63)

```

11221  CTGAATATTC CAGAAAGGGG ATTGAGCTCG GTACCCGGGA ATCTCAAGAA GGGATCGCAT ← ARBCS
11281  TAGACCTTGT AGCATACCCA TGTCGAACCT CCAACCTTTC ACACCAAACCT CCTTAAGCCT ← SmaI
11341  FATGGTAAAC GGGCTTTGAA AAACCACTGC CCAGTCAAC AAGACTTTA GCTACATCAT
11401  TTCAGGCTTG GAGCGGAACA TGGGTAGAAC GGTGAGTTTC AACAGGTAGT TTCCTGGTGTG
11461  TTTCATAGGG CATFGCAAGT GAAACAGGAA CGTTTACCGC AGCAGCTATG AGTTCCTCTAC
11521  GGAAACCTAT ATTATAAAG ACAACACTAG AACACAGGTT TTCAAATGCA GTAACACGAA
11581  GAGAGTTTCC AGAAGAGGCA TAGGTAAGAG CCGTTACTAT TGAAGACCCA GCGGTATCAA
11641  TAGGAATTAT ATGAAGTTT CCATAGAGTT TGGAAAACCT ATGTGTAGGT CAAATGGTAA
11701  TTTGCCGAAC GATGGTTAAA ACATAGGTAG GTGTGAGAAC GATAGGGTTA GTTGTCTCT
11761  TAGTCAGCAG GTTGAGCCTG AGAATCCTAG TCCCGATTAA AGAAAACGTT TGTGACTTCA
11821  TATCATTAAG TAAGGATGCA TTAGACATCT TGGGAAATCG TTGAAGAAGA GTCGAAGACA
11881  CTTAAAACCG TTAGATAGTG GCTGTGCTAG GAAGTAGCTA ACACCTATTA GAGGTATTCA
11941  ACAACCTCGG TTTACGGTAG GATCCTACTT TAGTTCGTGT GCAAGTTACC TTGGAGTTG
12001  TACGAGTTCC AGAACACCAA GCTTGGTTCG ACCTGACACA CGTTAAGGTT AAAATGGAGG
12061  TCGTGTGAGA AACGTCAAAG ACTTACGCAG TTGTCGCATT CGTACGCTGT TCTCATTCGA
12121  CACTGACTGA ACTATTTCGAA GCATAGGCTT GCGGGTAGG ACTGTTACGA CAGGTATTGG
12181  CCCCTACATG CCGCTTGTG CAGGGCCTCG AAAGAAAGGC AACAGCATTG GCCGTGCTGA
12241  TTTGTGGGTA CCGAGCAATT TACACTAGGT TACAAGTGA AACACAGGTA TAAGCACCTT
12301  TCACTTTAAG CGTATAAGCC ATTTTAGAAC GTGCTACGCT GGTGAATTCT TTGTTGTTAT
12361  AAGTAGAAGG TTCAGAACCC CTCGTAGGGT TACTTTCCTGA GATTGATTAC CATAATATAA
12421  CAAAACCTCT TCGAGTAGCT ACTCCAGCAC CATCTTAACC TGAGGGTGAA ACGAATAAGG
12481  GAATCTGTAG GAAGGTACCC CCTTATAAGA CCCGGTCCGT TATCTTTCAG ATTTTCGTAG
12541  TCACAATTCC AGAAAGTAGT TGACCTATAG AAGGAACATT GCTACTATCT TTAGTGTCTG
12601  TTGTAGTCCG AATACTAAA GTGTAGATAC ACCCTTGAAG AATCATTTC ATAGGGTGTA
12661  CGAACCAGG GACGTTGGAA GTAATTGTCT AGGAAGTTGG ACTTTACGAC GACAACGCCA
12721  AGGGGTTTAC TTCGGAAGTC CCTTCAAATT AGACGATTTA AACAGTCCGT CCGGACGCTG
12781  CGTTTTCCTA GGAACCCGAA ACCAGCTCG AGGTGGTCT CAATCTTGGT CTCGATTGGG
12841  ATTTGTATTT ACTTGGGAAGA GCTTGGAGTG GTAGGATCCT CTAGAGTCGA CCTGCAGAAG ← BamHI

```

ATG & STOP (검은색)

그림 63. pIG2-AtBG1 vector 내 AtBG1 유전자 서열 및 도입 위치. AtBG1 유전자(보라색)는 BamHI과 SmaI(빨간색 밑줄)으로 클로닝 되어 있다 (유전자가 vector 내 끼꾸로 들어가 있음; ATG start codon과 TAA stop codon은 검은 색으로 표시 되어 있음). 보라색 AtBG1 서열 내 밑줄은 HA-tag을 나타내며 녹색은 ArbcS terminator sequence 일부를 나타냄

- 본 연구에서는 pIG2-AtBG1 construct를 확인하기 위하여 DNA sequencing뿐 아니라 여러 제한효소를 이용한 map도 확인하였음 (그림 64). 이러한 과정을 거쳐 AtBG1의 벤트그라스로의 형질전환에 사용된 vector 염기서열과 제한지도를 확인함으로써, 사용된 vector에 대한 자료를 완성하였음

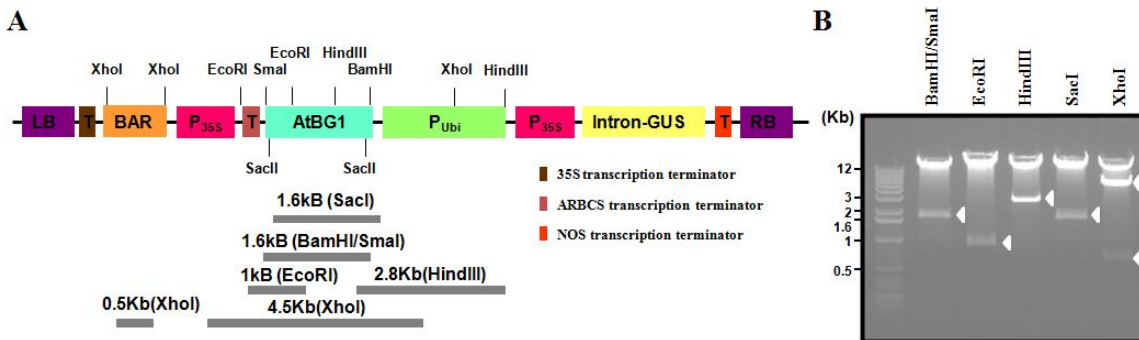


그림 64. pIG2-AtBG1 construct의 제한 지도 확인. A, 제한 효소에 따른 DNA fragment의 예상 size. B, 제한 효소를 처리하여 확인한 DNA fragment의 agarose gel. 다양한 제한 효소 처리에서 예측된 DNA fragment size(arrowheads)를 확인함

2) AtBG1 도입된 벤투그래스 형질전환체 개발과정

- 본 연구진은 벤투그래스 형질전환 시스템을 확립하여 이미 논문 발표와 일부 벤투그래스의 특허를 출원된 바 있음 (J. Plant Biol. (2007) 50, 577-585; Plant Cell Rep. (2009) 28, 397-406; J. Plant Biotechnol. (2009) 36, 327-335; 국내 특허 10-2009-0122011). 따라서 AtBG1의 형질전환도 같은 방법으로 진행되었음
- 벤투그래스 형질전환을 간단히 정리해 보면 (그림 65 참조), 벤투그래스 종자(Creeping Bentgrass “Crenshaw” 품종)의 표면을 70% 에탄올(v/v)로 10분 처리한 뒤에, 2% (w/v) sodium hypochlorite로 20분간 소독해 줌. 이후 소독된 종자는 캘러스 유도 배지 (MS basal salts, vitamins, 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3 g/L gelrite; pH 5.8)에 치상하였음
- 배발생능 캘러스(embryogenic callus)는 배지에 치상한 벤투그래스 종자를 25°C에서 4주간 암 배양을 통해서 획득하였으며, 이렇게 얻은 캘러스는 2주에 한 번씩 계대 배양을 해주며 한 달간 캘러스 유도 배지에서 배양하였음
- 계대 배양 과정에서, 형질전환에 적합한 캘러스를 선발하여 0.5 mg/L 키네티(kinetin)이 첨가된 캘러스 유도 배지에서 1주일간 배양한 후, 아그로박테리움을 이용한 형질전환을 실시하였음
- O.D₆₀₀=0.5까지 LB 배지 (Luria-Bertani medium; Difco, USA)에서 배양한 pIG2-AtBG1 벡터가 도입된 아그로박테리움 EHA105를 3,000rpm에서 15분간 원심분리 한 후에 LB 배지와 동일한 부피의 접종 배지 (Infection media; 1/2 MS media, 2% sucrose, 1% glucose, 100 μM acetosyringone, pH 5.2)로 현탁한 뒤 4시간 동안 배양하였음
- 그리고 키네티가 포함된 캘러스 유도 배지에서 배양된 캘러스를 아그로박테리움이 있는 배지와 섞어준 후에 15분간 부드럽게 흔들어주면서 배양한 후, 필터 페이퍼 위에 올려놓아 건조시키면서 캘러스에 필요이상 붙은 아그로박테리움을 제거해주었음
- 접종한 캘러스는 이후 공동배양 배지 (Co-cultivation media; 1/2 MS media, 2 mg/L 2,4-D, 2% sucrose, 1% glucose, 100 μM acetosyringone, 3g/L gelrite, pH 5.8)에 옮긴 뒤, 25°C에서 약 3.5일 동안 암 상태로 배양하였음
- 공동배양이 끝난 뒤에, GUS staining 분석을 통해서 형질전환 유무를 확인하고 형질전환된 캘러스를 5mg/L phosphinothricin (PPT; Duchefa)와 250mg/L cefotaxime이 포함된 캘러스 유도 배지에서 25°C, 2주간 암 상태로 배양하였음
- 2주간 암 상태에서 배양한 캘러스를 동일한 캘러스 유도 배지에서 8-10주간 100 μmol·m⁻²·s⁻¹의 cool-white fluorescent lamp 조건에서 배양하여 재분화를 유도하고, PPT에 저항성을 보이는 green shoot을 10 mg/L PPT와 250 mg/L cefotaxime이 포함된 뿌리 유도 배지로 옮겨주어 뿌리를 유도하였음. 이후 재분화 된 형질전환 벤투그래스 후보들을 흡수로 옮겨 주어 온실 조건에서 키운 후 분석하였음
- 이와 같은 과정을 거쳐 얻어진 형질전환체 후보들은 제초제 저항성 조사와 분자생물학적 분석을 통하여 형질전환체 여부를 확인하였음 (그림 66). 분자생물학적 분석에는 선발 마커(bar)와 목표 유전자(AtBG1) 도입 확인을 위한 genomic PCR과 도입 유전자 수를 확인하기 위한 Southern blot 분석, 그리고 유전자 발현을 확인하기 위한 Northern blot 등이 수행되었음
- 또한 AtBG1이 도입된 형질전환 벤투그래스는 놀랍게도 온실에서 자라면서 눈에 띄도록 야

- 생형 벤투그래스와는 다른 표현형 (키가 작고 옅은 초록색을 띠는)을 보여주었음 (그림 67)
- 형질전환 과정에서 얻은 많은 형질전환체 후보들 중에서 총 80개체를 온실에서 배양하여 분석한 결과, 상당수가 도입 유전자 위치가 같은 (즉, Southern blot 분석 결과 같은) 것으로 확인되었음. 하지만 5개 이상의 independent line들을 확보하였으며, 그 중에서도 도입 유전자 수가 하나이면서 AtBG1의 표현형을 보이는 대표 라인을 선발하여 이후의 실험을 진행하도록 하였음

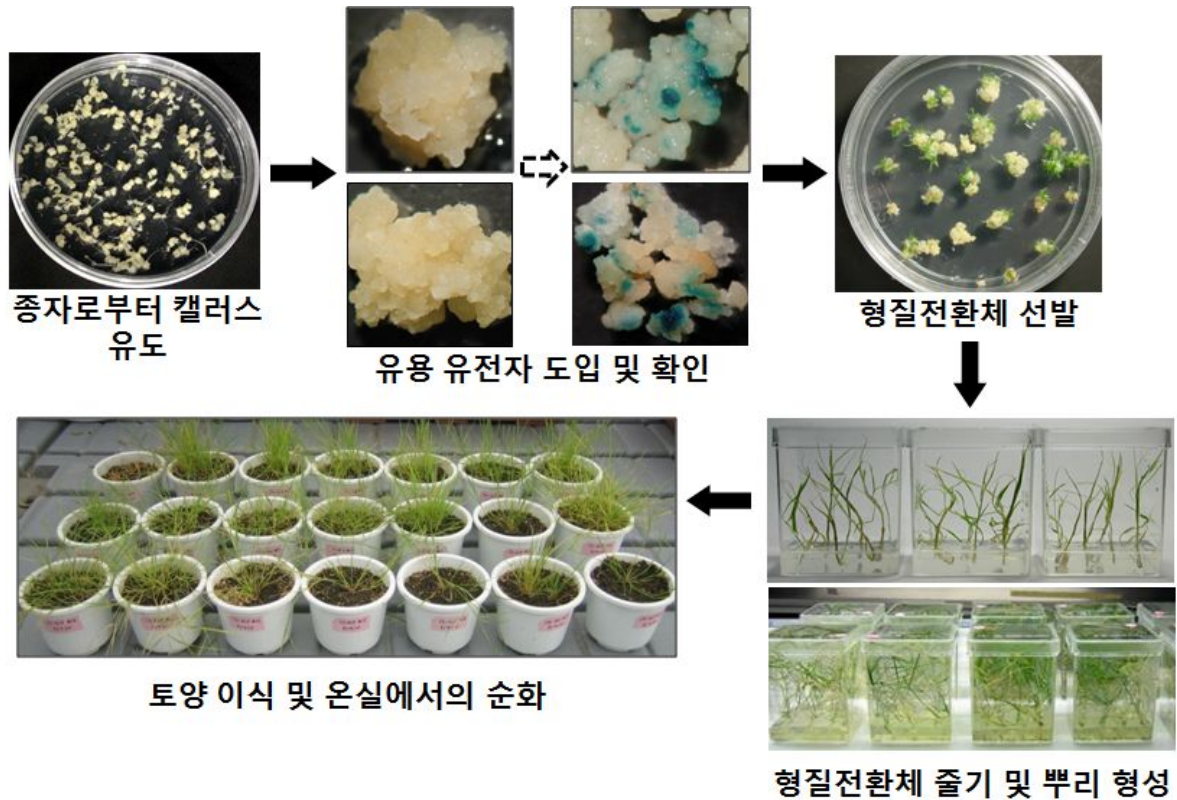


그림 65. 벤투그래스 벤투그래스의 형질전환과정 요약. 벤투그래스 형질전환은 성숙종자에서 embryogenic callus를 유도하여 아그로박테리움을 이용하여 유전자를 도입시키고 (중간에 GUS 확인), PPT가 포함된 배지에서 callus를 선발하여 줄기와 뿌리를 유도한 후, 토양으로 식재하여 온실에서 순화시켰음

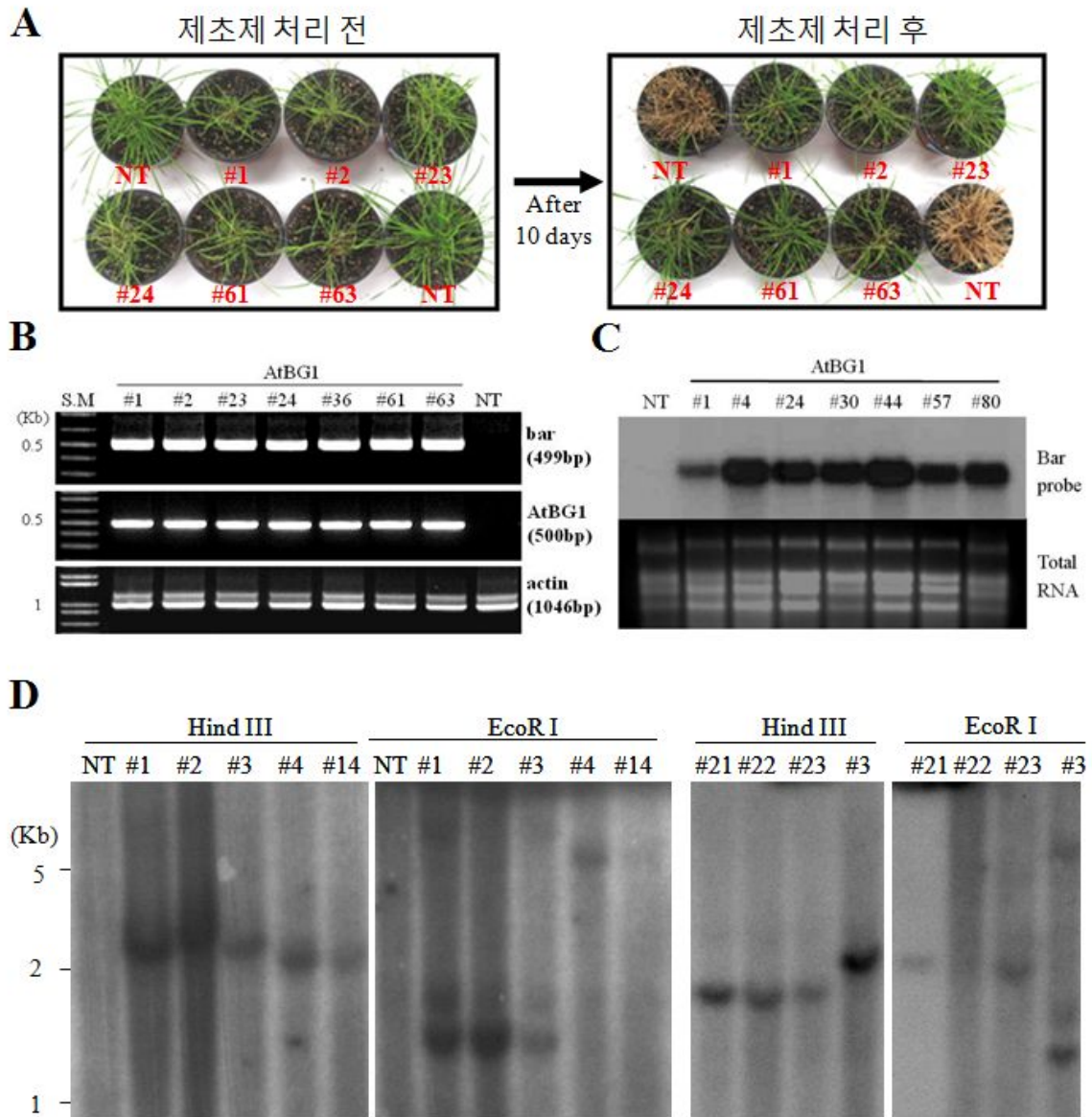


그림 66. 형질전환 벤토그라스 벤토그라스의 제초제 저항성 조사 및 분자생물학적 분석 결과. A, BASTA[®] 제초제 저항성 조사 결과. 0.4% BASTA[®] 제초제 살포 전후의 그림. 야생형 벤토그라스(NT, Non-transgenic)는 살포 10일 후 완전히 말라 죽는 데 반하여 형질전환체들은 생장이 정상적으로 진행되는 것을 확인할 수 있음. B, Genomic PCR 분석 결과. 제초제 저항성을 확인한 모든 개체에서 도입된 유전자 *bar* 및 *AtBG1*의 존재를 확인할 수 있다. Actin은 loading control로 보여주었음. S.M, size marker. C, Northern blot 분석 결과. D, Southern blot 분석 결과

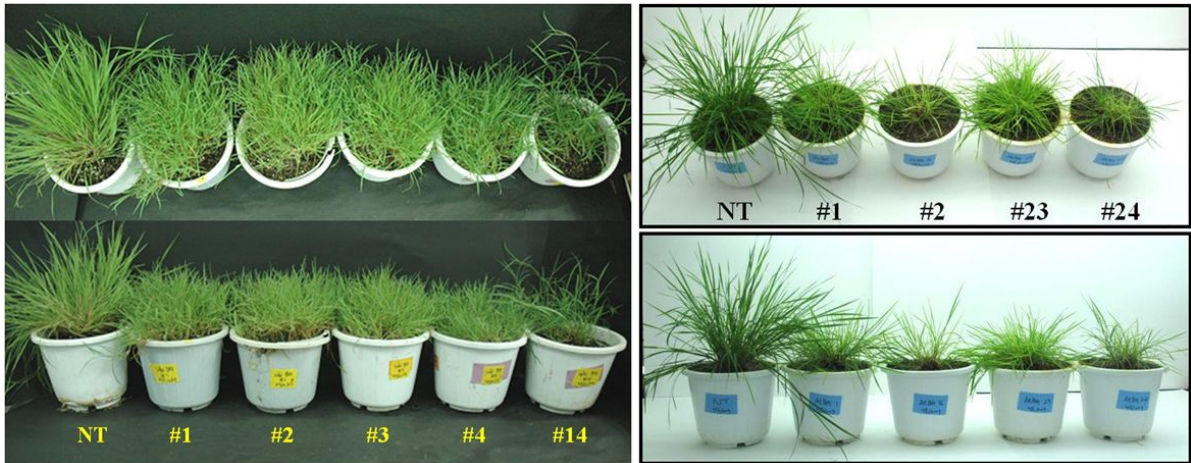


그림 67. AtBG1 유전자 도입 벤투그래스 벤투그래스의 apparent phenotype. AtBG1 도입 벤투그래스들은 키가 작고 촘촘하게 자라며, 연한 초록색을 띠고 있음을 관찰할 수 있다.

3) 선발된 AtBG1 도입 벤투그래스 형질전환체의 분자생물학적 분석

- 앞의 과정을 걸쳐 AtBG1 도입 벤투그래스 형질전환체의 실용화 연구를 위한 최종 후보를 선발하고자 하였음. 여기에 앞서 AtBG1 형질전환체들 중에서 #14 라인의 경우, 다른 형질전환체에 비하여 유독 차이나는 표현형을 보여주었음 (야생형과 비슷; 그림 67 참조)
- 본 연구진은 #14 라인의 표현형이 AtBG1이 도입되지 않아서인지 또는 AtBG1의 발현이 낮아서 인지를 증명하기 위하여 #14 라인에 대한 보다 세밀한 분석을 실시하였고, 그 결과 #14에는 bar 유전자는 정상적으로 도입되어 있으나 AtBG1 유전자는 도입되어 있지 않음을 확인할 수 있었음 (그림 68, 69). 따라서 본 연구진은 서로 다른 두 개의 캘러스에서 유도된 각 2개의 형질전환 식물체들 (#1 & #2, #23 & #24)을 최종 후보로 선정하고 후속 분자생물학적 분석을 수행하였음

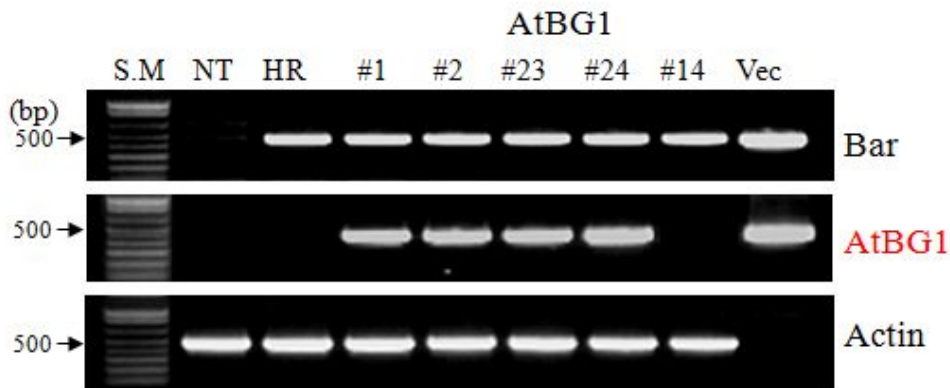


그림 68. #14 라인의 유전자 도입 분석 결과. AtBG1 도입 벤투그래스 벤투그래스들 중에서 표현형이 틀린 #14 라인의 유전자 도입 확인을 위한 genomic PCR 분석을 실시하였고, 그 결과 bar 유전자는 도입되었으나 AtBG1 유전자가 도입되어 있지 않음을 확인. 따라서 #14 라인에서 AtBG1의 표현형이 나타나지 않은 것은 AtBG1의 발현 문제가 아니라 유전자 도입이 되지 않았기 때문으로 최종 확인되었음. NT, Non-Transgenic bentgrass; HR, Herbicide-Resistant bentgrass; Vec, pIG2-AtBG1 as a positive control.

- 선정된 최종 후보들에 대한 제초제 저항성 (그림 66A), 표현형 조사 (그림 67), genomic PCR (그림 68) 등은 이미 앞선 결과를 통해 확인하였음. 따라서 이들 라인들에 대한 Southern blot 및 northern blot 분석을 *bar*와 *AtBG1* 유전자를 probe로 하여 실시하였음
- Southern blot 분석 결과, #1과 #2, 그리고 #23과 #24번 라인들 모두 single copy transgene을 지님을 확인할 수 있었음. 그리고 같은 callus에서 유래된 #1, #2 식물체와 #23, #24번 식물체는 같은 유전자 도입 위치를 지니는 것으로 확인되었음
- 또한 #14번의 경우 *bar* probe에서는 single band로 나타나지만, *AtBG1* probe에서는 band가 나타나지 않아 앞의 genomic PCR 결과와 같이 *AtBG1* 유전자가 삽입되지 않았음을 다시 확인할 수 있었음. 그리고 도입된 유전자의 발현을 조사하기 위하여 northern blot 분석을 실시한 결과, 선발된 라인들에서 도입된 유전자들(*bar* & *AtBG1*)의 발현이 원활이 이루어지고 있음을 확인할 수 있었음 (그림 70). 다만 #23/#24번 라인에서 *AtBG1* 발현이 #1/#2 라인에 비하여 다소 높게 나타났음

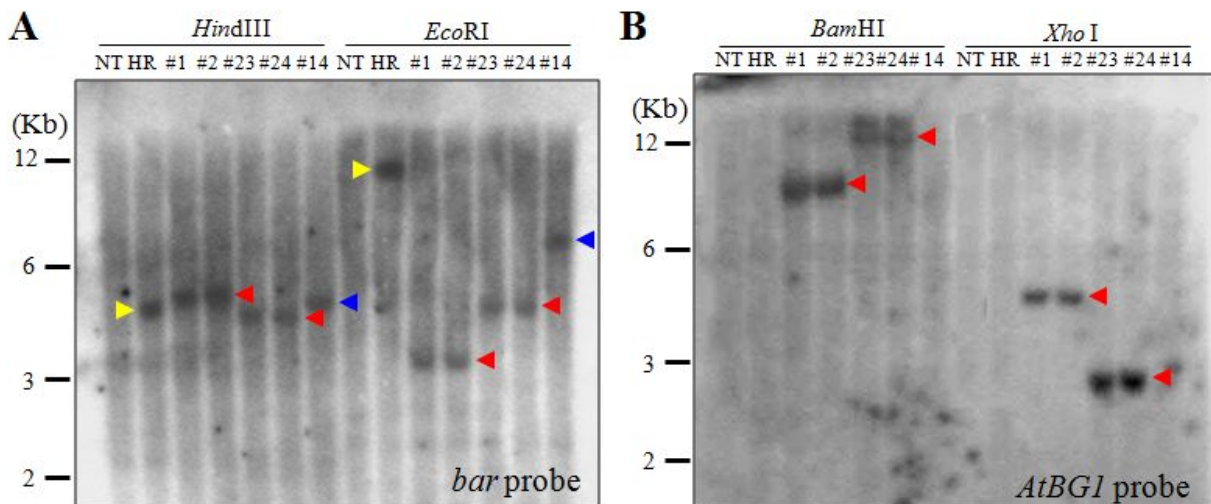


그림 69. 선발된 *AtBG1* 도입 벤프그래스 형질전환체의 Southern blot 분석 결과. 분석은 *bar* (A) 및 *AtBG1* (B)을 probe로 하여 각각 수행되었음. 빨간색 arrowhead는 *AtBG1* 형질전환체들의, 노란색 arrowhead는 제초제 저항성 벤프그래스(HR)의, 그리고 파란색 arrowhead는 #14 line의 band를 각각 보여줌. 선발된 *AtBG1* 형질전환체들은 모두 single transgene을 지니는 것으로 확인되었고, #1과 #2, 그리고 #23과 #24는 같은 캘러스에 유래된 식물체이기에 같은 Southern blot 결과를 보여줌. 또한 #14 라인에는 *AtBG1* 유전자가 도입되지 않았음을 재확인하였음

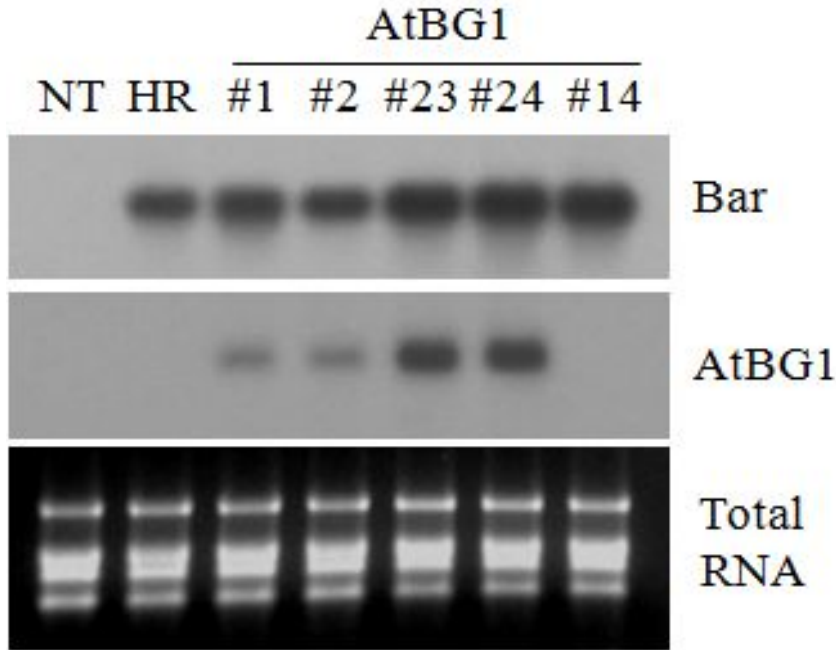


그림 70. 선발된 AtBG1 도입 벤투그라스 형질전환체의 northern blot 분석 결과. Total RNA는 loading control로 포함되었음

- 결론적으로 AtBG1이 도입된 형질전환체 분석을 통하여 single transgene을 지나면서 도입 유전자 발현과 AtBG1 유전자가 도입된 표현형이 나타나는 라인들은 선발하여, 그 중에서 향후 실용화 연구에 쓰일 최종 라인(#1/#2 & #23/#24)들을 본 연구를 통하여 선발하였음

나. 선발된 AtBG1 도입된 잔디의 분자생물학적 분석

- 지난 연구에서 AtBG1 유전자가 도입된 형질전환체 분석을 통하여 최종 이벤트 후보 라인으로 #1/#2 식물체와 #23/#24번 식물체를 선정. 이에 당해 연도에서는 #2 및 #23 이벤트 라인에서 도입유전자 위치 및 주변서열 분석을 중점적으로 실시
- 본 연구에서 사용한 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 방법은 벡터의 T-DNA 부위가 식물 유전체에 직접적으로 삽입되는 방법으로서, 외래 DNA가 식물체에서 안정적으로 발현되며 후대에 유전되는 장점을 가지고 있음. 하지만, T-DNA가 식물 유전체에 삽입되는 과정에서 식물의 유전자에 돌연변이가 생길 가능성도 있기 때문에 T-DNA의 삽입 부위에 대한 검정이 필요함
- 유전자가 식물체 내의 주 염색체 또는 세포 미세소기관의 DNA 등에 도입되었는지 확인하기 위하여, inverse PCR을 진행하였음
- Inverse PCR은 주로 genomic DNA에 삽입된 유전자의 주변 염기서열을 결정하기 위한 방법으로 통상적인 PCR이 양쪽 방향의 primer를 기준으로 안쪽의 염기 서열을 분석하는 것과 달리, 바깥쪽의 염기 서열을 분석하는 PCR을 말함 (그림 71, 표 11). 이러한 inverse PCR의 방법을 이용하여, 형질전환 식물체에서 T-DNA가 삽입된 부위의 염기 서열을 분석해 낼 수 있음
- 따라서 #2 및 #23 라인 식물체에서 genomic DNA를 추출한 뒤, *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI* 등의 제한 효소를 처리를 한 뒤에 그 DNA를 self-ligation 시켜 circular DNA를 만들고,

self-ligation 한 genomic DNA와 제한 효소 자리를 중심으로 통상적인 방향의 역방향으로 만들어진 primer를 가지고 PCR을 하여 product를 얻었고 (표 12, 그림 72), 유전자 염기서열 분석을 통하여 T-DNA 삽입위치 및 주변의 DNA염기 서열을 얻을 수 있었음

- i-PCR을 수행한 결과, AtBG1 도입 GM 잔디의 두 이벤트 라인인 #2번과 #23번 라인의 T-DNA 삽입 부위와 주변 염기서열을 확인할 수 있었다 (그림 73 & 그림 74). #2 이벤트 라인의 경우, T-DNA 염기서열 분석 결과 right border (RB) 염기서열이 소실이 되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, #23번 이벤트 라인의 경우 RB 및 left border (LB) 염기 서열 모두가 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 과정에서 소실된 것을 확인할 수 있었음
- 이러한 border sequence 소실의 경우 이전 연구 결과에 의해 활발한 nucleolytic degradation에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으며, 주로 RB에서 많이 일어나는 것으로 알려져 있음. 따라서 AtBG1 도입 GM 잔디 라인들에서도 이러한 border sequence 소실이 발생한 것을 알 수 있었음

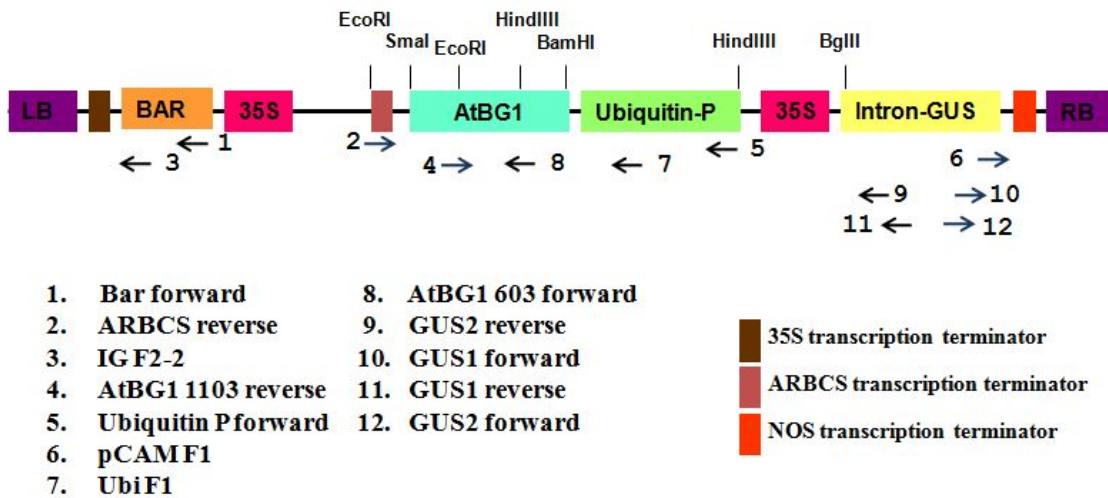


그림 71. AtBG1 유전자 삽입 위치 및 주변 서열 분석을 위한 I-PCR. 형질전환에 사용된 pIG2-AtBG1 벡터 내 T-DNA 부위와 그에 따른 inverse PCR용 primer들의 위치를 보여줌. Inverse PCR은 *HindIII*, *BamHI* 및 *EcoRI*의 제한 효소 처리를 한 뒤에, 위의 16가지 종류의 PCR primer들을 이용하여 진행하였음. Primary PCR을 진행하여 확보한 PCR product를 이용하여 secondary PCR을 진행하였음. [구체적 방법은 Appendix로 작성하여 주관기관에 제출하였음]

표 11. Inverse PCR에 사용한 primer sequences.

Name	Sequence
Bar forward	5'-gcgtgcgcatgcacgaggcgctcgg-3'
ARBCS reverse	5'-tcctcaactttaagtccgca-3'
IG F2-2	5'-cgctcatgtgttgagcatataag-3'
Ubiquitin P forward	5'-gcgtgattcaagcttgcctgcagtgcgca-3'
pCAM F1	5'-agcagggaggcaaacaagctag-3'
Ubi F1	5'-ttagccctgccttcatacgtct-3'
35S P reverse	5'-gcccttgggtcttctgagactgtatc-3'
AtBG1 603 forward	5'-ttgatcacatttaacgagcc-3'
GUS2 reverse	5'-gacgttgcccgcataattacg-3'
GUS1 forward	5'-ccaagcgtggtgatgtggag-3'
GUS1 reverse	5'-tacggcgtgacatcggctt-3'
GUS2 forward	5'-ggaatatttcgcgccactgg-3'

표 12. Primary 및 secondary PCR에 사용한 primer 조합.

	<i>Hind</i> III		<i>Eco</i> RI		<i>Bam</i> HI	
	LB	RB	LB	RB	LB	RB
1st PCR	Bar forward	GUS2 forward	Bar forward	Ubi F1	ARBCS reverse	Ubiquitin P forward
	ARBCS reverse	GUS1 reverse	35S P reverse	GUS2 forward	Bar forward	GUS2 forward
2nd PCR	IG F2-2	GUS1 forward	IG F2-2	AtBG1 603 forward	AtBG1 1103 reverse	Ubi F1
	AtBG1 1103 reverse	GUS2 reverse	35S P reverse	GUS1 forward	IG F2-2	pCAM F1

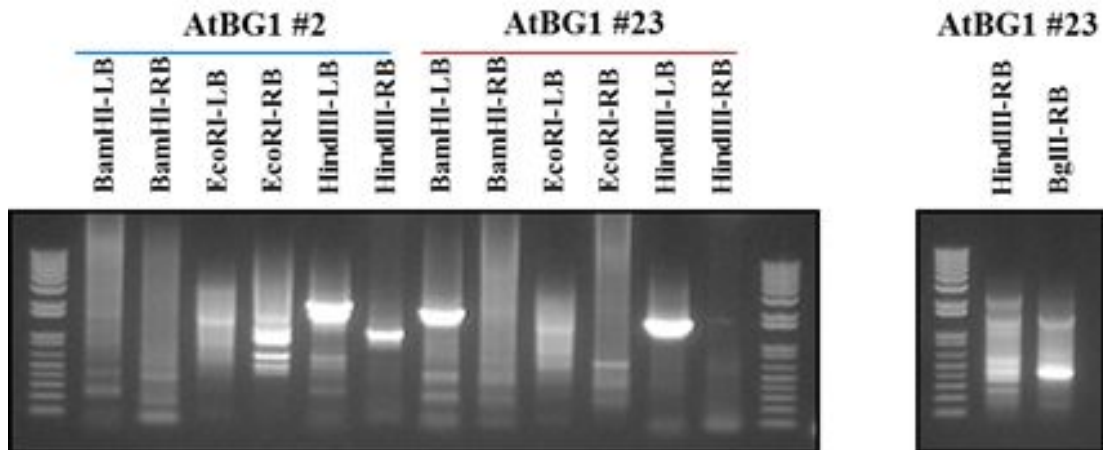
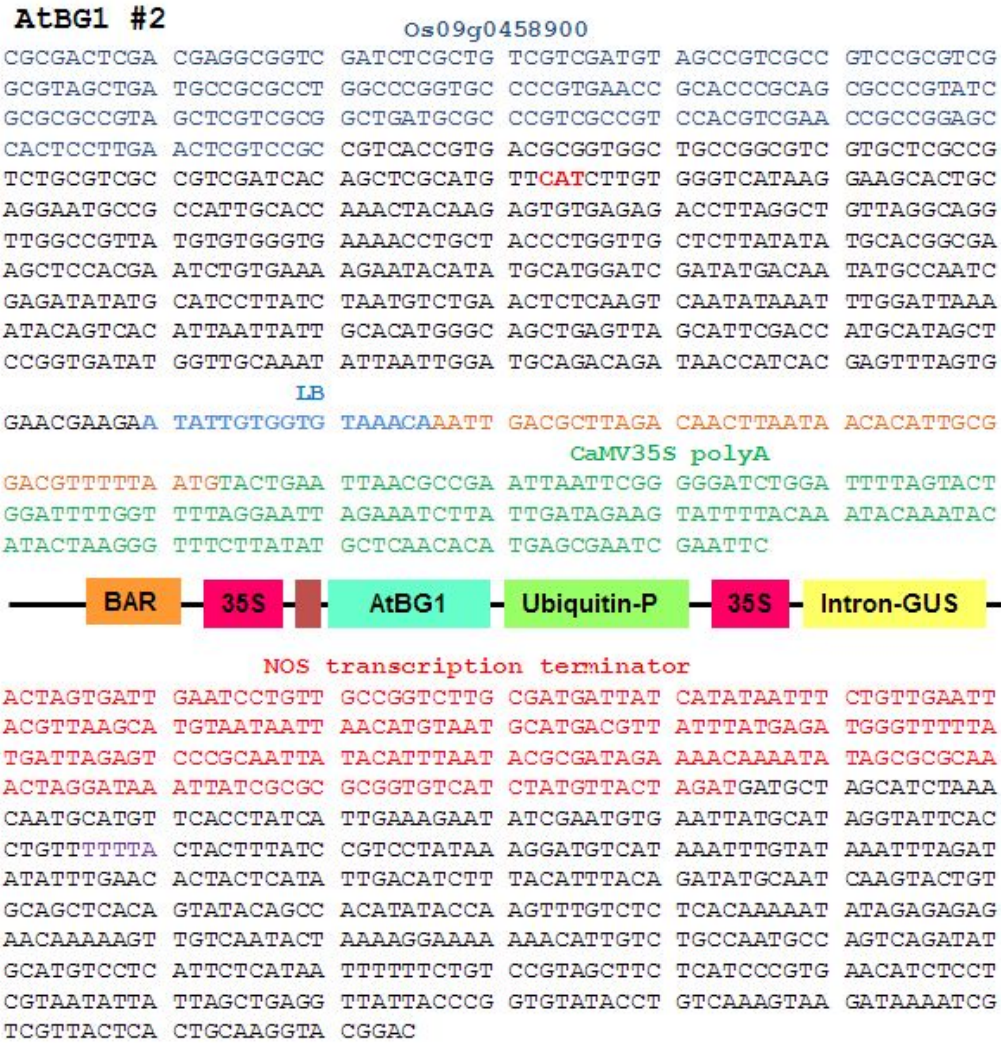


그림 72. Secondary PCR product 분석. Primary PCR에서 확보한 산물을 이용하여, secondary PCR을 진행하여 확보한 PCR 산물을 agarose gel 전기영동을 한 사진. 이렇게 확보한 PCR 산물을 pGEM T-Easy vector에 클로닝 한 뒤에 sequencing을 통해 T-DNA 주변의 염기 서열을 확보하였음

- 그리고 삽입된 T-DNA의 주변 염기서열의 분석한 결과, #2 이벤트 라인의 경우 벼 유전자 Os09g0458900와 유사한 유전자의 404 bp upstream region(ATG 기준)에 삽입된 것을 확인할 수 있었음 (그림 73)
- #23번 이벤트 라인의 경우, T-DNA가 유전자가 존재하지 않는 위치에 삽입되었음을 확인할 수 있었음 (그림 74)
- #2 이벤트 라인 내 T-DNA가 삽입된 벼의 유전자 Os09g0458900의 경우, 벼에 유사 유전자가 여러 개 존재하고 아직 그 기능이 알려져 있지 않았음. 그리고 AtBG1 #2 라인의 표현형질이 AtBG1 #23 라인과 큰 차이를 보이지 않는 것으로 볼 때, #2 라인의 경우에도 T-DNA insertion에 의한 잔디 유전자에 대한 영향은 거의 없는 것으로 여겨짐
- 결론적으로 본 과제 연구를 통하여 이벤트 라인 #2 및 #23을 설정하였고, 이들 이벤트 라인들에 대한 분자생물학적 분석을 완료하였음. 본 과제에서 선정한 두 이벤트 라인들에는 하나의 T-DNA가 도입되었고, 약간의 차이는 있지만 AtBG1의 발현이 모두 확인되었으며, T-DNA 삽입위치가 잔디의 다른 유전자에 큰 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였음. 그러므로 이들 이벤트 라인을 이용한 GM 잔디 품종 개발에 큰 문제가 없을 것으로 사료됨



Left Border

NM_001069914.2| *Oryza sativa* Japonica Group Os09g0458900 mRNA:

Identities=179/206 (87%)

[CU861796.1] *Oryza rufipogon* (W1943) cDNA clone: w1943sa009i10:

Identities=179/206 (87%),

[CT835898.1] *Oryza sativa* (indica cultivar-group)

cDNA:OSIGCSN029E20: Identities = 179/206 (87%),

Right Border

[EU730897.1] *Brachypodium distachyon* clone BACDB038O09, complete sequence:

Identities=46/60(77%)

그림 73. AtBG1 #2 이벤트 라인의 T-DNA 삽입 위치 및 주변 염기서열 분석 결과.

Secondary PCR을 통해 획득한 PCR 산물을 pGEM T-Easy 벡터에 클로닝 한 뒤, sequencing을 통해 주변 염기서열 정보를 얻었음. AtBG1 #2 라인의 경우 right border sequence가 *Agrobacterium*에 의한 형질 전환 과정에서 소실된 것으로 확인되었으며, 벼의 Os09g0458900 유전자와 유사성을 보이는 유전자의 404 bp upstream region (ATG 기준)에 삽입된 것을 확인할 수 있었음 (start codon으로 추정되는 염기 서열은 붉은색으로 표시함). 염기서열 분석은 NCBI에서 제공하는 BLAST (BLAST; Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 분석하였음

AtBG1 #23

```
TATTATCATT CGAGTGACGA CGTCCACACC AGAAAAGAAA ATTTTAGTTG CGACCATAGT
GCAAGTGATA AAATATTCAG TTGGTTGCAA CAGGAAACT TTCAAGTTGC ACGGTTGCAC
CCATTGCCAA CATCCAACAT GAAGGAGTTA ATTGAGATCT GAGTCAATTC TCAATCGTAT
TTCTTTTTAT GAAAGAAAAT AAGAAAAGGG AGATAACGAA GGACGCAATT ATTCATGGCA
AGCTGGTATG GGCAGGCCAG ATAGCCAATA GCTTTGCTG CCCGTCGTAT AGAATTTCTG
GTAAAGTATG AGCTGAATGG CCGAAGCTCT TGTCATGGAT GTGTATGCAT GCACGCCCTT
GTTTTTCCTT GACACATCTC CGGAAGACAG ATCCGTTCCA AAAACCCTGA TGTAGTAAGT
CCAAAAGATC AACTACATAC CTATATGTTT GACAAGGAAA ATTCGCGCAA AATTCACGCT
ACCCCTGGTG AAATGCTAAC TAGGAGTAGA GTAGAATAAT TCAATAAACT GATTGTAAAC
AGCTCAGCGC AGCAAATTG AACAAGACGC GAGGGGTAGC ACAAGCACAA TCCCTTGATC
TGCTTGACAG GACAGCCATT CCACAGCGAG TGACGAGATC GACAACCTAA TAACACATTG
CGGACGTTTT TAATGTACTG AATTAACGCC GAATTAATTC GGGGGATCTG GATTTTAGTA
CTGGATTTTG GTTTTAGGAA TTAGAAATTT TATTGATAGA AGTATTTTAC AAATACAAAT
ACATACTAAG GGTTCCTTAT ATGCTCAACA CATGAGCG
```

35S poly A tail



NOS terminator

```
AGGCAAACAA GCTAGCCACC ACCACCACCA CCACGTGTGA ATTACAGGTG ACCAGTTCGA
ATTTCCCGGA TCGTTCAAAC ATTTGGCAAT AAAGTTTCTT AAGATTGAAT CCTGTTGCCG
GTCTTGCGAT GATTATCATA TAATTTCTGT TGAATTACGT TAAGCATGTA ATAATTAACA
TGTAATGCAT GACGTTATTT ATGAGATGGG TTTTATGAT TAGAGTCCCG CAATTATACA
TTTAATACGC GATAGAAAAC AAAATATAGC GCGCAAAC TA GGATAAATTA TCGCGCGCGG
TGTCATCTAT GTTACTAGAT GATGCTAGCA TCTAAACAAT GCATGTTTAC CTATCATTGA
AAGAAATATCG AATGTGAATT ATGCATAGGT ATTCACCTGT TTTTACTAC TTTATCCGTC
CTATAAAGGA TGTCATAAAT TTGTATAAAC TTAGATATAT TTGAACACTA CTCATATTGA
CATCTTTACA TTTACAGATA TGCAATCAAG TACTGTGCAG CTCACAGTAT ACAGCCACAT
ATACCAAGTT TGCTCTCAC AAAAATATAG AGAGAGAACA AAAAGTTGTC AATACTAAAA
GGAAAAAAC ATTGTCTGCC AATGCCAGTC AGATATGCAT GTCCTCATT TCATAATTTT
TTCTGTCCGT AGCTTCTCAT CCCGTGAACA TCTCCTCGTA ATATTATTAG CTGAGGTGAT
```

Left Border

[AL929372.16] Mouse DNA sequence from RP23-461G6 on chr 2:

Identities = 37/45 (83%)

Right Border

[FN357321.1] *Schistosomamansoni* genome sequence super contig

Smp_scaff000030:Identities=39/48(82%)

그림 74. AtBG1 #23 이벤트 라인의 T-DNA 삽입 위치 및 주변 염기서열 분석 결과.

AtBG1 #23 라인의 경우 right border와 left border sequence 모두가 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 과정에서 소실된 것으로 확인되었으며, 유전자가 존재하지 않는 위치에 삽입되었음을 확인할 수 있었음

다. AtBG1 도입된 벤프그래스의 표현형질 조사

- 앞의 그림 6에서 보듯이, AtBG1이 도입된 벤프그래스 벤프그래스의 경우 키가 작고 옅은 초록색을 지니는 표현형을 확인할 수 있었음. 따라서 이러한 표현형질의 정량적 분석을 수행하였음
- 먼저 28일간 배양 후의 잎 길이 및 옆폭을 측정하여 식물체의 생장을 비교하였음. 이 실험을 위해서 비슷한 생육 시기의 식물체들을 새로운 토양의 화분으로 옮겨 심은 후 배양하면서 시간에 따른 잎 길이 및 옆폭을 측정하였음
- 그 결과 AtBG1이 도입된 형질전환 벤프그래스들은 야생형 벤프그래스에 비하여 잎 길이와

옆쪽이 함께 줄어들음을 확인할 수 있었음 (그림 75). 이는 AtBG1이 도입된 형질전환 벼트그래스들의 생장이 야생형 벼트그래스에 비하여 느리게 진행된다는 것을 제시함

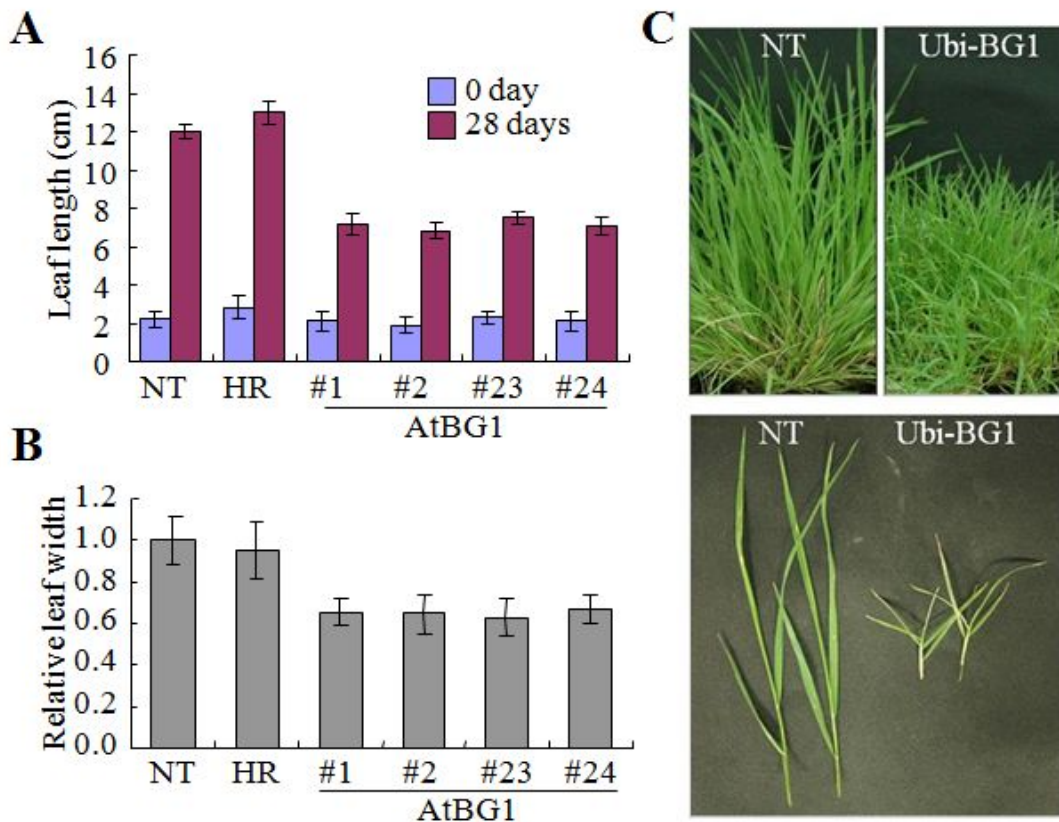


그림 75. AtBG1 도입 벼트그래스 형질전환체의 잎 길이 및 옆쪽 성장 비교. A, AtBG1 도입 벼트그래스들의 잎 길이 성장을 야생형 벼트그래스(NT) 또는 제초제 저항성 벼트그래스(HR)와 비교한 결과. 실험 시작일(0일)과 28일 후의 잎 길이를 측정. B, AtBG1 도입 벼트그래스들의 상대적 옆쪽을 비교한 결과. 야생형 벼트그래스(NT)의 옆쪽을 1로 하여 상대적 값을 계산. 각 error bar는 표준편차를 의미한다 (n = 15). C, 완전히 성숙한 야생형 벼트그래스와 AtBG1 형질전환 벼트그래스의 비교 사진. AtBG1 형질전환 벼트그래스는 잎 길이뿐 아니라 옆쪽도 같이 줄어들어 있기에 성장 속도가 더딘 것으로 추정

- 상기 결과가 AtBG1 형질전환 벼트그래스의 생육이 느려짐을 제시하고 있기에, 벼트그래스 식물체의 생육 속도를 비교하여 보았음 (그림 76). 이 실험은 같은 생육 시기의 식물체를 새로운 화분으로 옮긴 후, 먼저 시간에 따른 잎 길이 성장을 4일 간격으로 측정하고, 4일 동안의 길이 성장을 다시 계산하여 성장 속도를 비교하였음
- 야생형 벼트그래스나 AtBG1 도입 벼트그래스 모두 측정된 24일 동안 시간에 따른 잎 길이 성장을 보여 주었음. 하지만 AtBG1 도입 벼트그래스의 잎 길이 생장이 야생형 벼트그래스에 비하여 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었음 (그림 76A). 이를 바탕으로 잎 성장 속도를 측정해 본 결과, 야생형 벼트그래스와 AtBG1 도입 벼트그래스 모두 16일째에서 가장 높은 생육 속도를 보여 주었음 (그림 76B). 하지만 AtBG1 도입 벼트그래스의 생육 속도

가 야생형 벼트그래스에 비하여 역시 현저히 저하되어 있음을 확인할 수 있었음

- AtBG1의 식물체 내 기능이 비활성 ABA를 활성 ABA로 만드는 역할이고 ABA는 스트레스 저항성을 식물에게 부여할 뿐만 아니라 성장 저해 효과를 지니기에, 이들 결과는 도입된 AtBG1이 벼트그래스 식물체에서 활성 ABA 농도를 높여 식물체의 성장속도를 현저히 낮춤으로써 야생형 벼트그래스보다 키가 작은 표현형이 나타나는 것으로 여겨짐
- 골프장용 벼트그래스인 벼트그래스의 경우 높은 성장 속도에 의한 잦은 관수와 벼트그래스 각이로 병충해 발생이 높고 또한 유지관리비용이 많이 소요되기에, AtBG1 벼트그래스와 같은 생육 속도가 낮은 벼트그래스 품종은 고부가가치 품종으로 육성될 수 있을 것으로 사료됨

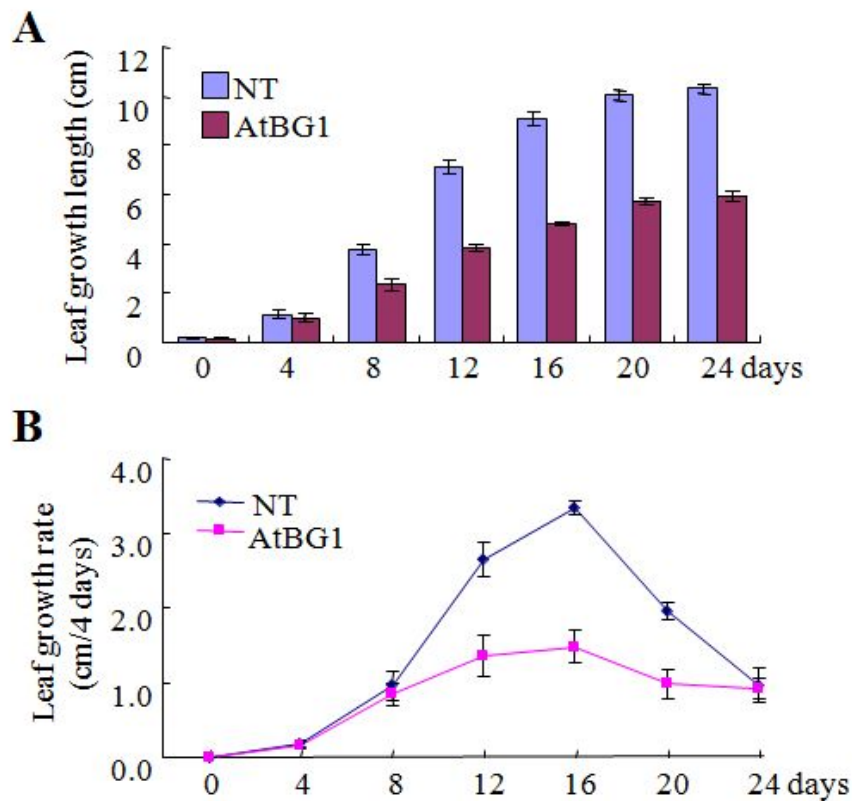


그림 76. AtBG1 도입 GM 벼트그래스의 잎 길이 성장 (A) 및 생육 속도 (B) 비교 결과. 4일 간격으로 24일 동안 잎 길이를 측정하였다. 각 error bar는 표준편차를 의미함 (n = 5)

- AtBG1 도입 벼트그래스의 또다른 표현형으로 색깔이 야생형에 비하여 연한 초록색으로 관찰되었음. 이에 이러한 연초록색이 엽록소 함량과 관계있는지를 알아보기 위하여 엽록소 함량을 측정하였음 (그림 77). 그 결과, AtBG1 도입 벼트그래스의 엽록소 함량이 야생형 벼트그래스에 비하여 현저히 줄어들어 있음(약 50%)을 확인할 수 있었음. 따라서 AtBG1 도입 벼트그래스의 연한 초록 표현형은 엽록소 감소에 기인하는 것으로 확인됨

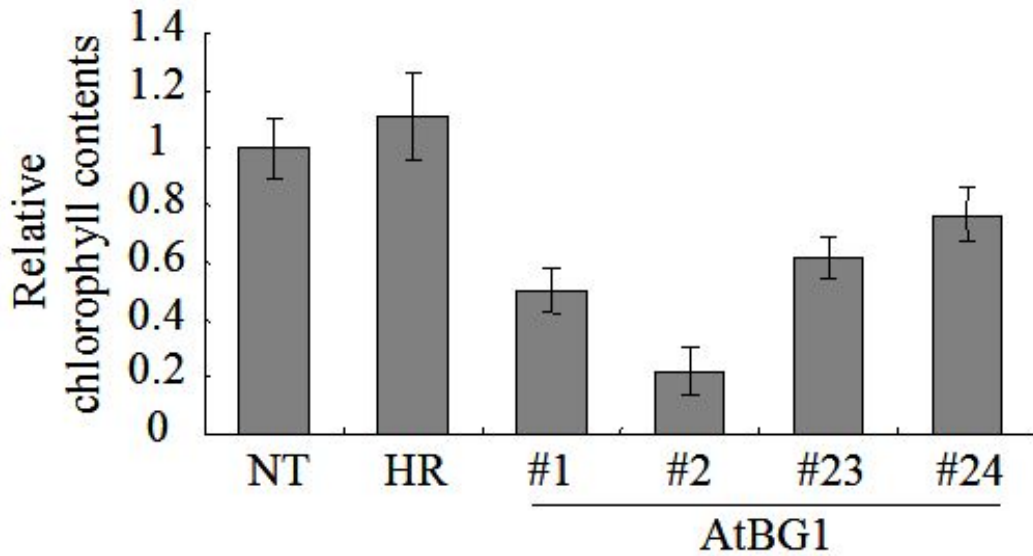


그림 77. AtBG1 도입 GM 벤틀그래스의 엽록소 함량 측정 결과. 야생형 벤틀그래스의 엽록소 함량을 1.0로 하여 상대적 값을 계산하였다. Error bar는 표준편차를 의미한다 (n = 15)

- 마지막으로 AtBG1이 식물체에 도입되면 활성 ABA가 많아지고 ABA는 스트레스 저항성을 일으키는 호르몬으로 알려졌기에, AtBG1 도입 벤틀그래스의 가뭄 저항성을 조사하였음 (그림 78)
- 가뭄 저항성 조사는 단수 후 시간에 따라 잎을 채취하여 잎 무게를 건조 전후로 측정하여 수분 함량을 측정함으로써 이루어졌음. 조사 결과, 가뭄 처리에 따른 AtBG1 도입 벤틀그래스의 수분 함량 감소가 야생형 벤틀그래스에 비해 크게 감소하였음을 확인할 수 있었음. 이는 AtBG1 도입 벤틀그래스가 야생형 벤틀그래스에 비해 가뭄저항성이 우수함을 제시함

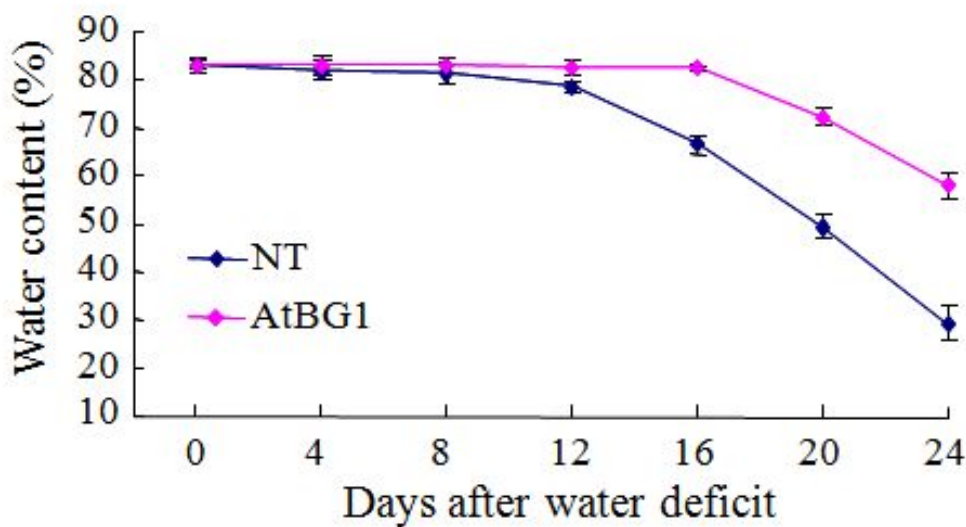


그림 78. AtBG1 도입 GM 벤틀그래스의 가뭄 처리에 따른 수분 함량 감소 측정 결과. 단수 후, 4일 마다 수분 함량을 측정. Error bar는 표준편차를 의미 (n = 5)

- 분자생물학적 연구를 통하여 선정된 #2 및 #23 이벤트 라인들을 이용하여 생장 속도와 내건성 및 내염성 표현형들의 정량적 분석을 수행하였음
- 먼저 28 일간 배양한 식물체의 생장 분석을 통하여 지난 연구에서 AtBG1이 도입된 형질 전환 잔디들의 생장이 야생형 잔디에 비하여 느리게 진행된다는 것을 알 수 있었음. 이에 #2 및 #23 이벤트 라인들의 생육 속도를 먼저 비교하여 보았음 (그림 79)
- 이 실험은 같은 생육 시기의 식물체를 새로운 화분으로 옮긴 후, 먼저 시간에 따른 잎 길이 생장을 4일 간격으로 측정하고, 4일 동안의 길이 생장을 다시 계산하여 생장 속도를 비교하는 방식으로 분석되었음
- 야생형 잔디나 AtBG1 도입 잔디들 모두 측정된 28일 동안 시간에 따라 생장에 따른 잎 길이 증가를 보여 주었으나 AtBG1 도입 #2 및 #23 이벤트 라인들의 잎 길이 생장이 야생형 잔디에 비하여 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었음 (그림 79A)
- 이를 바탕으로 잎 생장 속도를 측정해 본 결과, 야생형 잔디와 #2 및 #23 이벤트 라인들 모두 20일째에서 가장 높은 생육 속도를 보여 주었으나 두 이벤트 라인들의 생육 속도가 야생형 잔디에 비하여 역시 현저히 저하되어 있음을 확인할 수 있었음 (그림 79B)
- AtBG1의 식물체 내 기능이 비활성 ABA를 활성 ABA로 만드는 역할이고 ABA는 스트레스 저항성을 식물에게 부여할 뿐만 아니라 생장 저해 효과를 지니기에, 이들 결과는 도입된 AtBG1이 벤투그라스 식물체에서 활성 ABA 농도를 높여 식물체의 생장속도를 현저히 낮춤으로써 야생형 잔디보다 키가 작은 표현형이 나타나는 것으로 추정됨
- 골프장용 잔디인 벤투그라스의 경우 높은 생장 속도에 의한 잦은 관수와 잔디 깎기로 병충해 발생이 높고 또한 유지관리비용이 많이 소요되기에, AtBG1 잔디와 같은 생육 속도가 낮은 잔디 품종은 고부가가치 품종이라 할 수 있음
- 식물체 내 활성 ABA 증가는 스트레스 저항성을 높여주는 것은 이미 잘 알려져 있음. 또한 AtBG1이 도입된 애기장대에서는 내건성 및 내염성이 증대됨이 보고되었음 (Lee et al., 2006, Cell, 126, 1109-1120). 이에 AtBG1 도입 GM 잔디 라인들의 내건성 및 내염성을 조사하였음
- 먼저 #2 및 #23 이벤트 라인들의 가뭄 저항성을 조사하였음 (그림 80). 가뭄 저항성 조사는 28일간 단수시키면서 시간에 따라 잎을 채취하여 잎 무게를 건조 전후로 측정하여 수분 함량을 측정하였음. 또한 단수 28일 후 recovery를 시켜 식물체의 생존 유무도 확인하였음
- 그 결과를 살펴보면, 먼저 28일간의 가뭄 처리 시 야생형 잔디(NT)나 pIG2 벡터만 도입된 잔디(HR)은 모두 회복되지 못하고 죽는 데 반해, #2 및 #23 이벤트 라인들은 28일간의 가뭄을 견디고 회복됨을 알 수 있었음 (그림 80A). 그리고 수분 함량 측정 결과, 가뭄 처리에 따른 이벤트 라인들의 수분 함량 감소가 야생형 잔디에 비해 크게 감소하였음을 확인할 수 있었음 (그림 80B). 이는 AtBG1 도입 잔디가 야생형 잔디에 비하여 가뭄 저항성이 매우 우수함을 증명한 것임
- 내염성 조사는 장일 (16h light/8h dark) 조건에서 4주간 600 mM NaCl로 관수하여 키우면서, 염 처리 전의 식물체 엽록소 함량을 1로 하여 염 처리 후의 상대적 엽록소 함량을 측정하는 방식으로 조사되었음
- 그 결과, AtBG1 도입 잔디는 가뭄에 대한 저항성을 보이는데 비해, 염해에는 저항성을 보이지 않는 것을 확인하였음 (그림 81). 이 결과는 애기장대 결과와는 약간 차이가 있는데, 아마도 식물체마다 염해에 대한 반응성이 차이 나는 것에 기인하는 것으로 여겨짐

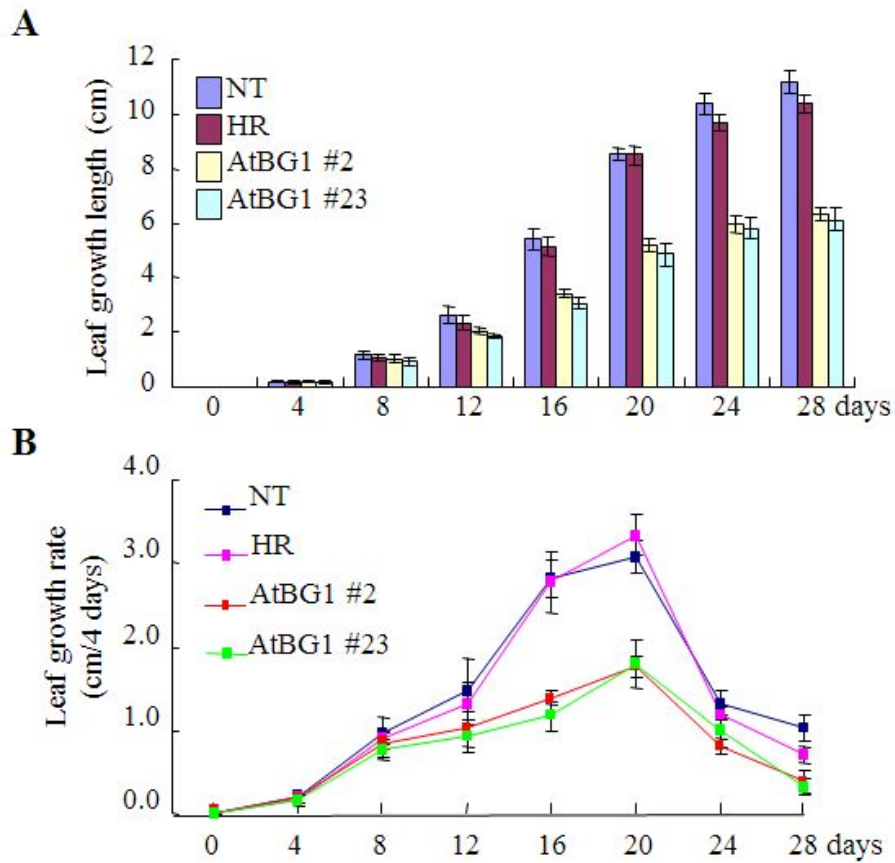


그림 79. AtBG1 도입 GM 잔디의 잎 길이 성장 (A) 및 생육 속도 (B) 비교. 4일 간격으로 28일 동안 잎 길이를 측정하였음. 각 error bar는 표준편차를 의미 ($n=5$). NT, non-transgenic plant (control); HR, transgenic bentgrass with pIG2 vector (i.e., herbicide-resistant bentgrass); AtBG1, transgenic bentgrass with pIG2-AtBG1.

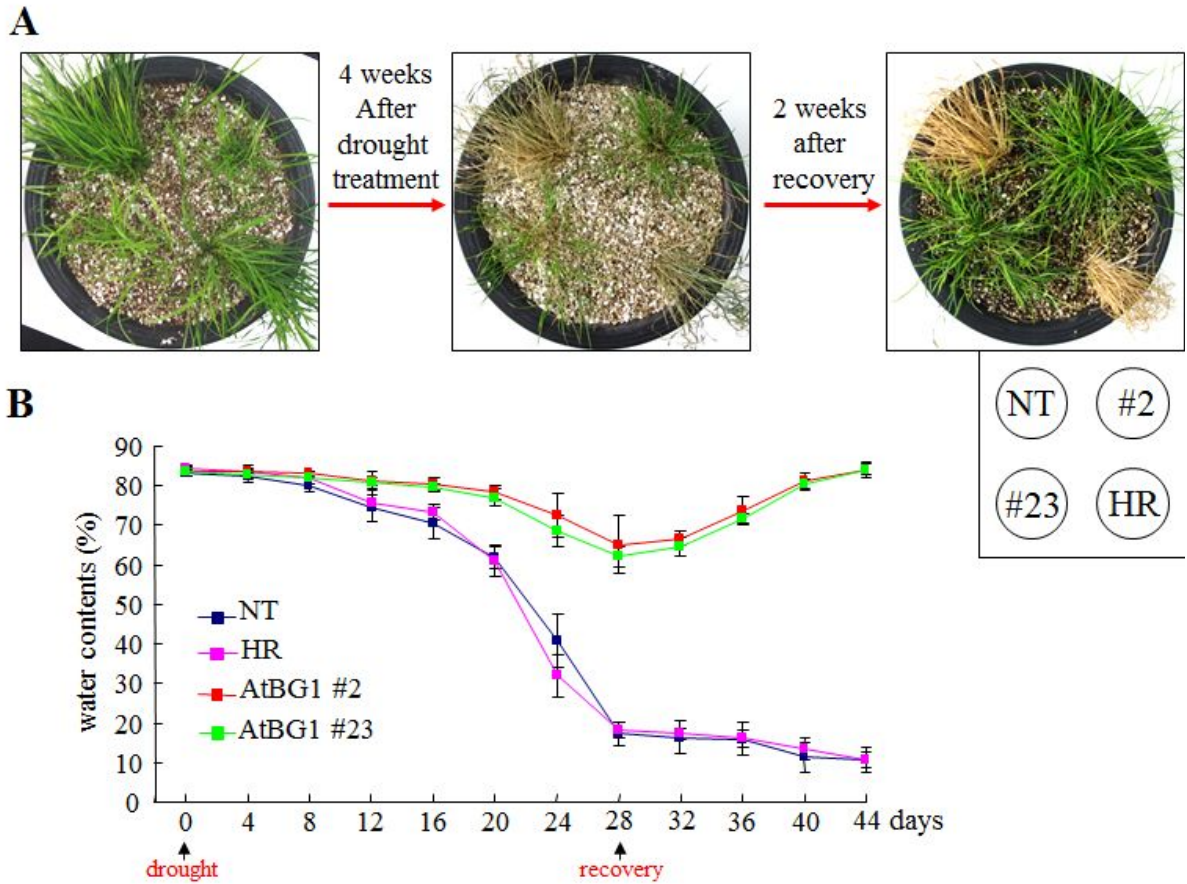


그림 80. AtBG1 도입 GM 잔디의 내건성 조사 결과. (A) 단수 4주 후와 재 관수 후 2주째의 잔디 식물체 사진. (B) 잎 수분 함량 측정을 이용한 내건성 조사 결과. 장일 조건에서 4주간 관수를 하지 않고 키우면서 시간 경과에 따른 식물체들의 water contents 측정하였음 ($n=5$). 또한 이후 2주간 재 관수를 하면서 recovery 양상도 같은 방식으로 조사하였음

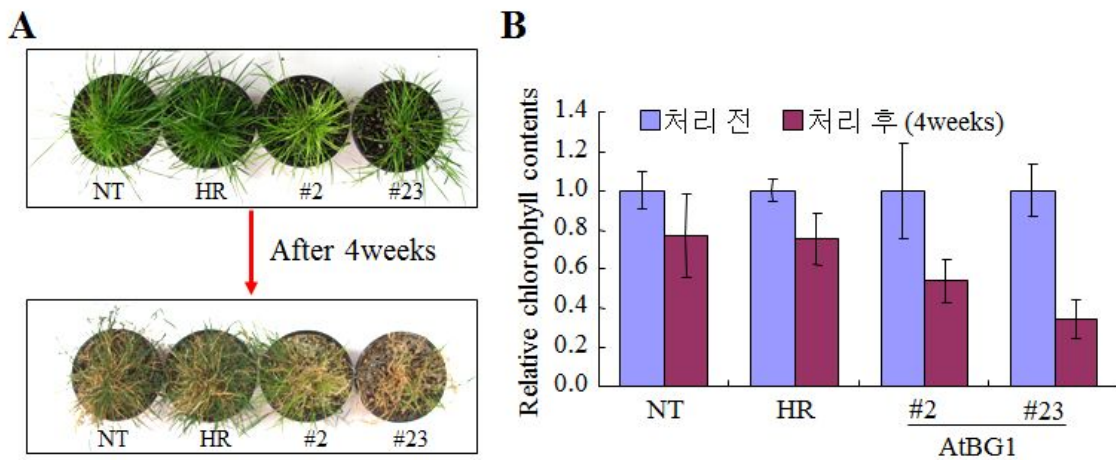


그림 81. AtBG1 도입 GM 잔디의 내염성 조사 결과. (A) 염 처리 전후의 식물체 사진. (B) 염 처리 전후의 엽록소 함량 측정 결과. 4주 동안 600 mM NaCl로 관수하여 키우면서 처리 전후의 엽록소 함량을 측정하였음

- 결론적으로 AtBG1 도입 GM 잔디의 표현형질 조사 결과를 요약하면, 이 GM 잔디는 활성 ABA 함량이 높아져 성장 속도가 떨어져 왜소성 표현형과 엽록소 함량 감소에 따른 연초록색을 보이며, 또한 ABA 증가에 의하여 가뭄 저항성도 크게 증대된 것을 확인할 수 있었음. 다만 내염성은 야생형 잔디에 비해 큰 차이가 없는 것으로 확인되었음

라. GM유체의 환경방출실험

- GM 벤투그래스의 환경방출실험으로 WT과 GM 벤투그래스의 거리가 Type I은 0.5m, Type II는 1.0m, Type III는 3, 6, 9m로 설정하여 LMO 포장에 정식한 후 실험을 수행하였음 (그림 82)
- 그러나 대조구와 GM 벤투그래스의 생육과정에서 GM 벤투그래스는 추대가 되지 않았기 때문에 교배율 조사를 수행하지 못했음 (그림 83). 이는 GM 잔디의 생육특성상 생장이 느리기 때문에 추대가 지연된 것으로 판단되며 교잡율을 조사하기 위해서 추가실험을 수행해야 함



그림 82. 거리에 따른 GM 벤투그래스의 교배율을 조사하기 위한 포장 전경. 좌측; Type I(0.5m), 중간; Type II(1.0m), 우측; Type III(3,6,9m). A; 2010. 06. 08 모습, B; 2010.06.12 모습, C; 2010.07.12 모습

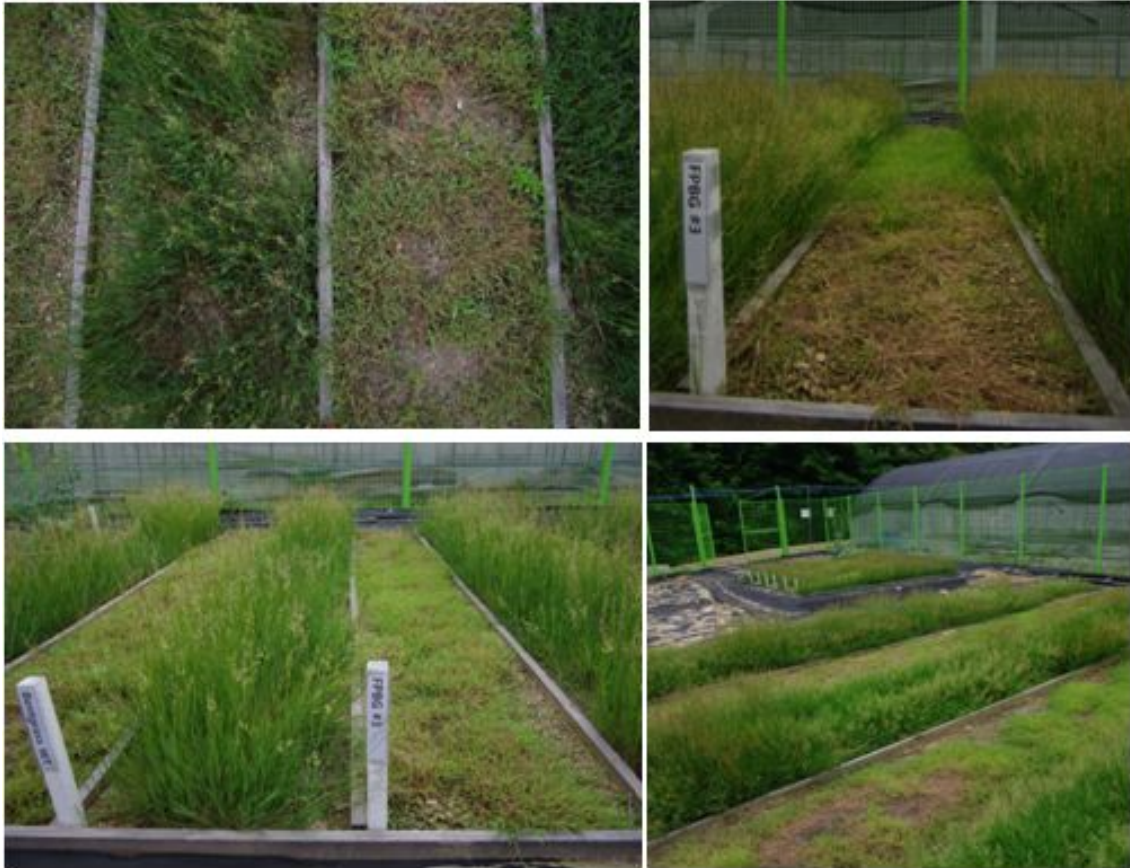


그림 83. Type I와 II의 2010.06.12(좌측), 2010.07.12(우측) 모습. 노지 포장 (Type I, II)에서 대조구(WT)와 GM 벼트그래스의 생육과정에서 GM 벼트그래스는 추대가 되지 않았음

3. 유채 EVENT (Event #; FnPBnTg2802)의 독성 및 알러지 검정

가. 승인 제외대상 약제내성 유전자

- LMO법 통합고시안 제3-1조 3항에 따라 본 형질전환에 사용한 벡터에 포함된 Kanamycin 유전자 및 *Agrobacterium* 숙주 벡터는 승인 제외대상 유전자에 해당
- 따라서 이들 유전자를 제외한 나머지 벡터 구성요소에 대한 allergen DB 검색을 실시하였음

나. Allergen DB 검색

- 유채 EVENT (Event #; FnPBnTg2802)의 독성 및 allergy 검정을 위해 형질전환에 사용된 벡터 유전자 origin을 3개의 allergen database를 검색하였음
- Allergen DB 검색 결과, 유채 EVENT에 사용된 유전자 (Phosphinothricin, PPT; AtBG1)는 인체 독성 또는 allergy를 유발하는 인자가 포함되지 않은 것으로 확인되었음 (그림 84)

4. 안전관리 및 과제간 협동

가. 안전관리 및 과제간 협동

○ LMO 포장은 안전관리 지침에 따라 시설을 설치한 후 유지관리 되었음 (그림 85, 86, 87)



그림 85. 포장관리. LMO 포장시설 승인을 받은 후 안전관리 지침에 따라 관리되고 있음

유전자 변형 생물체 연구포장 출입 대장

일시	시간	성명	업무 내용	비고
10.05.20	AM 10:20	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.05.25	AM 9:20	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.01	AM 10:25	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
11.06.05	AM 10:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.09	PM 16:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.09	PM 16:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.09	PM 16:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.16	AM 11:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.22	AM 17:50	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.28	AM 11:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.29	AM 10:10	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.07.02	AM 11:20	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.05	AM 9:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.06.06	AM 10:10	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.07.12	AM 10:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.07.13	PM 2:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.08.02	PM 1:40	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.08.02	PM 2:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.09.02	PM 1:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.10.05	PM 3:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
06	AM 10:30	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
11	PM 2:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
19	PM 4:00	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
23	PM 1:30	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
26	PM 4:15	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
29	PM 2:15	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.11.06	PM 1:50	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.11.15	AM 10:30	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.11.16	AM 10:30	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.11.20	AM 10:30	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	
10.12.08	PM 11:30	김민희 1명	유전자 변형 생물 운송차량 - 운송차량관리	

그림 86. LMO 포장의 작업 관리 및 출입대장 (중평 LMO 포장 출입대장)



그림 85. 수원 LMO 포장에서 Event 2802 폐기물 이동이나 GM 벤트그래스의 이동시 운반 차량 표지가 설치된 차량을 이용하여 운반

- 화분 비산거리 측정 및 토양 미생물 검정을 위하여 노지 재배 포장 (유채 및 GM 벼트그래스)에서 화분 포집기 설치 및 시료를 채취하는 등 과제간 연계가 원활함 (그림 86)



그림 87. 화분 포집기 설치 및 토양 미생물에 미치는 영향과 교배율을 조사하기 위한 시료채취 (제 2협동과제, 생명공학연구원) 2010. 04. 29; 2010. 05. 12; 2010. 06. 25 시료채취 작업

나. 기타 안전관리

- 본 과제 수행의 모든 과정은 LMO법 (유전자변형 생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률, 2008. 1)과 (주)에프엔피의 LMO 관리 매뉴얼에 따라 수행되었음

1) 개화기 및 종자 수확 후 관리

- ① 수정에 필요한 꽃 이외의 꽃 따주기
- ② 꽃가루 비상예방을 위한 봉지 씌우기
- ③ 꽃가루 이동 교잡 확인

2) 방출 실험 종료 시 시험장 처리

- ① 1 단계 : 비선택성 제초제 살포 (그라목손, 근사미)
- ② 2 단계 : 수확 후 개체 비닐포장에 넣어 분리배출
- ③ 3 단계: 폐기물 처리업체에 위탁 회수 및 소각

제 2절 GM 작물의 고감도 분석법 표준화 및 검정방법 개발

1. 이론적, 실험적 연구방법

- 가. Bioinformatic tool을 이용한 GM 유채 및 벤투그래스의 형질전환에 사용된 vector의 구성에 관한 염기서열 분석
- 나. 기능성유전자의 *in-silico* 분석을 통한 primer 제작 및 이를 이용한 최적 PCR 조건 확립
- 다. GM 유채 및 벤투그래스의 고감도 분석법 확립 및 GM 작물 검증을 위한 분석법 개발

2. 연구내용 및 연구결과

가. GM 유채 및 벤투그래스의 multiplex PCR 검출법 개발

- 유채와 벤투그래스의 형질전환에 사용된 벡터를 구성하는 염기서열을 분석하여 각각의 기능유전자 및 항생제 선별 유전자 특이 프라이머 (primer) 제작하여 형질전환체를 검출하였음
- 각각의 vector-specific primer의 특성에 따라 PCR 조건을 확인하여 PCR을 수행하여 형질전환체 시료를 검증 (그림 1, 2, 3)
- 도입된 형질전환체의 검출효율을 높이기 위한 방법의 하나로 도입유전자 또는 항생제 저항성유전자의 발현을 조절하는 promoter와 유전자 specific primer를 제작하였음

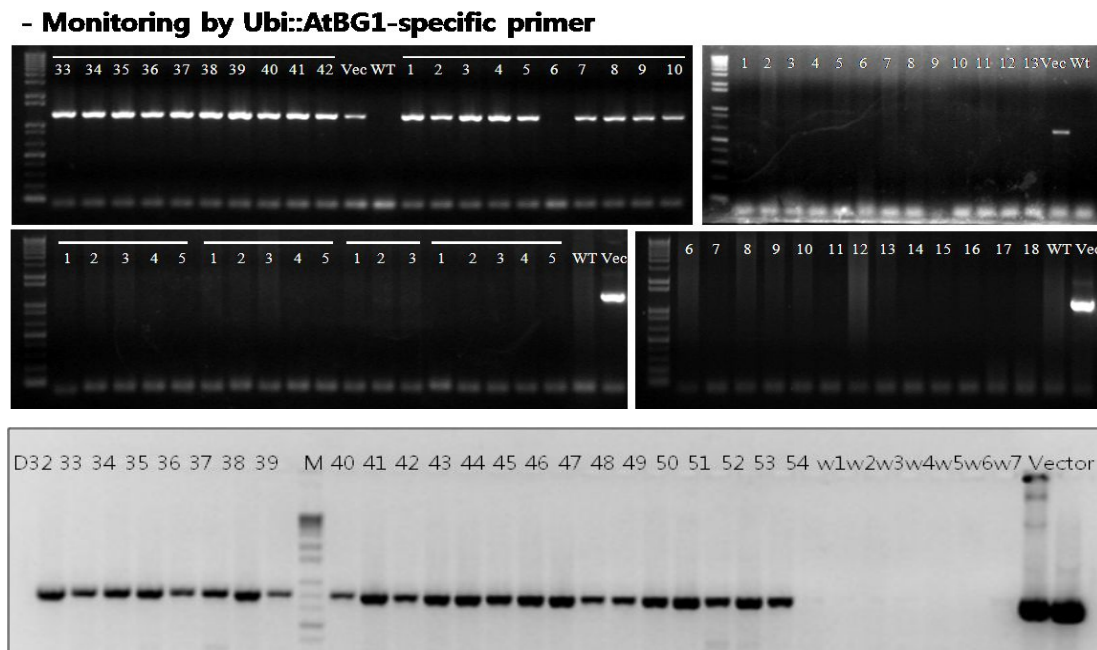


그림 1. 형질전환체 검출에 사용한 vector-specific primer (Ubi::AtBG1)의 예

- Monitoring by 35S::GUS-specific primer

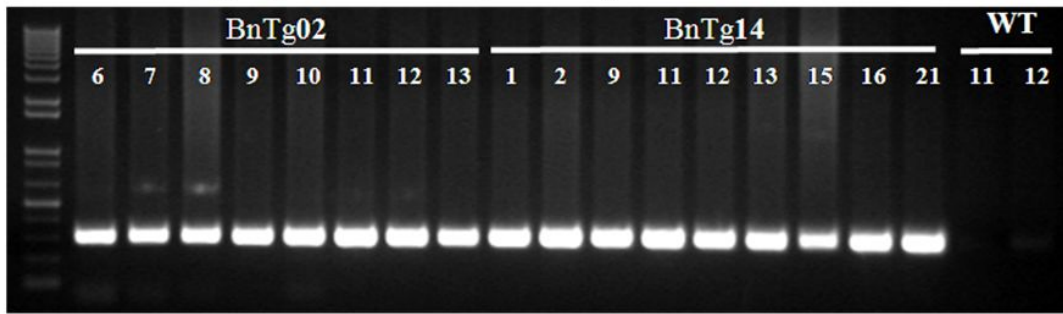


그림 2. 형질전환체 검출에 사용한 vector-specific primer (35S::GUS)의 예

- 몇몇 vector-specific primer를 사용할 경우 무작위로 채취한 unknown 시료를 이용한 검출에서 그림 1과 같이 검출에 사용한 프라이머가 vector와 일치할 경우에만 검출 가능
- 따라서 이러한 primer의 조합은 사용된 벡터를 이미 알고 있는 형질전환체의 검출에는 유용하나 unknown 시료의 경우 검출방법의 보완이 필요
- 도입된 유전자에 대한 정보가 없는 경우, 형질전환체 개발에 일반적으로 사용하는 벡터구성 요소를 이용한 multiplex 방법이 유용

- Monitoring by 35S::PPT-specific primer

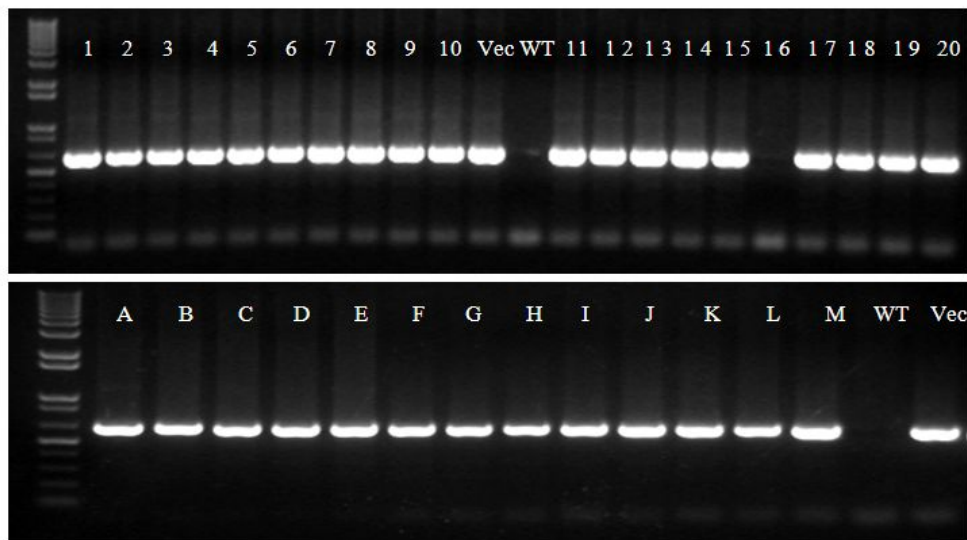


그림 3. 형질전환체 검출에 사용한 vector-specific primer (35S::PPT)의 예. GM 유채 개발에 사용한 벡터 특이 염기서열을 이용한 형질전환체의 monitoring 결과로 제 1세부과제에서 수행중인 환경방출실험 포장에서 무작위로 채취한 시료를 이용하여 본 과제에서 개발한 PCR 검출법으로 screening. 형질전환체 (BnTg02, 14)와 대조구 (WT)

- 형질전환체 검출을 위한 multiplex PCR primer 제작을 위해 NCBI DB 검색을 통한 형질전환용 벡터에 일반적으로 많이 사용하는 각각의 구성요소에 대한 염기서열 확보 (그림 4)
- Blast search를 통하여 염기서열 유사성이 95%이상의 염기서열을 가진 promoter와 선발마커를 확인하였으며 이를 이용한 primer를 제작하였음 (표 1)

- 벡터의 일반적인 구성 및 염기서열 (그림 5)은 NCBI에서 일반적으로 형질전환에 사용하는 벡터중 CaMV35S, Ubiquitin, Actin, RD29A 등의 promoter와 PPT, Hygromycin, Kanamycin 등 항생제 저항성 유전자에 대한 염기서열 분석
- 각각의 염기서열의 상동성을 분석하여 기능유전자내의 unique한 서열을 이용하여 primer 제작하고자 CLC Sequence Viewer Ver 6.0 프로그램을 이용하여 형질전환벡터에 가장 많이 사용하는 promoter (35S promoter, Ubiquitin, Actin, RD29A)와 항생제 내성 유전자 (PPT, Hygromycin)등 선별 마커를 분석하였음 (그림 6, 7)
- CLC Sequence Viewer Ver 6.5.1. 프로그램을 이용하여 벡터 내 염기서열을 DB와 비교 분석 후 유사성이 높은 염기서열을 확인하여 specific primer 제작용 template로 사용하였음 (그림 8)

Hit	Description	E-value	Score	Bit score	Hit length	%Identity	Positive	Gaps
EU315007	Transformation vector pC23C, complete sequence	1.52E-145	265.00	525.82	327.00	95.00	313	0
EU327977	Binary vector pCCRE, complete sequence	1.52E-145	265.00	525.82	327.00	95.00	313	0
EU327496	Transformation vector pC23LG, complete sequence	1.52E-145	265.00	525.82	327.00	95.00	313	0
EU327495	Transformation vector pC23LB, complete sequence	1.52E-145	265.00	525.82	327.00	95.00	313	0
EF546437	Binary vector pGFPGUSplus, complete sequence	1.52E-145	265.00	525.82	327.00	95.00	313	0
DQ469641	Transformation vector pYW310, complete sequence	0.00	853.00	1,691.44	853.00	100.00	853	0
DQ469640	Transformation vector pYW301, complete sequence	0.00	853.00	1,691.44	853.00	100.00	853	0
DQ469639	Transformation vector pYW300, complete sequence	0.00	853.00	1,691.44	853.00	100.00	853	0
DQ077692	Cloning vector pUC19-35S-FLAG-RBS, partial sequence	0.00	849.00	1,683.51	849.00	100.00	849	0
AB608312	Gateway binary vector pGWB761 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608311	Gateway binary vector pGWB760 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608309	Gateway binary vector pGWB755 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608308	Gateway binary vector pGWB754 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608306	Gateway binary vector pGWB752 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608305	Gateway binary vector pGWB751 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608303	Gateway binary vector pGWB745 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608302	Gateway binary vector pGWB744 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608300	Gateway binary vector pGWB742 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608299	Gateway binary vector pGWB741 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608295	Gateway binary vector pGWB729 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608293	Gateway binary vector pGWB727 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608292	Gateway binary vector pGWB726 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608290	Gateway binary vector pGWB724 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608289	Gateway binary vector pGWB723 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608287	Gateway binary vector pGWB721 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608286	Gateway binary vector pGWB720 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608284	Gateway binary vector pGWB718 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608283	Gateway binary vector pGWB717 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608281	Gateway binary vector pGWB715 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608280	Gateway binary vector pGWB714 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608278	Gateway binary vector pGWB712 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608277	Gateway binary vector pGWB711 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608275	Gateway binary vector pGWB709 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608274	Gateway binary vector pGWB708 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608272	Gateway binary vector pGWB706 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608271	Gateway binary vector pGWB705 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB608268	Gateway binary vector pGWB702 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
HM047294	Binary vector pBI121-ELEMENTS, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
GU370780	Cloning vector pTDuExAn6, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB543178	Gateway binary vector pGWB561 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB543177	Gateway binary vector pGWB560 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB543175	Gateway binary vector pGWB461 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0
AB543174	Gateway binary vector pGWB460 DNA, complete sequence	0.00	847.00	1,679.55	847.00	100.00	847	0

그림 4. 형질전환용 벡터에 사용하는 promoter 및 항생제 저항성 유전자 blast search 결과 (예) 35S promoter

표 1. Promoter 및 선별저항성 유전자 blast search 결과

Name	Size (bp)	Search 완료 (개)	BLAST 결과 (Nucleotide)
35S promoter (1)	835	435	95%이상
35S promoter (2)	439	435	95%이상
Ubiquitin	918	6796	95%이상
Actin	1406	4440	95%이상
RD29A	949	6	95%이상
BAR	552	68	99% 이상
Hygromycin	1038	360	99% 이상

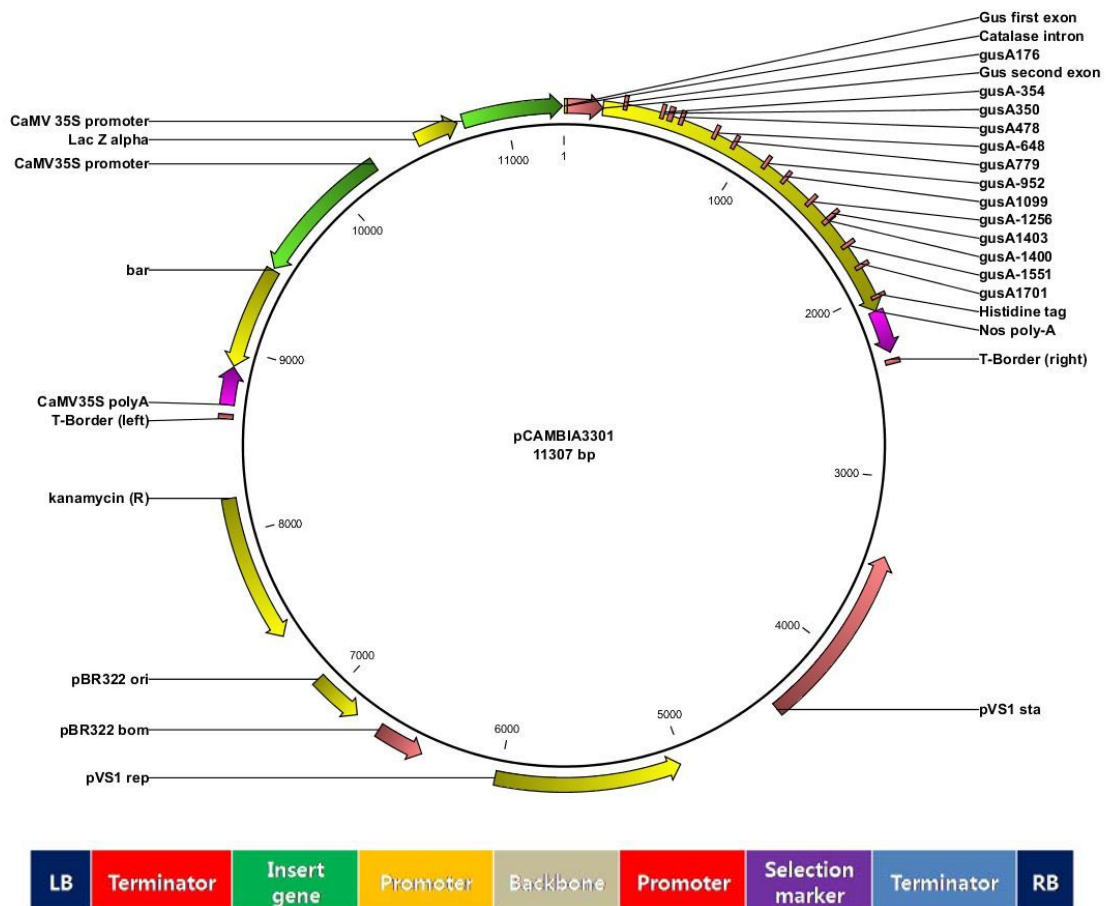


그림 5. 형질전환에 사용하는 벡터의 일반적인 구성요소. 목표유전자와 항생제 선별 유전자가 각각의 promoter와 terminator에 의해 발현이 조절됨

- GM 작물 개발에 사용되는 벡터의 일반적인 구성요소인 Phosphinotricin (PPT), Kanamycin (Km), 1-glucuronidase (GUS) 및 *Arabidopsis thaliana* β -glucosidase 1 (AtBG1)에 특이적인 프라이머를 Primer 3 프로그램을 이용하여 제작 (그림 9)

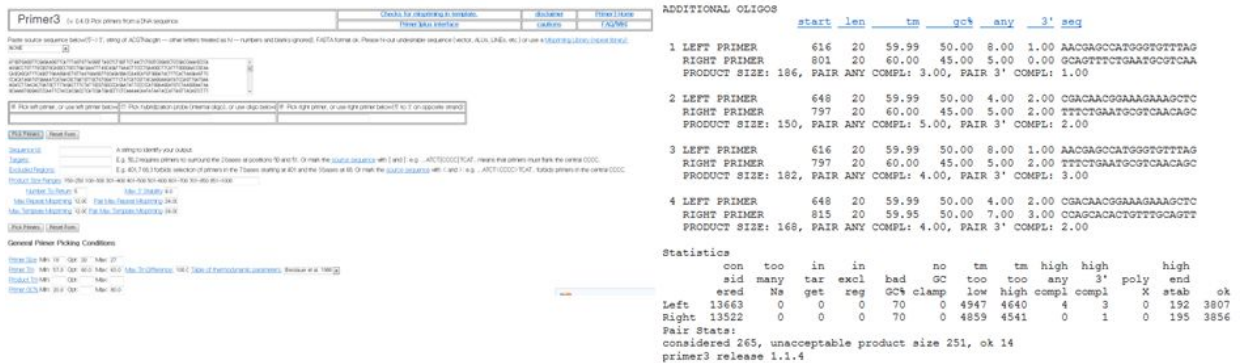


그림 9. Primer 3 프로그램을 이용한 프라이머 제작

- 제작된 프라이머에 대하여 다양한 조합을 작성하여 형질전환체 및 wild type 식물의 gDNA를 template로 사용하여 다형성을 확인하였음
- 우선 본 과제에서 형질전환을 위해 사용한 AtBG1 유전자에 대한 특이적인 프라이머 조합 선별을 위하여 다양한 조합을 확인한 결과 1개의 조합을 선별하였음 (그림 10)
- 식물형질전환 벡터의 일반적인 구성요소인 GUS, PPT, 35S promoter를 detection 가능한 프라이머 조합을 선별하기 위하여 여러 조합에 대한 테스트를 수행한 결과 1개의 조합을 선별하였음 (그림 11, 12, 13)
- Multiplex PCR의 프라이머 조합에 들어갈 Actin 특이 증폭 프라이머의 선별을 위하여 틀을 위해 논문 및 NCBI 탐색을 통하여 제작된 actin 프라이머 조합을 이용하여 GM 및 WT 식물체 테스트 후 Actin 프라이머 조합을 선별하였음 (그림 14)



그림 10. AtBG1 특이 프라이머 조합에 대한 GM, WT 개체의 스크리닝을 통해 다형성 확인된 프라이머 조합 선별. M; 1kb ladder, 1; GM유체, 2; WT유체, 3; GM잔디, 4; WT잔디, 5; SLT, 6; GM유체xSLT, 7; pFnP01 vector (잔디), 8; pFnP01 vector (유체)

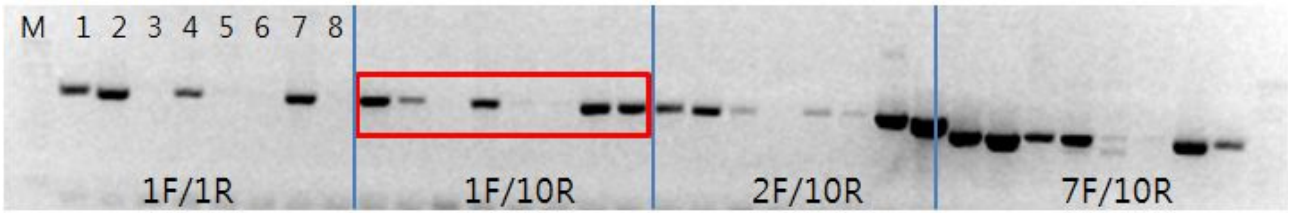


그림 11. GUS 특이 프라이머 세트에 대한 GM, WT개체의 스크리닝을 통해 다형성 확인되는 프라이머 선발. M; 1kb ladder, 1; GM유채, 2; GM유채, 3; WT유채, 4; GM잔디, 5; WT잔디, 6; SLT, 7; GMxSLT, 8; GMxSLT

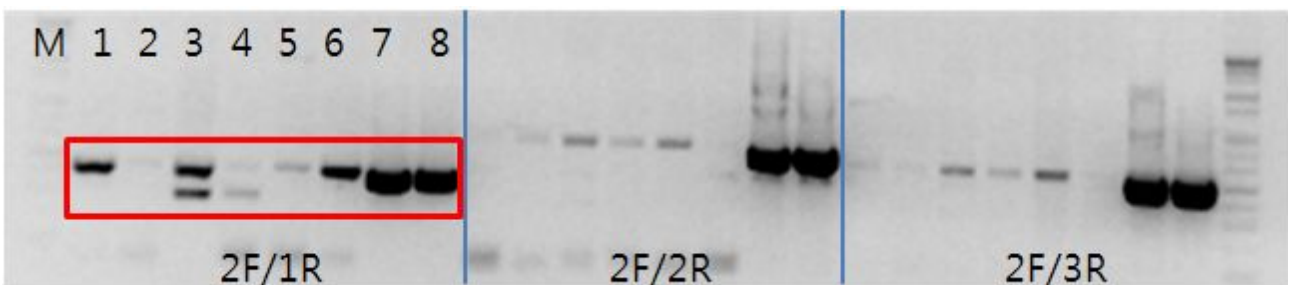


그림 12. PPT 특이 프라이머 세트에 대한 GM, WT개체의 스크리닝을 통해 다형성 확인되는 프라이머 선발. M; 1kb ladder, 1; GM유채, 2; WT유채, 3; GM잔디, 4; WT잔디, 5; SLT, 6; GM유채xSLT, 7; pFnP01 vector (잔디), 8; pFnP01 vector (유채)

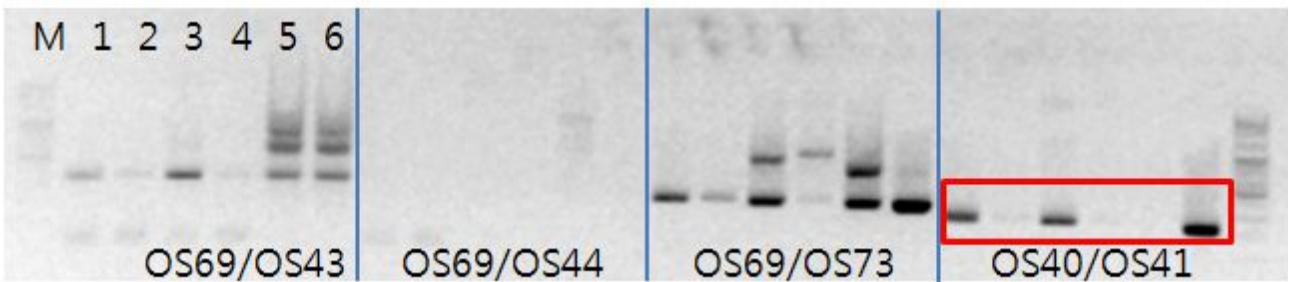


그림 13. 35s promoter 특이 프라이머 세트에 대한 GM, WT개체의 스크리닝을 통해 다형성 확인되는 프라이머 선발. M; 1kb ladder, 1; GM유채, 2; WT유채, 3; GM잔디, 4; WT잔디, 5; pFnP01 vector (잔디), 6; pFnP01 vector (유채)

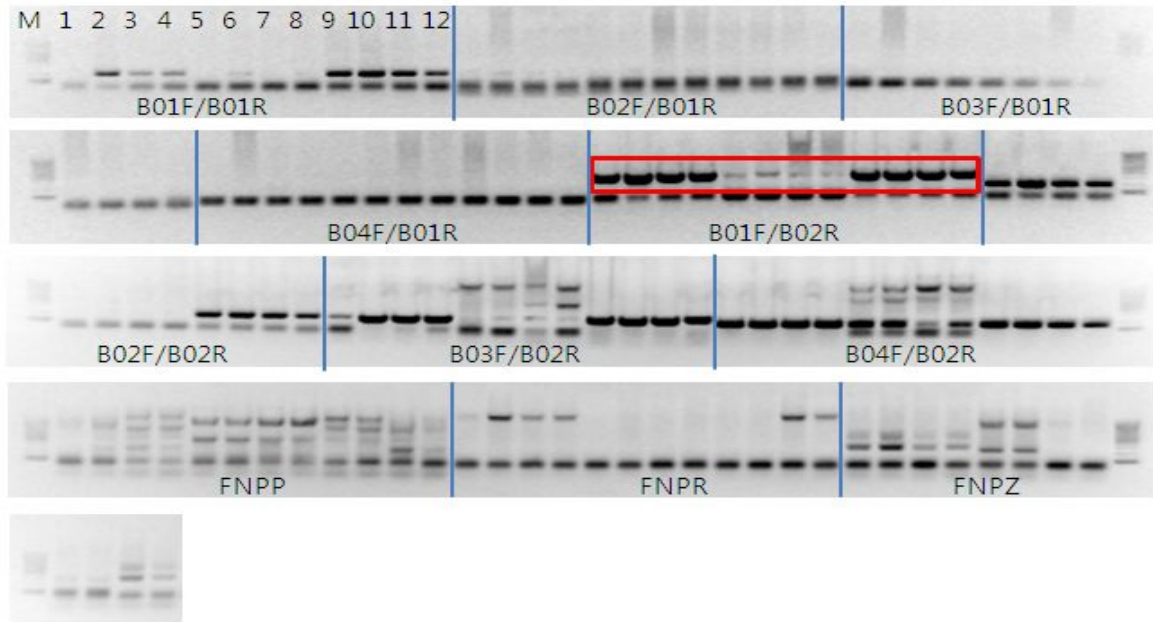


그림 14. Actin 프라이머 조합에 따른 테스트 수행 후 actin 프라이머 선별. M: 1Kb marker, 1-4: GM 유체, 5-6: GM 잔디, 7-8: WT 잔디, 9-12: WT 유체

나. 형질전환용 벡터 특이 primer를 이용한 다중검색 PCR 조건 확립 및 검증

- 벡터 내의 기능유전자의 확인을 위하여 각각의 기능유전자 특이적 Primer를 이용 PCR을 수행하였음
- 벡터 내의 기능유전자는 형질전환에 가장 높은 빈도로 사용하는 primer로 35SCaMV와 항생제 저항성 유전자인 Hygromycin과 PPT 그리고 reporter gene으로 사용하는 GUS를 이용하여 각각의 PCR 조건을 확인하였음 (그림 15)

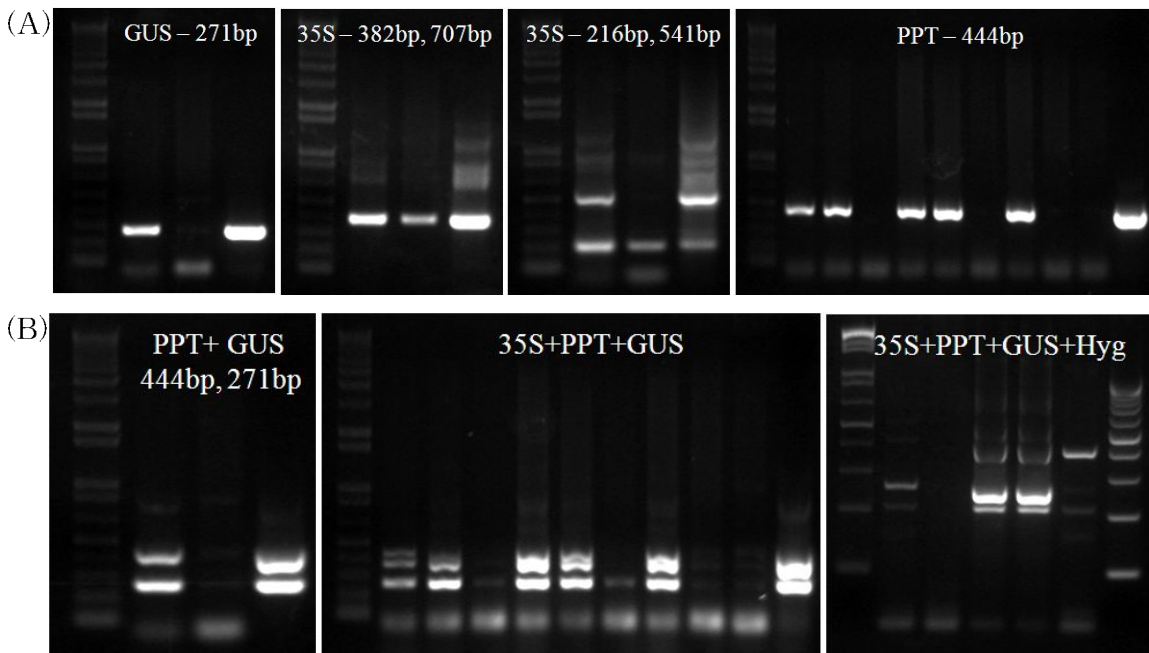


그림 15. 각각의 vector-specific primer (A)와 혼합(di, tri)된 primer 조합을 이용한 PCR 조건 확인 (B)

- 벡터 특이 primer를 이용한 다중 검출 조건과 특이밴드를 확인하고, 각각의 primer에 대한 최적 조합 및 조건을 확인한 후 multiplex PCR를 수행하였음
- 각각의 특이 primer와 형질전환용 벡터를 이용하는 multiplex PCR 결과, 35S promoter, GUS, Hygromycin 그리고 PPT를 검출할 수 있는 조건을 확립하였으며 그 구성은 35S promoter-OS73/OS68, PPT-OS28/OS29, GUS-OS91/OS81, Hyg-OS94/OS95 프라이머 조합임 (그림 16)
- 특히, 형질전환에 사용한 벡터에 대한 35S, GUS 그리고 PPT 등 세 개의 특이유전자를 검출함으로써 unknown 시료에 대한 검출이 가능하였음

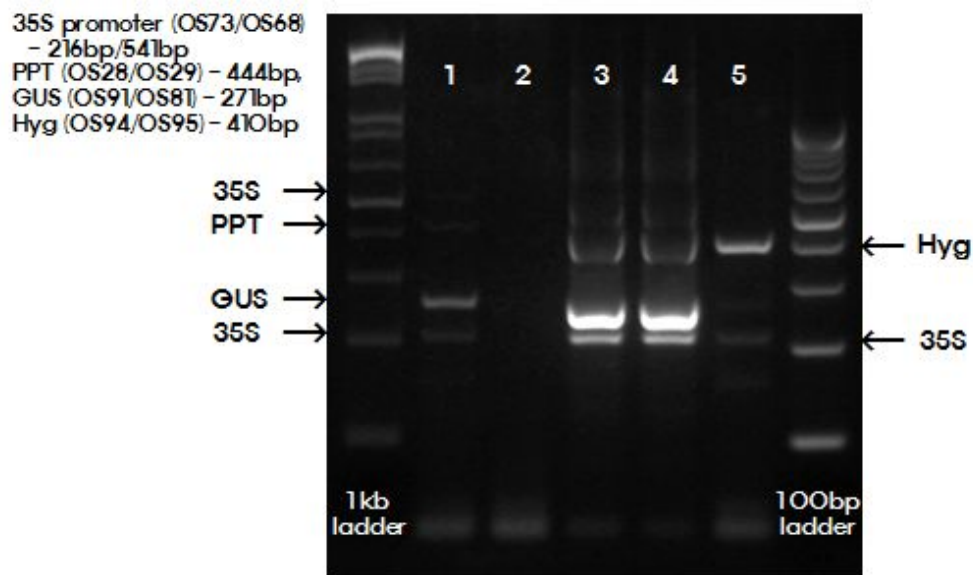


그림 16. 벡터 내 기능유전자 특이 primer와 형질전환용 벡터를 이용한 multiplex PCR. lane1; 형질전환 식물체, lane2; 대조구 (WT), lane3; 형질전환 벡터(pFnP01), lane4; 형질전환 벡터 (pFnP01+pFnP02), lane5; 형질전환 벡터 (pFnP02)

- Multiplex PCR 프라이머 세트의 추가 개발을 위하여 AtBG1, GUS, PPT, Right border (RB), Km 총 5가지의 단일 PCR 테스트로부터 선발된 각각의 프라이머 세트를 이용하여 16가지의 multiplex PCR 프라이머 조합을 구성하였음 (그림 17)
- pFnP01 벡터를 이용하여 구성된 16가지의 프라이머 조합을 테스트한 결과 9-16번 조합에서 5가지의 유전자에 대한 특이밴드가 모두 증폭됨을 확인하였으며 PCR 조건을 변경함으로써 5가지 유전자에 대한 특이밴드의 증폭을 명확하게 하였음 (그림 18)
- 그러나 Km은 형질전환용 벡터의 구성요소이나 식물체에 삽입되는 영역에서 제외되는 경우가 많고 RB의 경우도 식물체에 형질전환되는 과정에서 소실되는 경우가 많기 때문에 이들을 제외하고 35S promoter를 추가하였음. 또한 Actin 특이 프라이머를 추가함으로써 실험상의 오류를 확인할 수 있도록 multiplex PCR 구성을 변경하였음

NO. 1	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 2	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 3	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 4	Forward primer	Reverse primr	size
RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97
PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187
Km	KM01F	KM04R	225	Km	KM01F	KM04R	225	Km	KM01F	KM04R	225	Km	KM01F	KM04R	225
AtBG1	AtBG1_03F	AtBG1_02R	438	AtBG1	AtBG1_04F	AtBG1_02R	442	AtBG1	AtBG1_01F	AtBG1_02R	524	AtBG1	AtBG1_03F	AtBG1_09R	579
GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246
NO. 5	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 6	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 7	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 8	Forward primer	Reverse primr	size
RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97
PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187
Km	KM04F	KM03R	269	Km	KM04F	KM03R	269	Km	KM04F	KM03R	269	Km	KM04F	KM03R	269
AtBG1	AtBG1_03F	AtBG1_02R	438	AtBG1	AtBG1_04F	AtBG1_02R	442	AtBG1	AtBG1_01F	AtBG1_02R	524	AtBG1	AtBG1_03F	AtBG1_09R	579
GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246
NO. 9	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 10	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 11	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 12	Forward primer	Reverse primr	size
RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97
PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187
Km	KM03F	KM03R	317	Km	KM03F	KM03R	317	Km	KM03F	KM03R	317	Km	KM03F	KM03R	317
AtBG1	AtBG1_03F	AtBG1_02R	438	AtBG1	AtBG1_04F	AtBG1_02R	442	AtBG1	AtBG1_01F	AtBG1_02R	524	AtBG1	AtBG1_03F	AtBG1_09R	579
GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246
NO. 13	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 14	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 15	Forward primer	Reverse primr	size	NO. 16	Forward primer	Reverse primr	size
RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97	RB	RB01F	RB01R	97
PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187	PPT	PPT08F	PPT01R	187
Km	KM03F	KM04R	317	Km	KM03F	KM04R	317	Km	KM03F	KM04R	317	Km	KM03F	KM04R	317
AtBG1	AtBG1_03F	AtBG1_02R	438	AtBG1	AtBG1_04F	AtBG1_02R	442	AtBG1	AtBG1_01F	AtBG1_02R	524	AtBG1	AtBG1_03F	AtBG1_09R	579
GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246	GUS	GUS03F	GUS10R	246

그림 17. AtBG1, GUS, PPT, 35S promoter, Actin의 단일 PCR 테스트로부터 선발된 각각의 프라이머 세트를 이용하여 구성된 multiplex PCR 프라이머 조합

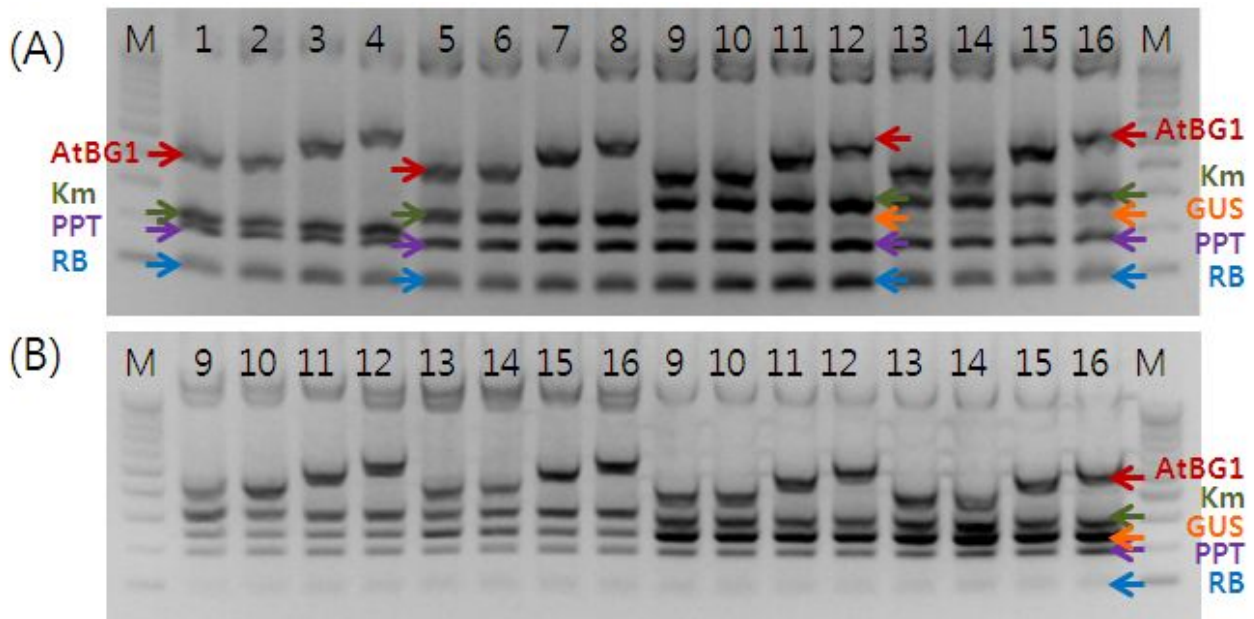


그림 18. pFnP01 vector를 이용한 다형성 프라이머 조합에 따른 밴드 패턴 확인. multiplex PCR을 위하여 9-16번 조합선발 (A) 후 PCR 조건을 변경하여 재확인 하였음 (B)

- 변경된 multiplex PCR 구성요소 AtBG1, GUS, PPT, 35S promoter, Actin의 프라이머 중 AtBG1, GUS, PPT, Actin의 4조합을 이용하여 multiplex PCR 조건을 확립하였으며 (그림 19), AtBG1, GUS, PPT, 35S promoter, Actin의 5조합을 이용한 multiplex PCR 조건을 확립하였음 (그림 20). 최종 선발된 4조합 (AtBG1, GUS, PPT, Actin) 및 5조합 (AtBG1, GUS, PPT, 35S promoter, Actin)의 multiplex PCR 조건은 그림 21과 같음

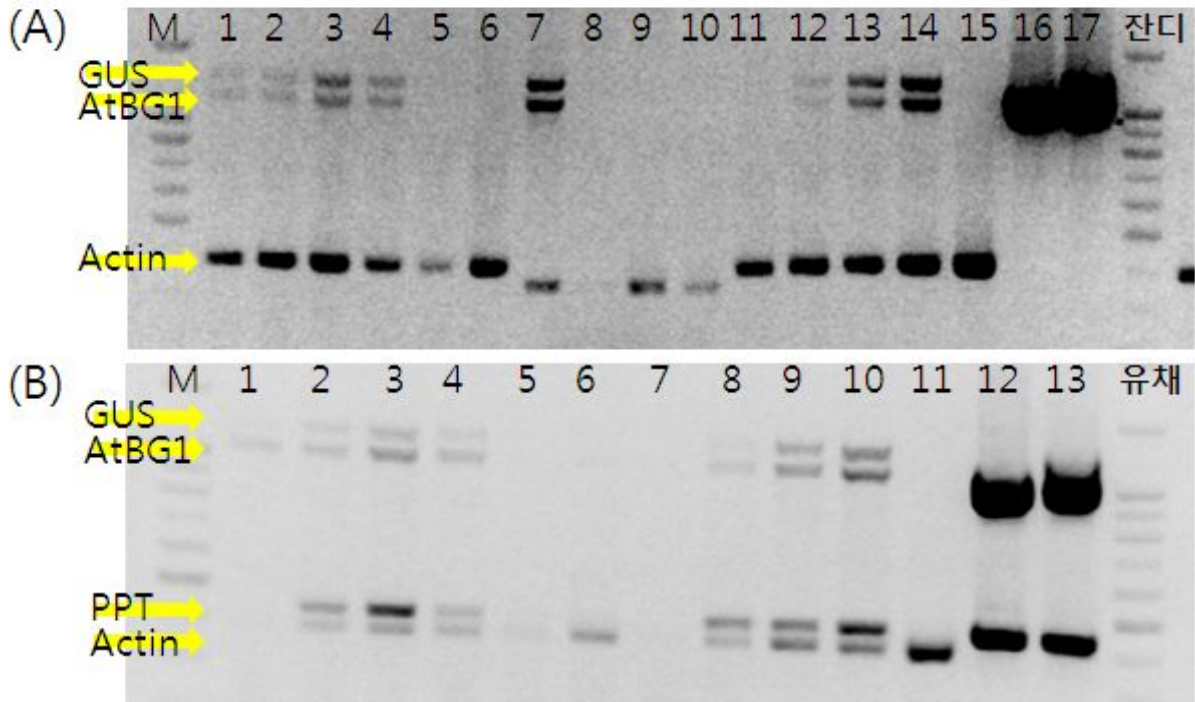


그림 19. AtBG1, GUS, PPT, Actin의 4조합을 이용한 Multiplex PCR 조건확립. (A) M; 100bp ladder, 1-4; GM유채, 5-6; WT유채, 7; GM잔디, 8-10; WT잔디, 11; SLT, 12-14; GMxSLT, 15; 통영갯, 16-17; pFnP01 plasmid DNA, (B) M; 100bp ladder, 1-4; GM유채, 5-6; WT유채, 7; SLT, 8-10; GMxSLT, 11; 통영갯, 12-13; pFnP01 vector

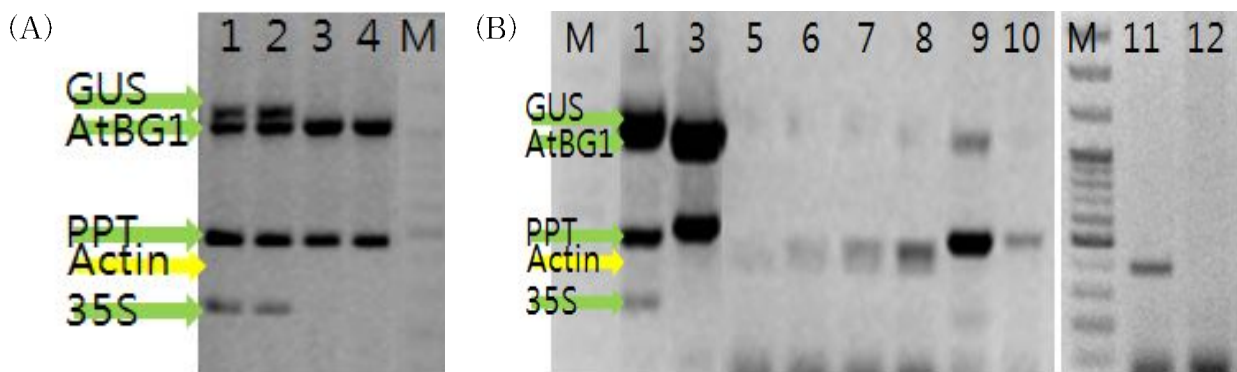


그림 20. AtBG1, GUS, PPT, 35S promoter, Actin의 5조합을 이용한 multiplex PCR 조건확립. (A) M; 100bp ladder, 1-2; pFnP01 vector, 3-4; 변경된 pFnP01 vector, 5-8; GM 유채, 9-10; GM 잔디, 11; WT 유채, 12; negative control

PCR program		PCR 조성 ($\mu\ell$)	
95°C	4min	DNA (50ng)	1
95°C	30sec	10X buffer	1
60°C	30sec	10mM dNTP	0.2
72°C	50sec	Taq	0.1
30cycle		GUS	0.12
		AtBG1	0.1
		Primer (10pmol) (Forward/ reverse 각각)	PPT 0.1
		35S	0.1
		Action	0.08
72°C	8min	D.W.	6.7
8°C	∞	Total	10

그림 21. 최종 선발된 4조합 (AtBG1, GUS, PPT, Actin) 및 5조합 (AtBG1, GUS, PPT, 35S promoter, Actin)의 multiplex PCR 조성 및 조건

다. GM 유채 및 벤프그래스 포장 인근 식물체의 모니터링

- Multiplex PCR을 이용한 고감도 분석법 개발을 수행하면서 동시에 중평의 LMO 실험포장 인근의 식물체를 채취하여 모니터링 하였음
- 2011년 3월부터 두 달 간격으로 노지재배 실험 포장으로부터 0.5m, 1m, 9m 반경내에 존재하는 식물체를 채취하여 GM 감별 마커를 이용하여 분석하였음. 2011년에는 주로 GUS 특이마커를 이용한 단일 PCR 방법을 이용하였으며 2011년 후반기부터 multiplex PCR 방법으로 모니터링 하였음 (그림 22-25)

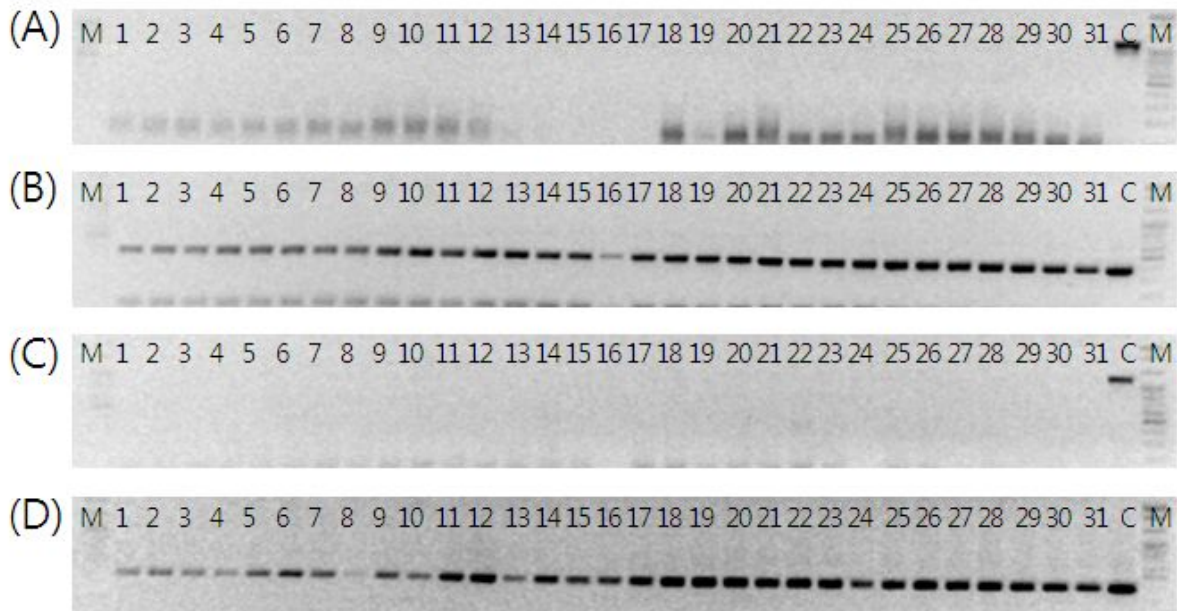


그림 22. 2011년 3월. GUS 특이 프라이머를 이용하여 유채 및 잔디 LMO 포장 인근의 식물체에 대한 모니터링 수행. 유채인근 식물체의 GUS 특이마커 (A) 및 Actin 특이마커 (B). M: 1Kb marker, 1-8: 반경 0.5m 내의 식물체, 9-17: 반경 1m 내의 식물체, 18-31: 반경 9m 내의 식물체, C: control (GM 유채)

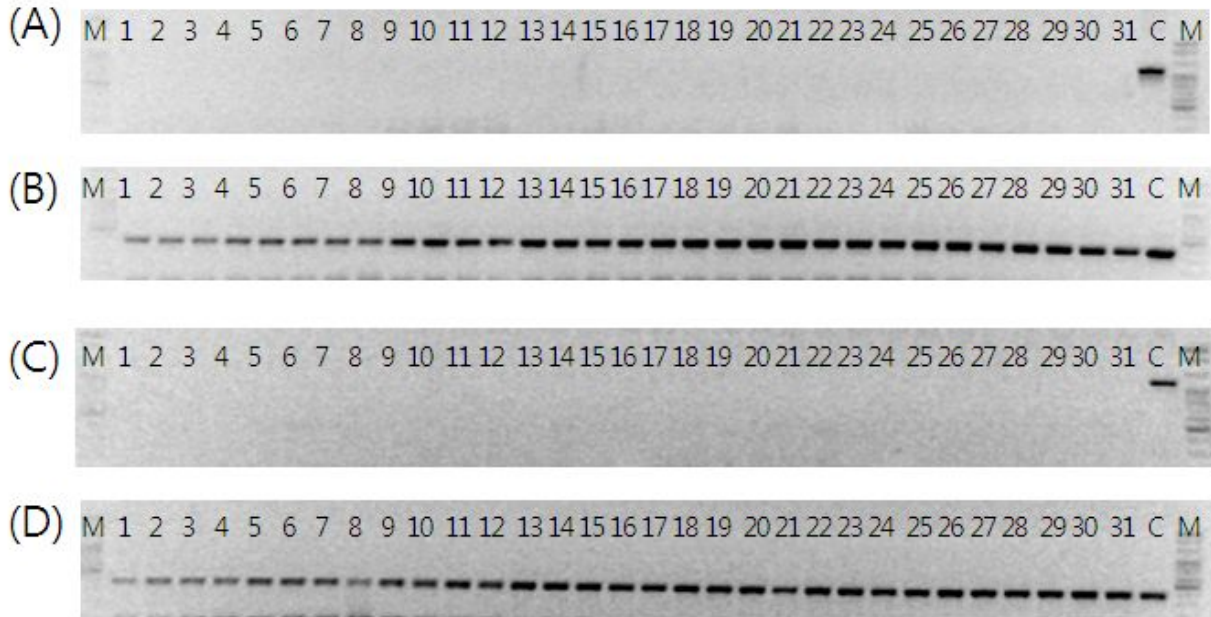


그림 23. 2011년 5월. GUS 특이 프라이머를 이용하여 유채 및 잔디 LMO 포장 인근의 식물체에 대한 모니터링 수행. 유채인근 식물체의 GUS 특이마커 (A) 및 Actin 특이마커 (B). M: 1Kb marker, 1-8: 반경 0.5m 내의 식물체, 9-17: 반경 1m 내의 식물체, 18-31: 반경 9m 내의 식물체, C: control (GM 유채)

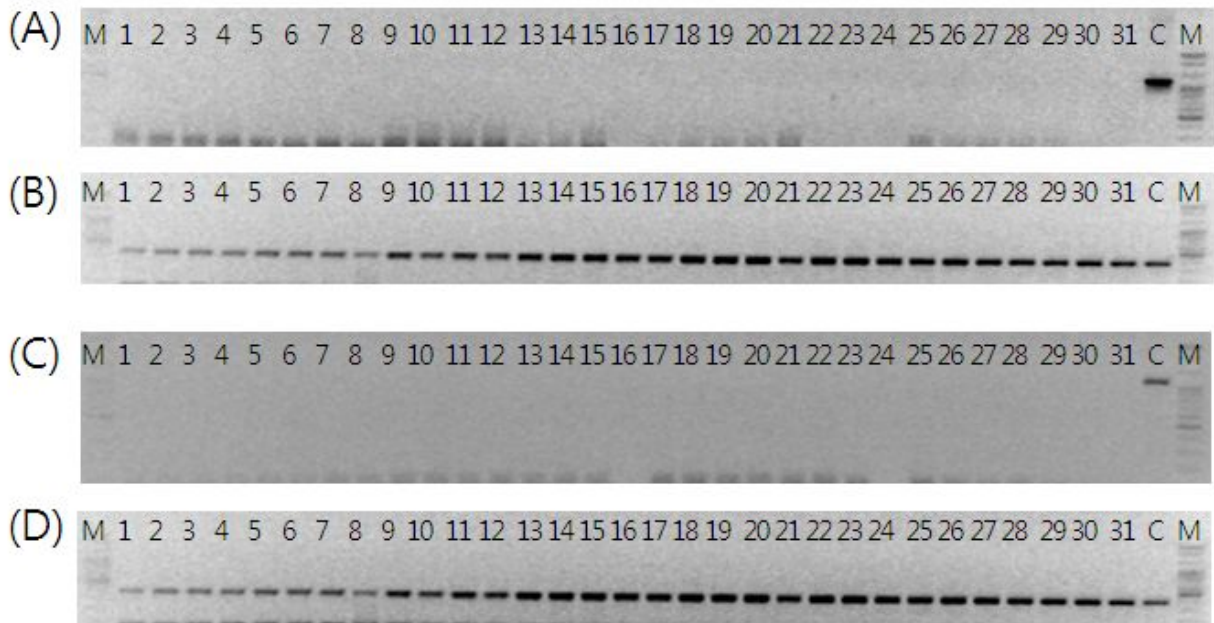


그림 24. 2011년 7월. GUS 특이 프라이머를 이용하여 유채 및 잔디 LMO 포장 인근의 식물체에 대한 모니터링 수행. 유채인근 식물체의 GUS 특이마커 (A) 및 Actin 특이마커 (B). M: 1Kb marker, 1-8: 반경 0.5m 내의 식물체, 9-17: 반경 1m 내의 식물체, 18-31: 반경 9m 내의 식물체, C: control (GM 유채)

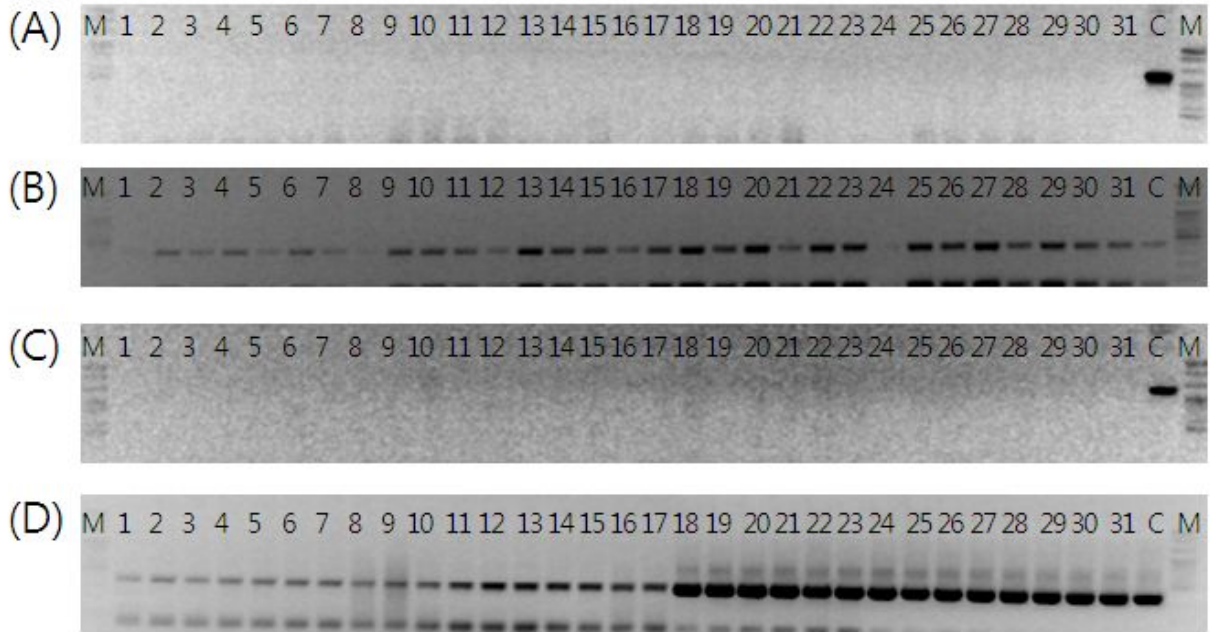


그림 25. 2011년 9월. GUS 특이 프라이머를 이용하여 유채 및 잔디 LMO 포장 인근의 식물체에 대한 모니터링 수행. 유채인근 식물체의 GUS 특이마커 (A) 및 Actin 특이마커 (B). M: 1Kb marker, 1-8: 반경 0.5m 내의 식물체, 9-17: 반경 1m 내의 식물체, 18-31: 반경 9m 내의 식물체, C: control (GM 유채)

- 2011년 후반기부터 4조합의 multiplex PCR을 이용한 모니터링을 수행하였음. Multiplex PCR의 프라이머는 GUS (1F/10R, 1170bp), AtBG1 (2F/1R, 1063bp), PPT (2F1-1/R, 490bp), Actin (B1F/2R, 393bp)으로 구성되어 있으며 LMO 포장 인근 0.5m 반경내 식물체 8주, 1m 반경내 식물체 9주, 9m 반경내 식물체 32주에 대한 스크리닝을 수행함 (그림 26, 27)

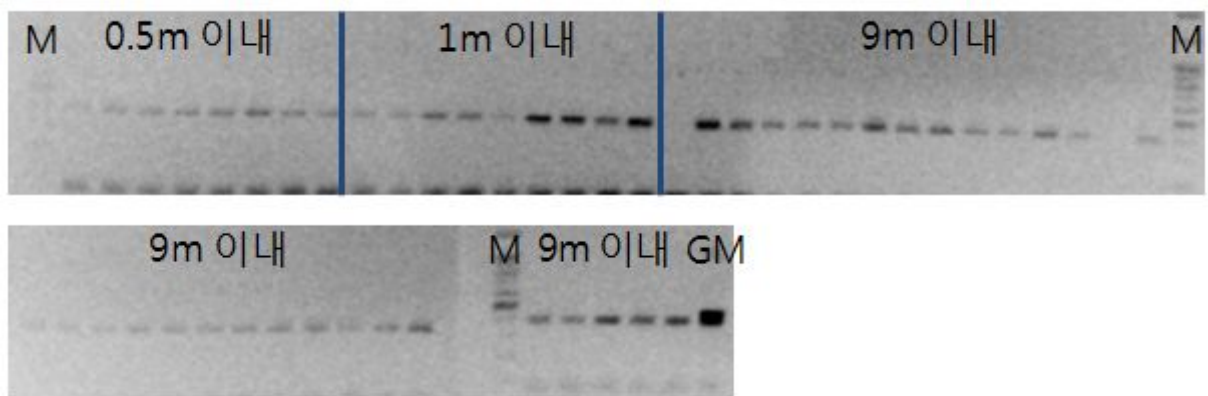


그림 26. 2011년 11월. 4조합의 multiplex PCR을 이용하여 유채 및 잔디 LMO 포장 인근의 식물체에 대한 모니터링 수행

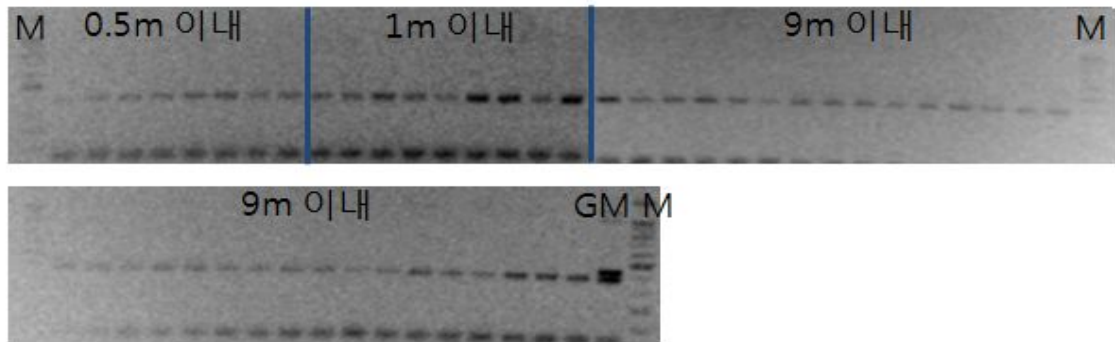


그림 27. 2012년 3월. 4조합의 multiplex PCR을 이용하여 유채 및 잔디 LMO 포장 인근의 식물체에 대한 모니터링 수행

- 모니터링을 수행한 결과 GM 유채 및 GM 잔디의 LMO 포장 인근에서 GM 식물체는 발견되지 않았음

나. 형질전환용 진단키트 개발을 위한 항체 제작

- Basta 저항성 GM 작물의 면역 검사법 개발을 위하여 Bar gene (약 20kDa)을 과발현벡터에 삽입하였음 (그림 28)

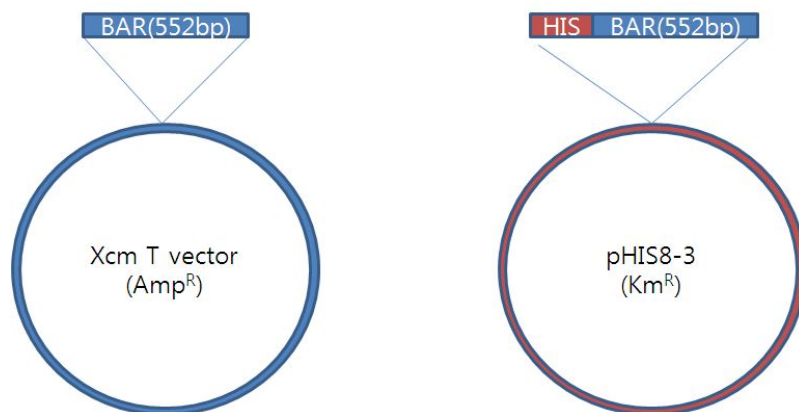


그림 28. Basta 저항성 GM 작물 면역 검사법 개발을 위해 사용된 벡터

- 이렇게 제조된 재조합체 DNA를 competent cell인 *E. coli* DH5a에 Invitrogen electroporator II (μ F50, Vmax 1800, 150 Ω)를 이용하여 형질전환 시킨 후 제한효소를 사용하여 삽입된 DNA 크기를 확인하였음
- 과대발현을 위하여 먼저 MAPK 유전자를 지니고 있는 균주로부터 plasmid DNA를 추출하여 competent cell에 형질전환 시킨 후 single colony를 ampicillin이 포함된 LB 3ml에 접종하여 1시간 동안(A₆₀₀, OD. 0.5) 진탕배양한 뒤, 과대발현을 위해 IPTG(Isopropylthio- β -D-galactoside)를 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하고 2시간 더 배양하였음
- 배양액을 원심분리한 후 세포를 수확하여, washing buffer(10mM Tris, 30mM NaCl, pH 7.4)로 2회 세척하였고, washing buffer와 protein sample buffer를 1:1 비율로 첨가하여 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 최종적으로 SDS-PAGE를 수행하여 과대발현 확인 (그림 29)

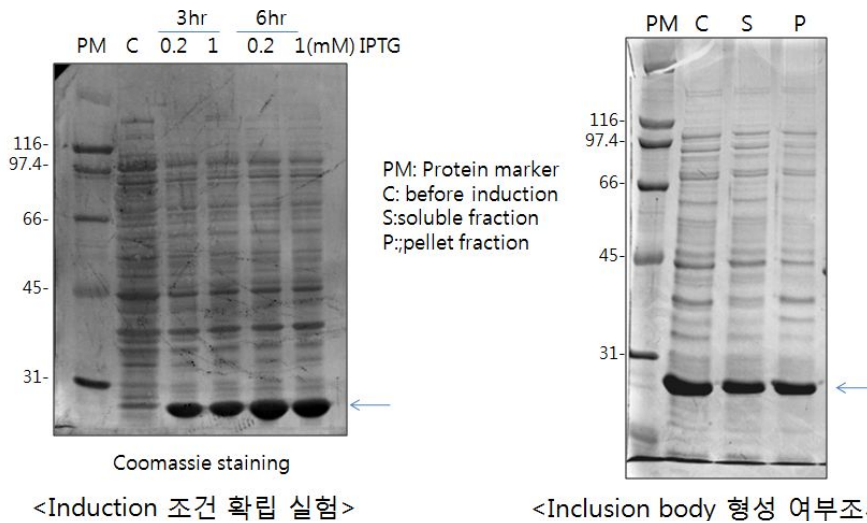


그림 29. 단백질 발현 확인. PM: protein marker, C: before induction, S: soluble fraction, P: pellet fraction

- 과대발현된 단백질의 분자량을 확인하기 위하여 약간 변형된 Laemmli(1970)의 방법으로 진행하였음. 전기영동은 0.09% SDS를 함유하는 Tris-glycine 완충용액(Trizma base 5.4g, glycine 26g, SDS 0.9g, pH 8.3/l)을 사용하였으며, Spacer gel은 30% acrylamide:Bis-acrylamide(29:1), 0.5M Tris/HCl(pH 6.8), 10% SDS, 10% TEMED, 10% ammonium persulfate를 섞어서 준비하였음. Separating gel은 30% acrylamide:Bis-acrylamide(29:1), 1.5M Tris/HCl(pH 8.8), 10% SDS, 10% TEMED, 10% ammonium persulfate(APS)를 섞어서 이용하였고, sample buffer는 0.5M Tris/HCl(pH 6.8), 10% SDS, 38% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol을 섞어 사용하였음. 전기영동은 spacer gel에서는 80V의 전압으로, separating gel에서는 100V의 전압으로 전개시켰음
- 전기영동 후 gel을 증류수로 2회 세척하고, staining solution(0.2% coomassi brilliant blue R-250, 50% methanol, 6% acetic acid)으로 30분간 진탕배양기에서 염색한 후, rapid destaining solution(10% acetic acid, 50% methanol)으로 10분 동안 1차 탈염색하고 destaining solution(7% acetic acid, 5% methanol)으로 2차 탈염색하였음
- 과대발현시킨 단백질을 Qiagen사의 Ni-NTA spin-kit(Qiagen Co. Inc.)를 사용하여 정제하고, SDS-PAGE, immunoblotting을 통해 재확인하였음. 형질전환체를 LB에서 과대발현시킨 뒤, 원심분리하여 세포를 수확하였음. Pellet에 buffer B (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 8M Urea, pH 8.0)를 1ml 첨가하여 1분 동안 sonication 한 후 원심분리하여 상등액만을 수확하였음. Buffer B 600μl로 미리 충전시켜 놓은 column에 얻어진 상등액을 첨가하였고, 1분 동안 column에서 반응시킨 후 2000rpm에서 2분 동안 원심분리하였음. 단백질이 binding된 column에 Buffer C(100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M Urea pH 6.3)를 600μl 첨가하여 2회 세척한 후, column에 Buffer E(100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 4.5)를 100μl를 첨가하여 정제된 단백질을 수확하였음 (그림 30)

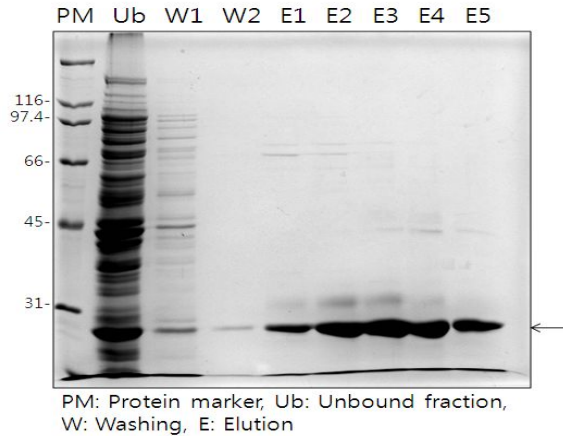


그림 30. 단백질 분리정제

- 항원으로 사용할 정제된 단백질은 PBS buffer에 준비하여 동량의 CFA (Complete Freund's adjuvant, Difco, Rockford)와 혼합하여 emulsion을 조제하였음
- 토끼 1마리당 emulsion 200 μ g/0.5ml씩 피하주사 하였으며, 항원면역반응 측정을 위한 1차, 2차 3차 boosting은 각각 4주, 6주, 8주째에 동일한 항원을 IFA(Incomplete Freund's adjuvant, Difco, Rockford)와 동일 혼합하여 토끼 1마리 당 200 μ g/0.5ml씩 피하주사 하였음
- 각 boosting 단계마다 소량의 피를 채취하여 serum을 얻었고, 항체 생성여부를 측정하였음. 3차 boosting 1주일 후 전체혈을 하였음. 소량의 피를 채취할 때는 꼬리 끝을 자른 후 피를 채취하며, 전체혈 시에는 심장채혈을 하였음
- 항원의 주사로 유도된 면역반응은 토끼의 혈청에 존재하는 항체의 정도를 ELISA를 수행하여 결정하였음
- 9주차에 전체혈을 하여 항체가 형성된 혈액을 항체 정제하였음. 항체정제는 항원을 affinity-gel에 부착하여 column을 제작하여 항체를 분리하는 방법을 통하여 정제하였음
- 혈청검사를 수행한 결과 2번 토끼에 비하여 1번 토끼 혈청의 특이도와 민감도가 양호하였으며 식물조직을 이용하여 검증을 수행하였음 (그림 31, 32)

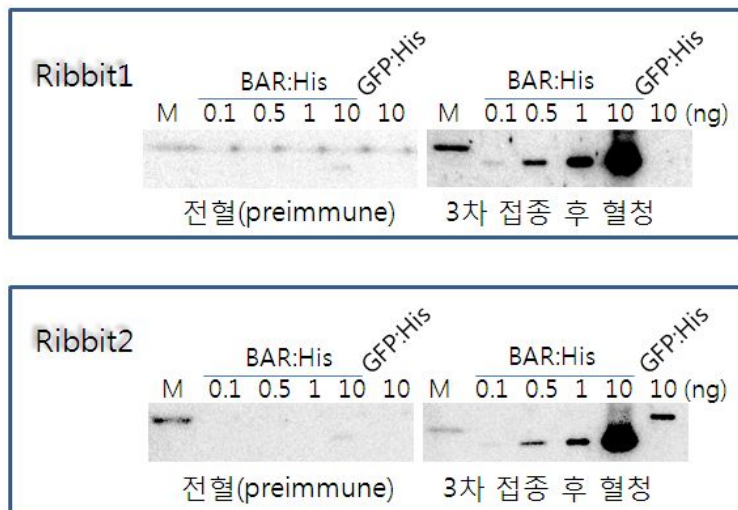
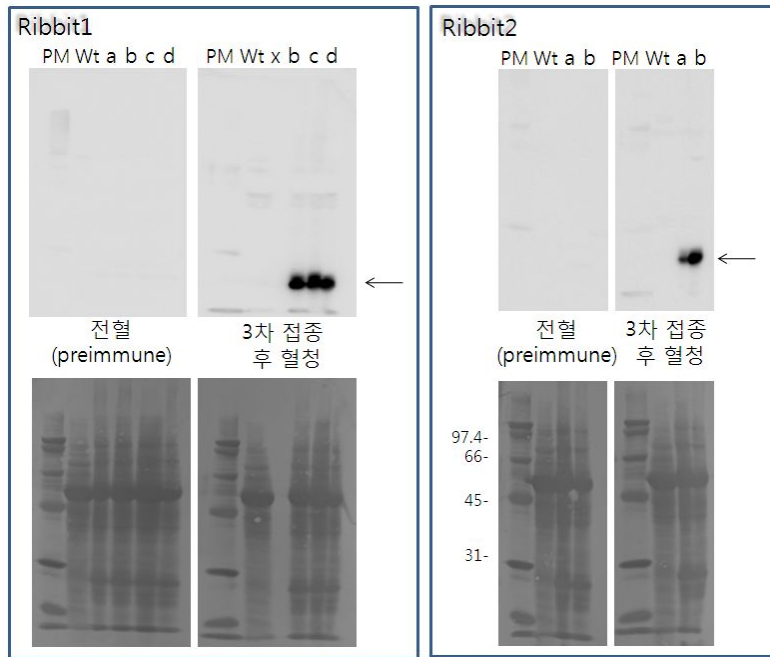


그림 31. 토끼 주사 3차 접종 후의 혈청. 1번 토끼 혈청의 특이도와 민감도가 더 좋음



PM: protein Marker, Wt: wild type, a~d: Bar resistant plants, 40 ug of total protein from Arabidopsis

그림 32. 식물조직을 이용한 검증 수행 (PM; protein marker, Wt; wild type, a~d: Bar resistant plants, 40ug of total protein from Arabidopsis)

- Bar-His protein을 주사한 토끼의 항체를 사용하여 테스트한 결과 basta 저항성 식물체에서 감응이 확인되었음 (그림 33). 그러나 전체혈로부터 정제한 항체의 역가가 높지 않아 추가 실험이 요구됨

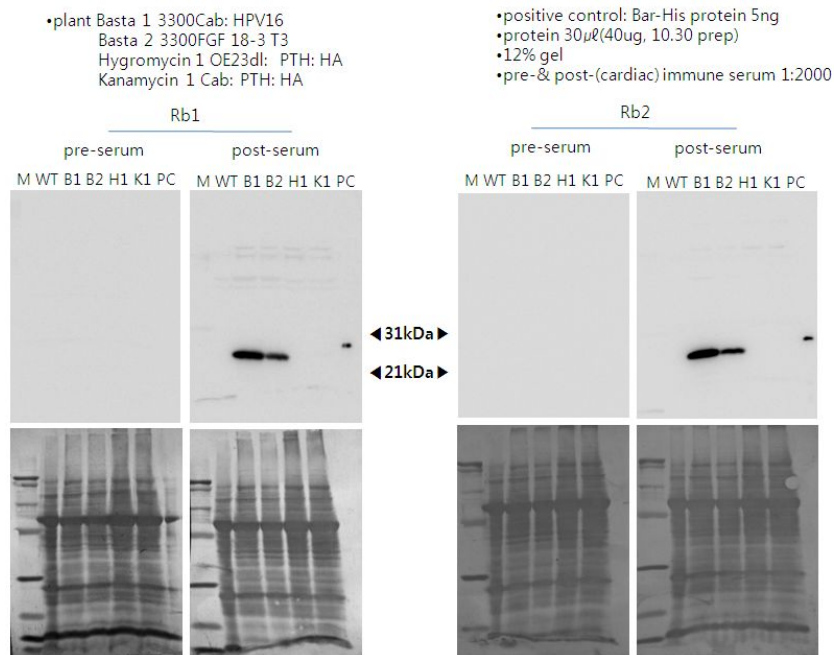


그림 33. Bar-His protein을 주사한 토끼의 항체 테스트 결과

제 3절 유채와 벤투그래스의 환경위해성평가 가이드라인 개발

제 1항 이론적, 실험적 연구방법

1. GM 작물의 안전성평가는 크게 식품 안전성평가와 환경위해성평가로 나뉨
 - 식품 안전성평가는 CODEX 기준 등 표준화된 지침이 개발되어 있으며, 대부분의 실험방법이 정형화 되어있음
 - 환경위해성평가의 경우 작물별, 도입 유전자별, 도입 환경별로 실험방법이 다르기 때문에 아직까지 정형화된 가이드라인이 개발되어 있지 않음
2. GM 유채와 잔디 유전자변형작물의 환경위해성평가 가이드라인 개발
 - GM 유채와 잔디 개발의 효율적 안전관리 방안과 환경위해성평가 지침 제공을 위해 OECD, 바이오안전성의정서 당사국 총회 등 국제기구의 지침서를 분석
 - 기존 국내 승인된 국외 GM 작물 심사서를 분석
 - 국내에서 안전성평가 중인 내용과 국내외 관련 논문, 서적 등을 분석
 - GM 작물의 환경위해성평가 연구 지원을 위한 외국 우수 전문서적의 번역서를 제작

제 2항 연구내용 및 연구결과

1. 유전자변형 작물의 위해성평가 이론 분석

가. 위해성분석의 핵심요소인 위해성평가

- 위해성분석 (risk analysis)은 위해성평가 (risk assessment), 위해성관리 (risk management), 위해성커뮤니케이션 (risk communication)을 종합한 개념임
 - 위해성평가 (과학적 요소); 내재적인 해(hazard)를 동정하고, 그로부터 발생할 가능성을 측정하고, 이를 종합하여 위해성(risk)의 정도를 평가(추정)
 - 위해성관리 (의사결정 요소); 위해성평가로 동정된 위해성이 수용할만한 것인가 또는 관리할 수 있는 것인가를 평가하고, 이를 위한 계획 또는 조치를 실행
 - 위해성커뮤니케이션 (사회적 요소); 위해성평가와 관리를 연결하고 패드백하는 과정으로 위해성 분석 절차를 강화함. 위해성 관련 이해당사자의 상호대화를 촉진
- 위해성분석의 3가지 요소들은 서로 연관되어 있음. 즉, 위해성평가는 위해성관리를 위한 정보를 제공하고, 위해성커뮤니케이션은 위해성평가의 출발점에 영향을 주고, 위해성관리를 보완하는 기능을 담당함
- 3가지 요소 중 위해성평가가 핵심적인 요소임. 현재 대부분 국가의 유전자변형생물체 안전 관리에 대한 법과 우리나라의 LMO법은 유전자변형생물체의 광범위한 생산(재배), 수출입, 유통 이전에 위해성평가와 이에 대한 국가규제기관의 심사를 안전관리의 핵심으로 이해하고 있음. 위해성평가로 과학적 정보가 생성되고, 이러한 정보에 따라 위해성관리가 이루어지고 이해당사자간 소통이 이루어져야 함
- 위해성커뮤니케이션의 관점에서 현재 우리나라의 소비자 및 경작자 인식은 상당히 부정적

인데, 과학적 사실에 근거하지 않은 소문, 추측, 상상에 근거를 두고 있다는 문제점이 있음. 본 연구는 위해성커뮤니케이션을 직접적으로 다루지 않음. 소비자, 학생 또는 경작자의 인식특성, 수용도 및 커뮤니케이션 활성화를 위한 상세한 방법 등은 농촌진흥청 어젠다연구사업 중 하나인 'GMO 교육프로그램의 개발과 농업생명공학 지식재산권의 실시자유도 분석'에서 다루고 있으므로 다만, 위해성평가 또는 위해성관리가 사회적 인식과 상호연관되므로 지침과 가이드라인의 개발 시 커뮤니케이션의 간접적 측면을 고려함

나. 위해성평가의 개념과 일반적 원칙

1) 위해성의 확률적 정의

- 유전자변형생물체, 단일 화합물, 물질을 넘어서서 어떤 행위 또는 사건에 일반적으로 적용되는 위해성(risk)은 해(harm, hazard)와는 구별하여야 함. 즉, '해'는 '어떤 사건의 부정적이거나 원하지 않는 영향'을 말하지만, '위해성'은 '그 바람직하지 않은 영향을 미칠 수 있는 어떤 사건이 발생할 기회 또는 확률'로 정의됨

$$\begin{aligned} \text{위해성} &= \text{확률(probability)} \times \text{영향(consequence)} \text{ 또는} \\ &= \text{사건의 가능성(likelihood)} \times \text{부정적 영향(impact)} \end{aligned}$$

- 확률적 개념이 적용된 위해성평가; 위해성평가는 잠재적인 위해요소(hazard, harm)를 동정(identification)하는데 그치지 않고, 그 해의 발생가능성을 평가한 후, 위해요소와 확률을 종합하여 영향을 추정하는 단계로 구분됨. 예를 들어, 유전자이동성에 대한 위해성을 평가할 경우, 유전자가 이동되는지의 유무 및 이동경로, 대상 생물체의 생식특성 등에 대한 다양한 정보를 수집하고, 이동확률을 측정한 후, 이러한 유전자 이동이 농업생태계 또는 자연생태계에 어떤 영향을 줄 것인가를 예측하는 것으로 볼 수 있음. 확률(노출)평가와 영향에 대한 예측이 빈약하거나, 실제 위해성평가 시 유전자가 이동했다는 사실에만 집중하여 종결하는 것은 위해성관리에 필요한 정보를 제공하지 못하게 되므로 적절한 위해성평가라고 할 수 없음
- 확률적 개념이 적용된 위해성관리; 확률적 개념은 위해성관리에 대한 기본적인 접근법을 제공한다. 위해성평가로 밝혀진 위해성의 특성 및 정량적인 수준에 따라 차별적인 관리조치를 취하게 됨. 즉, 부정적인 영향이 낮다고 판단될 경우 가능성(노출)을 제한하는 조치를 완화할 수 있고, 그렇지 않을 경우는 엄격한 확산방지 조치가 요구됨. 확률적 개념으로부터 유래한 차별적 관리조치는 바이오안전성의정서와 우리나라 LMO법의 환경방출용과 식용사료용가공용으로의 직접 사용 구분, LMO법의 시험연구 관련 규정의 허가와 신고, 일본 카르타헤나법의 환경방출(제1종사용)과 밀폐사용(제2종사용), 호주 유전자기술규제법의 면제, 신고, 등록, 허가의 취급구분 등에 적용되고 있음
- 확률적 개념이 적용된 위해성커뮤니케이션; 과학적, 경험적으로 확립된 확률적 개념을 대중이 이해하지 못하여 위해성평가 결과가 활용되지 못하거나, 안전관리 이행에 어려움을 겪는 경우가 있음. 사회적 인식이 위험한 것은 조금이라도 없어서는 안된다는 신념에 기반을 두고, 한계허용치를 인정하지 않으려는 태도는 적절한 위해성커뮤니케이션에 많은 장애를 초래할 것임

2) 일반적인 위해성평가의 목적, 개념 및 방법(접근법)

- 목적; 위해성평가는 궁극적으로 인간 건강과 환경에 대한 위해성을 최소화하거나 회피하기 위하여 유전자변형생물체의 잠재적인 부정적 효과를 동정하고 평가함으로써 위해성관리가 필요한지와 이를 위한 적절한 조치를 밝히는 것임. 바이오안전성의정서는 위해성평가의 목적을 다음과 같이 기술함.

잠재적인 수용환경(the likely potential receiving environment)에서 생물다양성 보전과 지속가능한 이용에 대하여, 인간건강에 대한 위해를 고려하여, LMO가 미칠 잠재적인 영향을 확인하고 평가. (바이오안전성의정서 제15조 1항, 부속서III의 1항)

- 개념; 진술한 바와 같이 위해성평가는 내재적인 해(hazard)를 동정하고, 그로부터 발생할 가능성을 측정하고, 이를 종합하여 위해성(risk)의 정도를 평가(추정)하는 과정으로 3-4단계로 구분하여 진행됨 (표1).

표1. 위해성평가의 3요소(단계)

요소(단계)	내용(질문)
위해요소 확인	<ul style="list-style-type: none"> • 무엇이 일어날 것인가? • 어떻게 일어날 것인가?
발생가능성(확률) 측정	<ul style="list-style-type: none"> • 일어날 가능성은 어느 정도인가?
영향 또는 결과 추정	<ul style="list-style-type: none"> • 일어난다면 어느 정도 심각한가? • 위해성은 무엇인가?

- 방법(접근법); 위해성평가는 과학적인 방법으로 수행되어야 하며, 체계적인 접근이 필요함. 화학물의 인체영향에 대한 위해성평가는 유전자변형생물체보다 오래전에 시작되었으며 많은 경험이 축적되었다. 인체건강에 대한 접근법은 유전자변형작물 위해성평가의 기초를 이룬다. 건강위해성평가는 위험성확인, 노출평가, 용량-반응평가, 위해도결정의 4단계로 수행된다 (표2)

표2. 단일화학물의 위해성평가의 단계

단계	수행내용
위험성확인	<ul style="list-style-type: none"> • 유해요인이 실제 유해한 영향을 나타내는가, 즉 요인과 영향간의 원인관계가 성립하는가를 확인 • 독성연구와 역학연구결과에 의한 기존의 정보들을 근거로 확인 • 정성적 위해성평가
노출평가	<ul style="list-style-type: none"> • 주어진 노출환경에서 얼마나 실제로 노출되는가를 정량적으로 평가하는 과정 • 실질적으로 이루어지는 다양한 노출요인과 노출경로들을 고려한 노출시나리오에 근거해 노출용량을 추정
용량-반응평가	<ul style="list-style-type: none"> • 노출용량에 따른 유해영향간의 관계를 규명해 내는 과정

	<ul style="list-style-type: none"> • 예를 들어, 물질의 발암성, 유전독성의 유무에 따라 역치(threshold)의 존재유무를 가정하며, 이에 따라 그 방법론이 다름. 1) 발암물질이며, 유전독성이 있는 경우에는 비역치 방법론을 적용하며, 2) 비발암물질이거나 발암물질이며 유전독성이 없는 경우는 역치방법론을 적용 • 역치방법론의 경우 역치지점을 찾는 것이 용량-반응평가의 결과물이며, 비역치방법론의 경우는 관계함수의 직선의 기울기를 찾는 것이 주요결과임.
위해도결정	<ul style="list-style-type: none"> • 이전단계에서 도출된 모든 정보를 활용하여 정량적 위해도를 추정해 내는 과정. • 이는 주로 유전독성이 있는 발암독성물질에 활용되는 비역치방법론의 경우는 발암위해도로 표현되며, 1) 발암영향이 이차적으로 나타나는 영향이며, 2) 일차적으로 발생하는 영향에서 역치가 존재할 경우, 3) 유전독성이 없는 경우는 MOE(Margin of Exposure) 방법론을 활용함 • 또한 비발암물질의 경우는 위해지수(Hazard Index)로 위해도를 추정함.

다. 유전자변형생물체 위해성평가의 특징

- 과학적 또는 체계적인 접근 외에 유전자변형생물체의 위해성평가에 특이하게 적용되는 원칙으로 상대적 접근법(평가)과 사안별 평가임
- 상대적 접근법(평가)
 - 필요성; 단일 화합물의 평가와는 달리 유전자변형생물체는 살아있는 생물체를 평가대상으로 한다. 생물체는 구성요소가 복잡하고, 매우 정교하게 연결되어 있으며, (적어도 현재의 기술수준으로는) 그러한 특성에 대한 정보가 모두 확보되지 않음. 환원적인 접근방식에 따라 생물체를 모든 구성요소로 분해한 후 이들 각각에 대한 평가를 하는 것은 불가능함. 또한 많은 구성요소를 평가하였다 하더라도 이러한 정보가 규제결정을 위해서는 도움을 줄 것으로는 기대되지 않기 때문에 이러한 문제를 해결하기 위하여 살아있는 복잡하고 정교한 생물체에 대해서는 다른 접근법의 개발이 필요함.
 - 이러한 문제를 해결하기 위한 하나의 방법은 적절한 대조구(비교구)를 선정하고 유전자변형생물체를 이들과 비교하는 것이다. 이를 상대적 접근법이라고 하며, OECD에 의해 실질적동등성(substantial equivalence)과 친숙성(familiarity) 개념이 개발되었고 WHO/FAO에 의해서 발전되었음
 - 실질적동등성; 실질적동등성은 식품/사료로 안전하게 사용되어온 역사를 가지고 있는 기존 생물체를 비교구로 사용할 수 있다는 가정에서 출발함. 실질적동등성의 목표는 유전자변형생물체와 비변형 비교구 간에, 인간과 동물에 미치는 독성학적 및 영양학적 영향에 관하여 평가되어야 할 유사성과 잠재적인 차이를 확인하는데 있으며, 동일한 재배법과 환경조건에서 생육되었을 때 유전자변형생물체 유래의 식품/사료가 전통적인 상대만큼 안전한

지(as safe as) 아닌지에 대한 증거를 제공하는 의미가 있음. 실질적동등성은 적당한 비교 대상을 찾을 수 없는 경우, 예를 들어 식물의 조성을 크게 변형시키려는 의도로 하나의 형질 혹은 여러 형질들을 도입한 경우는 적용이 어렵다는 한계가 있음

- 친숙성; 친숙성은 환경위해성평가의 실질적동등성으로 언급되기도 함. 친숙성은 대부분의 형질전환 식물이 생물학적 특성을 잘 알고 있는 작물과 같은 생물체로부터 개발된다는 가정에서 출발함. 사전 지식과 경험을 기술하고 유전자변형과 일련의 취급과 관련된 차이를 조명하기 위하여 형질전환작물에 대한 비교구로서 비변환작물을 사용하며, 새로운 계통 또는 품종의 대규모 환경방출 또는 상업적 재배 전에 소규모 위해성평가를 수행하거나 다른 작물의 유사한 구조체(construct)와 형질의 적용으로부터 얻은 적절한 지식과 경험을 활용한다는 의미가 있음. 친숙성을 적용할 때는 형질전환 작물과 비전환작물 사이의 모든 차이를 동정하는 것뿐만 아니라 더 나아가서 그 차이의 중요성과 의미에 중점을 두어야 함. 친숙성 개념은 본 연구과제의 대상인 GM 작물의 새로운 형질인 무생물적 스트레스 내성 작물에 적용할 수 있음

라. 위해성평가 수행을 위한 고려사항

- 과학적으로 의미있는 위해성평가를 수행하기 위해서는 광범위한 전문가의 참여를 필요로 함. 이때 필요한 전문분야는 분자생물학(핵산기술), 유전학, 생태학, 분류학, 생화학, 독성학 등 매우 많음 (UNEP 생명공학기술안전성 국제기술지침은 19가지 전문분야를 나열하고 있음). GM 작물의 위해성은 사안별로 평가되기 때문에 모든 전문분야가 필요한 것은 아님
- 위해성평가의 비용에 대하여 Kalaitzandonakes 등이 조사한 바 있음. 몇몇 주요 생명공학 회사로부터 제공받은 자료를 토대로 제1세대 형질인 제초제저항성과 해충저항성 옥수수의 규제비용을 산출하였다(Kalaitzandonakes et al. 2006; 2007). 제초제저항성 옥수수의 경우 6.2-14.5백만불, 해충저항성 옥수수의 경우 7.1-15.4백만불이 위해성평가를 포함한 규제이행에 소요되었음. 평균 100억원 정도 소요되는 위해성평가 비용은 소규모 연구소는 물론 다국적 농업생명공학 기업에서도 부담으로 작용함
- 위해성평가를 수행하는데 대부분의 시간은 도입형질의 세대간 안정성(stability)과 농업적 표현형의 년도별 통계적 유의성을 확보하는데 사용되며 약 3-5년의 기간이 소요됨
- 이를 종합하면 위해성평가는 다양한 전문가가 참여하고, 막대한 연구비와 상당한 기간(초기의 유전자개발부터 시작하면 10년을 넘어선다)을 소모하는 대규모 연구사업이라고 할 수 있음. 따라서 이 연구사업이 위해성관리에 사용될 과학적으로 의미있는 정보를 산출하기 위해서는 전략적인 측면을 고려해야 함
- 유전자변형생물체 위해성평가의 도전은 개별평가라기 보다는 이를 종합하여 의사결정에 연결시키는 작업임. 이를 원활히 수행하기 위하여 위해성평가자에게 요구되는 사항은 1) 위해성평가 관련 규제 및 국제 동향에 대한 이해, 2) 위해성평가에 대한 최근 연구 동향, 3) 위해성평가의 원리 및 특성에 대한 이해, 4) 위해성평가 결과에 대한 종합적 해석 능력, 5) 위해성평가 요소에 대한 기존 지식과 그 한계에 대한 이해 등으로 제안되었음. 이러한 맥락에서 유전자변형생물체 위해성평가 전문가가 부족하다고 할 수 있음
- 위해성평가에 필요한 정보는 질적, 과학적으로 수용 가능해야 함. 관련 유전자변형생물, 사용목적 및 잠재적 수용환경에 따라 이러한 자료들은 사례별로 세부적 성격 및 수준이 저마다 다름. 위해성평가 과정에서 과학적 추가 정보에 대한 수요가 발생할 수 있으며, 이는 평

가 과정 중에 파악 및 요청될 수 있지만 기타 주제와 관련된 정보는 몇 가지 사례에서 관련성이 없을 수 있음

- 위해성평가 결과 및 정보의 질과 관련성 확인을 위해서 많은 사안들이 고려되어야 함
 - 위해성평가의 맥락에서 자료의 관련성 평가 기준. 예를 들면, 보호목표와 평가종료점과 관련이 있고, 유전자변형생물의 잠재적 부정적 효과 파악 및 평가에 기여하며, 위해성평가 결과 및 결정에 영향을 미칠 수 있다면 관련 자료로 고려됨
 - 수용 가능한 과학적 질을 갖춘 자료들을 위해성평가에 이용해야 함. 자료의 질은 과학적 정보수집 및 보고서의 기준에 부합해야 하며 연구 방법 및 설계에 대한 독립적 검토 역시 포함되어야 함
 - 적절한 통계 테스트를 이용하여 통계적으로 의미 있는 결과를 도출해야 하며, 위해성평가 시, 필요한 경우에는 위해성평가 보고서에 기록해야 한다. 위해성평가는 분과적이거나 대조적일 수 있는 다양한 과학 분야에서 도출된 자료들의 사용 및 분석을 요하는 경우가 많음
 - 과학적 데이터에서 요구하는 바는 독립적 인증을 위해 사용 자료 및 방법 보고를 상세하고 투명성 있게 진행해야 함
 - 유전자변형생물체의 유형에 따라 농부, 재배자, 과학자, 규제당국, 원산지 및 현지 커뮤니티의 지식 및 경험, 국제 기준과 지침 모두 위해성평가에서 사용될 수 있음
 - 위해성평가의 수행에는 다양한 과학 분야에서 관련 배경을 갖춘 독립적 전문가들의 개입이 요구됨
- 위해성평가의 효율적 이행을 위해서는 단계적 접근이 필요하다. Raybould는 Bt 작물의 비표적 생물체 영향 평가에서 ‘기존데이터 ⇨ 실험실 ⇨ 온실 ⇨ 포장’의 단계별 접근과 문제형성을 제시하였음. 적절한 문제형성 또는 가설설정 에 대해서는 뒤에서 상세하게 기술하였음

마. 위해성평가 과정 로드맵

- 바이오안전성의정서 당사국총회는 2011년 전문가그룹회의를 통해 위해성평가 로드맵을 개발 발표하였음 (그림 1). 이 로드맵은 인체건강에 대한 위해성을 고려하면서 잠재적 수용환경에서 생물 다양성의 보존 및 지속적 이용에 대한 유전자변형생물체의 잠재적 부정적 효과를 파악하고 평가하기 위한 위해성평가 단계를 포함하고 있음
- 위해성평가는 반복적으로 수행되어야 하며, 특정 단계들은 진한 화살표가 나타내는 바대로 반복 및 재검토되어야 함. 2단계와 3단계 주변의 상자는 이 단계들을 동시적이거나 역순으로 고려해야 할 경우도 있다는 것을 나타냄. 점선 화살표는 위해성평가 과정의 외적 사안들에 대한 경로임

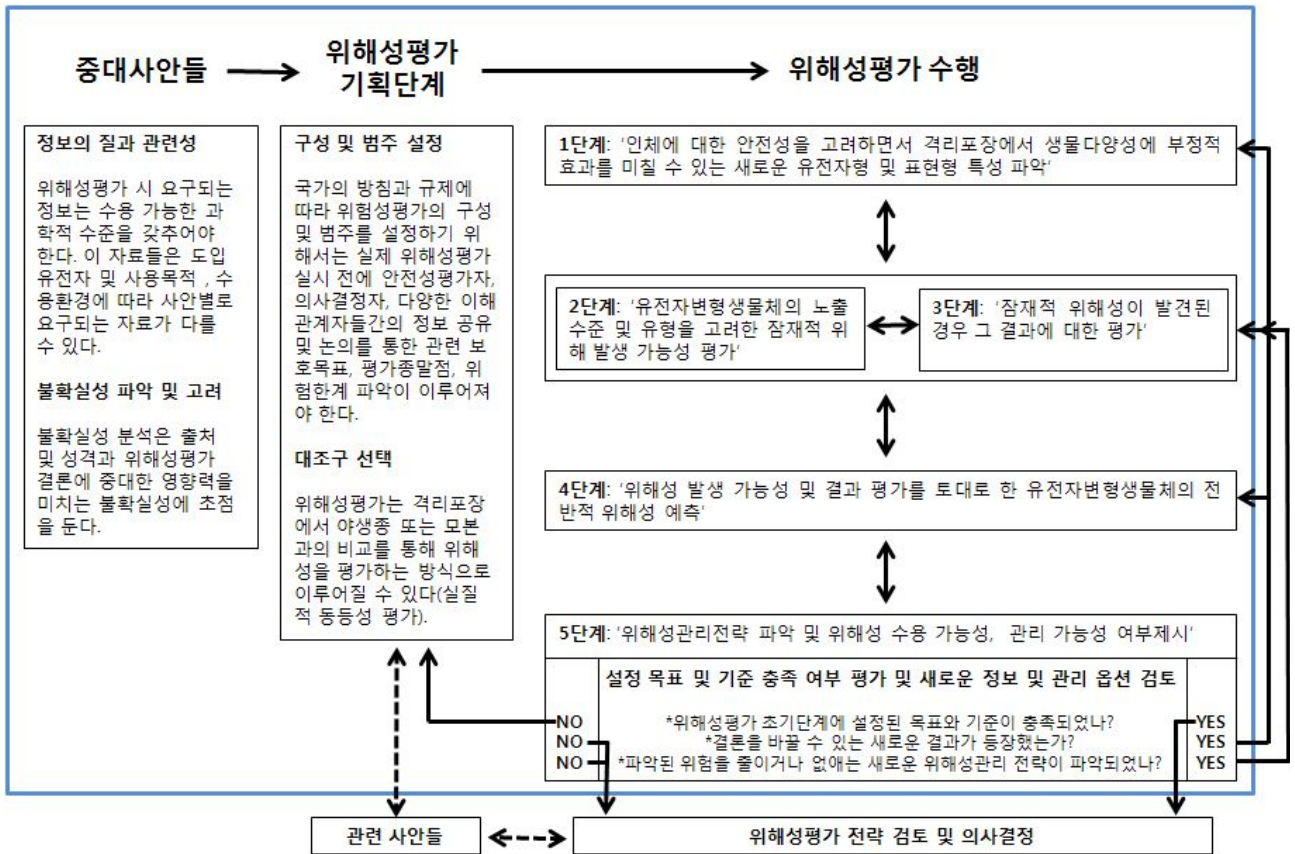


그림 1. 위해성평가 과정 로드맵

바. 위해성평가의 불확실성 파악과 새로운 형질의 GM 작물 평가

1) 불확실성의 파악 및 고려

- 가) 불확실성은 과학 분석 및 위해성평가의 필수불가결한 요소이다. 불확실성의 출처는 자료 및 정보, 자료의 부족, 모형 시스템 및 사용된 방법 포함, 연구설계 선택 및 정보 분석으로 도출 될 수 있음
- 나) 카르타헤나프로토콜에 따르면 '위해성수준이 불확실한 경우, 특정 관련 사안에 대해 추가 정보를 요청하거나 수용환경에서 유전자변형생물 모니터링 및 적합한 위해성관리 전략을 실시하는 방식으로 처리할 수 있음.'³⁾ 불확실성은 각 국제 기구 통합 예방 조치에 따라 다양한 방식으로 처리되어야 하는 경우가 있음.⁴⁾⁵⁾
- 다) 불확실성 검토는 위해성평가를 보다 더 과학적으로 유효화함. 불확실성 분석은 출처 및 성격에 대한 검토를 포함하며 위해성평가 결론에 지대한 영향력을 가질 수 있는 불확실성에 중점을 둠
- 라) 식별된 각각의 불확실성의 출처로 불확실성 특성은 다음과 같은 요소에서 기인되었다고 설명됨. (i) 정보 부족, (ii) 불완전한 지식, (iii) 불가분의 변동성, 예를 들면, 연구 중

3) 카르타헤나 부속서 III, 8단락(f).

4) 카르타헤나 생명안전 프로토콜 지침, 52-66단락 (<http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/EPLP-046.pdf>).

5) 프로토콜 조항10, 6단락: '인체건강에 대한 위해요소를 고려하면서, 수입 당사자에 있어 생물 다양성의 보존 및 지속적 사용에 대한 유전자변형생물의 잠재적 역효과의 정도에 대한 관련 과학정보와 지식의 불충분함에서 기인된 과학적인 확증이 부족하면, 당사자가 관련 유전자변형생물의 수입에 대한 적절한 결정을 내려 잠재적 역효과를 피하거나 최소화할 수가 없다.'

인 집단의 이종이 이와 같은 출처에 속함. 이와 같이, 다양한 유형의 불확실성은 위해성평가 1단계부터 4단계까지 검토되고 설명되어야 하며 위해성평가 결과 전달 시에는 양적으로나 질적으로 불확실성이 예상되는 위해 수준과 위해성평가 결론 및 제안에 미칠 영향에 대해서 밝혀야 함

마) 어떤 경우에는 추가 정보가 잠재적 역효과에 대한 이해도를 보다 높일 수 있는 것은 아니기 때문에 위해성 평가자는 요청된 추가 정보를 통해 위해성평가를 보다 잘 할 수 있을 것인지를 확인해야 함. 정보 부족으로 인한 불확실성은 추가 연구를 한다고 해서 줄일 수는 없으며, 불완전한 지식이나 불가분의 변동성으로 인한 불확실성은 추가 측정 및 연구로 줄일 수 없음. 이 경우에는 추가 정보 조항이 불확실성을 줄이기보다는 실제로 또 다른 불확실성을 야기할 수 있다. 필요한 경우 위해성평가 시 더 많은 자료가 제공된다고 해서 불확실성이 처리될 수 없다고 판단되는 경우에는 위해성관리 및 모니터링을 통해 처리할 수 있음

2) 새로운 형질을 가지는 GM 작물의 위해성평가

가) 기후변화 대응 작물 (예, 무생물적 스트레스 내성 작물); 생태계 내 생존력 강화로 생태계 영향 가능성 (예, 잡초화 및 침입성), 발현조절의 상위 인자 변형에 의한 비의도적 영향의 불확실성 증가

나) 대사변형 작물 (예, 영양성분 강화); 관련 대사의 비의도적 변화, 프로파일링 기술 적용성 논란

다) 의약품생산용 및 바이오연료(산업용) 작물; 식량공급 체인으로의 혼입가능성 ⇨ 식량작물로의 유전자 이동성

라) 저수준혼입(LLP) 상황의 위해성평가; 위해성평가의 확률적 개념 적용

※ 본 연구는 무생물적 스트레스 내성 작물의 위해성평가를 대상으로 한다.

2. 무생물적 스트레스 내성 작물의 환경위해성평가

가. 서론

- 1) 위해성평가의 관점에서 새로운 형질인 무생물적 스트레스 내성 작물(abiotic stress tolerance crops); 현재까지 전세계적으로 상업화되어 재배되고 있는 주요 GM 작물은 대두, 옥수수, 면화, 유채이며, 주요 형질은 제초제저항성, 해충저항성이다. 최근 저온, 고온, 수분 및 염도 등과 같은 무생물적 스트레스에 내성을 갖는 GM 작물의 포장시험이 전세계적으로 수행되고 있으며, 한발내성 옥수수는 위해성심사가 거의 완료되었음. 무생물적 스트레스 내성은 새로운 형질로서 위해성평가와 심사에 새로운 도전을 주고 있음
- 2) 앞에서 언급한 바와 같이 위해성평가는 규제결정에 활용되어 도움이 되어야 함. 제1세대 GM 작물의 유전자이동성에 기인하는 잡초화 또는 생태계 침입성을 평가할 때 유전자의 이동 여부에만 집중하고 생태계 내에서의 교잡종의 선발과 지속성 등을 검토하지 않았던 것과 같은 유사한 오류가 재현되지 않도록 신중한 위해성평가 설계가 이루어져야 할 것임. 이것은 규제담당자의 의사결정뿐만 아니라 첫단추가 잘못 끼워져 개발자의 막대한 위해성평가 예산이 낭비되는 것을 막는 역할을 하게 됨. 현재 우리나라에서 국가 연구개발 사업으로 진행되고 있는 위해성평가들이 적절한 가설에 근거하고 있는지 점검할 필요가 있음
- 3) 이러한 무생물적 스트레스 내성 GM 작물의 환경방출에 대한 특수성과 최근의 연구개발 및 상업화 진입등의 상황이 고려되어 바이오안전성의정서 당사국총회에서는 기술전문가 그룹 회의를 개최하여 무생물적 스트레스 내성 GMO에 대한 가이드라인을 개발 중에 있음. 본 연구에서는 당사국총회에서 현재까지 개발한 가이드라인을 분석하여 무생물적 스트레스 내성 GM 작물의 환경위해성평가에 대한 특성과 고려사항을 제시하고자 함

나. 무생물적 스트레스 내성 GM 작물의 환경위해성평가 특성과 고려사항

- 1) 무생물적 스트레스 내성 GM 작물의 위해성평가 시 '맥락과 범주' 부문과 로드맵 1단계의 보호목표, 평가종료점 파악 및 과학적으로 타당한 시나리오 확립이 특히 요구됨. 또한 새로운 특성과 수용환경간의 다중적 상호작용 및 격리포장 실험 설계의 필요성이 요구됨
- 2) 식물에서의 무생물적 스트레스 내성을 향상시키는 몇 가지 유전자 및 유전자 조합은 식물 스트레스 생리학에 대한 다면발현성 효과를 가질 수 있음. 예를 들면 가뭄, 기온, 염분 스트레스는 서로 관련이 있으며, 이러한 스트레스에 대한 식물 반응은 다중적 요소와 유전자를 공유함. 이러한 다면발현성 효과는 '비의도적 예측 가능한 효과'로 분류되며 위해성 평가 시 다른 스트레스 반응간의 교차검정에 대한 검토 및 역효과 유발 가능성을 평가함으로써 추론 가능함
- 3) 하나의 환경조건에 대해 식물의 스트레스 내성을 평가하고 스트레스 요인 (예. 가뭄, 홍수, 저온 및 고온, 염분 및 기타 유독성 이온 등)의 기간 및 주기를 포함한 가능한 변수의 적당한 범주를 파악해야 함. 이러한 변수들은 다음과 같은 경우에 난관이 될 수 있다. (i) GM 작물의 표현형 분석 및 위해성평가 자료 산출을 위해 포장 실험에서 이러한 조건들에 대한 조절/측정을 할 때, (ii) 외부적, 생리학적 한도 간 상호작용의 영향을 많이 받을 수 있는 GM 작물 자체의 표현형 정의
- 4) 무생물적 스트레스 내성 GM 작물들의 환경위해성평가에서 수행되어야 할 몇 가지 잠재적 역효과과 발생할 수 있으며 그 예는 다음과 같음. a) 의도된 환경 스트레스 내성 이외

- 의 환경에 유리한 다른 형질, b) 농경지에서의 지속력 및 자연 서식지로의 침입성 향상, c) GM 작물에 노출된 생물체에 대한 효과, d) 야생종 및 토착종으로의 유전자 이동
- 5) 이상의 무생물적 스트레스 내성 GM 작물들의 특징을 고려할 때 환경위해성평가를 위한 위해가설(시나리오)은 다음과 같이 정리할 수 있음
- 가) 획득된 내성 특성은 다면발현성 효과 등과 같은 GM 작물의 기타 내성의 영향력을 발휘할 수 있는 잠재력이 있는가?
- 나) 내성 특성은 GM 작물의 침입성, 지속성 및 잡초화를 증진시켜 기타 생물체, 먹이사슬, 서식지에 역효과를 야기할 수 있는 잠재력이 있는가?
- 다) 무생물적 스트레스 내성 GM 작물과 이종교배를 통해 생성된 GM 작물은 허용된 환경을 넘어서는 범주의 서식지 및 생태계를 변화시키고 지배할 수 있는 잠재력이 있는가?
- 라) 특정 스트레스 내성 GM 작물은 자연 환경에 대해 목표한 장점 이외의 다른 장점을 제공하는가?
- 마) 스트레스 내성 GM 작물은 환경에 어떤 영향을 미치는가?

다. 대조구 선택의 특성과 고려사항

- 1) 비교 대상 작물의 선택; 위해성평가의 첫 단계에서는 인체에 대한 위해성을 고려하면서 잠재적 수용환경에서의 생물 다양성에 역효과를 미칠 수 있는 GM 작물과 관련된 유전자형이나 표현형, 생물학적, 의도적 및 비의도적 변화에 대한 특성분석을 실시해야 함
- 2) 무생물적 스트레스 내성 GM 작물의 유전자형 및 표현형의 변화는 모본과의 의도적 및 비의도적 비교를 통해서 파악함. 실질적 동등성 비교는 GM 작물과 같은 시간 및 장소에서 재배되는 경우 실험비교를 위한 기준이 되며, 다른 환경에서 비 GM 작물을 관찰하는 범주에서의 비교 역시 기준이 됨
- 3) 무생물적 스트레스 내성 GM 작물의 위해성평가를 위한 적합한 실질적 동등성 선택 시에는 다양한 스트레스 요인과 기간 조건의 범위에서 새로운 특성 발현 평가 필요성을 고려해야 함. 무생물적 스트레스 내성 GM 작물이 스트레스가 없는 상황에 적합한 장점이 많은지를 평가하기 위해서는 비교 접근법이 사용되지만 재해의 잠재적 역효과 평가를 위해 추가 접근법(실질적 동등성) 역시 필요함
- 4) 위해성평가 실험 시 특별히 고려하여야 할 사항은 무생물적 스트레스 내성 특성 효과에 맞게 실험설계가 통제 가능한가 하는 것이다. 실험을 위해 스트레스 조건이 과하게 처리된 경우 비변형 GM 작물의 성장이 저지되거나 심각한 영향을 받을 수 있음. 이러한 경우 스트레스 내성을 지닌 비변형 근연종 등을 이용하여 실질적 동등성을 평가할 수 있음. 그러나 이러한 경우 통계 상 의미 있는 차이점을 파악하기 더욱 어렵게 할 수도 있음
- 5) 적합한 대조구가 없는 경우 무생물적 스트레스 내성 GM 작물에 대해 수용환경에서 새로운 유전자형으로서 특성분석을 해야 함. 현재 개발되고 있는 '전사체학'이나 '대사체학' 등의 '오믹스(omics)' 기술 정보는 차선 조건에서 재배된 식물들 간 비교를 통해 감지 불가능한 표현형 및 성분분석연구 (새로운 알레르겐 및 영양성분 생성)에 도움이 될 것임
- 6) 이상을 종합할 때 무생물적 스트레스 내성 GM 작물의 대조구 선택시 고려사항
 - 목적 스트레스 및 non-스트레스, 비 목적 스트레스 상화에서의 특성 비교
 - 하나 이상의 대조구 사용 및 실험 조건에서의 해당 대조구 사용 가능 여부

라. 스트레스 반응에 대한 비의도적 특성에 대한 고려사항

- 1) 무생물적 스트레스 내성 GM 작물은 생물적 또는 무생물체에 대해 다양한 저항성과 같은 특성을 획득하여 목적인 형질 외에도 다른 유리한 환경 적응 이점을 획득 할 수 있음. 예를 들면, 가뭄이나 염분 내성 GM 작물들은 비교적 높거나 낮은 재배온도에서 대조구보다 더 잘 견딜 것임
- 2) 무생물적 스트레스 내성이 향상된 GM 작물은 종자의 휴면, 생존력 및 발아력의 변화 등도 역시 발생할 수 있음. 특히, 무생물적 스트레스 내성 관련 유전자들이 생리학의 주요 단계에 관여하는 경우 이 유전자들의 변형은 다면발현성 효과를 가지게 될 것임
- 3) 스트레스에 대한 다양한 내성의 변화는 초식동물, 포식기생충 및 병원체와의 상호작용도 변할 수 있기 때문에 이 식물들과 상호작용하는 다른 생물체들에 직간접적으로 영향을 미칠 수 있음
- 4) 따라서 스트레스 반응에 대한 비의도적 특성에 대해 다음과 같은 사항을 고려하여야 함
 - 스트레스 조건에서의 의도적 또는 비의도적으로 발생하는 부정적 효과 유발 가능성
 - 생물적 스트레스 저항성의 변화 및 GM 작물과 상호작용하는 생물체 집단에 미치는 영향
 - 물질적 변화 (예. 독소, 알레르겐 및 영양분)에 의한 부정적 효과 발생 가능성

마. 격리포장에 대한 특성과 고려사항

- 1) 무생물적 스트레스 내성 GM 작물은 스트레스 조건에서 재배되기 때문에 유전자변형 작물의 환경위해성평가를 위한 시험 포장의 지역적 특성이 매우 중요함. GM 작물의 안전성평가는 모두 격리포장에서 수행되어야 하며, 격리포장은 GM 작물과 환경간의 상호작용 및 특성, 행동에 영향을 미치는 다양한 지역별 요인들에 대해 고려되어야 함
- 2) 또한 자료 수집 및 현장실습을 위해 선택되는 지역 및 장소들은 상업적 재배가 허용되는 경우 GM 작물이 직면할 수 있는 환경 조건, 농경 조건, 식물 건강 조건을 대표해야 함. 예를 들면, 식물군, 동물상, 토질, 토양화학, 농경기준, 기후 및 지리적 조건 등의 차이에 따라 다양한 방식으로 환경을 정할 수 있다. 지역적 수준 평가 시 잠재적 비의도적 효과 차이를 확실히 유발할 수 있는 농경기준과 기후 및 지리적조건 등 지역 관련 인자들은 위해성평가 초기에 결정되어야 함
- 3) 격리포장의 고려사항
 - GM 작물의 생물다양성, 기원지 및 유전적 다양성 근원과 관련된 지리적, 기후적, 생태학적 특성 정보 등을 포함한 잠재적 수용환경
 - 무생물적 스트레스 내성 GM 작물의 특성 및 행동에 영향을 미치는 다양한 지역별 인자(다양한 농경기준 및 농경구조(예. 질소 비료 사용), 다양한 경작체계(예. 무경운 농법), 다양한 윤작 기준, 다양한 기후 조건, 기타 스트레스 및 생물적 상황 및 비표적생물 발생 가능성 등)
 - 환경위해성평가 자료 산출을 위해 적합성 및 잠재적 수용환경의 다양한 지역별 인자들에 대한 대표성
 - 잠재적 수용환경에서 GM 작물과 이종교배 가능한 근연종들로의 유전자이동에 대한 영향
 - 스트레스 요인의 부재로 내성이 발현되지 않을 경우 GM 작물의 행동양식

바. 스트레스 내성 작물의 지속성 및 침입성 향상에 대한 고려사항

- 1) 기후조건, 수분공급 및 토양염분 등은 식물의 성장, 생산성, 확산 및 지속을 제한하는 인자들임. 무생물적 스트레스 내성 유전자의 발현은 농경지에서 GM 작물의 지속성을 향상시킬 수 있음. 이러한 유전자의 발현은 초기에 잠재적 수용환경으로 고려된 범주를 넘어서 자연환경에서 GM 작물의 확산 능력을 변화시킬 수도 있음. 예를 들면, 종자에서 ABA의 대사가 변화에 생길 경우 휴면 등 생리적 특성도 바뀔 수 있음. 따라서 가뭄 및 염분에 대한 내성을 갖도록 변형된 식물 종자는 추가로 겨울철 생존을 향상시키는 추위에 대한 내성 역시 가질 수 있음. 따라서 무생물적 스트레스 내성 GM 작물은 다양한 스트레스 상황에서 비변형 작물 및 기타 종들 보다 더 향상된 지속 잠재력을 가질 수 있음
- 2) 대부분의 내성은 주로 낮은 선발압 (예. 약한 스트레스 상황)에서 식물의 잠재적 지속성에 영향을 미칠 수 있는 에너지 비용인 관련 '대사비용'을 가질 수 있음. 대사비용은 환경에서 GM 작물의 장기적 생존 잠재력 및 지속성에 중대한 영향을 미칠 수 있으므로 농경지 및 자연 서식지에서 GM 작물의 지속력 평가 시 반드시 고려해야 함
- 3) 지속성 및 침입성 향상에 대한 고려사항
 - 자연환경에서의 GM 작물의 지속성 및 자연 서식지의 침입성 향상 결과
 - 잠재적 지속성 향상 시 가능한 통제 방법 및 타당성 검토
 - 종자휴면, 토양 속 종자의 지속성, 광범위한 환경조건에서의 발아성, 영양생장, 단기 수명, 종자 생산 및 종자 산포, 장거리 종자 산포 등 잡초화 관련 일반 특성에 대한 장기적 평가
 - 잠재적 수용환경에서의 GM 작물의 서식지 범주를 바꿀 수 있는 기후적 변화의 효과
 - GM 작물의 내성 발현으로 인한 농경기준 변화 여부

사. 스트레스 환경 및 생태계에 대한 영향에 대한 고려사항

- 1) 무생물적 스트레스 내성 GM 작물 개발은 자연 환경에서 작물들의 경작지 및 재배 범위를 확장시킬 것임. 따라서 먼저 경작지에서의 생물 다양성의 변화가 조사되어야 함
- 2) 또한 무생물적 스트레스 내성 GM 작물 재배는 생태계를 변화시킬 수도 있음. 예를 들면, 다양한 생태계에서 특정한 공생 해충을 확산시킴으로써 생태계를 변화시킬 수 있음
- 3) 생태계에 대한 영향에 대한 고려사항
 - 지리적 변화 및 경작지 확장
 - GM 작물 관련 농경 기준과 이 기준으로 인한 스트레스 환경 및 생태계 변화
 - GM 작물로 인한 농경기준 변화가 스트레스 환경에 미치는 영향을 예측하기 위한 예측 모델 사용 가능성

3. GM 유체와 잔디의 환경위해성평가 문제형성과 선택

가. 무생물적 스트레스 내성 GM 작물의 위해성평가 모델

- 1) 위해성평가의 관점에서 새로운 형질인 무생물적 스트레스 내성; 현재까지 전세계적으로 상업화되어 재배되고 있는 주요 GM 작물은 대두, 옥수수, 면화, 유채이며, 주요 형질은 제초제저항성, 해충저항성임. 최근 저온, 고온, 수분 및 염도 등과 같은 무생물적 스트레스에

내성을 갖는 GM 작물의 포장시험이 전세계적으로 수행되고 있으며, 한발내성 옥수수는 위해성심사가 거의 완료되었음. 무생물적 스트레스 내성은 새로운 형질로서 위해성평가와 심사에 새로운 도전을 주고 있음

- 2) 앞에서 언급한 바와 같이 위해성평가는 규제결정에 활용되어 도움이 되어야 함. 제1세대 GM 작물의 유전자이동성에 기인하는 잡초화 또는 생태계 침입성을 평가할 때 유전자의 이동 여부에만 집중하고 생태계 내에서의 교잡종의 선발과 지속성 등을 검토하지 않았던 것과 같은 유사한 오류가 재현되지 않도록 신중한 위해성평가 설계가 이루어져야 할 것임. 이것은 규제담당자의 의사결정뿐만 아니라 첫단추가 잘못 끼워져 개발자의 막대한 위해성평가 예산이 낭비되는 것을 막는 역할을 하게 됨. 현재 우리나라에서 국가연구개발사업으로 진행되고 있는 위해성평가들이 적절한 가설에 근거하고 있는지 점검할 필요 있음

나. 환경위해성평가를 위한 문제형성과 선택사항 평가

- 1) 새로운 형질의 위해성평가 모형을 개발하기 위해서는 기존의 제조저항성과 해충저항성에 잘 적용되었던 모형을 검토할 필요가 있음. 화합물의 환경위해성평가를 위한 모델이 미국 EPA에서 개발되었음 (그림2). 위해성평가의 중요한 초기 단계인 문제형성(problem formulation)은 보호할 가치(필요)가 있으며, 기능적으로 정의된 환경요소에 대한 평가의 종말점(endpoint)을 설정하고, 이들의 예상되는 환경적인 관계를 고려하여 가설을 설정하고, 이를 검증할 수 있는 분석계획을 수립하는 것을 의미함 (그림2). 2007년 Nelson과 Banker는 EPA 프로젝트로 수행된 문제형성과 선택사항에 대한 평가에 관한 핸드북 (Problem Formulation and Options Assessment Handbook(이하 PFOA)을 발간하였음. 본 연구에서는 PFOA를 분석하여 하여 정리하고 GM 유채와 벤틀그라스 및 비생물 스트레스 내성 작물의 환경위해성평가 가이드라인 개발에 적용하였다. 또한 이 문제형성과 선택사항에 대한 평가에 관한 핸드북을 번역서로 출판하여 관련 연구자에게 제공함으로써 안전성평가 연구에 활용할 수 있도록 하였음

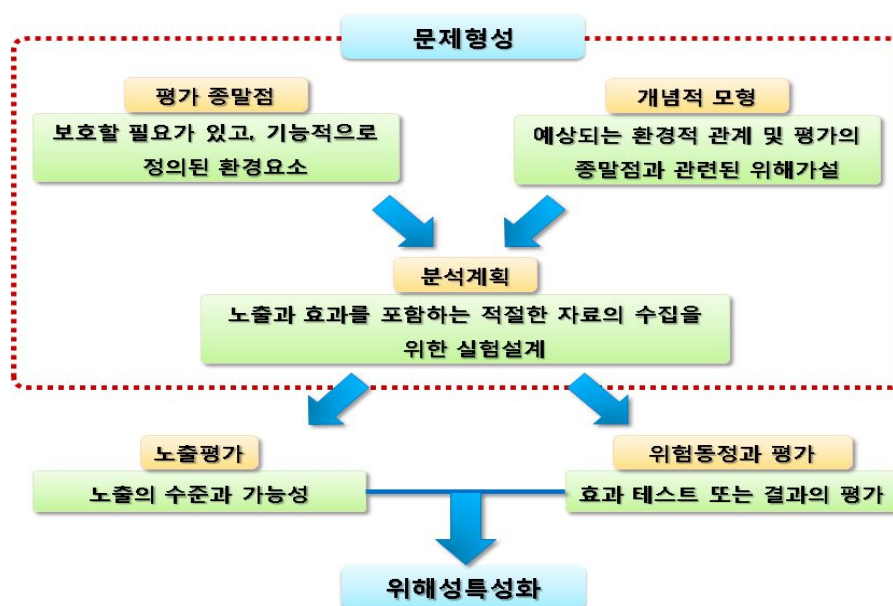


그림 2. (환경)위해성평가의 문제형성 과정 (US EPA, 1998)

2) 환경위해성평가에 대한 PFOA의 일반론

가) PFOA의 목표

- 문제 형성과 선택사항 평가는 신중한 문제 형성과 GMO의 생물학적 안전성에 대한 미래 대안의 비교 평가를 수행하기 위한 방법론임
- 미래 대안은 현재 존재하는 것의 자리에서 이행될 수 있는 사용가능한 선택사항으로 현재 존재하는 사항, 미래에 존재할 사항, 특별한 상황에서 고려될지 아닐지 모르는 미래에 존재할 수 있는 사항을 포함함
- PFOA 과정은 GMO가 고려되는 특수한 상황에서 가능한 위해의 파악과 감소, 잠재적인 이점의 증대를 이해관계자들이 협력적으로 분석하고 충고할 수 있게 도움을 주며, 이렇게 하기 위해서는 PFOA가 투명해야 하며, 모든 적절한 이해관계자들을 포함해야 하고, 최상의 이용 가능한 과학에 의해 합리적으로 정보가 제공이 되어야 함
- PFOA 과정은 GMO 평가의 어떠한 생물학적 안전성 프로그램의 평가에서 주요 부분으로, 이는 GMO의 제안된 사용에 의해서 잠재적으로 영향을 받는 모든 사람들을 평가에 영향력 있게 관여할 수 있도록 위해성평가 중앙에 모이도록 하는 독특하고 필수적인 것임
- 건전한 토론은 다양한 규모에서, 전면적인 규율하에서, 정책 수립자와 규제자 사이의, 이해관계자들 사이의 모임을 제공하며 이는 결정 과정 속에 결합된 공공 심의의 실행 수단에 과학에 바탕을 둔 분석을 제공함

나) PFOA 방법론

- PFOA 과정은 특정 브레인스토밍, 논의, 분석적 요소로 구성되어 있음. 이 부분은 PFOA 과정에 관련된 특정 단계와 상태를 간략히 보여줌 (그림 3)
- PFOA 단계들은 정통 위해성평가에 있는 단계에 동일하게 대응되지 않으며, 이는 각 나라들이 자신의 위해성 분석을 다르게 조직화하기 때문임

Figure 3.1: PFOA의 4단계

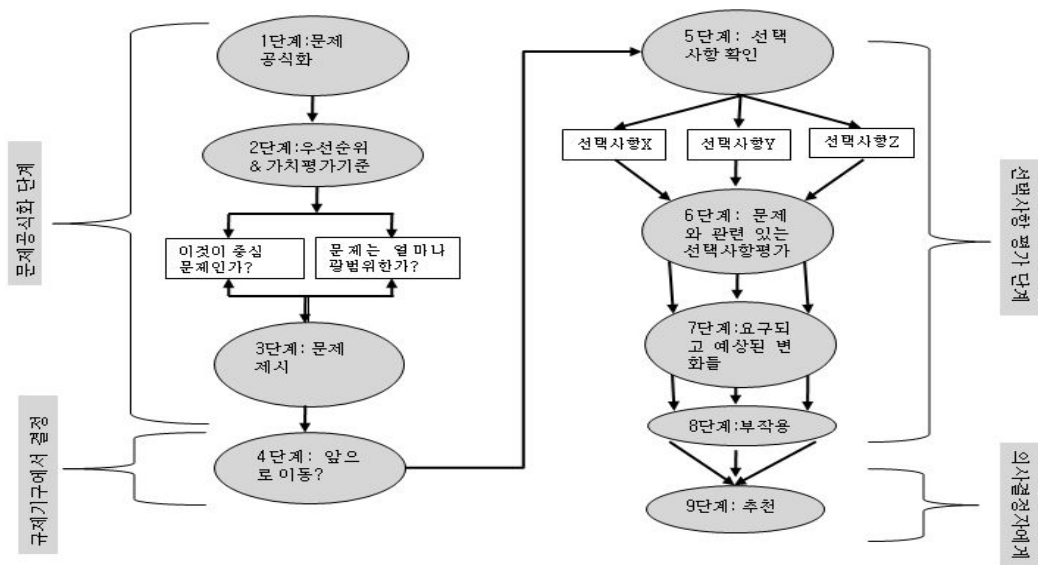


그림 3. PFOA의 단계

다) PFOA 과정 수행을 위한 필요한 정보

- PFOA는 환경위해성평가 과정에서 필요한 정보의 범위를 확장시킴
- 전통적으로, 환경위해성평가에서 사용되는 많은 양의 정보는 생물학, 생태학, 농경 과학, 사회 과학에 기반을 둔 정보의 고려, 특히 경제학에서 나옴. 그러나, PFOA에서 나타난 토의는 문화적, 정신적, 윤리적 정보와 같은 전통적인 환경위해성평가에서 드물게 간주된 정보 형태뿐만 아니라 사회 과학에서 더 많은 정보 기초를 포함하기 위해서 환경위해성평가에 필요한 정보를 넓히는 잠재력을 가지고 있음
- 어떤 정보가 PFOA에서 필요한 지, 정보가 어떻게 보유되는 지, 정보의 격차를 어떻게 파악할 것인지, 정보의 어떤 한계가 존재하는 지를 결정할 필요가 있음
- 필요 정보에 대한 초기 평가는 앞으로 진행할 때 PFOA를 통틀어 올려 피지는 중요한 역할을 담당함. 이것이 수행될 때, PFOA가 잘 진행되도록, 계획 단계에서 예상하는 잠재적 정보 요구로 가능한 한 많은 시간과 자원에 도움이 되어야 할 것임
- 그러나, PFOA가 시작하기 전에 파악할 수 있는 정보에 한계가 있고, 노력이 협력적으로 대응해야 한다는 것을 깨닫는 것이 중요함. PFOA에 대한 정보를 수집하는 것은 지속적인 과정이고 정보 요구는 계속적으로 토의 과정에서 그 자체를 보여줄 것임

라) GMO에 대한 고려 사항

- 기술로서의 GMO
- 식물이나 동물 종으로서의 GMO
- 농경 생태학적 체계 관점에서의 GMO
- 생태계 관점에서의 GMO
- 생산 체계 관점에서의 GMO
- 사회정치학적 체계 관점에서의 GMO

다. 가뭄저항성 GM 유채에 대한 문제형성

- GM 유채는 2010년 현재 전 세계적으로 6백만 ha에서 재배되고 있으며 GM 작물 중 콩, 옥수수, 면화에 이어 4번째로 많이 재배되고 있음 (ISAAA, 2011)
- GM 유채의 채택률은 23%로써 전 세계 유채의 약 1/4을 차지하며 캐나다, 미국, 호주, 칠레에서 재배되고 있음. 현재 재배되고 있는 GM 유채의 형질은 거의 대부분 제초제저항성임
- 제초제저항성 유채는 GM 작물 상업화 초기인 1996년부터 재배되어왔기 때문에 유채의 환경위해성에 대한 문제 및 논란은 새로운 작물에 비해 상대적으로 적을 수 있지만 가뭄 스트레스 내성 형질은 전 세계적으로 환경에 대한 장기적 영향평가가 수행되지 않았으며 (최근 몬산토사가 가뭄저항성 옥수수를 승인받음), 도입형질 상 환경생태계에서 야생종에 비해 유리하다는 특징이 있음
- 가뭄저항성 유채와 기존의 GM 콩, 옥수수, 벼 등과 비교할 때 국내 환경위해성평가에서 특히 고려되어야 하는 사항은 다음과 같음
 - 유전자 이동성 : 유채는 타가수분 비율이 콩, 벼 등에 비해 높은 편
화분이동은 풍매 뿐 아니라 충매 가능하며 국내에 교잡 가능 잡초 존재
 - 잡초화 가능성 : 유채 종자는 거의 휴면하지 않아 후년 자생가능성 높음
가뭄저항성 형질은 환경생태계에서 유리

- 유전자 이동성은 농민(특히 유기농업자) 및 환경단체 등이 매우 민감하게 반응하는 사항이며, 캐나다 및 일본에서 발생한 운송 중 낙곡에 의한 GM 유채의 자생 및 교잡 발생은 사회·정치적으로 중요한 이슈임. 이들 고려사항에 대한 가뭄저항성 유채의 환경위해성평가 문제형성 모델은 다음 표 3과 같음

표 3. 가뭄저항성 유채에 대한 문제형성

평가 종말점	<ul style="list-style-type: none"> • 교잡을 통한 가뭄저항성 잡초의 번성 • 잡초화를 통한 GM 유채의 번성
개념적 모형 (친숙성)	<ul style="list-style-type: none"> • 유채는 타가수분 비율이 높다 • 교잡가능 잡초가 존재한다 • 유채는 거의 휴면하지 않아 자생가능성이 높다 • 가뭄저항성 형질은 생태계에서 유리하게 작용한다
위해 가설	<ul style="list-style-type: none"> • 가뭄저항성 유채로부터 유전자이동을 통해 발생한 잡초는 환경생태계를 부정적으로 교란시키지 않을 것이다 • 가뭄저항성 유채는 자연 상태에서 식물군으로의 침입 및 이들 군집의 구조를 부정적으로 변화시키지 않을 것이다
분석 계획	<ul style="list-style-type: none"> • GM 유채의 화분비산 거리 및 화분활력 분석 • GM 유채의 타가수분 비율 및 다른 유채와의 교잡을 분석 • GM 유채와 교잡가능 잡초와의 교잡을 분석(잡초의 발생 시기에 따른 교잡 가능성 조사 필요) • 교잡 잡초의 경쟁력 분석 • GM 유채의 월동성 및 발아력 분석 • GM 유채의 잡초화 가능성 및 경쟁력 분석

라. 가뭄저항성 GM 벤투그라스에 대한 문제형성

- GM 벤투그라스는 유채와 달리 현재까지 전 세계적으로 상업화된 사례는 없는 실정임. 현재까지 개발된 GM 벤투그라스는 The Scotts Company와 Monsanto에서 공동 개발된 글라이포세이트 제초제 저항성 라운드업레디 벤투그라스가 있으나 이 벤투그라스는 2003년 4월 안전성심사서를 제출하였음에도 미농무부 동식물 검역소(USDA-APHIS)에서 승인을 보류하여 아직 상업화되지 않았음
- GM 벤투그라스 승인 지연의 가장 큰 원인은 화분 및 종자의 확산 문제임. Watrud 등(2004)은 제초제저항성 벤투그라스를 이용한 실험에서 화분에 의한 유전자이동이 바람에 의해 2 km까지 빈번히 발생할 수 있으며 최대 21 km까지 유전자이동이 발생한다고 보고하였음. 또한 Zaplola 등(2008)은 미국 오레곤주의 격리포장에서 수행된 4년간의 GM 벤투그라스의 확산에 대한 연구에서 종자에 의해 4.6 km까지 확산되는 것을 관찰하여 보고하였음
- 이러한 화분 및 종자의 장거리 확산 문제는 환경생태학적 안전성 확보에 있어 많은 큰 난관으로 작용됨

- 화분 및 종자의 확산을 포함한 GM 벤투그라스의 환경위해성평가에서 고려되어야 하는 주요 사항은 다음과 같음
 - 유전자 이동성 : 이중교배 가능
 - 품매를 통한 유성번식
 - 4배체의 염색체를 가짐으로 다양한 중간 잡종 생성 가능
 - 전 세계적으로 다양한 교잡 가능 잡초 존재
 - 개체 확산성: 유성번식 외에 포복경을 이용한 무성번식 가능
 - 종자가 가벼워(13,500 seed g⁻¹) 바람 및 물에 의해 장거리 확산 가능
 - 잡초화 가능성 : 종자 산포 후 바로 발아 가능(후년 자생가능성 높음)
 - 최소 4년간의 토양 내 휴면 가능
 - 다년생 식물
- 이상의 고려사항 들을 반영한 가뭄저항성 벤투그라스의 환경위해성평가 문제형성 모델은 다음 표 4와 같음

표 4. GM 벤투그라스에 대한 문제형성

평가 종말점	<ul style="list-style-type: none"> • 교잡을 통한 GM 잡초의 번성 • 종자 및 무성번식을 통한 GM 벤투그라스의 확산 • 잡초화를 통한 GM 벤투그라스의 번성
개념적 모형 (친숙성)	<ul style="list-style-type: none"> • 벤투그라스는 타가수분 비율이 높다 • 교잡가능 잡초가 존재한다 • 유채는 거의 휴면하지 않아 자생가능성이 높다 • 가뭄저항성 형질은 생태계에서 유리하게 작용한다
위해 가설	<ul style="list-style-type: none"> • 가뭄저항성 유채로부터 유전자이동을 통해 발생한 잡초는 환경생태계를 부정적으로 교란시키지 않을 것이다 • 가뭄저항성 유채는 자연 상태에서 식물군으로의 침입 및 이들 군집의 구조를 부정적으로 변화시키지 않을 것이다
분석 계획	<ul style="list-style-type: none"> • GM 유채의 화분비산 거리 및 화분활력 분석 • GM 유채의 타가수분 비율 및 다른 유채와의 교잡율 분석 • GM 유채와 교잡가능 잡초와의 교잡율 분석(잡초의 발생 시기에 따른 교잡 가능성 조사 필요) • 교잡 잡초의 경쟁력 분석 • GM 유채의 월동성 및 발아력 분석 • GM 유채의 잡초화 가능성 및 경쟁력 분석

4. GM 작물의 안전성심사

가. 국내 안전성심사를 위한 위해성평가 자료

- 국내 LMO의 안전관리는 농식품부, 보건복지부, 환경부 등에서 관리하며(그림 4), 외국의 위해성심사체계는 그림 5와 같음
- GMO의 안전성평가에 대한 승인은 LMO법 통합고시 별표 10-1(표 5)에 의거 농촌진흥청, 환경과학원, 수산과학원, 질병관리본부 및 식품의약품안전청에서 검토 후 결정함
- 각 검토기관은 협의심사를 진행하며 GM 작물의 경우 환경위해성은 농진청이, 식품안전성은 식약청에서 주로 담당함
- GM 작물의 환경위해성평가와 관련하여 농진청은 농업환경과 관련한 부분을 중점적으로 검토하며, 환경과학원은 환경방출 및 일반 생태계에 미치는 영향을, 수산과학원은 어류 및 해양 생태계에 미치는 영향을 중점적으로 검토
- 안전성평가 검토기관은 LMO법 및 통합고시를 기본으로 평가하나 세부적인 항목에 대한 승인기준은 매년 강화되고 있는 실정임. 이는 안전성평가가 과학적 데이터에 근거하고, 과학적 수준은 지속적으로 상승하기 때문으로 안전성평가를 수행하는 연구자는 각 심사기관의 승인 동향 및 심사 승인, 중점 검토사항 등에 대한 정보를 지속적으로 모니터링 하는 것이 필요함. 참고로 심사 승인 보고서 등은 각 기관 온라인 및 현장 방문을 통해 조회 가능



그림 4. 국내 LMO법상 안전관리 체계

구분	근거	심사 방법	비고
EU	<ul style="list-style-type: none"> • GM식품 및 사료에 대한 규정 1829/2003 	<ul style="list-style-type: none"> • EFSA에서 6개월 이내에 심사를 마치고 의견 제시 • 각료이사회, 집행위원회 등의 과정을 거쳐 최종 승인여부 결정 • 승인될 경우에는 각 회원국에 그대로 적용됨. 	<ul style="list-style-type: none"> • EFSA에서 인체/동물위해성 및 환경위해성 심사 모두 수행 • 재배용도가 포함될 경우에는 회원국에서 환경위해성심사 추가 수행
	<ul style="list-style-type: none"> • GMO의 환경방출에 대한 지침 2001/18/E 	<ul style="list-style-type: none"> • 처음 접수한 회원국 책임기관에서 위해성심사 수행 • 위해성심사 결과에 대하여 모든 회원국의 동의 필요 (모두 동의하면 승인여부 결정) 	<ul style="list-style-type: none"> • 동의하지 않은 회원국이 있을 경우에는 EFSA에서 이견부분에 대한 의견 제시 • 각료이사회, 집행위원회에서 승인여부 결정
미국	<ul style="list-style-type: none"> • 동물검역법 • 식물보호법 • 바이러스혈청독극물관리법 • 살충제살균제취약관리법 • 독극물관리법 • 식품의약품화장품법 	<ul style="list-style-type: none"> • 재배용(USDA) • 식용(FDA) • 사료용(FDA) • 살충·살균성분이 포함된 작물은 EPA의 심사 추가 	<ul style="list-style-type: none"> • LMO와 관련한 새로운 법. 제도를 제정하지 않고 기존의 법을 이용하여 위해성관리
한국	<ul style="list-style-type: none"> • 유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률 • 식품위생법 	<ul style="list-style-type: none"> • 농·임·축산·수산용(농식품부) • 산업용(지식경제부) • 보건의료용(보건복지부) • 환경정화용(환경부) • 해양용(국토해양부) 	<ul style="list-style-type: none"> • 농·임·축산·수산용(농식품부) • 산업용(지식경제부) • 보건의료용(보건복지부) • 환경정화용(환경부) • 해양용(국토해양부)
일본	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오안전성의정서이행을 위한 국내법 • 식품위생법 • 사료안전법 	<ul style="list-style-type: none"> • 공동으로 환경위해성심사 (환경성+농림수산성) • 식품용의 경우에는 인체위해성심사(식품안전위원회) • 사료용의 경우에는 동물위해성심사(농림수산성) 	<ul style="list-style-type: none"> • 의정서 이행법 시행 이전에 이미 승인받은 LMO의 경우(식용, 사료용)에는 유예기간을 두어 환경위해성 심사를 완료하도록 함.

그림 5. EU, 미국, 한국, 일본의 위해성심사체계 비교

표 5. LMO법 통합고시 별표10-1, 유전자변형생물체의 위해성평가자료

항목		검토기관					
		농촌진흥청	환경과학원	산업자원부	수산과학원	질병관리본부	식약청
1. 일반 자료	가. 개발의 목적	○	○	○	○	○	○
	나. 개발의 유용성 및 용도	○	○	○	○	○	○
2. 숙주에 관한 자료	가. 분류학상 위치 (학명, 일반명, 품종·계통명 등을 포함)	○	○	○	○	○	○
	나. 자연계에 있어서 분포 상황	○	○	○	○	○	○
	다. 인류에 의한 이용 내력 (국내외에서의 이용 상황, 재배(배양) 및 품종 개량의 역사 등 포함)	○	○	○	○	○	○
	라. 생물학적 특성	○	○	○	○	○	○
	(1) 자연환경 또는 자연환경을 반영하는 시험 조건하의 생존 및 생식·번식 능력	○	○	○		○	○
	(2) 생식 번식양식 주기 및 교잡성 (3) 자연생태계에서 다른 생물과의 상호작용(천적, 병원성생물, 경쟁자, 포식자 등) (4) 기타 유전적 특성에 관한 조항(유래를 포함) (5) 생식양식 및 다른 품종 또는 근연종과의 생식 호환성 (6) 산포(화분·종자의 산포 특성, 산포에 영향을 주는 환경요인)	○	○	○			
	<해양·수산용의 경우> (7) 수명(개체의 세대주기) (8) 자연서식처 (9) 야생 포식생물 및 피식생물 (10) 기생충과 경쟁자 (11) 공생자와 숙주에 대한 정보 (12) 생존에 미치는 환경요인과 치사값 (13) 성숙숙시기, 산란기, 잉란수 등 (14) 교배성공율, 자손의 생존력 (15) 호흡대사, 영양대사 (16) 표현형적, 유전자적 표식들 (17) 서식환경내 근연종 및 교잡가능한 동종의 존재				○		
	마. 유해 물질의 생산 가능성(근연종의 유해물질 생산가능성 포함)	○	○	○	○	○	○
	바. 숙주 및 근연종에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발성 보고 자료					○	○
	사. 병원성 및 외래인자(바이러스 등)의 오염여부	○	○	○	○	○	○
	아. 원산지 및 유전적 다양성의 중심지	○	○	○	○	○	○
	자. 기생성 등 기타 주요한 생리학적 성질	○	○	○	○	○	○
	차. 미생물인 경우, 병원성 존재 여부 또는 알려진 병원체와의 관련성에 관한 조사자료					○	○
	카. 잡초화(또는 야생형화) 가능성	○	○	○	○	○	○

항목		검토기관					
		농촌진흥청	환경과학원	산업자원부	수산과학원	질병관리본부	식약청
3. 공여 생물체에 관한 자료	가. 분류학상 위치 (학명, 일반명, 품종·계통명 등을 포함)	○	○	○	○	○	○
	나. 인류에 의한 이용 내력	○	○	○	○	○	○
	다. 생물학적 특성	○	○	○	○	○	○
	라. 유독 물질의 생산 가능성	○	○	○	○	○	○
	마. 공여생물체 및 근연종에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발성 보고 자료					○	○
	바. 미생물인 경우, 병원성 존재 여부 또는 알려진 병원체와의 관련성에 관한 조사자료					○	○
4. 운반체(vector)에 관한 자료	가. 명칭 및 유래 (GenBank Accession No. 등)	○	○	○	○	○	○
	나. DNA분자량	○	○	○	○	○	○
	다. 제한효소에 의한 절단지도(백터 내 유전적 요소, 위치, 방향성, 염기서열 등 포함)	○	○	○	○	○	○
	라. 유해 염기배열 등의 유무	○	○	○	○	○	○
	마. 운반체의 구성에 관한 정보	○	○	○	○	○	○
	바. 백터가 다른 세포로 전달될 가능성 또는 숙주의존성					○	○
	사. 중간 숙주 내 유전요소의 확인 및 기능					○	○
	아. 중간 숙주에 관한 자료					○	○
5. 도입 유전자에 관한 자료	가. 도입된 유전자의 기능(GenBank Accession No. 등) 및 특성	○	○	○	○	○	○
	나. 도입 유전자의 구성요소별 유래 및 염기서열 (1) 도입유전자의 크기, 명칭, 기능 (2) 조절인자(전사개시인자 및 종결인자) (3) 선발표지유전자 (4) 그 밖의 조절인자 및 DNA 기능에 영향을 주는 기타 인자	○	○	○	○	○	○
	다. 이용을 위하여 유전자를 변형한 내용	○	○	○	○	○	○
	라. 위해염기서열의 존재	○	○	○	○	○	○
	마. 완성된 백터내의 유전자염기서열 위치 및 방향성	○	○	○	○	○	○
	바. 외래전사해독 프레임의 유무와 그 전사 및 발현 가능성	○	○	○	○	○	○
	가. 유전자변형 방법(형질전환 방법)	○	○	○	○	○	○
6. 유전자변형 생물체의 개발에 관한 자료	나. 유전자변형 생물체의 개발 과정에 대한 설명 (재배, 배양, 육종법 등)	○	○	○	○	○	○
	다. 도입 유전자 표현형의 후대 안정성	○	○	○	○	○	○
	라. 개발에 사용된 물질에 대한 규격						○
	마. 개발 유전자변형 생물체의 보관 및 관리						○

항목		검토기관					
		농촌진흥청	환경과학원	산업자원부	수산과학원	질병관리본부	식약청
7. 유전자변형생물체의 분자생물학적 특성에 관한 자료	가. 유전자변형생물체의 도입유전자 확인 결과	○	○	○	○	○	○
	나. 유전자의 도입 위치 (염색체 또는 세포 미소기관) 및 주변염기서열	○	○	○	○	○	○
	다. 도입 유전자의 복제수	○	○	○	○	○	○
	라. 도입유전자의 검출 및 발현의 확인에 사용된 방법	○	○	○	○	○	○
	마. 안정성에 대한 자료 (1) 도입된 유전자서열 및 크기의 복수 세대 동안의 변화 (2) 도입된 유전자의 발현부위, 발현시기, 발현량에 대한 복수 세대 동안의 변화					○	○
	바. 유전자변형생물체 게놈에 도입된 유전자가 독소, 알레르겐을 암호화하지 않음을 증명하는 자료					○	○
	사. 유전자산물에 관한 자료 (1) 유전자산물의 형질 특성(단백질, 비번역 RNA 등) (2) 도입된 유전자의 단백질 생성 후 변이(post-translational modification) 여부 (3) 유전자산물의 기능 (4) 도입된 유전자 또는 도입결과 변화되는 표적 단백질의 발현정도, 발현시기, 발현위치 및 측정방법과 이의 민감도 (5) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향 (6) 선발표지유전자에 관한 구조와 기능, 저항성을 나타내는 기전 및 대사결과 생성되는 산물 (7) 유전자변형생물체의 검출 및 확인 방법				○	○	○
8. 유전자변형생물체와 비교 자료	가. 변형 후의 개선된 특성 및 성질	○	○	○	○	○	○
	나. 숙주와 유전자변형생물체의 생존 및 증식의 차이 비교					○	○
	다. 숙주 또는 숙주가 속하는 생물종과의 차이점	○	○	○	○		
	(1) 자연환경 또는 자연환경을 반영하는 시험 조건하의 생존 및 생식번식 능력	○	○	○	○		
	(2) 생식·번식양식 주기 및 교잡성						
	(3) 자연생태계에서 다른 생물과의 상호작용(천적, 병원성생물, 경쟁자, 포식자 등)						
	(4) 기타 유전적 특성에 관한 조항(유래를 포함)						
	(5) 생식양식 및 다른 품종 또는 근연종과의 생식 호환성	○	○	○			
	(6) 산포(화분·종자의 산포 특성, 산포에 영향을 주는 환경요인)						
	(7) 유해물질 생산 및 생태계 잔류 영향						
<해양수산용의 경우> (8) 수명 (9) 자연서식처 (10) 야생 포식동물 및 피식동물 (11) 기생충과 경쟁자 (12) 공생자와 숙주에 대한 정보 (13) 생존에 미치는 환경요인과 치사값 (14) 성숙숙시기, 산란기, 잉란수 등 (15) 교배성공율, 자손의 생존력 (16) 호흡대사, 영양대사 (17) 표현형적, 유전자적 표식들 (18) 다른 생물체와의 유전자 이동(잡종형성)에 대한 잠재성				○			

항목		검토기관					
		농촌진흥청	환경과학원	산업자원부	수산과학원	질병관리본부	식약청
9. 세부 위자 해 영향 자료	가. 유독 물질의 생성과 관련된 정보 (생물체가 분비하는 독성 물질의 여부 등)	○	○	○	○		
	나. 잡초화 가능성 관련 정보	○	○	○	○		
	다. 주변 생물 및 생태계에 미칠 수 있는 영향에 관한 정보	○	○	○	○		
	라. 유전자변형생물체를 도입하고자 하는 환경에 대한 정보 (1) 유전자변형생물체 원산지와의 거리 (2) 지리적, 기후, 주변 식물의 생태학적 특성에 관한 정보	○	○	○	○		
	마. 환경정화용의 경우 (1) 환경정화의 대상이 되는 특정 표적물질에 관 한 정보 (2) 표적물질이 숙주에 미치는 영향 (3) 표적물질에 대한 유전자변형생물체의 작용기 작 (4) 숙주와 유전자변형생물체가 표적물질 이외의 물질을 변화시킬 가능성 (5) 주변생태계(대기, 토양 및 수계)의 이화학적 특성에 대한 영향 (6) 유전자변형식물체의 대사산물이 먹이사슬에 서 농축됨으로 인해 다른생물체에 미칠 수 있는 영향		○				
	바. 해양수산용의 경우 (1) 개체군 증가로 먹이사슬 교란 및 생물종 다 양성 위협 (2) 야생 동종 및 근연종에 대한 경쟁적 위협 (3) 야생 동종 및 근연종의 유전자 pool로 도입 유전자의 이동 (4) 서식지확대 (5) 질병유발 및 전파 (6) 서식지 환경변화 및 물질순환 변화 (7) 기생충 또는 포식자에 대한 영향 (8) 기타 비의도적 영향				○		
	사. 유전자변형생물체의 병원성에 관한 자료(유전 자변형미생물인 경우) (1) 유전자변형생물체의 전염성 조사자료 (2) 유전자변형생물체의 감염량 조사자료 (3) 유전자변형생물체의 숙주범위에 대한 조사자 료 및 변이(alteration) 가능성 (4) 인간 숙주 밖에서의 생존 가능성 (5) 병원성 관련 벡터나 다른 전염 수단 존재 여 부 (6) 생물학적 안정성 (7) 항생제 저항성 (8) 군집(colonization) 가능성 (9) 독소생성능력					○	○

항목		검토기관					
		농촌진흥청	환경과학원	산업자원부	수산과학원	질병관리본부	식약청
9. 세부 영향 자료	아. 유전자변형생물체의 독성에 관한 자료 (1) 문헌자료 (가) 유전자산물 또는 이의 대사산물이 일으킬 수 있는 잠재적 독성 (나) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 독성 단백질과의 구조적 상동성 유무 (다) 작업자, 최종 이용자가 흡입, 섭취 등의 방법으로 유전자변형생물체에 노출되는 평균 노출량 산출 (2) 필요시 다음의 독성 실험자료 (가) 단회투여독성 (나) 기타 독성					○	○
	자. 유전자변형생물체의 알레르기성에 관한 자료 (1) 문헌자료 (가) 유전자산물의 잠재적 알레르기성 (나) 유전자산물 및 이의 대사산물 등과 이미 알려진 알레르겐과의 구조적 상동성 유무 (2) 필요시 알레르기성 관련 실험					○	○
10. 유전자변형생물체의 환경방출에 관한 자료	가. 환경방출에 대한 자료 (1) 방출 기간 및 일시 (2) 방출 장소(지리학적 특성, 지질학적 특성, 자연환경 보전지역 등 생물학적 중요 보호구역과의 관계) (3) 방출 생태계(방출지역의 근연종 등 생물체 종류 및 분포) (4) 방출 방법 (5) 방출 량 (6) 기존 방출인가 정보(인가국가, 인가일시, 인가번호) (7) 환경방출 실험의 관련 정보(실험구의 배치, 각 실험구의 방출 면적 등 실험설계서 및 종료 시 처리)		○	○	○		
	나. 포장시험 실적(농업용의 경우) (1) 종자용 유전자변형생물체에 해당하는 경우 (가) 실시시간 (나) 실시방법 (다) 실시규모 (라) 종료 시의 처리방법 (2) 원형상태의 식용·사료용·가공용 유전자변형생물체의 경우 (가) 실시시간 (나) 실시방법	○					
	다. 격리사육 실적(양식용의 경우) (1) 격리사육 기간 (2) 격리사육 방법 (3) 격리사육 규모 (4) 사육 종료시 처리방법				○		

항목		검토기관					
		농촌 진흥청	환경 과학원	산업 자원부	수산 과학원	질병관 리본부	식약청
11. 모니터 링, 폐기물 관리, 긴급 상황에 대하 자료	가. 모니터링 시행 계획(방법, 기간, 빈도)	○	○	○	○		○
	나. 유전자변형생물체의 불활성화 방법	○	○	○	○	○	○
	다. 긴급 상황 대응 계획(확산방지)	○	○	○	○		○
	라. 폐기물의 처리 방안	○	○	○	○	○	○
	마. 해양·수산용 유전자변형생물체의 경우 (1) 탈출방지 및 통제 (가) 탈출방지 밀폐시설의 명세 (나) 유전자변형수산생물체의 유출을 방지 또는 최소화하기 위한 절차와 방법 (다) 비허가자 및 외부 포식동물 등의 침입 통 제 절차와 방법 (라) 다른 생물체의 침입 통제 절차와 방법 (마) 불임화 등 위해성 저감 방법 (2) 모니터링 기술 (가) 효과적인 모니터링 방법 (나) 정상 개체와의 구별 특이성 및 모니터링 기술의 민감도와 신뢰성 (다) 다른 개체로 유전물질 전달시 검정 기술 (라) 모니터링의 기간과 빈도 (마) 보고체계 (3) 비상상황 발생시 계획 (가) 유전자변형생물체의 우연적, 고의적 방출 시 포획, 통제를 위한 절차 와 방법 (나) 방출에 의해 영향을 받은 지역의 격리 방 법 (다) 태풍, 폭풍, 화재, 홍수, 포식자 유입 등 절박한 비상사태시 계획 (4) 시행관리 계획 (가) 시설 점검과 유지 계획 (나) 감독인원 및 시설 작동기록의 점검계획 (다) 시설 및 실험현장에 대한 보완유지계획				○		
바. 유전자변형생물체에 의한 인체위해성이 있는 경우 (1) 적절한 예방법과 치료법 등의 존재 여부 및 이 방법을 적용한 임상자료 또는 동물실험 자료 (2) 유전자변형생물체에 대한 노출 및 이로 인한 위해여부를 확인할 수 있는 의학적 감시 방 법 (3) 작업자 등이 위해한 유전자변형생물체에 대 한 인체 노출을 피하기 위한 물리적인 차단 방법					○	○	

항목		검토기관					
		농촌진흥청	환경과학원	산업자원부	수산과학원	질병관리본부	식약청
12. 해외 인가 및 용 상황	가. 국가명 나. 기관명 다. 위해성평가기관 라. 인가번호 마. 인가자료 바. 이용 상황 등	○	○	○	○	○	○
	가. 농업용, 산업용, 환경정화용의 경우 유전자변형생물체 정성 및 정량 검정을 위한 유전자 염기서열 정보 및 표준시료 (표준 시료는 국가의 검역, 유통 감시업무에 활용할 수 있도록 종자당 등 원재료 상태로 제출) (1) 해당 유전자변형생물체와 숙주 생물체의 불활성 종자 각각 50종자 및 혼합시료 1kg (2) 영양체시 해당 유전자변형생물체와 숙주 생물체의 불활성 영양체 각각 50영양체 (3) 미생물일 경우 불활성 시킨 유전자변형생물체 일정량 제출 (4) 해당 숙주 생물체에 특이적이며, 제놈(genome)에 하나의 카피(single copy)로만 존재하는 내재유전자의 염기서열(sequence) 정보 (5) 해당 유전자변형생물체의 특이적 검출을 위한, 숙주 생물체의 제놈(genome) 유전자와 외래도입 유전자의 5' 및 3' 말단 부분과의 양 연결부위에 대한 염기서열(sequence) 정보 (6) 기타 분석방법 개발에 필요한 유전정보 등	○	○	○		○	
13. 표준품 제출	나. 해양·수산용의 경우 유전자변형생물체의 검정을 위한 유전자 염기서열 정보 및 표준시료(원재료 상태로 제출)-해양수산부 (1) 해당 유전자변형생물체와 숙주 생물체의 불활성 개체 각각 50개체 (2) 해당 숙주 생물체에 특이적이며, 게놈(genome)에 하나의 카피(single copy)로만 존재하는 내재유전자의 전체 염기서열(sequence) 정보 (3) 해당 유전자변형생물체의 특이적 검출을 위한, 숙주 생물체의 게놈(genome) 유전자와 외래도입 유전자의 5' 및 3' 말단 부분과의 양 연결부위에 대한 염기서열(sequence) 정보 (4) 기타 분석방법 개발에 필요한 유전정보 등				○	○	
	다. 보건의료용의 경우는 평가대상을 확인할 수 있는 분석정보에 대한 자료와 표준품						○

5. GM 유체의 환경위해성평가 가이드라인

가. 서론

- 앞장에서 언급한 문제형성과 LMO법 통합고시 별표 10-1에 의거하여 GM 유체에 대한 위해성평가 가이드라인 모델을 작성하였음
- 가이드라인은 식품안전성분야를 제외하고 유체에 대한 일반적 사항과 환경위해성평가와 관련된 부분을 중점으로 하였음
- 가이드라인 개발을 위해 제초제저항성 유채 및 해충저항성 옥수수, 해충저항성 벼, 한발 내성 옥수수 등의 안전성평가 심사서와 GM 유채 및 기타 GM 작물의 환경위해성평가 관련 논문 등을 참조하였고 국내 환경에 적합하도록 국내 유채관련 서적의 정보를 이용하였음
- 가이드라인의 제목 뒤에 관련 연구를 수행하는 연구자의 편의 도모를 위해 LMO법 통합고시 별표 10-1의 항목 번호를 기입하였으며 각 항목에 대해 연구자가 참고할 수 있도록 간단한 실험방법 등을 기재하였음
- 또한 별표 10-1에서 요구하는 일반적인 생물학적 특성 2항의 ‘숙주에 관한 자료’와 실제 안전성평가에서 수행하는 8항과 9항의 ‘유전자변형생물체의 변화된 생물학적 특성’은 서로 연관되어 있음 (2항을 기본으로 8항과 9항의 연구를 수행함)
- 따라서 본 가이드라인에서는 8, 9항에 2항의 기본 자료를 같이 제시하여 연구자가 응용하여 연구를 수행할 수 있도록 하였음

나. 원산지 및 유전적 다양성의 중심지(2-아, 9-다, 9-라, 10-나, 11-가)

1) *Brassica napus* 종의 특성

- 기원은 명확치 않으나, 가까이에서 자라고 있던 두 개의 이배체 종인 *B. oleracea*와 *B. rapa* 간의 자연적인 교잡이 이루어진 후, 우연하게 잡종의 염색체가 배가 되었던 것으로 추적할 수 있음
- 다른 계놈을 가진 두개의 종이 짝을 맺은 후, 잡종의 염색체 수가 두 배가 됨으로써 다배체(polyploidy)의 특별한 경우인 이중 이배체(amphidiploids)가 생산되었음
- 이렇게 두 배가 된 염색체 설정은 안정된 감수 분열(meiosis)을 하여 새로운 다배체를 재생산할 수 있게 했을 것이고 염색체가 두 배로 늘어나지 않는 교잡은 생식 능력이 없는 자손을 낳음
- *B. napus*에 대한 세포학 연구는 이것이 AA와 CC 계놈을 모두 가지고 있으며, 단일 계놈종(monogenomic species)인 *B. oleracea* (CC genome)와 *B. rapa* (AA genome)에서 추출된 이중 이배체라는 것을 보여주었음 (Mizushima, 1980)
- 이러한 교잡/ 염색체 증가 현상은 *B. napus*의 경우에만 나타날 가능성이 큰데 그 까닭은 이것의 기원 중심이 지중해 지역에 따로 떨어져 있기 때문이며 *B. napus*와 *B. juncea* 모두 공통적으로 *B. rapa* AA 계놈을 가지고 있음

2) *B. napus*는 종의 교잡

- *B. napus*는 좋은 자가 수정이 가능하기 때문에 현장 조건에서 *B. napus*의 개별 식물들 사이에 어떤 교잡이 일어나기는 해도 1차적으로는 자가 수분이 일어남 (Huhn and Rakow, 1979; Rakow and Woods, 1987)
- 화분은 끈적거리는 성질이 있고 일차적으로 식물들 사이의 접촉을 통해서 물리적으로 이동

하거나 곤충에 의해서 이동됨. 현장 조건 하에서 *B. napus*와 성적으로 수정이 가능한 경작 종은 다른 종의 *B. napus*와 *B. rapa*, 그리고 *B. juncea*임

- *B. carinata*, *B. oleracea*, *Sinapis alba* syn *B. hirta* 및 *B. tournefortii* 등과 같은 몇몇 야생 겨자종(wild mustard species)은 현장 조건에서 *B. napus*와 교잡을 할 때 자손을 생산하기 위해 거세(emasculation)나 인공 수분 등과 같은 인공 단계를 필요로 함 (OECD, 1997)

3) *B. napus*의 지리학적 근원

가) *B. oleracea*의 지리학적 근원

- *B. oleracea*의 야생형은 아관목 (작고, 줄기 하부는 나무의 특성을 가지고 상부는 초목의 특성을 가진 관목식물)의 다년생으로 그리스 지중해 해안부터 스페인과 프랑스의 대서양 해안을 거쳐, 영국의 해안, 독일의 Helgoland 섬까지 자생하고 있음 (Snogerup 등, 1990)
- 전형적으로 야생종은 방목으로부터 보호되는 석회암 지대, 회질층 절벽에서 발견되었음
- 어떤 개체는 종종 자갈지역에서의 절벽 아래에서 발견되고 거기에서 그 식물은 다른 수목에 둘러싸여서 성장함
- 일부 군집은 가파르게 경사진 목초지에서 발견된다. Helgoland에서 군락은 트인 암석지대에서 발견되었음
- 유럽과 북미 지역의 순화된 종은 경지외부에서의 자생군집이 아니라 탈출 개체라고 보고되었으며 *B. oleracea*는 현재 북미 지역에 도입되어 재배중임

나) *B. rapa*의 지리학적 근원

- 야생 *B. rapa*(아종 *sylvestris* L.)는 ssp. *rapa*(재배용 순무품종)과 *oleifera*(순무)에서 유래된 종으로 알려져 있다. 유럽, 러시아, 중앙아시아, 극동지역에서 자연 서식하고 있으며, 이 중 유럽이 기원 중심지로 알려져 있음
- 아시아와 극동지역의 생태형이 아프가니스탄의 개별 근원에서 발생했으며 후에 동쪽 지역으로 이동하여 *B. rapa*가 우점종이 되었다는 주장이 있으며 Prakash와 Hinaka(1980)은 *oleiferous B. rapa* 아종이 유럽과 아시아의 두 장소에서 발달되었다고 주장하였음
- 일반적으로 *B. rapa*는 해안가 저지대, 고원 산간지방(깊은 계곡 또는 산악지대의 경사면), 고산지대, 뾰족한 연산에서 발견됨. 최근에 도입된 캐나다에서는 경작된 땅, 경지, 정원, 도로변, 황무지 등에서 발견됨 (Warwick and Francis, 1994)

다) *B. montana*의 지리학적 근원

- *B. napus*의 선조 종인 *B. montana* 또한 아관목 다년생 식물, 스페인과 북부 이탈리아의 지중해 해변에서 기원한 종임 (Snogerup 등, 1990). 일반적으로 석회암 절벽(cliff), 암석, 벽(wall) 등에서 발견되며, 때때로 경작지에서도 발견됨
- 비록 일반적으로는 해안지대와 암석 지대에서 발견됨에도 불구하고 해발 1,000 m의 고원 내륙지대에서 발견된다는 기록이 있음
- 엽록체와 미토콘드리아 DNA의 분석을 통해 제시된 최근의 연구는 *B. montana* (n=9)가 *B. rapa*와 *B. oleracea*의 세포질의 기원이 되는 원형(prototype)에 가깝다는 사실을 밝혔음 (Song and Osborn, 1992)
- 유럽에서는 도로변, 황무지, 경작지, 부두, 도시, 마을, 강둑 등에서 통상적으로 발견되는 황색의 겨울형이 우세하며 영국의 유체가 재배되는 지역에서는 그곳의 자연에 적응함 (naturalization)

- 상대적으로 최근에 도입된 캐나다와 미국에서는 잡초, 산포 또는 경작지에서의 자생 등이 보고되었음 (Munz, 1968, Muensher, 1980).

다. 잡초화(또는 야생형화) 가능성(2-카, 9-다, 10-나, 11-가)

- *B. napus*는 일반적으로 잡초화 특성이 없음. *B. napus*는 Rollins가 전염성 잡초(pestiferous weed)로 기록하지 않은 유일한 자연산 Brassica임 (1981)
- *B. napus*는 분위 25°-49° 사이에 위치한 아시아, 유럽 및 북미에서 심각하거나 주요한 일반적인 잡초로 등록되지 않았음 (Holm et al., 1991). 핀란드(북위 60°)와 케냐(북위 5°에서 남위 5°사이)에서만 일반적인 잡초로 등록되어 있음. *B. napus*는 세계 어디에서도 심각하거나 주요한 잡초가 아님 (Holm et al., 1991)
- 국내의 경우 국내에 자생하는 국내잡초와 외국에서만 발생하는 해외잡초가 있는데, 양자 사이에는 국내에 들어와 이미 정착 야생화 되었다고 농업과학기술원에서 새로 발견한 미기록 외래 잡초 22종을 합하면 277종에 이른다고 보고되었음 (이한규, 1995). 우리나라의 관련 문헌을 검토한 결과 카놀라를 잡초로 간주하지 않는 것으로 나타났음
- *Brssica napus* 종자는 토양 특성 내에서 남아서 이어지는 곡물 재배 주기에 자생 식물을 생산할 수 있음. 그러나 기계적인 경작을 통해서 자생 유채 식물의 만연을 줄일 수 있음

라. 도입 유전자 표현형의 후대 안정성(6-다)

- GM 작물의 도입유전자로부터의 형질 발현 비율은 일정하게 3대 1로 분리되어야 함. 이와 같은 분리 비율은 삽입유전자 삽입체가 멘델 방식으로 유전이 되는 단일의 우성 유전자로서 작용한다는 것을 입증하는 것임. 표현형과 멘델 방식의 유전은 상업용 육종 프로그램에서 여러 세대 전반에 걸쳐서 일관성 있게 이루어져야 함
- 여러 세대 식물의 앞에서 나온 DNA의 분석은 모본의 게놈 DNA 속으로 한 개의 단일 지역에서 유전자가 삽입된 것을 Southern blot을 통해 확인함 (2 copy 이상인 경우 도입된 모든 도입유전자를 다 확인하여야 함). 도입된 표현형이 한 개의 우성 멘델 특성으로 유전되었음을 보여주는 유전 데이터를 통해서 단일 삽입체의 존재를 확인함. 또한 여러 세대를 대상으로 사본의 수와 안전성을 알아보기 위한 분자 분석을 수행해야 함
- 또한 여러 세대에 걸쳐서 그리고 다양한 환경 내에서 표현형적으로, 유전적으로 안정적이라는 것을 명확히 입증하기 위해 다음과 같은 연구가 필요함
 - 도입된 유전자들이 동일한 염색체 위치에서 유지된다는 것을 입증
 - 세대간 도입 형질을 나타내는 단백질 발현의 변화가 없음을 입증
 - 세대간 도입 형질의 특성이 손실 없이 유지됨을 증명
 - 다양한 환경 조건, 유전적 배경 안에서 도입 형질의 특성이 확인됨을 증명
 - 다른 품종과 자가 수분하거나 여교잡한 이후에도 도입 형질 특성이 단일 유전자의 멘델 식 유전 형태로 유전되는 것을 입증 (도입 유전자 분리와 안전성을 확인하기 위한 카이제곱 분석을 수행)

마. 변형 후의 개선된 특성 및 성질(8-가)

- 유전적으로 개선된 작물, 특히 곡물에 대한 식품 및 사료 안전성 평가 프로그램의 설계는 동물과 인간 영양에 있어서 이 곡물과 곡물 산물들의 사용에 대한 자세한 이해를 요구함

- 유채는 주로 동물 사료와 인간 식품 성분으로서 사용을 위하여 가공되며 기본적으로 식용 유는 인간이 소비하는 유일한 형태인 반면, 열처리한 카놀라 박분(heat-processed canola meal)은 단백질이 풍부한 가축의 사료로만 쓰이며 인간은 소비하지 않음 (OECD, 2001)
- 카놀라 박분을 함유하는 혼합동물 사료의 주요한 용도는 가금류, 돼지 및 목축 산물로 유채에서 추출되는 주요한 식용식품인 기름은 무시할만한 탐지 불가능한 수준의 단백질을 함유함. 이것은 오일 및 셀러드유, 셀러드 드레싱, 쇼트닝, 마가린 등에서 사용되며 현재 캐나다, 일본, 미국 등지에서 중요한 식용유로 사용되고 있음 (OECD, 2001)
- GM 유채의 식품 및 사료 안전성을 평가하기 위해 GM 유채와 이에 해당하는 대조식물을 실험재료로 하여 광범위한 성분 분석을 실시함. 모든 계통에서 나온 종자의 성분 분석 (% 단백질, 지방, 회분, 수분함량, 식이섬유, 탄수화물 및 칼로리 계산)을 실시하고 지방산 및 방향성 아미노산인 tryptophan, phenylalanine 및 tyrosine 등을 비롯한 아미노산에 대한 분석을 실시함. 또한 항영양성분(glucosinolates, sinapine, 및 erucic acid)에 대한 분석도 실시하며 정제유, 탈취유, 표백유 및 구운 박분(meal)들에 대해서도 추가의 성분 분석을 실시함
- 실험을 실시한 유채 생산 지역은 다양한 식생과 생육조건을 가진 다수지역을 선택하고 여러 해에 걸쳐 시행되어야 하며, 실험이 이루어진 장소와 연도에 대해 자세히 기술해야 함. 이렇게 나온 정리된 결과들을 통해 GM 유채와 모품종은 성분에 있어서 실질적인 차이가 없다는 것을 보여주어야 하며 유채 종자 중 항영양소 수치 (glucosinolate, sinapine, phytic acid 및 erucic acid)는 현재 상업용 카놀라에서 확인되는 수치 이하인 것을 확인해야 함. 더불어 영양학적 동등성을 닭, 쥐, 메추라기 및 송어 등의 실험을 통해 입증
- 성분 및 영양소 함량에 대한 이런 결과는 GM 유채가 일반적인 유채만큼 안전하고 영양이 풍부하다는 것을 확인시켜줄 수 있음. GM 유채 곡물과 기름에서 나온 가공 식품은 도입 유전자 단백질을 제외하고는 상업적으로 판매되는 유채 품종과 성분적으로 동등하다는 것을 증명해야 하며, 더욱 중요한 점은 유일하게 사람이 섭취하는 카놀라유에서 도입 유전자에 의한 단백질이 탐지 불가능하다는 것임. 열가공 과정은 농장 동물의 소비에 사용되는 유채 곡물에 들어있는 도입유전자에 의한 단백질을 불활성화 시킴
- 주요영양성분, 항영양성분 및 미량원소에 대한 분석의 예는 다음의 표 6~표 18을 참고할 수 있음. 표의 '품종X'는 GM 유채를 의미한다. 영양성분에 있어 GM 유채가 대조구와 의미 있는 차이가 나타나더라도 일반 유채의 주요품종과 OECD에서 제시하는 일반품종의 범위를 제시하여 실질적 동등성을 주장 할 수도 있음

표 6. 주요영양성분에 대한 동질성 비교

주요영양성분	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
수분, % fw ^a						
조단백, % dw ^b						
지방, % dw						
회분, % dw						
조섬류, % dw						
탄수화물 ^c , % dw						

표 7. 단백질 함량에 대한 동질성 비교 (연도별)

표본 (연도)	Mean (평균)	Range (범위)	Number of Samples (표본수)	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
품종X (00년도)						
대조구 (00년도)						
품종X (00년도)						
대조구 (00년도)						

표 8. 아미노산 조성 분석 비교 (% to total protein)

아미노산	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
alanine						
arginine						
aspartic acid						
cysteine						
glutamic acid						
glycine						
histidine						
isoleucine						
leucine						
lysine						
methionine						
phenylalanine						
proline						
serine						
threonine						
tyrosine						
valine						

표 9. 지방 함량 분석 비교 (연도별)

표본 (연도)	Mean (평균)	Range (범위)	Number of Samples (표본수)	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
품종X (00년도)						
대조구 (00년도)						
품종X (00년도)						
대조구 (00년도)						

표 10. 지방산 조성 분석 비교 (상대적인 %)

지방산	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
C16:0						
C16:1						
C18:0						
C18:1						
C18:2						
C18:3						
C20:0						
C20:1						
C20:2						
C22:0						
C22:1						

표 11. 섬유질, 회분, 수분, 탄수화물의 근사치 분석 비교 (연도별)

분석	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
% Fiber	00년도					
	00년도					
% Ash	00년도					
	00년도					
% Moisture	00년도					
	00년도					
% Carbohydrate (by calculation)	00년도					
	00년도					

표 12. Alkyl Glucosinolate 함량 분석 비교

시료 (연도)	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
00년도						
00년도						

표 13. Indolyl Glucosinolate 함량 분석 비교

시료 (연도)	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
00년도						
00년도						

표 14. Thiolalkyl Glucosinolate 함량 분석 비교

시료 (연도)	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
00년도						
00년도						

표 15. Glucisinate Profile 분석 비교 (연도별)

Glucisinate	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
ALKYL	00년도					
	00년도					
Allyl	00년도					
	00년도					
3-Butenyl	00년도					
	00년도					
4-Pentenyl	00년도					
	00년도					
2-OH-3-But.	00년도					
	00년도					
2-OH--Pent.	00년도					
	00년도					
THIOALKYL	00년도					
	00년도					
4-MeSbut.	00년도					
	00년도					
4-MeSpent.	00년도					
	00년도					
INDOYL	00년도					
	00년도					
3-meInd	00년도					
	00년도					
4-OHInd	00년도					
	00년도					
ARYL	00년도					
	00년도					
4-OHBenzyl	00년도					
	00년도					

표 16. Sinapine과 Phytic Acid 함량 분석 비교

분석	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
Phytic Acid %DW						
Sinapine (00년도)						
Sinapine (00년도)						

표 17. Erucic acid 함량 분석 비교

분석	p value	대조구	품종X	동등성검정	일반범위	
					주요품종	OECD
Erucic acid (00년도)						
Erucic acid (00년도)						

표 18. 연도별 조성 분석 비교

Canola 구성요소	00년도 평균		00년도 평균	
	RR	Conventional	RR	Conventional
A. Oil (dry basis)				
Protein (dry basis)				
Saturated fatty acid				
% total fatty acids				
Erucic acid				
% total fatty acids				
B. glucosinoltes				
Micromoles/gram of meal				

바. 숙주와 유전자변형생물체의 생존 및 증식의 차이 비교(8-나)

- GM 유채와 모품종의 생존 및 증식의 차이를 비교한다. 특히 가뭄에 대한 저항성 GM 유채의 경우 제한된 관개조건하에서의 생리 및 생식 데이터를 제시해야 함
- 또한 가뭄 저항성 유채의 포장시험에서 가뭄 저항성 유전자 삽입에 의한 다면적인 영향으로 기인할 수 있는 차이 및 가뭄저항성 유채와 숙주 간에 농업적 형질 혹은 생식적 특성들에 있어서 차이가 나타나는지를 확인하여 제시하여야 함

사. 숙주 또는 숙주가 속하는 생물종과의 차이점(8-다)

1) 자연환경 또는 자연환경을 반영하는 시험 조건하의 생존 및 생식·번식 능력

- GM 유채의 생태적 상호작용 평가에서는 변화된 유해화 가능성에 관한 특이적인 생태적 위해성을 평가하기 위해 자료를 수집함. 평가에는 네 가지 일반적인 자료 범주가 포함 : 1) 농경학적 특성, 2) 발아, 휴면, 출현 3) 생식생장(화분특성 포함) 4) 식물의 종자 잔존 5) 해충, 질병과 식물의 상호작용. 평가된 특성의 개요는 실험을 통해 제시함
- 생태적 상호작용 평가는 친숙성 개념(OECD, 1993)을 지침으로 하여 유채 생산 및 평가에

정통한 과학자들이 실시한 실험실 실험과 포장연구를 통합한 자료에 기초함. 각각의 평가에서, 규제대상 품목인 GM 유채는 GM 유채와 유전적 배경이 유사하나 가뭄저항성 형질이 포함되지 않은 적절한 관행 유채(대조구)와 비교함

- 가뭄저항성 번식 특성은 유채가 가뭄에 대한 저항성이 전달된다는 점 이외에 유전자의 도입이나 암호화된 도입유전자에 의한 단백질로 인해 농경학적 특성 (형태학, 성장 발달, 해충에 대한 민감성 또는 농경학적 곡물 관리 제도에 대한 변형된 반응) 상에 생물학적으로 유의적이고 의도되지 않은 결과를 초래한다는 관찰이 발견되지 않아야 함
- 몇 가지 지표에서 유의적인 차이가 관찰되더라도 이러한 차이가 매우 경미하거나 실험이나 시험 품종들을 걸쳐서 어떤 일관된 경향을 나타내지 않으며 전통 유채 품종들에 대한 정상적인 생물학적 변이성 범위 이내에 드는지 주시해야 함
- 따라서 모품종의 유전형에 대해서 예상되는 값의 범위(변이성)를 정확하게 반영하고 GM 유채에 대한 신뢰성 있는 비교가 가능하게 하기 위하여 여러 지역에서 데이터를 수집해야 함
- GM 유채와 대조구의 번식 양식과 관련된 농업적 특성을 비교하기 위하여 격리포장에서 재배시험을 수행함. 여러 해에 걸쳐 다양한 지역의 격리포장에서 GM 유채와 대조구를 함께 표준재배법으로 재배함
- 농업적 특성 평가를 위해 출수기, 간장, 수장, 수수, 수당립수, 등숙비율, 천립중, 등숙비율, 수량을 조사하여 유의적 차이 유무를 확인함. 추가실험을 통한 화분의 크기, 모양, 생명력에 있어서 GM 유채와 대조구간의 유의적 차이를 보이는지 확인이 필요함
- 모든 시험 환경 내에서 이루어진 관찰을 근거로 하여 GM 유채와 대조구사이에는 목적형질에 대한 차이 외에 어떠한 표현형적 차이가 없으며 이와 같은 결론을 통하여 성분에 있어서도 차이가 없다는 자료로서 입증할 수 있음

2) 생식·번식양식 주기 및 교잡성

가) 생식·번식양식 주기

- 화분 생산력과 생육 능력 및 자가 수분 화합성은 산출량으로 알아볼 수 있기 때문에 GM 유채와 대조구와의 생식, 번식 등의 주기를 비교하기 위하여 연도별 출수기를 분석하여 유의성 있는 차이를 보이는지 알아보고, 형태학적 특성 결과와도 유의성을 확인함

나) 생식능력

- 생식능력 비교는 다음과 같은 실험으로 조사할 수 있음
- GM 유채와 대조구를 격리온실에서 재배하여, 개화성기의 일정 시간에 슬라이드글라스 위에 개약된 화분을 털어 놓고 화분의 발아배지를 스포이드로 집적하여 생식능력을 분석할 수 있음. 수집된 화분의 직경과 발아율 및 화분 활력을 조사함
- 화분 활력 조사시에는 50% 이상 화분 활력을 잃는 시간과 발아력이 거의 상실하여 수정이 불가능할 때의 시간 등도 조사함

다) 교잡성

- 유채는 자가수분과 교차수분에 능숙한 충매화이다. 각각의 꽃이 많은 양의 화분을 만들어 이웃 꽃들과 외부 화분 경쟁을 하는 개화 작물이므로, 밀씨의 수정은 보통 자가수분에서 유래됨. 그러나 대략 30% 정도의 수준으로 인접한 식물들과 이종교배가 일어날 수 있음. 이종교배 수준은 화분매개충의 가능성, 품종, 날씨에 의존하여 변화함

- GM 유채의 화분비산 거리를 분석한 실험에서는 GM 유채로부터 non-GM 유채로의 화분비산에 의한 평균 타가수분율이 1.5, 3.0, 4.5m 범위에서 0.012~0.029%로 GM 유채는 모두 4.5m 이내에서 교잡이 이루어졌음
- 화분비산에 의한 유전자 이동은 GM 유채의 재배면적, 풍속, 대기 온·습도 및 햇빛 등에 따라 달라지므로 연구 결과는 연구자 및 지역 간에 차이를 보일 수 있으나, GM 유채로부터 6m까지의 평균 타가수정율은 0.005~0.046%의 미미한 수준에 머무르는 것으로 보고되었음 (Timmons, 1995).

3) 자연생태계에서 다른 생물과의 상호작용(천적, 병원성 생물, 경쟁자, 포식자 등)

가) 포장의 곤충상 비교

- 곤충에 의한 피해 증상은 때로는 전염성인 병해와 비슷해서 구별이 어려움. 곤충이 피해를 입힌 식물체는 물리적인 피해뿐만 아니라 곤충이 만들어내는 독성물질에 의한 생리적인 피해를 입기도 함. 포장에서 식물체에 직접 입히는 피해를 막는 것도 중요하지만 수확 후 저장 시 입는 피해에 주의를 기울여야 함.
- 곤충의 입으로 잎이나 줄기, 뿌리를 씹음으로써 피해를 입히는 것으로는 화분딱정벌레, 바구미, 뿔벼룩잡충, 진딧물, 나방이나 나비의 애벌레 등이 있음. 유묘기 때가 가장 피해를 입기가 쉽고, 때로는 자란 식물체도 피해를 입기도 한다. 구멍을 뚫어 유채의 줄기나 관부 속으로 올라가 먹거나 생식함으로써 피해를 입히는 곤충으로서는 나방이나 나비 애벌레 종류가 있고, 식물체에서 즙액을 흡입함으로써 피해를 주는 곤충은 진딧물 등이 있음. 저장 곡물에 구멍을 뚫는 피해는 바구미와 곡물 딱정벌레 등에 의해서 발생함
- 유채의 가장 큰 피해를 주는 해충은 화분딱정벌레 (pollen beetle), 종자 협 (seed-pod), 바구미 (weevil), 뿔벼룩잡충 (flea beetle) 및 진딧물 (aphis) 등이며 이들 곤충에 대한 실험실 조건 및 포장 조건에서의 GM 유채와 대조구 간의 곤충상을 비교 조사하여 GM 유채가 곤충상에 영향을 미치지 않음을 입증하여야 함. 주요 곤충에 대한 특징은 다음과 같음
 - Cabbage Aphid(진딧물) *Brenicoryne brassicae* L. : 진딧물 (aphid)은 유채에서 가장 많이 발생하며, 감염의 심각함보다 감염의 시기와 관련하여 가끔은 피해정도에 차이가 있음. 배추 진딧물은 유채에 아주 보편화된 해충이지만, 심하게 공격을 받으면 어떤 해에는 개개의 식물체는 물론 식물 집단에게도 피해를 줌. 드물게, 감염되는 조건이 아주 좋을 때는 수량손실이 많이 생기기도 하며, 북아프리카, 에디오피아, 남아메리카, 인도, 중국 및 오스트레일리아에서도 발견되고 있음
 - 화분딱정벌레[Pollen(Blossom)Beetle *Meligethes aeneus* F.] : 화분딱정벌레 (pollen beetle), *Meligethes* spp.는 일반적으로 더 온화한 기후에서 유채 작물에 아주 지독한 해충들이며, *Meligethes aeneus*는 특히 유채에 피해를 준다. 화분딱정벌레는 유채의 일반화된 해충이지만, 겨울유채에서는 봄 이른 시기부터 딱정벌레가 산란하지 못하므로 화뢰 형성시기에 별 피해가 없어 중요하지 않으며, 봄에 파종하는 유채에는 피해가 큼
 - 작은날벌레 (Brassica Pod Midge *Dasineura brassicae* Winn.) : 작고 검은 작은날벌레 (black midge)는 협(pod)내에 자신의 알을 산란하기 위해 바구미 굼벵이가 뚫고 들어간 구멍을 통해 들어감
 - 기타해충 : 그 외 중요 해충에는 팔태충 (Reticulated Field Slug *Deroceras reticulatum*, Mul Grey Field Slug *Deroceras agreste* L.), 딱정벌레와 바구미 (Cabbage Stem Flea Beetle, *Psylliodes chrysocephala* L.), 바구미 (Turnip Gall Weevil *Ceutorhynchus*

pleurostigma Marsh)가 있다.

나) 병원성 생물에 대한 영향

- 병원성 생물에 대한 영향은 주로 병을 유발하는 진균 및 세균, 바이러스에 대한 조사를 통해 평가
- 유채에서 문제되는 병충해로는 균핵병이 가장 무서운 병해이며, 간혹 발생하는 병으로는 흰가루병이 있음. 유채에 발생하는 병의 종류는 많으나 우리나라에서는 가을에 파종하여 저온 가뭄기간 동안에 재배하므로 병이 많이 발생하지는 않음. 우리나라에서 유채에 발생하는 병으로서는 균핵병, 노균병, 뿌리혹병, 검은점무늬병, 흰가루병, 잿빛곰팡이병, 잎잘록병 등임
- 따라서 이들 병에 대해 GM 유채와 대조구 간에 주요 병 발생정도 비교, 주요 병원균을 이용한 유묘의 감수성 검정, 병원균으로의 유전자 전이여부 조사 등을 수행하여 GM 유채와 대조구 간에 유의적 차이가 없음을 입증하여야 함
- 병원균으로의 유전자 전이여부 조사는 인위적으로 위에 언급한 병원균을 일정한 간격으로 반복 접종 한 후 PCR 검정을 통하여 분석하는 방법으로 조사할 수 있음
- 국내 유채에 발생하는 주요 병원균에 대한 설명은 다음과 같음
 - 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*, Stem Rot/White) : *Sclerotinia* stem rot(white mold로 알려진)는 유채(canola), 완두(pea), 콩(bean), 해바라기(sunflower), sweet-clover 및 광엽 잡초를 포함한 많은 종류의 광엽식물을 가해함. 따뜻하고 습도가 높은 날씨에 매우 급속도로 퍼지며, 만약 개화하는 동안 감염이 일어나면 상당한 손실이 야기. 유채에서 수량감소는 재배포장에서 감염된 비율에 따라 상당한 차이가 있음. 예로서, 포장에서 감염비율이 20%일 때 수량은 10% 감소. *Sclerotinia*는 유채를 밭에서 이어짓기할 경우 가장 피해가 큰 병해로 특히 봄철 개화기에 비가 자주 오고 대기습도가 높은 때 많이 발생하는데 제주도과 같은 유채 전작 이어짓기 지대에서 수량에 큰 영향을 주는 병해임
 - 흰가루병(*Peronospora parasitica*, Downy Mildew) : Downy Mildew는 *Peronospora parasitica* (Pers.) Fr.로 곰팡이에 의해서 야기. 스웨덴과 폴란드에서는 유채에 많은 피해를 주는 병의 하나. 독일과 영국에서는 유묘기와 기본 영양생장기에 아주 심하게 피해를 받기도 하며. 가을이나 봄에 감염이 잘되며 감염이 되어 병이 심해지면 수량이 10-15% 감소하기도 함
 - Stem Canker(줄기 암종병) 또는 Blackleg (*Phoma lingam* (Tode ew Schw.) Desm. *Leptosphaeria maculans*) : Stem canker(줄기 암종병)은 유채를 재배하는 곳에서 폭넓게 퍼지며, 유채의 가장 중요한 병의 하나. 발병과 피해는 계절과 품종에 따라 다양. 유채의 가장 큰 병은 blackleg인 *Leposphaeria maculans* Desm. (syn. *Phoma lingam*)로 이 병은 종자와 바람이 전염 매개가 되며 상식화된 포자들이 감염이 되지 않은 지역까지 옮길 수 있음
 - Dark Leaf and Pod Spot(검은점무늬병) *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. : 검은점무늬병은 유채 재배의 지역에 많이 발생하는 곰팡이 병의 하나. 이 병의 발병은 습도가 높은 시기에 많아지며 방제도 어려워짐. 협(pod)이 형성될 때 습도가 높고 따뜻한 날씨가 지속되면 병이 발생하며 심각한 수량감소가 생기기도 하며 프랑스, 남부독일, 폴란드, 영국 및 캐나다에서 검은점무늬병은 유채의 주된 곰팡이 병의 하나
 - Clubroot(뿌리혹병) *Plasmodiophora brassicae* Wor. : 뿌리혹병(clubroot)은 많은 Brassica 작물들을 가해하는데, 이것은 *Plasmodiophora brassicae* Wor에 의해서 야기. 이

병은 전 세계에 걸쳐 중요하리만큼 다양하고, 유럽과 중국 등지의 Brassica 채소의 대규모 생산지에서 특별하게 피해를 나타내기도 함

- Grey mould(젯빛곰팡이병) *Botrytis cinerea* Pers.-*Botryotinia fuckeliana* : Grey mould (젯빛곰팡이) 병은 어디에나 있는 (ubiquitous) 흔한 것 중의 하나. 유채에서 발병은 습기가 많은 시기에 문제가 됨
- 기타병해 : 모잘록병(damping-off)이라고 부르는 병 또는 부제증(foot rot)은 *Pythium* spp.인 *Phytophthora cryptogea*와 *Thanetophorus cucumeris*의 병원균에 의해서 야기. 그들은 유채가 서있는 상태에서 아주 중요한 병. 피해의 정도는 지역적으로 다양한 특별한 병원균과 특수한 지역의 품종의 저항성에 따라 다르며 주된 증상은 유묘기의 줄기 하부에 검은 부패(black rot), 어두운 갈색 부패이며, 줄기의 수축(constriction)을 야기시키기도 한다. 혹독한 공격에도 생존한 유묘들은 식물체로서 발육에 장애를 받고 종자 수량이 거의 힘들게 됨. 인도에서는 경제적인 측면에서 중요한 병이고, 지역종(local race)의 대다수에도 심각한 병이 되기도 함

다) 토양미생물에 대한 영향

- 토양미생물에 대한 영향은 GM 유채 재배 시 주변 근권의 토양미생물에 미치는 영향 여부 구명을 통해 조사 할 수 있음.
- GM 유채와 대조구의 포장 및 pot에서 채집한 근권의 세균, 방선균, 사상균의 균수 측정 및 미생물유래 인지질지방산(phospholipid fatty acids, PLFA), 토양 DNA의 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)를 이용한 군집구조를 분석
- 토양미생물에 대한 영향 중 하나로 GM 작물 도입유전자의 토양미생물로의 수평유전자이동 여부 조사가 요구됨. 토양 속에 있는 대부분의 DNA는 분해되지만 일부분은 토양에서 여러 달 동안 잔존하게 되는데, GM 작물의 DNA도 이러한 과정을 통해 토양으로 유출되고 존속. 따라서 토양에 노출된 유리 DNA의 지속성 여부가 유전자 변형 작물의 안정성 판단에 지표가 됨. 즉 유출된 형질전환 작물의 DNA가 뉴클레아제에 의해 신속히 분해되면 토양미생물로 유입이 극히 희박해지지만, 반대로 DNA가 토양에 오랜 기간 남아 있다면 형질전환 가능성은 높아짐. 비록 현재까지 수평유전자이동은 최적화된 실험실 조건에서만 발견되었을 뿐 자연환경 조건에서는 발견되지 않았지만, 국내 심사에서 관련 데이터가 요구되고 있는 실정임

라) 생식양식 및 다른 품종 또는 근연종과의 생식 호환성

- *Brassica napus*는 환경조건에 따라 다양한 이종교배를 할 수 있는 종. 포장에서의 이종교배 실험은 8m 이하의 인접한 케놀라 식물에 25% 정도로 전달되는 것을 보여줌. *Sinapsis arvensis*, *Brassica campestris*, *Brassica nigra*의 온실 또는 야외 시험에서는 이종교배가 발견되지 않았음. *B. napus*는 30% 확률로 이종 교배를 하며, 잠재적으로 *B. rapa* (oliseed rape, Polish Canola, turnip, rutabaga), *B. juncea* (brown mustard, Indisn mustard), *B. carinata* (Ethiopian mustard), *B. nigra* (black mustard, Diplotaxis muralis (sand rocket, stinking wall rocket), *Raphanus raphanistrum* (wild radish), *Erucasturmgallicum* (dog mustard)등이 대상이 될 수 있다고 알려져 있음 (표 19). *B. napus*와 *B. adpressa*, *B. nigra*, *Sinapsis arvensis*, *Raphanus raphanistrum*와의 이종 교배는 일어나지 않는 것으로 보고된 바 있음. *Diplotaxis*와 교배할 가능성은 극히 낮은데, 식물이 개화하기 전에 일어나기 때문임. *B. carinata*와 *B. oleracea*와의 교배도 또한 불가능한 것으로 알려져 있으며 그

이유는 야생에서 없는 품종이며, 상업적으로 재배된 경우도 없기 때문임

- *Brassica napus*는 *Brassica rapa*, 다른 주요 유채종, 때에 따라 캐나다 서부에서 자생하는 잡초와도 교배한다고 알려져 있음. *B. juncea*와의 교잡이 일어난다는 것이 야외 실험에서 밝혀졌음. 많은 *Brassica napus* 교잡종은 야생종에 비해서 번식력이 떨어지고, 삽입유전자의 특성을 잃어버리는 것으로 보고되고 있음

표 19. 다양한 *Brassicaceae* 종과 *B. napus* 간의 경지 조건에서의 이종간 교배

Pollen recipient	Field hybrids produced?	Fertility of hybrids
<i>B. napus</i>	yes	normal
<i>B. rapa</i>	yes (0.7-3.3%)	<10% viable
<i>B. juncea</i>	yes (0.1-0.3%)	<10% pollen viable
<i>B. nigra</i>	yes (extremely low numbers)	male sterile
<i>B. oleracea</i>	no	na
<i>B. carinata</i>	no	na
<i>B. adpressa</i>	yes (extremely low numbers)	mostly sterile
<i>Raphanus raphanistrum</i>	no	na
<i>Sinapsis arvensis</i>	no	na
<i>Erucastrum gallicum</i>	no	na
<i>Diplotaxis muralis</i>	no	na

마) 산포 (화분 종자의 산포 특성, 산포에 영향을 주는 환경 요인)

- 유채의 탈립성에 대한 특성 중 하나가 성숙한 종자의 꼬투리(장각과)가 분쇄되어 손실되거나 퍼져 나가는 것임. 낫질(swathing)과 같은 농업 관행은 수확이전 종자의 손실을 막기 위해서 일상적으로 사용하는 방법이지만 어느 정도의 종자 손실은 피할 수가 없음. 분쇄 현상으로 인한 손실은 꼬투리의 성숙도 정도에 영향을 주는 환경적 요소들, 수분함량, 수확 전 재료의 물리적 교란 등에 크게 의존함
- *Brassica* 종자는 광범위한 분산을 촉진하는 특이한 현상이 없기 때문에 (바람에 흩날리거나 동물의 털에 붙지않음) 탈립된 종자는 원래의 현장 가까운 곳에 계속 머물게 됨. 성숙한 채 분쇄되어 떨어졌던 종자는 여전히 생육 능력을 유지할 수 있어서 수확 이후에 발아할 수 있기 때문에, 그 다음 해에 나타난 자생 식물을 계수하는 방법으로 종자의 탈립 정도를 측정. 다음 현장 재배철에 나타나는 자생식물은 종자의 탈립 결과일 뿐 아니라 수확시점에 우발적으로 옆질러지거나 다른 메커니즘들에 의한 것일 수도 있다. 따라서 자생 식물을 계수하는 것은 파손된 종자 수 보다 더 많이 나타날 수 있으며 잠재적 침입성(potential invasiveness)이라는 주요한 문제를 제기하는 것이기도 하다.
- 탈립 측정 실험 예 : 연도별로 다양한 식생의 시험 지역에서 종자의 탈립에 인한 분실정도를 직접 측정한다. 모든 지역에서 유채가 익기 시작할 때 재배 계획에서 동시에 채집용 그릇을 배치하는 방법으로 종자 탈립정도를 측정한다. 대조구에 대한 비율로 나타냄. 일부 지역에서 유의적인 차이가 발생하였다면 부정적인 기후 조건이 악영향을 미쳐 번이성을 더 증가시켰는지, 다른 지역에서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았는지 확인할 필요가 있음. 수년간의 모니터링 결과를 토대로 종자확산에 있어서 중요한 요인 중 하나인 탈립성은 GM

유채와 대조구 사이에는 차이가 없으며 모든 지역에서 나온 평균값에서 통계적인 유의성이 없다는 것을 증명할 수 있어야 함.

- 자생식물의 수 측정 실험 예 : 유채 종자는 토양에 남아 다음 곡물 회전 시점에 자생 식물을 생산할 수 있음. GM 유채를 수확하였던 지정 시험 지역에 그 이듬해에는 다른 작물(밀, 보리, alfalfa 등)을 심거나 그냥 빈 상태로 남겨 둔 뒤 GM 유채의 발생을 측정. 자생식물이 관찰되면 자생식물의 빈도수 및 GM 유채와 대조간의 번식력 차이 등을 조사. 또한 기계적 경작 등을 이용한 자생 GM 유채의 만연을 줄일 수 있는 방법 등을 제시

아. 잡초화 가능성 관련 정보(9-나)

- *B. napus*는 북미에서 잡초 식물이 아니며 Weed science Society of America (1989)가 작성한 Weeds of the United States (Lorenzi and Jeffrey, 1987)에도 등록되어 있지 않음. *B. napus*은 Rollins(1981)가 유해성 잡초로 기록하지 않은 자연화된 유일한 *brassica*이며, *Brassica*는 잡초화의 유해성을 가지고 있지 않는 것으로 보고되어 있음 (Federal noxious Weed Regulation, 7 CFR 360). *B. napus*은 미국, 캐나다, 멕시코 또는 유사한 위도 범위 즉 북위 25°에서 49° 상에 위치하는 유럽이나 아시아 국가에서 심각하거나 주요하거나 일반적인 잡초로 등록되어 있지 않음 (holm et al.,1991). 핀란드 (북위 60°)와 케냐 (북위 5에서 남위 5°사이)에서만 일반 잡초로 등록되어 있지만, *B. napus*는 세계 어디에서도 심각하거나 주요한 잡초로 등록되어 있지 않음 (Holm et al., 1991).
- 국내 잡초 중에는 오래전부터 국내에 자생하는 국내잡초와 외국에서만 발생하는 해외잡초가 있는데, 양자 사이에는 국내에 들어와 이미 정착 야생화 되었다고 농업과학기술원에서 새로 발견한 미기록 외래 잡초 22종을 합하면 277종에 이른다고 보고하였음 (이한규, 1995). 우리나라 밭에서 발생하는 주요 잡초는 크게 하계(夏季) 작물포장과 동계(冬季) 작물포장으로 나누어 볼 수 있는데, 이 중 하계 작물포장의 잡초는 봄이나 초여름에 발생하여 여름에 최고 생장을 한 후 가을에 결실하여 주로 여름작물의 재배 시에 발생. 온대지방의 발생잡초는 특히 이 부류에 속하는 것이 많음. 이러한 잡초의 종자는 겨울을 지나면서 자연적으로 휴면되어 봄이나 초여름에 발생하여 고온다습한 온대 몬순 기후에 잘 적응한다. 콩을 포함한 하계작물에 가장 많이 발생하는 잡초는 바랭이, 쇠비름, 피, 깨풀 등이고 다음으로 개비름이며 다년생잡초로는 메꽃, 썩 등을 들 수 있다. 일반적으로 바랭이가 우점하는 곳에서는 쇠비름이나 깨풀 등의 발생이 억제되다가 바랭이가 방제되면 이들이 많이 발생하므로 이들의 방제도 필수적 임(김길웅 등, 최신 잡초방제학원론, 2003).
- 국내 밭에 발생하는 주요 잡초는 표 20과 같으며 우리나라의 관련 문헌을 검토한 결과 유채를 잡초로 간주하지 않는 것으로 나타남

표 20. 일반적으로 국내의 밭에 발생하는 잡초

구분	잡초명	학명
화본과	뚝새풀	<i>Alopecurus aequalis</i> Sobol. Var. <i>amurensis</i> (Kom.) Ohwi
	메귀리	<i>Avena Fatus</i>
	바랭이	<i>Digitaria ciliaris</i> (Retz) Koeeler
	좀바랭이	<i>Digitaria timorensis</i> (Kunth) Balansa
	개기장	<i>Pacum bisulcatum</i> Thumb
	강아지풀	<i>Setaria viridis</i> (L) P. Beauv
광엽잡초	자기풀	<i>Aeschnome indica</i> L
	어저귀	<i>Abutilon theophrasti</i> Medic
	깨풀	<i>Acalypha australis</i> L
	개비름	<i>Amaranthu lividis</i> L
	쑥	<i>Artemisia princeps</i> Pampan. Var. <i>orientilis</i> (Phampan.) Hara
	메꽃	<i>Calystegia japonica</i> (Thunb.) Chois
	냉이	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L) Medicus
	명아주	<i>Chenopodium album</i> L. var. <i>centrorubrum</i> Makino
	망초	<i>Erigeron Canadensis</i> L.
	식뜨기	<i>Equisetum arvense</i> L
	토끼풀	<i>Trifolium repens</i> L

○ 비록 유체가 잡초로 분류되진 않지만 GM 유체의 경우 새로운 형질을 획득하였으므로 잡초화 가능성에 대한 조사가 제시되어야 함. GM 유체의 잡초화 가능성에 대한 자료는 종자의 탈립성 및 자생력, 휴면(월동성) 및 경쟁력 분석 등의 방법으로 조사 될 수 있음. 만약 GM 유체가 가뭄저항성의 형질을 갖았다면 생존력+가뭄에 대한 적응력에 대한 분석도 제시되어야 함. 이 중 GM 유체의 종자 탈립성 및 자생력 조사는 앞선 ‘종자의 산포’ 부분에서 언급한 바와 같음

- 휴면(월동성) 분석

- ① 종자 휴면은 종종 잡초로 간주되는 식물과 연관된 중요한 특성이므로(Anderson, 1996; Lingenfelter and Hartwig, 2003) 밭아 및 휴면에 관한 정보는 식물의 증가된 잡초화 가능성을 평가할 때 유용함
- ② 종자가 성숙된 후 분쇄 및 탈립으로 인하여 수확 이후에 현장에 남겨진 소량의 종자가 이후에 밭아를 할 수 있음. 하나의 식물로써 GM 유체의 월동 능력에 대한 모든 관찰 결과는 이것이 대조구 및 현재 사용 중인 다른 유체와 동등한 방식으로 행동한다는 것을 나타냄
- ③ 월동성 조사는 다음과 같은 방법으로 조사될 수 있다.

매물기간별, 매물깊이별 밭아율 측정 실험 예 : 유체 종자가 비의도적으로 유출될 경우를 대비하여 수확과정에서 탈립된 유체 종자가 매물심도 및 기간별로 밭아되는 양상과 월동조건에 따라 생존할 수 있는지를 조사하기 위하여 실험을 수행함. 수확과정에서 탈립된 GM 유체가 경운과정에서 토양 속에 매몰되어 연속적으로 밭아될 수 있으므로 매물기간을 여러 수준(매물 후 6, 12, 24개월 등)으로 하여 시험을 실시. 수

확시기가 지역별로 다를 수 있으므로 3회에 걸쳐 매몰할 필요도 있음. 매몰조건은 GM 유채와 대조구를 대상으로 종자를 각각 리터백에 200립씩 넣어 실험에 사용함. 매몰조건은 깊이별로 땅을 판 후 망사자루를 땅속에 묻고 흙을 덮음. 발아실험은 시기별로 매몰 깊이별로 회수한 유채 종자를 25°C 항온기에서 실시함. 이때 매몰 깊이는 최대 20cm까지, 매몰기간은 3-5년 정도 조사할 필요가 있음

- 경쟁력 분석

- ① 경쟁력 분석은 GM 작물에 도입된 형질에 의해 대조구에 비해 경합우위를 나타내는지를 조사하는 것임. 만약 GM 작물이 대조구에 비해 경쟁(경합)력이 우수할 경우 생태계에서 우점하여 번성할 가능성이 제기될 수 있음. 비록 GM 유채가 대조구에 비해 경합우위를 나타내더라도 다른 잡초와의 경쟁력 분석 등을 통해 잡초화 가능성에 대한 최종 결정을 내려야 함

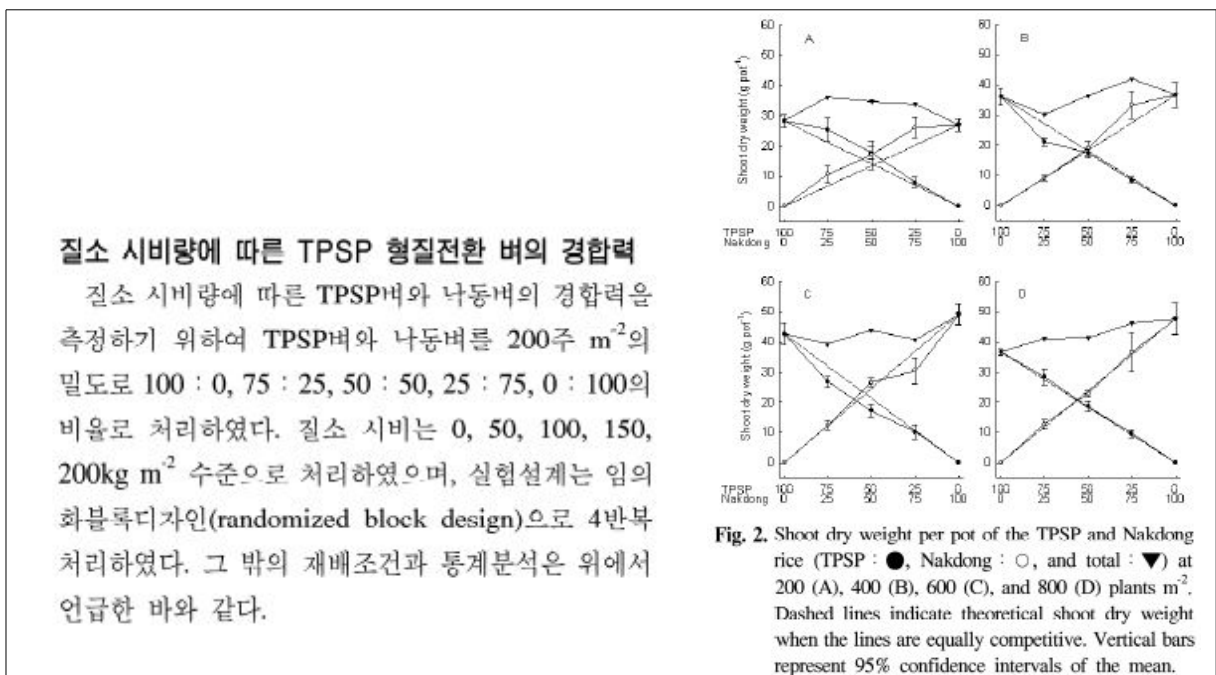


그림 6. GM 벼에 대한 경쟁력분석 방법 및 결과(박기웅 등, 2007)

자. 주변 생물 및 생태계에 미칠 수 있는 영향에 관한 정보(9-다)

- 주변 생물 및 생태계에 대한 영향은 크게 식물, 동물, 미생물, 곤충, 어류, 조류 등 비표적 생물체에 대한 평가로 이뤄질 수 있음. 비표적 생물체란 GMO가 표적으로 하는 대상 이외의 모든 생물종을 일컫음. 예를 들면 해충저항성 Bt 벼의 경우 방제하고자하는 흑명나방 및 조명나방 등이 목적 생물체이며 그외의 모든 생물이 비표적 생물체가 됨. GMO의 안전성평가는 비표적생물체에 미치는 영향이 non-GMO인 대조구와 비교하여 상대적으로 상동성을 보여야만 함. 비표적생물체에 대한 영향 평가는 모든 생물종을 대상으로 하는 것은 불가능하기 때문에 실험에 용이한 모델생물종 및 GMO와 관련된 생물 (천적, 병원성 생물, 경쟁자 및 포식자 등), 멸종위기종 등에 대해 주로 수행함
- 비표적 생물체 평가에 대한 대상 생물의 선정과 관련하여 현재 각 심사기관에서 가이드라인 등이 개발되고 있으므로 관련 심사기관의 정보 수집 및 지속적인 모니터링이 연구자에게 요구됨

차. 유전자변형생물체를 도입하고자 하는 환경에 대한 정보(9-라)

1) 유전자변형생물체 원산지와의 거리

- 상업성을 갖는 유채는 십자화과(*Crueiferae*)의 한 속(genus)인 *Brassica*의 종으로부터 얻어진다. *Brassica*에는 약 160종이 있으며, 주로 1년생과 2년생 초본이다. *B. napus*는 Argentine rape, swede rape, colza로 알려져 있는데, 이들은 특수한 품종들에 의존하여 여름 또는 겨울 유채로 명명되는 것에 우선함. *B. napus*는 진정으로 야생의 형태로 존재하는지는 불분명하며 유럽에 기본적으로 제한되어 있음. *B. napus*는 조상종들의 야생형이 균형을 지니면서 지중해 지역에서 파생된 것으로 보임. *B. napus*의 기름종자 생산은 중세에 유럽에서 시작되었으며 19세기에 아시아에 소개되었음
- 현재 중국과 일본의 유전자원은 토착의 *B. rapa* 종과 유럽의 *B. napus*간 교잡에 의해서 개발되었으며 우리나라의 재배내력은 확실하지 않지만 1643년에 발간된 산림경제에 [운대]라는 이름으로 기록되어 있음. 우리나라에서 기름생산을 위해 본격적으로 재배된 것은 1960년대에 전남북, 경남 및 제주지역에 일본 도입종이 보급되면서 시작되었음
- 가뭄저항성 유채는 아직 상업적으로 재배되지 않은 상태이고, 비의도적 방출에 대한 방지를 위해 격리포장에서 실시되고 있음. 가뭄저항성 유채는 가뭄이 상습적으로 발생하는 지역이나 이미 사막화가 만연된 중국과 몽골, 아프리카 지역 등에 도입될 것으로 생각되며, 동 지역은 유채의 원산지로부터 지리적으로 분리되어 있음

2) 지리적, 기후, 주변 식물의 생태학적 특성에 관한 정보

- 월동성 및 온도에 따른 및 다양한 생식, 생육에 관한 실험결과로 미루어 가뭄저항성 유채에서 유래된 지리적, 기후 및 생태학적 특성은 대조구와 차이가 없으므로 이의 의도적 방출지역에 대한 특성이 비형질전환 유채의 재배지역 특성과 동일하다고 할 수 있음
- 관련된 자세한 사항은 앞서 제시된 유채의 생물학적 특성과 자연계에서 분포 및 상태에 관한 정보를 참조할 수 있음

6. GM 벤투그라스의 환경위해성평가 가이드라인

가. 서론

- GM 벤투그라스의 환경위해성평가 가이드라인은 제5절의 “GM 유채의 환경위해성평가 가이드라인 모델”과 같이 LMO법 통합고시 별표 10-1에 의거하여 작성하였으며, 소재목 뒤에 통합고시 별표 10-1의 항목 번호를 기입하여 연구자의 편의를 도모하였음
- 별표 10-1에서 요구하는 일반적인 생물학적 특성 2항의 ‘숙주에 관한 자료’와 실제 안전성 평가에서 수행하는 8항과 9항의 ‘유전자변형생물체의 변화된 생물학적 특성’은 서로 연관되어 있음 (2항을 기본으로 8항과 9항의 연구를 수행함). 따라서 본 가이드라인에서는 8, 9항에 2항의 기본 자료를 같이 제시하여 연구자가 응용하여 연구를 수행할 수 있도록 하였음
- GM 벤투그라스는 GM 유채와는 달리 현재 상업화된 이벤트가 없는 실정으로 미국에서 개발된 제초제저항성 벤투그라스의 심사 청구서와 국내외 벤투그라스 관련 서적 및 연구논문, 관련 심사서 등을 참조하여 작성하였음
- 앞장의 GM 유채와 공통되는 주요영양성분 분석, 항영양성분 분석 등 몇몇 사항들에 대해

서는 본 가이드라인에서는 생략하였음

- 벤투그라스 중 현재 가장 많이 상업적으로 사용되고 유전자변형 연구가 많이 진행된 종은 크리핑 벤투그라스이나, 본 연구에서는 향후 연구가 진행될 수 있는 같은 *Agrostis* 속인 콜로니얼 벤투그라스, 벨벳 벤투그라스, 레드탑에 대한 특성들도 같이 조사하여 제시하였음

나. 생물학적 특성(2-라, 8-나, 8-다, 10-나)

1) 생육적인 특성 및 용도

- *Agrostis* 속에는 약 125 종류의 식물이 있는데 기후적으로 temperate 및 subartic 지역에 주로 분포함. 또한 tropical 및 subtropical 지역의 고산지대에도 분포하고 있는 식물로 일년 생부터 영년생까지 다양함. 생육형은 B-type에서 S-type까지 여러 종류가 있음
- 현재 *Agrostis* 속에 포함되는 종류 중 잔디로 이용되고 있는 종류는 모두 영년생이며. 대표적인 종류에는 크리핑 벤투그라스(*Agrostis palustris*), 콜로니얼 벤투그라스(*Agrostis tenuis*), 벨벳 벤투그라스(*Agrostis carnina*) 및 레드탑(*Agrostis alba*) 4 종류가 있음. 이중 콜로니얼 벤투그라스, 크리핑 벤투그라스 및 벨벳 벤투그라스 세 종류를 통상적으로 벤투그라스류 잔디라고 함. *Agrostis* 속 잔디의 생리·생태적 특성과 이들 잔디 동정에 필요한 형태적 특성 차이는 표 21에 제시하였음
- 벤투그라스류는 엽폭이 대단히 좁은 세엽형으로 균일하고 고밀도의 품질이 양호한 잔디밭을 제공함. 따라서 벤투그라스류 잔디는 골프장 퍼팅그린 등과 같은 고관리 잔디지역에 많이 이용되고 있음. 이들 잔디는 포복성이 강하고 한지형 잔디 중 저온에 대한 내성도 가장 강하기 때문에 5 mm 전후의 지속적인 예초 환경에서도 잔디밭을 유지할 수 있음

표 21. *Agrostis* 속 잔디의 생리·생태적 특성 비교

속명	종류	원산지	생육형	생육형태	질감	조성 ^Z 방법	조성속도	비료 요구도
<i>Agrostis</i>	Creeping bentgrass	유라시아	S-type	tillers stolons	fine	S V	medium~fast	high
	colonial bentgrass	유럽	S/R-type	tillers short stolons short rhizomes	fine	S V	medium~fast	high
	redtop	유럽	R-type	tillers short rhizomes	medium	S V	fast	low~medium

^ZS: seeding propagation, ^ZV: vegetative propagation

2) 크리핑 벤투그라스

- 콜로니얼 벤투그라스와 달리 크리핑 벤투그라스 종류는 그 이름에서 느낄 수 있듯이 잔디밭 위로 성장하는 가느다란 포복경이 있고, 이 포복경은 대단히 왕성하게 발달하는 특성이 있음. 그래서 어디에 뿌려지더라도 새로운 성체를 이룰 수 있음. 벤투그라스 줄기는 신발,

골프 용품, 타이어, 흐르는 물 등등을 통해 이동이 가능하며, 골프장에 심어진 벤투그라스는 가정 잔디밭이나 다른 잔디밭이 골프장과 나란히 위치하지 않더라도 위와 같은 방법을 통해 퍼져서 잡초화 될 수 있음. 포복경 위의 각 마디(nodes)에서는 뿌리와 줄기가 새로이 형성되므로 다른 종류에 비해 밀도가 상당히 높은 잔디밭이 가능함

- 생육적지는 cool humid 기후대로 골프 코스나 2cm 이하로 유지되어야 하는 뾰족한 잔디밭 등의 용도로 가장 널리 사용되는 벤투그라스의 종류임. 크리핑 벤투그라스는 환경적응력이 뛰어나서 transition zone에서도 사용할 수 있고 난지형 잔디의 동기간 녹색 제공을 위해 이용되기도 함
- 토양환경으로는 배수가 양호하고 pH 5.6~7.0정도의 보비력과 보습력이 양호한 채광지역이 좋음. 다른 초종에 비해 시비량과 관수요구도가 대단히 높은 종류이다. 내한성은 양호하지만, 온도가 내려가는 초겨울에 엽색이 퇴색되어 다음해 봄까지 지속됨

3) 콜로니얼 벤투그라스

- 콜로니얼 벤투그라스의 생장습성은 B-type의 주형에서부터 지하경과 포복경으로 생장할 수 있는 S/R-type 까지 있음. 하지만 지하경과 포복경의 발달은 대단히 미약하고 오늘날 그린에 가장 많이 사용하고 있는 크리핑 벤투그라스 (creeping bengrass)처럼 고품질이 아니며 크리핑 벤투그라스에 비해 포복성은 아주 약한 편임. 즉, 지하경과 포복경이 거의 없는 B-type의 주형으로 자란다고 보면 됨. 그러므로 골프장에는 별로 쓰이지 않으며 미국의 경우 약 34종의 벤투그라스가 서식하지만, 4~5종류 정도만이 인위적인 잔디밭을 위해 사용된다. 콜로니얼 벤투그라스의 잔디로서의 역할 및 역량을 증가시키기 위한 개량이 지속적으로 이루어지고 있는데, 왜냐하면 콜로니얼 벤투그라스는 달러 스폿 (*Lanzia spp.* And *Moellerodiscus spp.*)이라는 벤투그라스계의 가장 큰 문제가 되는 질병에 대해 강한 저항력을 갖추고 있기 때문임. 하지만 달러 스폿에 대한 저항력은 Brown Patch (*Rhizoctonia solani*)라는 질병에 대한 저항력은 약함으로 인해 상쇄되어 버림. 뿌리발달은 천근성으로 얇게 자란다. 콜로니얼 벤투그라스로 어느 정도 잔디밭의 밀도 형성을 위해서는 조성 시에 밀파가 요구되며, 조성 후에는 저예고로 관리해야 함
- 생육적지는 냉습한 기후대가 적지이므로 건조하거나 온도가 높은 환경에서는 생육이 불량함. 내서성과 내건성은 약하기 때문에 계절적으로 건조 시기에는 반드시 관수해야 하는 종류로 일반 잔디에 비해 유지관리 비용이 많이 요구된다. 미국에서는 대서양 해안가의 뉴잉글랜드 지역과 서부의 캐스캐이드 산맥 서쪽지역인 워싱턴주와 오레곤주 지역에서 관상목적의 정원용으로 많이 이용되고 있음
- 혼파로 켄터키 블루그라스와 함께 식재 시 켄터키 블루그라스보다 생육이 훨씬 강하게 나타남. 토양조건은 배수성이 양호한 사질토가 좋고, 토양산도는 pH 5.6~7.0사이의 약산성에서 중성정도의 토양이 적절함

4) 벨벳 벤투그라스

- 생육적지는 냉습한 기후대 지역에서 온도가 좀 더 서늘한 북쪽지역에서 잘 자라는 초종임. 북미대륙에서는 대서양 연안의 동북부 지역이 뉴잉글랜드와 서부 태평양 연안의 북부 지역이라고 할 수 있음. 벨벳 벤투그라스는 벤투그라스류 중 내음성이 가장 강한 편이며, 때문에 조성된 지 수십년이 지난 외국 골프장에서 그들이 있는 그린에서 종종 쉽게 발견할 수 있음
- 벨벳 벤투그라스는 크리핑 벤투그라스 보다 질감이 더 고운 세엽형 잔디이며, 생육형은 포

복경 생장이 가능한 S-type으로 밀도가 대단히 높은 잔디밭을 형성할 수 있음. 벨벳 벤투그라스는 골프장의 퍼팅 그린잔디로 주로 쓰임. 이것은 대단히 고품질의 퍼팅 그린을 만들어 내지만, 선선한 해안지방에만 특별히 서식하는 turfgrass로서 지역의 제한이 심함. 잔디엽색은 연한 녹색이며, 주로 수직형의 생장을 한다. 잔디밭 조성은 종자번식과 포복경애 의한 영양번식 모두 가능함

- 토양환경은 습하고 산성인 토양조건에서도 생육이 가능하지만, 건조한 토양에서는 생육이 대단히 불량함. 깎장 형성능력은 중간 정도로 콜로니얼 벤투그라스보다는 강하지만, 크리핑 벤투그라스 보다는 못함

5) 레드탑

- 레드탑은 생활사가 2~3년 정도 되는 단기 영년생 초종으로 여러 가지 타입의 생육형이 존재함. 지하경으로 생육하는 R-type으로부터 분얼경으로만 자라는 B-type까지 다양하게 존재하며, 상업용 시판 종자는 대부분 생육형이 B-type인 주형 생장을 하는 품종이 많음
- 레드탑은 다양한 조건의 토양 및 기상 환경에 잘 적응하며 관리에 비용이 많이 들지 않는 종류임. 시비요구량은 낮은 편이며, 배수가 불량한 산성 토양에서도 잘 적응하며 생존할 수 있음. 이러한 특성 때문에 토목 공사 시 도로 주변을 따라 파헤쳐진 배수구 위의 척박토와 습하거나 또는 배수가 불량한 척박토 위 잔디 식재 시 혼파로 이용되기도 함
- 또한 잔디, 목초지, 공원, 공항, 묘지 등등 관리에 별로 신경을 쓰지 못하는 잔디밭 형성에 주로 사용됨. 하지만 보비력이 있고 토양 반응이 중성인 토양에서 최적의 생장을 할 수 있음. 레드탑의 환경 적응성은 내건성은 있지만, 내서성과 내음성은 약한 편임
- 레드탑은 농장에서는 잡초로 분류될 수 있는데, 몇몇 농작지에서 끊임없이 번식되며, 뿌리 줄기를 통해 퍼지기 때문임. 하지만 이것 역시 소, 말 등의 먹이 잔디로 사용될 수 있음
- Idaho나 건조한 지방에서 자라는 다른 종류의 벤투그라스들도 최근 골프장 잔디로 사용하기에 어떤지 실험이 이루어 졌지만, 아직까지 잔디 관리인에 의해 상업적으로 활용된 적은 없음

다. 다른 품종 또는 근연종과의 생식 호환성(2-라, 8-다, 9-다, 10-가, 10-나, 11-가)

1) 생식 호환성

- 미국에 서식하는 10~12 종의 *Agrostis* 는 벤투그라스에 의해 잡종화 될 수 있다고 알려져 있으며, 잡종화는 보통 콜로니얼 벤투그라스(Colonial Bentgrass)에 의해 이루어지며, 결과물은 *A. murbeckii* 라고 불림. 빈도는 낮지만 redtop과의 잡종화도 이루어 질 것으로 알려져 있다. 콜로니얼 벤투그라스는 보통 건조한 지대의 벤투그라스와 교배하며, 결과물은 *A. fouilladei*라고 불림. 이 결과물은 콜로니얼 벤투그라스와도 교배가 가능한 작물이며, 몇 해에 걸쳐 이 모든 것들은 뉴질랜드로부터 콜로니얼 벤투그라스로 분류되어 모르는 사이에 도입 되었으며, 넓게 퍼졌음. 군락 벤투그라스 또한 redtop과 교배가 용이하며, 로드 아일랜드에서 발견되는 결과물은 *A. bjoerkmanii* 라고 불림
- 벤투그라스 또한 세 종류의 *Polypogon* 종들과 교배하여 잡종화된다는 보고가 있었음. 그러나 관련된 종과의 교잡종 현상은 드물며 원천식물(Source plant)로부터 거리가 늘어남에 따라 교배가능성은 급격하게 감소하며 잡종화의 이력을 갖지 않음
- 여러 종류의 잡종들은 대부분이 생식 능력이 없고, 있다하더라도 약하지만 식물학 적인 면에서는 대단히 활발함. 잡종화나 중간 잡종 생성은 재배에 있어, 그리고 식용 작물과 장식

용 작물의 개선에 있어서의 양상 역할을함. 여러 새로운 연구실의 기술은 turfgrasses 잡종에 대한 연구를 가속화 시키고 있으며, 늘 그래 왔듯이 질병에 대한 저항력 등을 올리는 것을 목적으로 한 *Agrostis* 종의 잡종화 연구에 많은 노력이 쏟아지고 있음

2) 이종교배(Interspecific crossing)

- *Agrostis* 속 내에서의 이종교배에 관한 다양한 보고들이 있음 (Davies, 1953; Jones 1956a,b,c; Bradshaw, 1958a; Hegi, 1935, Tutin, 1980; Welsh *et al.* 1987; Wipff and Fricker, 2001; Belanger, 2003). 그러나 이 교잡종의 대부분은 인공적으로 만들어지거나 포장 진단(field diagnoses)이 확인되지 않았음
- Davies, Jones 그리고 Bradshaw에 의해 설명된 교배는 주로 형태상으로 두 부모 간의 중간이며 생식력이 완전히 손실되거나 대부분 감소됨 (Bradshaw, 1958a; Jones, 1956a,b,c). 이종교배의 세포학적 특성 차이 또한 잘 알려져 있으며 증가된 배수성 식물의 유전적 기원에 관하여 학자들 사이에 이견이 있음. 이 식물들은 종내-종간 교배와 intraplant-intraclone 모두의 돌연변이에 기여
- 증가된 배수성에 근거하여 추정된 이종교배에 관한 초기의 가정(Davied, 1953; Jones 1956abc; Bradshaw, 1958a)은 Kik *et al*의 견지에서는 미심쩍었을 수도 있음. 그들은 다른 생태계로부터 수집한 *A. stolonifera*의 클론이 배수성과 관련된 생식력의 분포에 관한 세포학적 기질 차이를 가지고 있다는 것을 발견했음. 이 결과물은 이종교배와 높은 배수체 사이의 연관에 관한 초기 가정에 대한 대안의 설명임

3) 속간교배(Intergeneric hybridization)

- *Agrostis*와 마찬가지로 대부분의 *Polypogon spp*는 유사한 틈새적응과 제한된 분포를 가짐. 추정된 교잡종은 *Agrostis*와 일부 *Polypogon* 종 사이에서 보고되었다(Bjorkman, 1960; Parodi, 1951; Welsh *et al.*, 1987). Bjorkman(1954)는 *Polypogon* 종은 외관상이나 적응 양상이 매우 유사하기 때문에 종종 *Agrostis* 속으로 봄. Sokolavskaya(1930)는 *P. litoralis*는 *A. verticillata*와 아주 밀접하다고 믿었음. Bjorkman(1960)는 *A. stolonifera*와 *P. fugax* 또는 *P.semiverticillatus*(syn. *A.verticillata* Villars) 사이의 불임으로 추정되는 잡종에 대해 언급했음. 또한 그는(Bjorkman, 1954) *P. fugax* Nees종은 *P. litoralis* Sm(*A. stolonifera* x *P. monspeliensis* L. Desf 교잡종에 처음 붙여진 이름)이라고 말했음. 그러나 Sokolovskaya(1938)는 초기에 학자들이 *P. litoralis*는 *P. monspeliensis*와 *A. alba*간의 이종교배에 의한 것이라 생각했고 후에 Bjorkman(1960)은 *A. stolonifera*와 *P. monspeliensis* L의 교배로 얻은 잡종은 불임이라고 했음
- 속간교배는 *A. stolonifera*와 *P. monspeliensis* (L) Desf., 사이에서 자연적으로 발생한다고 알려져 있지만 교잡종은 불임임 (Bjorkman, 1960). 또한 불임 교잡종은 *P. fugax* 그리고 *P.semiverticillatus*(=*P. viridis*)와 함께 얻어짐 (Bjorkman, 1960). *Polypogon* 종의 대부분은 고도의 자가 임성을 가지고 있으며 자연 상태에서 교잡종의 형성을 쉽게 하지 않음
- *P. monspeliensis*는 미국 서부에서 일반적인 종자로서 전해져왔음 (Hitchcock, 1935). British Columbia부터 California까지 포함하여 저온의 배수로와 습윤한 장소에서 존재하는 *P. interruptus* H. B. K(Chase, 1950)는 미국 본토에서 지정되지 않은 지위의 종자로서 리스트에 포함되었음 (Holm *et al.*, 1979).
- Bjorkman(1960)에 의해 보고된 *P. fugax*에 대한 유사성에 근거하여 *A. stolonifera*와 생식력있는 교잡종을 형성하는 것은 쉽지 않음. USDA는 *Agrostis*와 *Polypogon* 사이의 속간교

잡은 빈도가 낮고 불임이며 큰 영향이 없다고 결론지었음 (Koehler, 1997).

라. 원산지 및 유전적 다양성의 중심지(2-아, 9-다, 9-라, 10-나, 11-가)

1) 지리학적 근원과 분포

- *Agrostis* 속은 *Aveneae* (*Agrostideae* 포함)류에 포함되며 이는 귀리(oats) 또한 포함함. 미국 내에 서식하는 31-34 종의 *Agrostis*는 토종이거나 이미 자연 적응이 끝난 종들이며, 이중 17-19종 정도는 캐나다에서도 발견됨
- 미국에 서식하는 *Agrostis* 중 25-28 종류 정도가 토종이며, 7-9 종류는 다른 지방, 대부분 유라시아 지방(7-8 종류는 완전히 도입 되었으며, 1-2종 정도는 대부분이 도입 되었다)으로 도입되기도 했음. 몇몇 잔디 종류가 Theophrastus에 의해 *Agrostis* 라고 불리었다. *Agrostis*의 종 분류체계는 정착되지 않았고, 어려우며 세계적으로 쓰이는 혹은 미국에서조차 확정된 분류법이 존재하지 않음
- 결과적으로 위에 명시된 종의 숫자는 서로 다른 분류 개념을 대변함. 위 *Agrostis* 속은 그들의 확률적 중심인 유럽 가까이에 나타나는 종들과 남반구의 종들, 그리고 덥고 추운 지방에서 서식하는 모든 종들을 포함하였을 때 200종류 이상의 종을 포함할 수도 있다. *Agrostis*는 선선한 날씨에서 서식하는 C3 타입의 광합성 경로를 갖춘(C3 photosynthetic pathway) 잔디그룹에 속함
- 벤투그라스류는 유럽대륙이 원산지 (표 22). 벤투그라스는 온대성 기후부터 저온대성 기후를 가진 지역에 이르기까지, 뉴질랜드, 호주 남부지방, 남아공, 남미(Tierra del Fuego, Patagonia 와 Andes 포함), 북미 및 크고 작은 섬들에 이르기까지 (하와이, Juan Fernandez, Falkland, Gough, Tristan da Cunha 등) 세계적으로 넓게 도입됨
- 벤투그라스는 유라시아, 북극, 북 아프리카 등지에서 토종이며, 북미, 캐나다 등지의 소금 광산이나 민물 호수 등지에서 간혹 토종으로 분류되기도 함. 하지만 *Agrostis* 의 네 동류들은 분명히 유라시아나 유럽에서만 서식하던 종들임
- 미국에서는 벤투그라스는 거의 대부분이 1750년 훨씬 이전부터 퍼지기 시작하여 정착했을 것임. 이들은 아마도 소, 양 따위의 사료로 가지고 다니던 씨앗 류 혹은 짚단 등등에 섞여서 도입되었을 것임. *Agrostis* 종들은 이미 미국의 전 주에 걸쳐 도입되어 더운 남동쪽 지방을 제외 하고는 거의 모든 자치주에서 도입이 완료된 상태임

표 22. 벤투그라스류 잔디의 원산지 현황

이름	이명	원산지
Creeping bentgrass	-	유라시아
Colonial bentgrass	common bentgrass brown bentgrass browntop bentgrass New Zealand bentgrass Northwest bentgrass Prince Edward Island bentgrass Rhode Island bentgrass	유럽대륙
Velvet bentgrass	-	유럽대륙
Redtop	-	유럽대륙

2) 크리핑 벤투그라스(Creeping bentgrass; *Agrostis palustris* Huds., *Agrostis stolonifera* L.)의 지리학적 근원

- *A. stolonifera*의 지리학적 기원에 관한 문헌에서 완전한 합의는 존재하지 않지만 유라시아와 북아메리카의 추운 기후에서 기원한 것으로 생각되며 (Hitchcock, 1950; Hubbard, 1984), 현재는 세계 다른 지역들의 유사한 환경에 도입이 되었음 (Hubbard, 1984; Hitchcock, 1950). *A. stolonifera*의 원산지과 도입된 서식지는 습윤하며 연안지역 (Hitchcock, 1950; Hubbard, 1984)과 고산지대의 목초지 (Hubbard, 1984), 범람원 (Bradshaw, 1958a)과 초기의 연속 삼림지대를 포함하는 경향이 있음 (Collet *et al.*, 1996). *A. stolonifera*는 분명히 수세기 동안 유라시아 목초지의 일반적인 구성요소가 되어왔음 (Bradshaw, 1958a; King, 1962; Duich, 1985)
- 원산지가 유라시아 대륙이지만 저예고의 관리 환경에서 고밀도의 고품질 잔디밭에 적합한 특성을 갖고 있기 때문에 오늘날 전 세계적으로 광범위하게 사용되고 있음. 이 잔디는 콜로니얼 벤투그라스보다 세엽형 타입으로 포복경을 통해서 왕성하게 자라는 영년생 초종임
- 크리핑 벤투그라스는 골프장 그린 및 볼링장 그린에 많이 이용되고 있는데, 1900년대 초기에는 여러 종류의 벤투그라스 혼합종인 South German Mixed Bent로 아주 일부 이용되었음. 하지만 1920-30년대에 걸쳐 미국 농무성과 미국 골프협회(USGA)산하 그린 섹션부와 공동으로 시작한 연구 육종 개발 결과로 우수한 품종이 개발되어 오늘날에는 벤투그라스류 잔디 중 가장 우수한 특성을 가진 초종으로 가장 많이 이용되고 있음

3) 콜로니얼 벤투그라스(Colonial bentgrass; *Agrostis capillaris* L, *Agrostis tenuis* Sibth, 또는 *Agrostis vulgaris* With.)

- 콜로니얼 벤투그라스는 유럽이 원산지임. 하지만 cool humid 기후대 지역으로 도입되어 뉴질랜드와 북미대륙에서 태평양연안 서북부 해안지대, 동부의 대서양 연안 뉴잉글랜드 지역에 광범위하게 자생하게 된 초종임
- 따라서 콜로니얼 벤투그라스가 재배되는 지명을 따라 커먼 벤투그라스(common bentgrass), 브라운 벤투그라스(brown bentgrass), 브라운탑 벤투그라스(browntop bentgrass), 뉴질랜드 벤투그라스(New Zealand bentgrass), 노스웨스트 벤투그라스(Northwest bentgrass), 프린스에드워드 아일랜드 벤투그라스(Prince Edward Island bentgrass), 로드 아일랜드 벤투그라스(Rhode Island bentgrass)로도 알려져 있음. 콜로니얼 벤투그라스의 학명은 *Agrostis capillaris* L, *Agrostis tenuis* Sibth, 또는 *Agrostis vulgaris* With.로 사용되기도 함

4) 벨벳 벤투그라스(Velvet bentgrass; *Agrostis canina* L.)

- 유럽이 원산지인 벨벳 벤투그라스는 벤투그라스류 중에서 질감이 가장 세협형으로 주로 북미대륙에서 대서양 연안의 동북부 지역이 뉴잉글랜드 지역과 태평양 연안의 북서부 지역에서 이용되고 있음. 이 잔디는 적절한 관리와 생육환경이 양호한 곳에서 자랄 경우 벨벳 벤투그라스의 잔디밭 품질은 잔디 중에서 시각적인 관상가치가 가장 우수한 초종임

5) 레드탑(Redtop; *Agrostis alba* L., *Agrostis gigantea* With.)

- 레드탑은 유럽이 원산지로 생육형이 R-type으로 지하경 생장을 하는 영년생 초종. 레드탑이라는 이름은 레드탑 종자에서 맨 위 부분의 색이 붉기 때문에 유래. 이 초종은 1954년 이전에 많이 이용되었지만 오늘날에는 잔디밭에 거의 이용되고 있지않은 종류

마. 잡초화(또는 야생화) 가능성(2-카, 9-다, 10-나, 11-가)

- 잡종을 만들 수 있는 벤투그라스와 기타 *Agrostis spp*, *Polypogon spp* 등은 현재 전 세계에 걸쳐 퍼져 있음. 하지만, 위의 종들이 발견된 지역에서는 위의 종들은 공격적이지 않은 성향을 가지고 있었으며 따라서 대체로 그들의 존재가 해로운 잡초로 인식, 관리하여야 할 대상으로 규정되거나 하지는 않았음
- 종류가 다양하고 지리적으로 전 세계에 걸쳐서 분포되어 있음에도 불구하고 위에 명시된 종들은 잔디 과의 작물에 대한 침략을 제외하고는 주요 작물에 해로운 잡초로 단 한 번도 규정되지 않았음
- 종합적으로 이것은 그들이 작물의 환경에 적응하고 살아남기 위한 잡초적 성향이 부족함을 뜻하며 이중 몇몇 종류는 중요하지 않은 잡초, 과일, 견과류 혹은 야채 농사에 적은 위협을 가하는 잡초로 신고된 적은 있지만, 주요 문제가 되는 잡초로 생각되거나 규정된 적은 한 번도 없었음
- 현재 유효한 정보들은 Glyphosate 혹은 Glufosinate에 저항성을 가진 벤투그라스가 위에 명시된 종들의 잡초로서의 영향력을 더 높일 것이라고 말하지 않음. 제초제의 사용에 의한 관리 요청을 제외하고는 이들에 의해 새로운 잡초 관리가 필요하거나 하지는 않음
- 현재 미국 내에서 Glufosinate는 최소한의 양만 사용되고 있으며, 따라서 Glufosinate 저항성 벤투그라스가 잡초 관리에 있어서 다른 문제들을 만들 것이라는 가능성은 제기되지 않고 있음. 하지만 Glyphosate 저항 벤투그라스는 잡초 관리에 있어 특정 상황에서 다른 문제들을 일으킬 소지가 있음
- Gardner *et al*(2003)은 미국에서 개발된 glyphosate-저항성 벤투그라스가 다른 잔디들과의 경쟁상황에 있어서 유전자 변형이 되지 않은 벤투그라스에 비해 덜 공격적으로 혹은 비슷하게 자랐다는 것을 발견했음. Loux and Harrison (2002)은 옥수수과 콩 포장에 있어서의 glyphosate-저항성 벤투그라스를 일반 벤투그라스와 비교했음. 그들은 glyphosate를 제외한 제초제에 대한 그들의 반응이나 농작물 방해 빈도에 차이를 만들어내지 못한다는 것을 발견했다. 벤투그라스는 두 작물 중 무엇과도 경쟁하지 못했음
- 미국에서 개발된 유전자변형 제초제 저항성 turfgrass에 대한 이슈들의 검토는 유전자 변형 벤투그라스가 농경지에서 잡초 문제가 되거나 잡초 문제를 일으킬 가능성은 낮다고 결론지었음 (Lee *et al*. 1996; Johnson and Riordan 1999). 이렇게 빈도가 낮은 이유는 벤투그라스는 prostrate하며 느리게 자라는 종이며 (단일 작물 재배 상황이 아니라면) 공격적 성향이 약하고 생존 경쟁력도 다른 작물이나 식물에 비해 떨어지기 때문. 중간 잡종은 생식 능력이 없거나 매우 약할 것이며, 경작 혹은 작물 로테이션 혹은 여러 제초제의 사용 등으로 인해 충분히 제어될 수 있는 종이기 때문임. 게다가 제초제에 대한 저항력은 제초제가 적용되기 전까지는 생존에 그렇게 큰 경쟁력을 가져오지 못함
- 분류학자나 생태학자들은 벤투그라스를 빠르게 자라는 다년생 작물로, 또한 생물학적으로 그리고 생태학적으로 다양한 적응력, 바람, 물 혹은 동물에 의해 퍼질 수 있는 씨앗에 의한 번식까지 가능한 종류로 분류함 (Bradshaw and Hardwick 1989; Eriksson 1989; Grime and Hunt 1975; Grime *et al*. 1988; Kik 1989; Kik *et al* 1990a; Kik *et al* 1990b; Marrs and Proctor 1976; Misra and Tyler 200a; Romero Garcia *et al*. 1988b; Sell and Murell 1996; Shipley *et al*. 1989; Smith and Bradshaw 1979; Teyssonneyre *et al*. 2002). 하지만 *Agrostis spp*. 종류는 주요 잡초로 미국 내에서 분류된 적이 없으며 (Holm *et al* 1991;

Holm *et al.* 1997), 그러므로 glyphosate 혹은 glufosinate 저항성 벼트그라스가 주요 잡초가 될 가능성은 위의 몇몇 경우를 제외 하고는 거의 없는 것으로 보임

바. 화분 이동성 및 비산(2-라, 8-다, 9-다, 9-라, 11-가)

- 1999년 동안 Wipff와 Fricker(2001)는 근원지로부터 292 m까지 벼트그라스 화분의 이동성을 측정하였고, 도입유전자를 가진 약 천 개 이상의 식물 중에서 단 한개의 식물을 발견했음. Wipff와 Fricker(2001)는 그들의 1998년과 1999년의 연구 결과들을 만들었음. 1999년의 데이터에서 이들 모델로부터 최고의 R²값은 808ft에서 0.1%, 1022ft에서 0.02%의 이식유전자 이동을 예측했음. 이 회귀분석으로부터 나온 data fit의 R²값은 1998년에 0.1781에서 0.3817, 1999년에 0.4516에서 0.8662 임
- Belanger *et al.* (2003)은 유전자가 도입되지 않은 *A. stolonifera*, *A. capillaris*, *A. castellana*, *A. gigantea* and *A. canina*에 동종 내의 glufosinate 저항성 이식유전자 이동과 동종 내의 이식유전자 이동을 실험했음. 각 종의 한 작물을 각각의 표본점(sample point)에 심었고, 각 표본점은 3 m 씩 떨어뜨렸다. 중앙에 위치한 이식유전자 유래 식물들로 부터의 최대거리는 15 m였음. 사방 15 안에서 *A. capillaris*, *A. castellana*, *A. gigantea* and *A. canina*에 대한transgenic hybridrecovery의 빈도는 이종간의 이동에 대해서 각각 0.044% (44,967개의 표본이 선별됨), 0.0% (2,298,418개의 표본이 선별됨), 그리고 0.0%(7,556)이였음. 종내 이식유전자 이동에 대한 recovery의 빈도는 0.631%(155,773 표본이 선별됨)이였음. 비록 이식유전자이동은 발생하였지만 제초제 저항성 이식 유전자는 제초제가 사용될 가능성이 낮은 자연 생태계에서 *Agrostis spp.*에 어떠한 경쟁우위를 주는 것도 쉽지 않을 것임
- 2004년 Watrud 등은 제초제저항성 벼트그라스를 이용한 실험에서 화분에 의한 유전자 이동이 바람에 의해 2 km까지 빈번히 발생할 수 있으며, 최대 21 km까지 유전자 이동이 발생함을 관찰하여 보고하였음
- 화분을 통한 유전자 이동성에 영향을 미치는 요인은 다음과 같음
 - ① pollen shed의 공시적 연구와 수용하는 암술머리
 - ② 식물들의 근접함
 - ③ 풍속과 방향
 - ④ 화분 생존능력과 수명(날짜와 시각)
 - ⑤ 온도, 상대습도
 - ⑥ 화분과 암술머리 또는 암술대 간의 친화성
- Davies(1953)는 British Isles에 있는 일부 *Agrostis* 종들에서 pollen shed에 대한 개화일과 시각을 기록했음 (표 23). 개화일은 겹쳤지만 수분시각에 제공된 일부 종간의 화분 매개 유전자 이동 사이에 약간의 격리가 있었음. Belanger *et al.*(2003)은 *A. stolonifera* 과 *A. gigantea* 또는 *A. canina*간의 교배를 온실에서 강제적으로 할 수 있었지만, 인위적으로 개화를 동기화하고 원추꽃차례를 bagging 함으로써 2년 동안 수행된 포장실험에서 잡종을 회복하지는 않았음. Belanger의 연구진은 *Agrostis spp.*에 대한 개화일에서의 차이는 *Agrostis spp.*간의 유전자이동을 제한할 가능성이 있다고 결론지었음

표 23. 주요 *Agrostis* 속의 개화 시간

<i>Agrostis spp.</i>	Pollen shed
<i>A. stolonifera</i>	10:00 - 11:30 am
<i>A. tenuis</i> (<i>A. capillaris</i>)	1:00 - 5:00 pm
<i>A. gigantea</i>	2:30 - 3:30 pm
<i>A. canina var. arida</i>	4:00 - 5:00 am
<i>A. canina var. fascicularis</i>	4:30 - 5:30 am

- 식물 집단의 크기와 재배밀도는 수용하는 암술머리에 대한 품종 내 화분 경쟁 때문에 이종 교배 빈도에 중대한 영향을 미침. Perennial ryegrass에서 격리거리와 경쟁하는 화분원을 조사하기 위해 설계된 일련의 수분실험에서, Griffiths (1951)는 품종 내 (단일 포장 내에서)화분경쟁의 효과는 품종간 교배 (포장들 간의)를 줄이는데 매우 효과적이었으며, 거리의 효과와 유사했음. 화분오염은 거리에 따라 급격히 줄어듦. 그러나 짧은 거리일 때, 품종 내 화분경쟁은 가장 인접한 식물들이 가장 큰 화분 기증을 제공하기가 용이하므로 거리보다 더 효과적임. 이 결과는 거리에 의한 적절한 격리가 제공되지 않은 수분 후에 큰 보증포장으로부터 번외열을 자르는 것을 추천하는 것에 대한 근거 제공. 유사한 결과들은 Griffiths가 인용했던 호밀에 대한 Heribert-Nilsson(1951)의 결과, Smooth bromograss에 대한 Knowles(1966)의 결과 그리고 Perennial ryegrass에 대한 Copeland와 Hardin의 결과들도 유사하게 도출되었음
- 순종 Creeping bentgrass 종자생산에 대해 규정된 격리거리는 보증종자의 등급(class)와 포장의 크기에 의존하여 변함 (Oregon 주립대, 2001a). 5에이커 이상의 포장은 다른 *Agrostis spp.*로부터 오직 165ft의 격리거리를 요구하는 반면에 5에이커보다 작은 포장은 300ft의 격리를 필요로 함
- 모든 크기의 원종 포장(Foundation seed field)에 요구되는 격리거리는 900ft임. 식별 가능한 다른 품종이나 허가된 혼입형 작물(off-type plants)들의 백분율은 보증등급이 가능한 종자생산 포장에서는 2%, 보급등급이 가능한 종자생산 포장에서는 0.1%임. 원종 등급이 가능한 종자생산 포장에서는 가시적인 혼입형 작물은 허용되지 않음. 이러한 최대 한계점은 오직 보증종자의 특별한 종류를 생산하는 포장에 존재하는 작물들에만 적용됨

사. 화분의 비산(2-라, 8-다, 9-다, 9-라, 11-가)

- 근원식물들의 소지(small area)를 이용하여 근원으로부터 다양한 거리에서 존재하는 recipient plant와 함께 연구자들은 근원에서부터 수용식물까지 인식 가능한 유전자들의 이동을 탐지하기 위한 자손분석(Progeny analysis)을 해왔음. 이러한 접근을 함으로써 톨페스 큐의 화분은 근원으로부터 최소 325 m (Nurminiemi *et al.*, 1998)와 330 m (Rognli *et al.*, 2000)의 먼 거리에서 수정에 영향을 준다는 것을 알아냄
- 대조적으로 비교적 적은 수의 원천식물을 사용한 다른 연구에서는 200 m가 아닌 150 m의

- 거리에서 수정이 발견되었음 (Wang *et al.*, 2004). 벤틀그라스를 이용한 실험에서는 약 300 m의 거리에서 화분이 관찰되었음 (마커 유전자에 대한 0.02%의 자손 양성반응)(Wipff and Fricker, 2001). 이 후자의 데이터에 대한 거리에 따른 단순한 기하급수적인 감소에 맞추는 것은 285종의 근원식물로부터 1.3 km 떨어진 recipient plant가 수정될 수 있음을 말해줌. 또 다른 실험에서 Sentinels로서 자연적으로 발생하거나 의도적으로 놓인 형질전환되지 않은 *Agrostis* 종은 Oregon주에서 GM 크리핑 벤틀그라스의 근원지 162-ha로부터 12~21 km 까지 노출된 후에 유전자이식 종자 (Transgenic seed)를 만들어냈음 (Watrud *et al.*, 2004)
- 화분비산에 관련된 이화학적요인 (Jackson and Lyford, 1999)에 대한 보고서는 대기의 불안정은 비산거리에 중대한 영향을 미친다고 보고했음. CALPUFF는 본래 장·단거리 모두에 대하여 미립을 포함한 공기오염물질들의 퇴적과 움직임을 측정하기 위해 개발된 공기오염 모델링 시스템임 (Scire *et al.*, 1990). 이 보고서에서 비산거리를 측정하기 위하여 CALPUFF를 사용했음
 - 모델화된 비산과 퇴적 연구를 위해 2.4 ha 근원포장으로부터의 CALPUFF 결과물은 3.2 km 에 이르러 m^2 당 100개의 생존 가능한 화분 알갱이들의 퇴적이, 4.2 km에 이르러 $10 m^2$ 당 생존 가능한 한 개의 화분알갱이의 퇴적을 보였음. 7월 달의 날씨에서 2.4 ha 포장에 대한 CALPUFF 모의실험은 포장에서 남쪽으로 5.9 km 거리에서 m^2 당 100개의 생존 가능한 화분 알갱이(viable pollen grains)들이, 포장으로부터 6.4 km지점에서 $10m^2$ 당 한 개의 생존 가능한 화분알갱이들의 퇴적이 생성되었음. 25-ha 규모의 포장실험으로부터 이 같은 퇴적 수준에 대한 거리는 각각 6.4 km, 6.7 km 였음
 - 다른 연구진들은 바람에 날린 잔디 화분은 복잡하며, 단일의 비산모델로는 적절하게 설명하기가 어렵다는 것을 알아냈음 (Giddings *et al.*, 1997b; Jackson and Lyford, 1999; Nurminiemi *et al.*, 1998; Rognli *et al.*, 2000). CALPUFF는 공기의 불안전성, 풍속의 변화하는 상태 그리고 지형의 방향과 효과에 의해 야기되는 풍매의 화분이동 복잡성에 대해 설명해줌. 게다가 이것은 시간에 따라 변화하는 방출율과 적절하게 시간에 따라 변하는 날씨 상태와 함께 이 속도에 어울리는 것을 허용. 그러므로 이 모델링도구는 일련의 상황에 걸쳐 화분의 이동을 평가하는데 유용. 그러나 대기 중에서 입자 분산의 복잡성이 주어졌지만 그럼에도 불구하고 화분퇴적의 매우 정확한 측정을 예측하는 것은 비현실적임. Validation study에서 비록 최대농도의 측정은 더 정확하겠지만(Hurley and Luhr, 2005), CALPUFF는 둘 혹은 그 이상의 요소에 의해 실제 값과 차이가 있을 수 있는 평균농도에 대한 측정을 제공
 - 또 다른 연구에서 화분 비산과 퇴적에 대한 모델링결과를 바로 입증하는 것은 가능하지 않았고, 근원으로부터 몇 킬로미터 떨어져 방출이 검출될 수 있는 다른 화분 근원의 거리와 다양성과 함께 화분농도의 큰 희석이 주어졌음. 직접관찰(Direct observation)의 불가능성 때문에 참으로 모델링이 유용. CALPUFF는 바람에 비산되는 입자들을 위해 사전에 광범위하게 실험되고 입증되었다(Scire *et al.*, 1990). 우리가 airborne plume에서 화분의 유동(pollen flux)을 증명하고 정량했기 때문에 우리는 이 계산된 방출율에 근거한 이 모델이 입자들의 비산과 퇴적에 대한 현실적인 결과를 제공하는 것에 대해 확신할 수 있음. 이전에 알려진 것과 같이, 퇴적에 대한 정확한 값은 모델링에 의해 쉽게 얻어지지 않지만, 규모의 특징과 최대농도는 이 접근에 의해서 거의 근사치에 갈 수 있음. 이 모델화된 화분퇴적의 일반적인

특징은 다른 보고와 동일. 특히, 중부 Oregon에서 GM 벤투그라스에 인접한 유전자 이동의 관찰에서(Watrud *et al.*, 2004) 예를 들면 CALPUFF 결과물은 근원포장의 수 킬로미터 내에서 높은 화분농도와 변동이 심한 바람방향 때문에 넓은 지역에 걸친 퇴적을 보여줌

- 화분퇴적의 상당한 밀도가 예상되는 것 같은 몇몇 상태는 또한 우세풍향을 거스른다. 예를 들어 7월에 근원포장 가장자리의 서쪽으로 0.1 km까지 멀리 떨어져서 Watrud *et al.*(2004)는 우세풍향을 거스르는 근처의 위치를 포함하여 근원의 수 킬로미터 안에서 유전자도입의 우세를 관찰. 열의 소용돌이(모래바람)이 화분이동을 돕는다는 시나리오로부터의 CALPUFF 결과는 매우 유익. 모래바람은 크리핑 벤투그라스가 개화하는 때인 6~7월 동안 서부와 중부의 Oregon의 종자조제지역에서 나타나는 것과 같은 따뜻하고 화창한 지역에서 일반적임. 이것은 열의 소용돌이로 보이며, 근원으로부터 10 km이상 즉시 화분을 이동시킬 수 있고 이것은 중부 Oregon의 근원으로부터 12~21 km의 유전자 이동과 관련되어 있음 (Watrud *et al.*, 2004). CALPUFF 결과는 모래바람에 의해 날리는 화분은 근원으로부터 수백 킬로미터 날릴 수 있지만, 이들 3 h 생존제한은 이 비산거리를 유전자이동으로부터 중요하지 않게 만듦. 포장근원의 크기는 화분퇴적의 크기 (규모)에서 근원포장의 근처에서 주로 퇴적밀도에 영향을 미치는 확실하지만 제한된 효과를 가지고 있음이 밝혀졌음. 반면에 비산 동안에 모델화된 결과에서 날씨상태는 더 영향이 있었음

아. 종자의 산포와 수명(2-라, 8-다, 9-다, 9-라, 11-가)

- 크리핑 벤투그라스는 종자에 의해서 뿐만 아니라 주로 포복경 줄기(creeping stolons)에 의해 번식. 종자는 바람, 물, 말자국이나 차량에 의해 생긴 진흙 구덩이, 동물 그리고 잔디 종자 오염물질(grass seed contaminant)에 의해 산포. 이렇게 산포된 종자는 약 1년간 토양에서 생존이 가능
- 만일 제초제 저항 벤투그라스가 골프장이나 씨앗 생산지역에서 탈출한다면, 생산된 씨앗의 싹 틔우는 능력이나 휴면기가 유전자 생존의 확률을 결정할 것임. 상업적 용도로 쓰이는 벤투그라스의 싹 틔우는 확률을 굉장히 높으며, 생존 가능 씨앗은 1년 후 조금 밖에 남지 않음. Hancock과 Mallory-Smith(2004)는 휴면기와 싹 틔우는 glyphosate 저항 벤투그라스의 형태는 일반적인 벤투그라스와 같다는 것을 보였음. 하지만, 야생의 벤투그라스는 휴면기가 더욱 길 것임. 만일 제초제 저항 벤투그라스가 야생 벤투그라스와 교배 한다면, 유전자를 가진 그리고 휴면기가 긴 씨앗이 생산될 수도 있는 것임
- 힐과 스티븐스(1981)는 canopy 아래에서 식물이 자라지 않는 여러 숲의 씨앗 은행을 시험하였다. 그들은 결과로서 콜로니얼 벤투그라스와 벨벳 벤투그라스가 비교적 긴 시간동안 토양에서 살아남았음을 발견. 조금 생존력이 남아 있는 *Agrostis spp.* 씨앗은 가장 오래된(45년) 시험 장소에서 발견되었고 두 종류 모두 25년이 지난 시험 장소에서 좋은 생존력을 아직 갖추고 있었음. 탐슨과 그림(1979)은 콜로니얼 벤투그라스와 벨벳 벤투그라스를 type IV 씨앗 은행 (크고 끈질김)종류로 분류했고, 힐 과 스티븐스(1981)의 자료는 이러한 분류와 일치. 램튼 과 싱(1970)은 1.8%의 문헌 콜로니얼 벤투그라스 씨앗이 7년 후에야 발아 했다는 것을 밝혔고, 11.7%는 그 시기까지도 휴면기로서 아직 생존력을 갖추고 있었던 것 또한 밝혔음. 하지만 이상적인 상황에서는 94%의 씨앗이 1년 안에 발아하는 것으로 알려졌음
- 슈틸라 (1998)는 최근 핀란드에서 목초지 혹은 목초지가 아닌 해변의 씨앗 은행을 조사하여 벤투그라스가 넘쳐난다는 사실을 발견. 이것은 조사 하던 중 4번째로 흔한 종류였으며

*Agrostis spp.*종류와 더불어 크고 생명력이 강한 씨앗으로 분류되어 있었음. 군락 벤투그라스 역시 Jutila의 연구에서 자주 발견. 즉 벤투그라스와 관련된 다른 종들, 콜로니얼 벤투그라스 그리고 벨벳 벤투그라스 등등은 토양에서 오랜 시간 동안 살아남을 수 있다는 것이 분명해졌음. 제초제 저항 벤투그라스는 골프 코스를 벗어나 퍼지게 될 것이며, 퍼진 씨앗들은 흙 속에 오래 살아남을 수가 있게 됨

자. 변형 후의 개선된 특성 및 성질(8-가)

- 유전적으로 개선된 작물, 특히 곡물에 대한 식품 및 사료 안전성 평가 프로그램의 설계는 동물과 인간 영양에 있어서 이 곡물과 곡물 산물들의 사용에 대한 자세한 이해를 요구. 벤투그라스는 주로 식용으로 사용되지 않으며 대부분 조경용으로 사용. 하지만 초식동물 및 곤충 등이 섭식할 수 있으므로 성분분석이 요구
- GM 벤투그라스의 식품 및 사료 안전성을 평가하기 위해 GM 벤투그라스와 이에 해당하는 대조식물을 실험재료로 하여 광범위한 성분 분석을 실시. 모든 계통에서 나온 종자의 성분 분석(% 단백질, 지방, 회분, 수분함량, 식이섬유, 탄수화물 및 칼로리 계산)을 실시하고 지방산 및 방향성 아미노산인 tryptophan, phenylalanine 및 tyrosine 등을 비롯한 아미노산에 대한 분석을 실시. 더불어 항영양성분(glucosinolates, sinapine, 및 erucic acid)에 대한 분석도 실시하며 정제유, 탈취유, 표백유 및 구운 박분(meal)들에 대해서도 추가의 성분 분석을 실시
- 실험을 실시한 벤투그라스 생산 지역은 다양한 식생과 생육조건을 가진 다수지역을 선택하고 여러 해에 걸쳐 시행되어야 하며, 실험이 이루어진 장소와 연도에 대해 자세히 기술. 이렇게 나온 정리된 결과들을 통해 GM 벤투그라스와 모품종은 성분에 있어서 실질적인 차이가 없다는 것을 보여주어야 함. 또한 벤투그라스 종자 중 항영양소 수치(glucosinolate, sinapine, phytic acid 및 erucic acid)는 현재 다른 벤투그라스종에서 확인되는 수치 이하인 것을 확인해야 함. 더불어 영양학적 동등성을 닭, 쥐, 메추라기 및 송어 등의 실험을 통해서 입증하는 것도 바람직함
- 성분 및 영양소 함량에 대한 이런 결과는 GM 벤투그라스가 일반적인 품종만큼 안전하고 영양이 풍부하다는 것을 확인시켜줄 수 있음
- 주요영양성분, 항영양성분 및 미량원소에 대한 분석의 예는 다음의 앞절에서 제시한 GM 유채 가이드라인의 표 6~표 18을 참고할 수 있음. 영양성분에 있어 GM 벤투그라스가 대조구와 의미있는 차이가 나타나더라도 일반 주요품종과 OECD에서 제시하는 일반품종의 범위를 제시하여 실질적 동등성을 주장 할 수도 있음

차. 숙주와 유전자변형생물체의 생존 및 증식의 차이 비교(8-나)

- GM 벤투그라스와 모품종의 생존 및 증식의 차이를 비교함. 특히 가뭄에 대한 저항성 GM 벤투그라스의 경우 제한된 관개조건하에서의 생리 및 생식 데이터를 제시. 또한 가뭄 저항성 벤투그라스의 포장시험에서 가뭄 저항성 유전자 삽입에 의한 다면적인 영향으로 기인할 수 있는 차이 및 가뭄저항성 벤투그라스와 숙주 간에 농업적 형질 혹은 생식적 특성들에 있어서 차이가 나타나지는지를 확인하여 제시하여야 함.

카. 숙주 또는 숙주가 속하는 생물종과의 차이점(8-다)

1) 자연환경 또는 자연환경을 반영하는 시험 조건하의 생존 및 생식·번식 능력

- GM 벤투그라스의 생태적 상호작용 평가에서는 변화된 유해화 가능성에 관한 특이적인 생태적 위해성을 평가하기 위해 자료를 수집. 평가에는 네 가지 일반적인 자료 범주가 포함 : 1) 농경학적 특성, 2) 발아, 휴면, 출현 3) 생식생장(화분특성 포함) 4) 식물의 종자 잔존 5) 해충, 질병과 식물의 상호작용. 평가된 특성의 개요는 실험을 통해 제시. 벤투그라스의 생활환은 그림 7과 같으며, 각 단계에 대한 GM 벤투그라스와 모본의 비교가 필요
- 생태적 상호작용 평가는 친숙성 개념(OECD, 1993)을 지침으로 하여 벤투그라스 생산 및 평가에 정통한 과학자들이 실시한 실험실 실험과 포장연구를 통합한 자료에 기초함. 각각의 평가에서, 규제대상 품목인 GM 벤투그라스는 GM 벤투그라스와 유전적 배경이 유사하나 가뭄저항성 형질이 포함되지 않은 적절한 관행 벤투그라스(대조구)와 비교함
- 가뭄저항성 번식 특성은 벤투그라스가 가뭄에 대한 저항성이 전달된다는 점 이외에 유전자의 도입이나 암호화된 도입유전자에 의한 단백질로 인해 농경학적 특성 (형태학, 성장 발달, 해충에 대한 민감성 또는 농경학적 곡물 관리 제도에 대한 변형된 반응) 상에 생물학적으로 유의적이고 의도되지 않은 결과를 초래한다는 관찰이 발견되지 않아야 함. 몇 가지 지표에서 유의적인 차이가 관찰되더라도 이러한 차이가 매우 경미하거나 실험이나 시험 품종들을 걸쳐서 어떤 일관된 경향을 나타내지 않으며 전통 벤투그라스 품종들에 대한 정상적인 생물학적 변이성 범위 이내에 드는지 주시해야 함. 따라서 모품종의 유전형에 대해서 예상되는 값의 범위(변이성)를 정확하게 반영하고 GM 벤투그라스에 대한 신뢰성 있는 비교가 가능하게 하기 위하여 여러 지역에서 데이터를 수집
- GM 벤투그라스와 대조구의 번식 양식과 관련된 농업적 특성을 비교하기 위하여 격리포장에서 재배시험을 수행. 여러 해에 걸쳐 다양한 지역의 격리포장에서 GM 벤투그라스와 대조구를 함께 표준재배법으로 재배. 농업적 특성 평가를 위해 출수기, 간장, 수장, 수수, 수당, 립수, 등숙비율, 천립중, 등숙비율, 수량을 조사하여 유의적 차이 유무를 확인. 추가실험을 통한 화분의 크기, 모양, 생명력에 있어서 GM 벤투그라스와 대조구간의 유의적 차이를 보이는지 확인 필요
- 모든 시험 환경 내에서 이루어진 관찰을 근거로 하여 GM 벤투그라스와 대조구사이에는 목적형질에 대한 차이 외에 어떠한 표현형적 차이가 없으며 이와 같은 결론을 통하여 성분에 있어서도 차이가 없다는 자료로서 입증할 수 있음

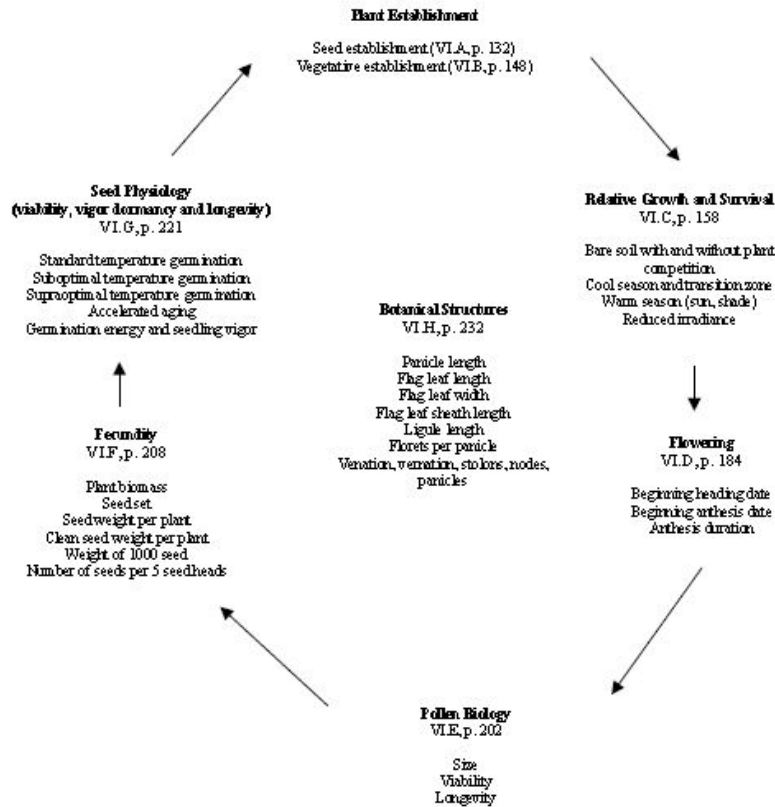


그림 7. 벤틀그라스의 생활환

2) 생식·번식양식 주기 및 교잡성

가) 생식·번식양식 주기

- 화분 생산력과 생육 능력 및 자가 수분 화합성은 산출량으로 알아볼 수 있기 때문에 GM 벤틀그라스와 대조구와의 생식, 번식 등의 주기를 비교하기 위하여 연도별 출수기를 분석하여 유의성 있는 차이를 보이는지 알아보고, 형태학적 특성의 결과와의 유의성도 확인함

나) 생식능력

- 생식능력 비교는 다음과 같은 실험으로 조사할 수 있음
- GM 벤틀그라스와 대조구를 격리온실에서 재배하여, 개화성기의 일정 시간에 슬라이드글라스 위에 개약된 화분을 털어 놓고 화분의 발아배지를 스포이드로 점적하여 생식능력을 분석할 수 있음. 수집된 화분의 직경과 발아율 및 화분 활력을 조사한다. 화분 활력 조사시에는 50% 이상 화분 활력을 잃는 시간과 발아력이 거의 상실하여 수정이 불가능할 때의 시간 등도 조사

표 24. 화분 크기조사(시기별, 지역별 조사 필요)

계통/품종	화분수	크기	표준편차	최소값	최대값
GM					
대조구 1					
대조구 2					

표 25. 화분 수명조사(시기별, 지역별 조사 필요)

Time after dehiscence (min.)	Pollen germination (%)		
	GM	대조구 1	대조구 2
0			
3			
5			
7			
10			

표 26. 화분 활력 조사(5% sucrose용액, MTT 처리)

Staining	% of pollen	
	GM	대조구
stained (Normal shape/size)		
stained (irregular shape/size)		
Non-stained		

○ 종자의 생식능력에 대한 조사가 필요하며 다음과 같은 실험결과를 참조할 수 있음

표 27. 종자 생존율에 대한 Fisher's Exacr Test(시기별, 지역별 조사 필요)

날짜	계통/품종	생존율	차이	95%유 의차	P값
4월	GM 대조구				
6월	GM 대조구				
8월	GM 대조구				

차이 : 대조구와 GM의 생존율 차이

○ 농업적 형질에 대한 조사는 길이, 엽면적, 분얼수, 개화, 종자 등에 대한 조사로 이뤄지며 다음과 같은 실험결과를 참조할 수 있음

표 28. nodes producing-tiller의 평균(지역별 조사 필요)

품종	% of nodes producing-tiller
GM	
대조구	

표 29. 30개 tiller에서의 평균 node 수(시기별, 지역별 조사 필요)

품종	node 수
GM	
대조구	

표 30. 상대생장 및 경합능력 평가를 위한 지역특성표(2개지역, 2년 이상)

지역	기후	재식일	토양특성	세대	대조구
----	----	-----	------	----	-----

표 31. 엽 길이 및 엽 면적(2개지역, 2년 이상)

품종	00년 0월			00년 0월			00년 0월			00년 0월		
	Mx	X	Mn	Mx	X	Mn	Mx	X	Mn	Mx	X	Mn
GM												
대조구												

Mx : 최대값(cm), X : 평균, Mn : 최소값

표 32. 밀도(2개지역, 2년 이상)

품종	00년 0월		00년 0월		00년 0월	
	%cover	Density	%cover	Density	%cover	Density
GM						
대조구						

표 33. 포복도(2개지역, 2년 이상)

품종	00년 0월	00년 0월	00년 0월
	Ground cover	Ground cover	Ground cover
GM			
대조구			

표 34. 개화 (격리온실)

품종	관찰갯수	날짜(날 수)	표준편차	최대, 최소 값
GM				
대조구				

표 34. 출수기 (격리포장, 2개지역, 2년 이상)

품종	관찰갯수	최초 출수 시기	최후 출수 시기	범위값	P값
GM					
대조구					

표 35. 개화종료일 및 평균 개화 지속일(격리포장, 2개지역, 2년 이상)

품종	관찰갯수	개화종료일	개화지속일	평균	최소,최대값
GM					
대조구					

표 36. panicle 당 종자수(격리포장, 2개지역, 2년 이상)

품종	수	평균	최대값	최소값	SD	P값
GM						
대조구						

표 37. 생중량, 종자무게(g/1개체), 천중립(격리포장, 2개지역, 2년 이상)

품종	수	평균	최대값	최소값	SD	P값
GM						
대조구						

다) 교잡성

- 벨트그라스 또한 세 종류의 *Polypogon* 종들과 교배하여 잡종화된다는 보고가 있음. 그러나 관련된 종과의 교잡종 현상은 드물며 원천식물 (Source plant)로부터 거리가 늘어남에 따라 교배가능성은 급격하게 감소하며 잡초화의 이력을 갖지도 않음
- 여러 종류의 잡종들은 대부분이 생식 능력이 없고, 있다하더라도 약하지만 식물학 적인 면에서는 대단히 활발. 잡종화나 중간 잡종 생성은 재배에 있어, 그리고 식용 작물과 장식용 작물의 개선에 있어서의 양상 역할을 해 왔음
- 벨트그라스는 이종교배를 하며 *Agrostis* 속 내에서의 이종교배에 관한 다양한 보고들이 있으나 이 교잡종의 대부분은 인공적으로 만들어지거나 포장 진단이 확인되지 않았음. Davies, Jones 그리고 Bradshaw에 의해 설명된 교배는 주로 형태상으로 두 부모 간의 중간이며 생식력이 완전히 손실되거나 대부분 감소됨
- 속간교배는 *A. stolonifera*와 *P. monspeliensis* (L) Desf., 사이에서 자연적으로 발생한다고 알려져 있지만 교잡종은 불임임. 또한 불임 교잡종은 *P. fugax* 그리고 *P. semiverticillatus* (= *P. viridis*) 와 함께 얻어짐. *Polypogon* 종의 대부분은 고도의 자가 임성을 가지고 있으며 자연 상태에서 교잡종의 형성이 쉽지 않음

3) 자연생태계에서 다른 생물과의 상호작용

가) 잔디초지에서의 국내 주요 잡초와의 작용

1) 봄에 발생하는 화본과 잡초

- 돌피 (Barnyardgrass, *Echinochola crus-galli*) : 주로 나지와 도랑근처에서 흔히 볼 수 있는 일년생 잡초. 잔디초지에서 계속적으로 자주 잔디를 예초하게 되면 땅위에 납작한 형태의 생장을 하며 적응. 잎은 편평한 30~50cm 길이로, 폭 5~15mm, 털이 없으며 잎집의 아랫부분은 홍자색을 띠며 납작한 형태를 가진다. 잎혀(Ligule)가 없는데 벨나 잔디는 잎혀가 있

는 형태. 꽃은 7~8월에 피고 원추화서는 길이가 10~20cm 정도이며, 분얼은 위로 올라 갈수록 짧아지고 밑 부분의 길이는 3~5cm 정도. 작은 이삭은 난형이며 길이는 2~4mm로 적자색으로 곁에 가지 같은 털이 있는 것이 특징. Barnyardgrass는 종자에 의해 번식되며, 다발형 생육습성(Bunch Growth Habit)

- 바랭이 (Crabgrass, *Digitaria sanguinalis* L.) : 경작지 밭에서 흔히 볼 수 있는 1년생 잡초로서 밑부분이 지상을 기면서 마디에서 뿌리가 나고 측지와 더불어 초장이 40~70cm 정도까지 생장. 잔디초지에서 가장 문제가 되는 잡초 중의 하나이며, 생육이 대단히 왕성하여 잔디의 생육을 크게 방해. 잎은 8~20cm, 길이 5~12cm 폭으로 연한 녹색이며, 엽초에 흔히 퍼진 털이 있는 것이 특징이다. 잎혀는 흰 빛이 돌고 길이가 1~3cm이며 꽃은 7~8월에 필

2) 봄에 발생하는 1년생 광엽잡초

- 마디풀(Prostrate knotweed, *Polygonum aviculare*)
길가에서 흔히 자라며 이른 봄에 나타나며 초장이 30~90cm이고 털이 없으며, 직립형인 것도 있으나 흔히 옆으로 비스듬히 퍼지고 가지가 많이 갈라지는 특징이 있음. 낮게 자라는 특성을 가져서 잔디초지에서 문제가 될 수 있음. 잎은 호생하고 긴 타원형으로 길이 1.5~4cm, 폭 2~12mm 이며, 흰색의 꽃이 6~7개월에 핀다. 이 잡초는 내담압성이 강하여 많이 밟혀지는 잔디초지에서 문제가 되기 쉬움
- 쇠비름 (Common Purslane, *Portulaca oleracea* L.) : 경작지인 포장에서 흔히 자라는 1년생 잡초로서 털이 없고 초장이 15~30cm에 달하며 적갈색이고 가지가 많이 갈라지며 비스듬히 옆으로 퍼지는 특징. 새로 조성하는 잔디초지에 나타나기 쉽다. 줄기가 적색을 띠며 뿌리가 넓게 퍼져서 손으로 제거하기가 대단히 어려움. 가뭄에 강하고 작고 노란 꽃이 6월부터 가을까지 계속 피며, 열매는 타원형이고 중앙부가 옆으로 갈라져서 긴 대가 달린 많은 종자가 나옴. 종자는 1주당 10,000~15,000개 정도의 종실이 생산되고, 찌그러진 원형이며 검은 빛이 돌고 가장가지가 약간 토돌토돌함
- 애기땅빈대 (Prostrate Spurge, *Euphorbia supina* Raf. ex Boiss.) : 밭이나 원야에서 자라는 1년생 잡초로서 원줄기는 지면을 따라 퍼지며, 길이가 10~20cm이고 잎과 더불어 털이 다소 있음. 늦봄에 나타나며 잎을 자르면 우윳빛 즙액이 나오고 잔디를 낮게 깎을 때 문제가 되기 쉽다. 잎은 대생(Opposite Leaf)하며 긴 타원형이고 양끝이 둥글며 길이 5~10mm, 폭 2~4mm로서 가장자리에 둔한 잔 톱니가 있고 중앙부에 붉은 빛이 도는 갈색반점이 있음. 종자는 길이 0.6mm 정도로서 4각상 타원형이며 3개의 능선이 있고 표면에는 몇 줄의 옆주름이 있는 특징

3) 봄에 발생하는 2년생 광엽잡초

- 소리쟁이 (Curly Dock, *Rumex crispus* L.) : 습지를 좋아하는 2년생~다년생 잡초. 줄기는 곧추 자라며 녹색바탕에서 자주빛이 돌고 뿌리가 비대해짐. 근생엽은 긴 타원형으로 길이 13~30cm, 폭 4~6cm로서 가장자리가 파상. 낮게 자라는 특성을 가지고 있으며 저장양분이 많아서 더위에 매우 강한 잡초. 열매는 세모가 지고 3개의 내화피로 둘러싸이며 이는 넓은 난형으로 길이 4~5cm, 폭 3.5~4.5mm로서 톱니가 없으며 사마귀 같은 혹은 1.5~2mm의 길이
- 점나도 나물 (Mouseear Chickweed, *Cerastium holosteoides*) : 밭이나 산야에서 자라는 2년생 잡초로서 낮게 자라는 특성. 초장 15~25cm이며 가지가 많이 갈라져서 비스듬히 자라고 흑자색이 돌며 털이 있음. 잎은 대생하며, 난형 또는 난상 피침형으로 가장자리가 밋밋하며 양끝이 좁고 잔 솜털이 있음. 줄기에 털이 많고 땅을 타고 퍼져 나간다. 잎은 작고 털

이 많으며 5~7월에 하얀 꽃이 핌. 잔디초지에서 문제가 되기 쉬운 잡초

- 잔개자리 (Black medic, *Medicago lupulina* L.) : 일년생, 이년생 또는 간혹 다년생처럼 반응을 보이는 잡초로서 종자로 재생하는 두과(Legume)식물. 식물전체에 짧은 털이 있고 밑부분에서 가지가 많이 갈라져 옆으로 기거나 비스듬히 선다. 잎은 엽병이 있으며 작은 잎이 3개이고 타원형이며 양끝이 둥글거나 넓으며 7~17mm, 6~15mm 폭으로서 위 가장자리에 잔톱니가 있음. 이는 주로 녹비 또는 목초로 이용되던 것이 양생화한 것이다. 곧은 뿌리는 얇게 퍼지며 초장은 30~60cm정도

4) 봄에 발생하는 다년생 광엽잡초

- 토끼풀 (White clover, *Trifolium repens*) : 초식가축의 목초로도 사용되며 잔디초지에서 매우 심각한 문제가 되는 다년생(Perennial) 또는 더운 기후 지역에서는 월년생(Winter annual)인 잡초. 콩과 식물로 주로 종자번식을 하지만, 포복경줄기에 의하여 옆으로 퍼진다. 뿌리는 섬유상이며, 줄기는 땅을 기는 포복성 생장이고 마디에서 뿌리가 내리며 매트(mat)를 형성하며 흰 꽃이 6~7월에 핌. 손으로 제거하기가 어렵고 땅속 영양기관이 많아서 재생이 매우 쉬움. 이러한 생육특성을 갖는 white clover는 특히 낮은 예초를 요하는 그린(Putting Green)에서도 살아남는 특징

- 서양 민들레 (Dandelion, *Taraxacum officinale*) : 유럽이 원산지인 다년생 잡초로서 잔디초지나 목초지에서 흔히 볼 수 있으며, 뿌리가 깊이 들어가는 특징이 있다. 잎은 지면에서 사방으로 퍼짐. 잎은 타원형이고 밑의 부분일수록 좁고 안면에 털이 없으며, 가장자리가 밑을 향해 우상으로 갈라져 있음. 꽃은 양성으로서 3~9월에 피며 모두 열매를 맺음. 지름이 2~5cm로 황색종자이며 잎이 없는 화경(Peduncle) 끝에 1개씩 위로 향해 달림. 뿌리나 줄기가 일부 남아서 재생하기도 하며 바람에 씨를 날려서 번식. 잔디초지에서 문제가 많이 되는 잡초 중의 하나이다. 유럽에서는 잎을 샐러드로 사용하며 뉴질랜드에서는 뿌리를 커피 대용으로 사용. 이 민들레는 종자와 뿌리관부로부터 재생되거나 번식. 뿌리는 직근으로 많이 분지된 관부를 갖으며, 쓴맛이 나는 백색유액이 있음

- 애기수영 (Red sorrel, 독명: *Feldampfer; Kleiner Ampfer, Rumex acetosella*) : 산지나 원야의 잔디초지에 볼 수 있는 다년생 잡초로서 초장은 30~80cm이며 원줄기는 원주형으로 많은 줄을 갖고 있는 홍자색을 띰. 뿌리에서 생기는 잎은 총생(Rosette Fasciculation)하며 호생으로 발생한다. 꽃은 5~6월에 피고 10~30cm의 원추화서에서 운생. 화경이 짧으며 연한 녹색을 보인다. 꽃받침은 6개이고 꽃잎은 없으며 수꽃은 6개의 수술이 있고, 꽃밥은 노란색으로 밑으로 향해 처짐. 암꽃은 3개의 암술대가 있으며 잘게 갈라진 암술머리는 홍자색. Red Sorrel는 종자와 포복성의 지하경에 의하여 재생 및 번식됨. 뿌리와 지하경은 넓게 퍼져 있으나 얇게 내린다. 척박한 토질이나 습하고 산성토양에도 잘 견디는 편임

5) 봄에 발생하는 사초와 잡초

- 방동사니 (Yellow Nutsedge, *Cyperus* spp.) : 사초과(sedge)일년생 잡초로서 들이나 밭 근처에서 흔히 자란다. 초장이 10~60cm이고 곧추 자라며 화경이 삼각형. 잎은 뿌리에서 발생하고 화경은 호생하며 나비 2~6mm로서 선형으로 가늘프고 연하다. 화경은 잎 사이에서 각 1개씩 생겨나와 잎같은 포(Bract)가 달리고 길이가 다른 가지에서 갈라져서 각기 많은 작은 이삭이 달리는 특징

- 툴 웨스큐 (Tall Fescue, *Festuca arundinacea* Schr.) : 유럽, 북부 아프리카, 서부 시베리아가 원산지로 주로 사료용 건초(Hay) 및 청예초(Silage)로 이용하고 원야나 황무지에서도

잘 적응하고 있음. Tall Fescue는 Meadow Fescue보다 초장이 뚜렷이 크기 때문에 식별이 용이하며 잎이 퍼지고 잎 표면이 짙은 녹색을 띠며, 잎은 골이 파여 있고 거칠지만 반질반질하게 광택이 나며 짙은 녹색. 잎집은 짧고 줄기는 느슨하게 싸고 있으며, 작은 잎혀를 가지고 있다. 꽃은 원추화서로 가지의 길이는 10~30cm 정도이며, 꽃은 6~7월에 개화하고 주로 타가수정 (Cross Fertilization)을 함. 뿌리가 150cm 정도로 깊이 뻗는 다년생 북방형 잡초로 도복 (Lodging)과 추위에도 잘 견디며 재생력도 강함

6) 늦봄~초여름에 발생하는 일년생 화분과 잡초

- 금강아지풀 (Yellow Foxtail, *Setaria glauca*(L.) Beauv.) : 일반 강아지풀 (*Setaria viridis*(L.) Beauv.) 원야에서 흔히 자라는 1년생 (Annuals) 잡초로서 토양이 비옥하고 잔디의 밀도가 낮은 곳에서 크게 문제가 됨. 잔디에서 문제가 많이 되는 금강아지풀(*S. glauca*)은 엽초에 털이 없으며 잎혀가 퇴화하여 털이 줄로 돋음. 초장이 20~50cm인 일년생 잡초로 밑부분에서 가지가 갈라지며 위 끝에 진털이 있다. 꽃은 8월에 피고 화수는 곧추서며 길이 3~10cm로서 원주형이고 황금색이다. 작은 이삭(Spikelet)은 3mm길이 정도
- 왕바랭이 (Goosegrass, *Bleusine indica*) : 양지쪽 도로변 또는 경작지 근처에서 자라는 1년생 잡초로서 초장이 30~80cm임. 주로 바랭이가 발아를 시작한지 수 주 후에 늦게 발아함. 잎은 편평형으로 길이 15~60cm, 폭 3~7mm 으로서 밝은 녹색이다. 밑부분 안쪽에 긴 털이 있으며 잎혀(Ligule)는 길이 1mm 정도로 백색이고 톱니가 있다. 꽃은 8~9월에 피며, 원줄기 끝에 우산모양이 수상화서(Spike)가 달리고 가지는 7~15cm 길이, 지름 1mm 정도로 3~7개 정도

7) 늦봄~여름에 발생하는 다년생 화분과 잡초

- 쥐꼬리새 (Nimble Will, *Muhlenbergia schreberi* J. F. Gmelin) : 산지의 수풀 가장자리에서 주로 자라는 다년생 잡초(Perennial)로서 종자에 의해 번식되며 습한 토양을 좋아함. 잔디초지에서는 약간 푸른기의 녹색을 띠며 군락(Colony, Community)을 이루고 있어 우산잔디 (*Cynodn Dactylon* (L.) Pres.)와 비슷하며 구별이 어렵지만 우산잔디는 꽃대(Flower Stalk)가 2개 이상의 가지를 치나 이 초종은 꽃대가 가지를 치지 않음. 잎은 편평형으로 길이 5~15cm, 폭 2~4mm로서 잎집(Sheath)과 더불어 분녹색(粉綠色)임. 잎집은 다소 편평하여 잎혀는 짧고 잔털이 있는 특징이며 꽃은 8월에 피며 원추화서는 7~15cm 길이로서 끝이 약간 밑으로 쳐지고 가지가 1개씩 달리며 작은 이삭은 길이가 2.5~3.0mm 정도이다. 수술은 3개이고 꽃밥은 0.8mm길이 정도

8) 봄이나 가을에 발생하는 광엽잡초

- 팽이밥 (Yellow Woodsorrel, *Oxalis* spp.) : 공지에서 흔히 자라는 다년생 잡초로서 줄기는 밑에서 가지를 치지 않고 위쪽으로 가면서 가지를 치며 털이 있음. 꽃은 노란색이고 5개의 꽃잎이 있음. 잎은 호생(Alternate)이고 3개의 작은 잎이 옆으로 퍼져 있으며 일광이 부족하거나 없을 때는 오프라드는 특징. 작은 잎은 길이와 폭이 각각 1~2.5mm로서 가장자리와 뒷면에 원줄기와 더불어 털이 약간 있음. 팽이밥은 각종 토양조건에 잘 견디는 특성으로 각처의 나지에서 생육하는 잡초로 원뿌리가 깊이 땅속으로 들어가고 그 위에서 많은 대가 나와 옆으로 또는 위를 향해 비스듬히 자라며 가지가 많이 갈라지고 10~30cm길이 정도
- 질경이 (Plantains, 독명 : *Breitwegerich ; Grosser Wegerich, Plantago major* L.) : 도로변 또는 나지에서 흔히 볼 수 있는 다년생 광엽잡초로서 질경이는 원줄기가 없고 많은 잎이 뿌리에서 나와 비스듬히 퍼지며 엽병은 길이가 일정하지 않으며, 대개 잎과 길이가 비슷

하고 밑부분이 넓어져서 서로 얼싸 안음. 또 낮게 자라는 폭으로서 평행된 엽맥이 있고 가장자리가 파상. 꽃은 6~8월에 피며 백색이다. 화수(Spike)는 전 초장의 1/3~1/2이고 털이 없으며 포(Bract)는 좁은 난형이고 꽃받침보다 짧으나 거의 없는 것이 많음. 질경이는 다년생이지만 간혹 일년생으로 각종 환경조건 등에 따라 반응을 보일 수도 있으며 종자에 의한 번식이 이루어짐

○ 창질경이 (Buckhorn Plantain, 독명 : *Spitzwegerich, Plantago lanceolata* L.)

질경이과에 속하며 유럽이 원산지인 다년생 잡초. 뿌리줄기가 굵고 육질인 것이 특징. 잎은 난형이며 곧추선 모양을 하며, 양끝이 좁고 초장이 10~30cm 길이로서 위를 향하여 털이 나 있음. 꽃은 8월에 피며 화경은 30~60cm 길이로서 끝에 수상화서가 달리고 화서는 처음에는 둥글지만 자라면서 수상으로 됨

○ 고사리 (Adderspit, 독명 : *Adlerfarn pteridium aquilinum* ver. *latiusculum*) : 햇볕이 잘 드는 곳에서 잘 생육하는 다년생 잡초. 생육특성을 보면 굵은 지하경이 옆으로 뻗으면서 군데 군데 잎이 나오고 높이가 80cm 정도까지 달함. 엽병은 20~80cm 길이로 연한 벗짚색이며 우편 밑을 제외하고는 털이 없는 상태이지만 땅에 묻힌 아랫부분은 흑갈색이고 털이 있는 모양. 잎몸(Leaf Blade)은 계란모양의 삼각형으로서 길이가 50cm, 폭이 40cm 정도까지 갈라짐. 초식가축(Herbivorous Animals, Grass-Eating Animals)중 소의 고사리 중독은 외국에서 19세기 말부터 bracken poisoning이라 불리어 왔으며, 우리나라에서는 제주도에서 발생빈도가 다른 지역보다 높음

나) 지표적 생물체와의 상호작용

- 벤틀그라스 포장의 곤충을 채집하여 수, 종류, 밀도 등을 비교. 발생하는 곤충은 국가별, 지역별, 기상조건에 따라 다름. 미국 오레곤에서 수행된 결과 긴 노리재, 땅벌레, 야도충, 지엽벌레, 바구미, 땅강아지, 진딧물, 노린재, 무당벌레, 거미, 벌 등의 목들이 관찰됨
- 최근 국립환경과학원에서는 국내 주요 지표적 생물체에 대한 가이드라인을 연구하여 제공하고 있음 (2011년)

다) 토양미생물과의 상호작용

- 앞 절의 'GM 유체의 가이드라인'을 참고할 수 있음

7. GM 작물 환경위해성평가에 대한 국제 동향과 번역서 발간

가. 서론

- GM 작물의 환경위해성평가 기술 및 내용은 과학발전 및 시대적 상황에 따라 발전함. 따라서 이에 대한 국제 동향을 주기적으로 모니터링하고 그에 맞게 평가를 진행해야 할 필요성이 제시됨. 따라서 본 연구에서는 생명공학의 안전성과 관련한 주요 국제기구를 소개하고 현황을 조사하여 안전성평가 연구자가 참조할 수 있도록 하였음
- 또한 GM 작물 안전성평가 연구와 관련된 우수 외국 서적에 대한 번역서를 발간하여 안전성평가 연구에 활용할 수 있도록 하였음
- 안전성관련 주요 국제기구는 표 38과 같이 UNEP, OECD, APEC, CODEX 등이 있으며, GMO의 개발 및 사용(특히 국가간 이동)에 있어서 안전성을 확보하기 위하여 각 국가의 규

제 확립과 조화 및 정보교류 촉진을 위하여 노력하고 있음. 이 가운데 UNEP과 OECD에서는 GM 작물에 대한 환경위해성평가 가이드라인 개발과 관련한 의제에 대해 논의 및 활동이 진행 중임. 주기적으로 두 기구의 웹사이트를 방문하여 최신 동향을 파악한다면 위해성평가 연구를 진행하는데 많은 정보를 획득할 수 있음

표 38. 생명공학 안전성 관련 주요 국제기구

국제기구	구분	회의명	관련기관
UNEP	환경	·바이오안전성의정서 당사국회의	지경부, 농진청 등
OECD	환경	·생명공학규제조화 작업반	환경부, 농진청
	환경, 식품	·신규식품사료안전성 작업반	농식품부, 농진청
APEC	환경, 식품	·농업생명공학교위정책대화	농식품부, 농진청
CODEX	식품	·생명공학응용식품 정부간 특별작업반 ·표시분과	식약청

나. UNEP (바이오안전성의정서 당사국 회의)

- UN 환경부 산하의 바이오안전성의정서 당사국 회의는 GMO의 국가 간 이동시 환경에 대한 안전성 확보를 주목표로 활동하고 있음 (표 39). 특히 지난 2101년 일본 나고야에서 개최된 제5차 당사국총회에서는 LMO의 국가간 이동에 대한 책임 및 복구에 대한 부속서가 채택되었음
- 최근 주요 의제 중 하나인 위해성 평가 및 관리(의제13, 제15조 및 제16조)의 LMO 위해성 평가를 위한 지침서 개발은 어류, 곤충, 후대교배종 등 특수한 LMO에 대한 안전성평가 지침 개발에 대해 논의되고 있음
- 특수한 LMO에는 교잡가능성이 높은 타가수정작물과 환경 스트레스내성 작물 등이 포함될 가능성이 있음. 이러한 지침서 개발을 위해 현재 AHTEG(전문가 회의)와 온라인포럼이 진행 중에 있음. 자세한 정보는 해당 웹사이트(<http://bch.cbd.int/about/>)에서 얻을 수 있음 (그림 5)

표 39. UNEP 바이오안전성의정서 당사국 총회

구분	내용
목적	· 유전자변형생물체의 국가간 이동시 환경에 대한 안전성 확보
기원	· 생물다양성협약 제19조 (생명공학의 취급과 이익분배)
연혁	· 1995 - 2000 실무그룹회의 (6회), 특별당사국회의 · 2000.01.29 바이오안전성의정서 채택 · 2000 - 2002 정부간위원회 (3회)

	<ul style="list-style-type: none"> · 2003.09.11 효력발생 · 2004 - 2008 당사국총회 (제4차까지) · 2007.10.02 한국 비준 · 2008.01.01 한국 이행 (LMO법 시행) · 2010.10.09 제5차 당사국총회
의제	<ul style="list-style-type: none"> · LMO의 취급, 운송 포장 및 표시사항 · 책임복구 · 개도국의 위해성평가 능력형성 (협력) · GM 작물 위해성평가를 위한 지침서 개발



그림 8. BCH 웹사이트 메인화면

다. OECD (생명공학규제조화 작업반)

- OECD의 생명공학규제조화 작업반은 생명공학제품의 개발 및 사용에 있어서 환경적 건강 및 안전성을 적절하게 평가하기 위하여 관련 규제의 국제적 조화 촉진을 목표로 운영되고 있는 국제회의임 (표 40). 최근 주요한 쟁점으로 미승인 GM의 저수준혼입(LLP, low level presence)과 주요 작물의 생물학과 형질에 대한 위해성평가 기술합의서 개발 등이 논의되고 있음. 특히 GM 식물의 방출을 위한 환경위해성평가 고려사항 등이 논의되고 있으므로 주기적인 모니터링이 요구됨. 자세한 정보는 해당 웹사이트에서 얻을 수 있음 (그림 9, http://www.oecd.org/topic/0,3699,en_2649_34385_1_1_1_1_37401,00.html).

표 40. OECD 생명공학규제조화 작업반

구분	내용
목적	· 생명공학제품의 개발 및 사용에 있어서 환경적 건강 및 안전성을 적절하게 평가하기 위하여 관련 규제의 국제적 조화 촉진
활동	· 환경위해성평가의 공통정보를 제공하는 기술합의서 개발
특징	· 진행은 매우 느리지만, 작성한 기술합의서는 개발자의 유전자변형생물체의 위해성평가 및 규제당국의 심사에 활용
연혁	· 1998 - 2008 제5차 제21차 · 2009 제22, 23차 · 2010.05 제24차 · 국제바이오안전성학회(ISBGMO)와 협력 활동 증가
의제	· 주요 작물의 생물학과 형질에 대한 위해성평가 기술합의서 개발 · 저수준혼입(LLP, low level presence)이 새로운 쟁점으로 부각

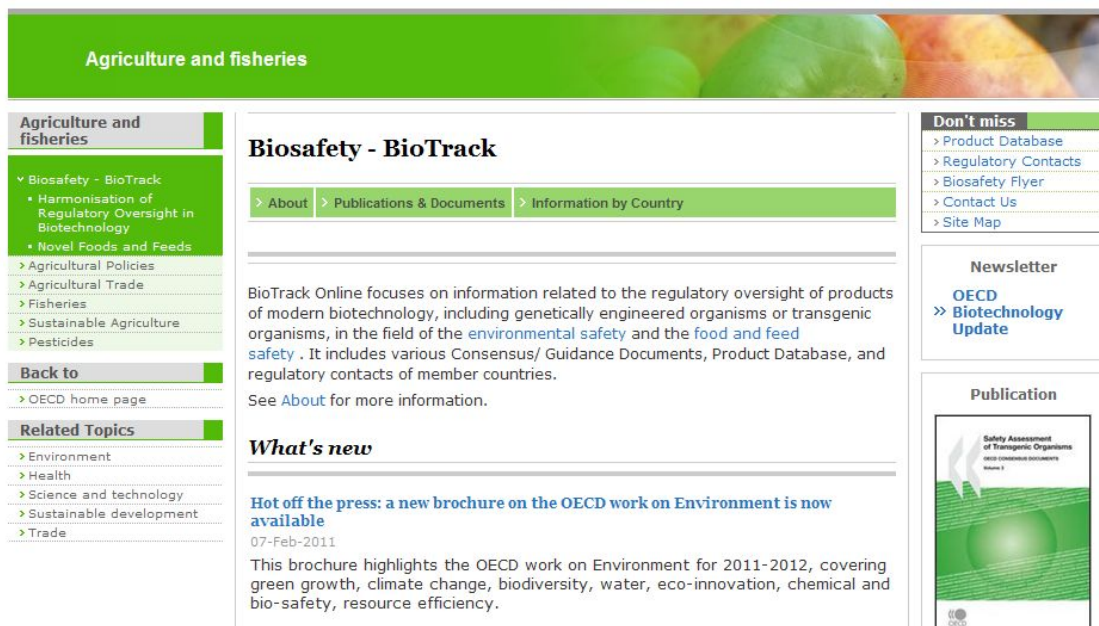


그림 9. BCH 웹사이트 메인화면

라. GMO 위해성평가 관련 전문번역서 개발

- 1) GMO의 안전성평가 연구자를 지원하기 위해 ‘GMO 안전성평가를 위한 문제형성과 선택 핸드북’ 과 ‘EU의 10년간 GMO 연구 보고서, 2001-2010’를 번역하여 교재화 하였음. 이 전문번역서는 안전성평가 연구자 및 GMO 개발자에게 제공되어 연구에 참조할 수 있게 하였음 (그림 10).



그림 10. GMO 위해성평가 관련 전문번역서 발간

2) GMO 안전성평가를 위한 문제형성과 선택 핸드북(Problem Formulation and Options Assessment Handbook)

- 주요 내용 : PFOA는 GMO 유전자 변형 식품의 안전성 평가에 관련된 미래 대안들의 비교 평가를 수행하기 위해 개발되었으며, 과학적 평가와 함께 심의를 통합하여 환경위해성평가를 강화하는 역할을 함. 이 안내서는 기관과 GMO의 환경위해성평가를 수행하는데 관련된 관계자들을 위한 것이며, PFOA를 계획하고 수행하며 관리하는데 필요한 정보와 자원을 과학자, 정부 입법자들과 기관 행정가들에게 제공하는 것이 목표임
- 주요 목차는 아래와 같음
 - ① 서론
 - ② GMO의 환경위해성평가와 통제 개선
 - ③ PFOA는 무엇인가?
 - ④ PFOA 워크샵에서 나온 결과 요약
 - ⑤ PFOA 계획과 실행
 - ⑥ PFOA 수행
 - ⑦ 마지막 고찰

3) EU의 10년간 GMO 연구 보고서, 2001-2010 (A decade of EU-funded GMO research, 2001-2010)

- 주요 내용 : 유럽연합 집행위원회는 지난 25년 동안 500개가 넘는 독립적인 연구단체들에게 3억 유로 이상의 기금을 지원해 GM 작물에 대한 130건의 연구 프로젝트를 수행한 보고서
- 'GMO의 안전성에 관한 유럽공동체 후원 연구, 1985-2000 (EC-sponsored research on Safety of Genetically Modified Organisms, 1985-2000)'에 이은 두 번째 결과 보고서임
- 본 보고서는 2001년부터 2010년까지 10년 간 총 2억 유로 기금을 지원받아 400개 이상의 연구소에서 81개 연구결과를 종합한 것으로 GM 작물의 안전성이 주제이며 연구 프로젝트로부터 도출된 결론으로서 GMO가 기존 생물체에 비해 환경이나 인체 및 사료에 위해성이 더 크다는 어떠한 과학적 근거를 찾을 수 없다고 진술하고 있음

제 4절 GM 유채와 벤틀그래스의 모니터링 기법 개발

제 1항. 이론적, 실험적 연구방법

- GM 유채와 벤틀그래스의 포장실험 중에 GM 유채나 벤틀그래스가 토양미생물 군집 구조에 미치는 영향을 분석하고, 토양미생물로의 수평유전자전이 가능성을 평가
- 화분의 특성 및 화분 비산 거리를 조사하고, 격리포장 주변에서 교잡가능한 종을 대상으로 도입유전자 확산에 대한 모니터링을 수행
- 최종적으로 GM 작물의 포장실험시 사용할 수 있는 모니터링 지침서를 제안

제 2항. 연구내용 및 연구결과

1. GM 유채

가. 토양의 물리화학적 특성 분석

- 충북 증평군 도안면 소재의 (주)에프엔피 격리포장에서 GM 유채(AtBG1 유채, line 28-14)와 모품종인 한라유채 (WT 유채) 재배 토양의 물리화학적 특성을 분석. 격리포장에는 반복 없이 하나의 시험구(크기: 4 × 4 m)만 설치되어 있었으며, GM 유채와 한라유채는 한 줄에 각각 8주씩 50 cm의 재식간격으로 정식되었음 (그림 1.1)

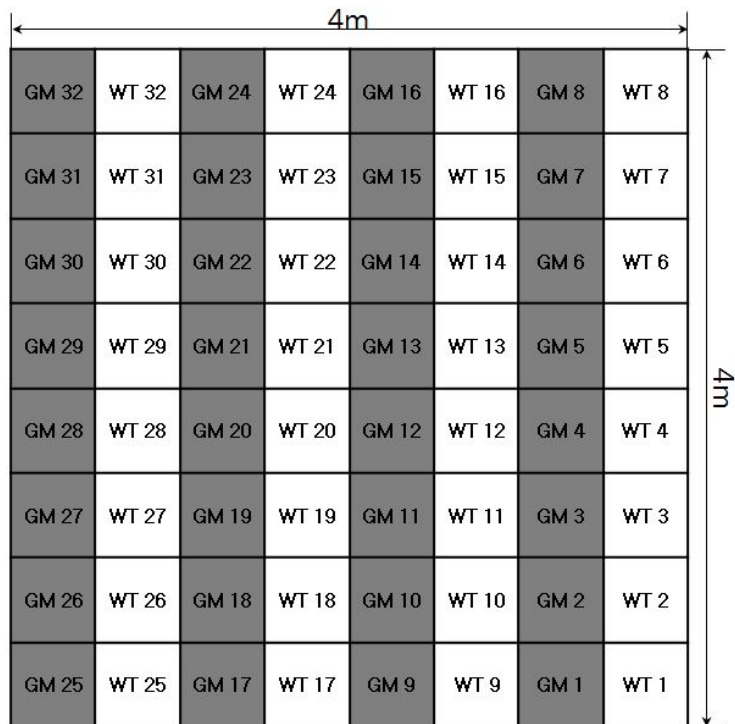


그림 1.1. 유채 재배 모식도

- 토양은 2009년 5월 27일에 채취. GM 유채와 WT 유채가 정식된 각 줄에서 두 군데씩 각각 총 8개의 토양 시료를 채취한 뒤 합하여 하나의 시료로 만들었다. 토양은 토양 코어(지름 3 cm)를 이용하여 20 cm 깊이까지 채취하였음. 채취한 토양은 실험실로 옮겨와 실온에서 7일간 건조하고, 2 mm 체로 쳐 체를 통과한 토양을 실험에 사용하였음
- 수분함량은 음건토양 약 10 g을 105°C 드라이오븐에서 24시간동안 건조시킨 뒤 무게를 측정하여 감소한 무게를 백분율로 환산하여 산출. 토양 pH는 50 mL tube에 10 g의 토양과 20 mL의 증류수를 넣고(w/v = 1:2), 30분간 흔들었음. 그 후 약 1 시간동안 정치시킨 뒤 pH meter로 3회 측정하여 평균값을 산출하였음. 유기물함량은 토양 약 2 g을 600°C 작열로에서 6시간 동안 태운 뒤 무게를 측정하여 감소한 무게를 백분율로 환산하여 산출
- 토성은 비중계를 이용하여 분석하였음. 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 16시간동안 정치시켰음. 증류수를 이용하여 총 부피를 1 L로 맞춘 뒤 실온이 될 때까지 정치시켰음. 이후 메스실린더를 상하뒤집기를 20회 반복하였고, 40초 뒤 비중계를 이용하여 1차비중(R_{40s})을 측정하였음. 이때 거품이 생긴 경우 butanol 1방울을 떨어뜨려 거품을 제거한 뒤 측정하였음. 2차 비중(R_{2hr})을 2시간 후에 측정하였고, 다음 식에 의하여 sand, clay 및 silt의 함량을 계산하였음

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

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

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

- 전질소(total-N), 유효인산(available phosphate), 치환성 칼륨(exchangeable K), 칼슘(Ca), 마그네슘(Mg) 및 나트륨(Na)의 함량의 분석은 서울대학교 농업생명과학대학 농생명과학공동기기원(NICEM)에 의뢰하였음
- GM유채와 WT유채 재배 토양의 물리화학적 특성을 분석한 결과 중성의 양질사토(loamy sand)였음. 좁은 면적에 하나의 시험구만 설치되어 있어서 GM 유채와 WT 유채에서 채취한 토양 간에 물리화학적 특성의 차이는 발견되지 않았음 (표 1.1)

표 1.1. 유채 재배 토양의 물리화학적 특성 분석 결과

Genotype	Water		sand (%)	clay (%)	slit (%)	Organic						
	content (%)	pH				matter content (%)	N(%)	P(mg/kg)	K(mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Na (mg/kg)
WT	0.69	7.05	81	7	12	3.4	0.129	294.1	56.0	1089	139.9	69.90
GM	0.62	6.94	81	7	12	3.2	0.130	291.2	44.1	1049	136.2	63.34

나. GM 유체가 토양미생물 군집 구조에 미치는 영향 평가

- (주)에프엔피에서는 그림 1.1과 같은 디자인으로 GM 유체와 한라유체를 2009년 5월 15일에 정식. 이 시험구에서 2009년 5월 27일, 6월 26일과 7월 29일에 GM 유체와 한라유체를 각각 4주씩 무작위로 선택하여 뿌리채 뽑은 뒤, 토양을 털어내었음. 한 주당 20 g의 뿌리를 100 mL의 3차 증류수에 씻고 1시간 동안 5000 rpm에서 원심분리하여 상층액은 버리고 남은 토양만 실온에서 말린 후 2 mm 체에 걸러 근권토양을 채취
- 또한 (주)에프엔피로부터 GM 유체와 한라유체를 각각 10주씩 분양받아 한국생명공학연구원의 격리온실에 2009년 6월 19일에 정식한 뒤 8월 11일에 각각 5주씩 무작위로 선택하여 위와 같은 방법으로 근권토양을 채취
- 채취한 토양 0.8 g으로 FastDNA SPIN Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하여 세균과 진균을 검출할 수 있는 각각의 primer로 PCR을 하였다. 세균을 검출할 수 있는 primer의 sequence는

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(8F),

5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(1492R)

진균 primer의 sequence는

5'-CAAACCTGGTCATTTAGAGGA-3'(EF3RCNL),

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(ITS4)

이며 8F와 EF3RCNL의 5'에는 ABI 3130에서 data를 분석하기 위한 표지로서 FAM이란 형광 dye를 labeling하였고 PCR로 증폭된 fragment는 polymorphism이 높은 제한효소 (*HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*)로 잘라 ABI 3130의 Genemapper program으로 분석하였다. 분석된 수치는 PRIMER (version 6.0, UK)를 통해 NMDS (non-metric multidimensional scaling) 와 ANOSIM (analysis of similarities)을 수행

- 2009년 에프엔피 격리포장에서 채집한 유체의 근권토양에서 세균과 진균 군집은 토양채취 시기에 따라 차이가 나며 동일한 시기에서 GM 또는 non-GM 에 따른 차이는 나타나지 않았음 (그림 1.2). 또한 2009년 동일한 시기에 충북 오창의 격리온실과 경기 수원 농진청의 격리포장에서 채취한 유체의 근권토양에서도 GM과 non-GM의 차이 보다는 서로 다른 토양에 의한 차이가 크게 나타났음 (그림 1.3)
- 2010년에 (주)에프엔피 격리포장에서 GM 유체(*AtBG1* 유체, line 28-02)와 모품종인 한라유체(WT 유체)를 각각 3 plot을 재배하여 실험을 실행하였음. 이 시험구에서 2010년 4월 29일, 6월 1일과 6월 29일에 각각 GM 유체 2주, non-GM 유체 2주를 무작위로 선택하였음. 토양을 털어낸 뿌리를 300 mL의 3차 증류수에 씻고 30분 동안 8000 rpm에서 원심분리하여 상층액은 버리고 남은 토양만 실온에서 말린 후 근권토양을 채취한 후, 잘 섞어서 냉동고에 보관하였음
- 채취한 토양 0.8 g으로 FastDNA SPIN Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하여 세균과 진균을 검출할 수 있는 각각의 primer로 PCR을 하였음. 세균을 검출할 수 있는 primer의 sequence는

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(8F),

5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(1492R)

진균 primer의 sequence는

5'-CAAACCTGGTCATTTAGAGGA-3'(EF3RCNL),

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(ITS4)

이며 8F와 EF3RCNL의 5'에는 ABI 3130에서 data를 분석하기 위한 표지로서 FAM이란 형광 dye를 labeling하였고 PCR로 증폭된 fragment는 polymorphism이 높은 제한효소 (*HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*)로 잘라 ABI 3130의 Genemapper program으로 분석하였음. 분석된 수치는 PRIMER (version 6.0, UK)를 통해 NMDS (non-metric multidimensional scaling) 와 ANOSIM (analysis of similarities)을 수행하였음

- 세균 군집의 경우 유채 계통에 따른 유의한 차이는 없었으나, 토양채취 시기에 따른 유의한 차이가 있었음 (표 1.2, 그림 1.4). 진균 군집의 경우 역시 유채 계통에 따른 유의한 차이는 없었으며 토양채취시기에 따른 차이만 뚜렷하게 관찰되었음

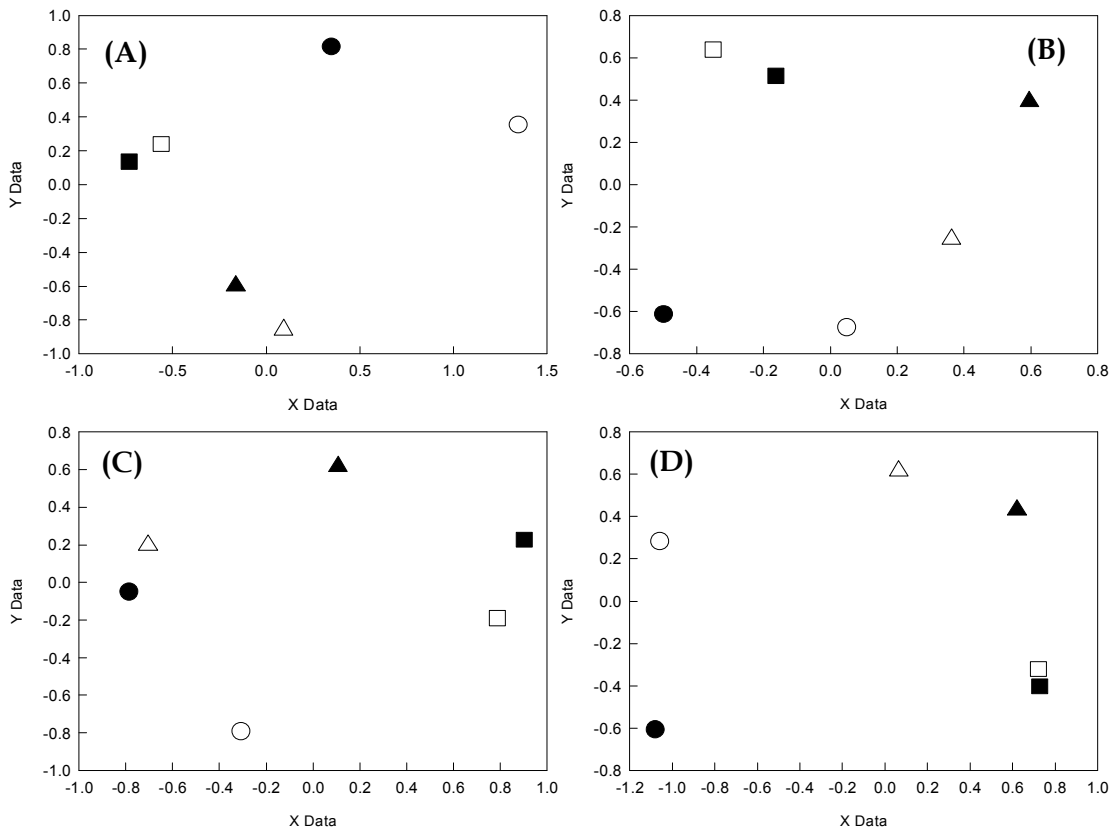


그림 1.2. 2009년 (주)에프엔피에서 채집한 유채에서 16S와 ITS 염기서열의 T-RF프로파일에 대한 NMDS 분석 결과. 평균값을 표시함. (A: 세균-*HaeIII*, B: 세균-*HhaI*, C: 진균-*HaeIII*, D: 진균-*HinfI*, ○: WT 5월, △: WT 6월, □: WT 7월, ●: GM 5월, ▲: GM 6월, ■: GM 7월)

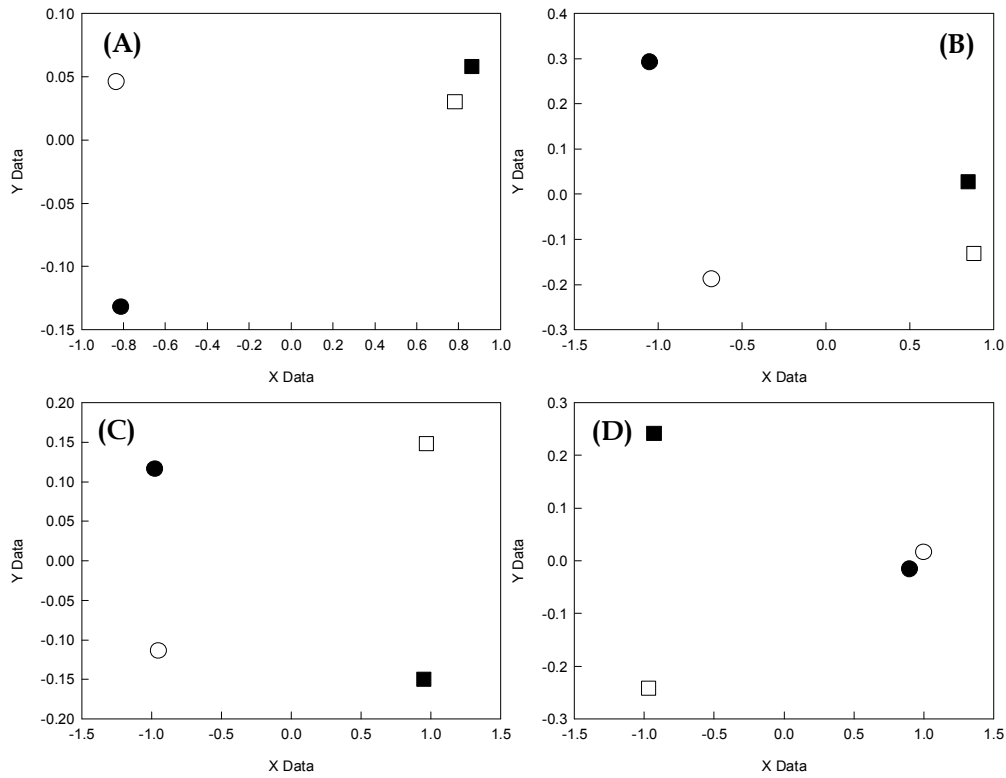


그림 1.3. 2009년 오창온실과 수원농진청에서 채집한 유체에서 16S와 ITS염기서열의 T-RF 프로파일에 대한 NMDS 분석 결과. 평균값을 표시함. (A: 세균-*HaeIII*, B: 세균-*HhaI*, C: 진균-*HaeIII*, D: 진균-*HinfI*, ○: WT 온실, □: WT 농진청, ●: GM 온실, ■: GM 농진청)

표 1.2. 2010년 유체 근권토양 시료 T-RFLP 프로파일의 ANOSIM 분석 (NS, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

	Bacterial 16S rRNA T-RF		Fungal ITS T-RF	
	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
Genotype				
WT vs. TR	0.025 NS	-0.210 NS	-0.062 NS	-0.185 NS
Sampling month				
Global R	0.337 *	0.519 *	0.864 ***	1.000 ***
Apr vs. 1 Jun	0.444 *	0.778 **	1.000 **	1.000 **
Apr vs. 29 Jun	0.185 NS	0.241 NS	0.556 *	1.000 **
1 Jun vs. 29 Jun	0.389 NS	0.463 **	1.000 ***	1.000 **

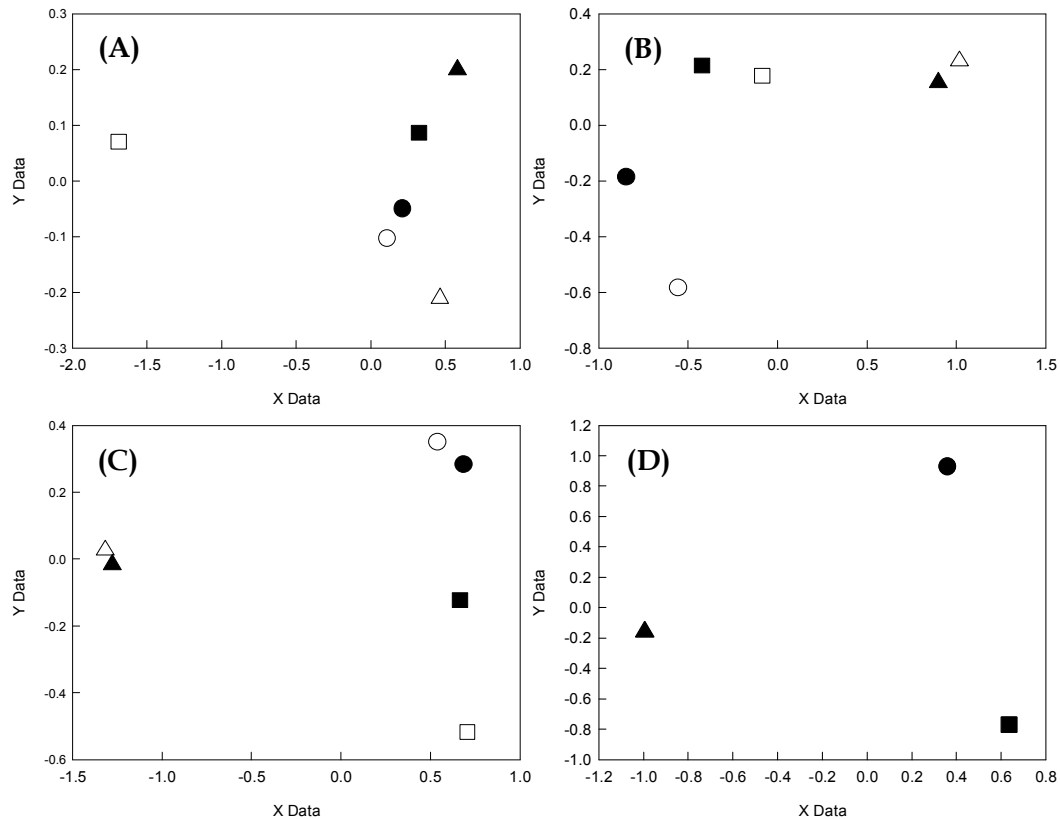


그림 1.4. 2010년 (주)에프엔피에서 채집한 유채의 근권토양에서 16S와 ITS 염기서열의 T-RF 프로파일
 일에 대한 N-MDS 분석 결과. 평균값을 표시함. (A: 세균-*HaeIII*, B: 세균-*HhaI*, C: 진균-*HaeIII*, D: 진
 균-*HinfI*, ○: WT 4월, △: WT 6월 1일, □: WT 6월 29일, ●: GM 4월, ▲: GM 6월 1일, ■: GM 6
 월 29일)

다. 토양미생물로의 수평유전자 전이 조사

- GM 유채로부터 토양미생물로의 수평유전자 전이 가능성을 조사. 토양미생물이 식물체에 가장 근접하게 분포하고 있는 근권에서 토양시료를 채취하였으며, 배양법과 PCR 분석을 통해 연구를 수행
- 충북 증평군의 (주)에프엔피 격리포장에서 2009년 5월 27일, 6월 26일, 7월 29일에 GM 유채와 한라유채 식물체를 뿌리까지 뽑아 세게 흔들어 흙을 털어내었으며, 뿌리에 계속 붙어 있는 토양을 근권토양으로 간주하였음. 또한 경기도 수원시 농촌진흥청 격리포장에서 2009년 8월 10일에 유채 뿌리 주변의 토양을 soil core로 채취하였으며, (주)에프엔피 격리포장에 새로 조성한 GM 유채와 non-GM 시험구에서 2009년 11월 26일에 근권토양을 위와 동일한 방법으로 채취하였음
- 각 시기와 장소별로 채취한 토양은 Fast DNA SPIN® for Soil Kit (Q-Biogene, USA)을 이용하여 total DNA를 추출한 후 PCR 분석을 수행하였음. 분석에 사용된 primer는 GM 유채에 선발마커로 도입된 유전자인 Bar 유전자 부위에서 제작되었다. Primer의 염기 서열은 다음과 같음

Forward: AAG GAC GGT CAA CTT CCG TA

Reverse: ACT CGG CCG TCC AGT CGT A

- 양성대조구로서 진균류의 내재유전자인 18S rRNA 부위를 증폭하였다. Primer의 염기 서열은 다음과 같음

Forward: GGG CAT TCG TAT TTC ATA GTC AGA G

Reverse: CGG TTC TTG ATT AAT GAA AAC ATC CT

- 각 시기별로 채집된 토양시료로부터 PCR 분석을 수행한 결과 2009년 5월에 증평에서 채취한 토양을 제외하고 나머지 모든 토양에서 Bar 유전자가 검출되었음 (그림 1.5)

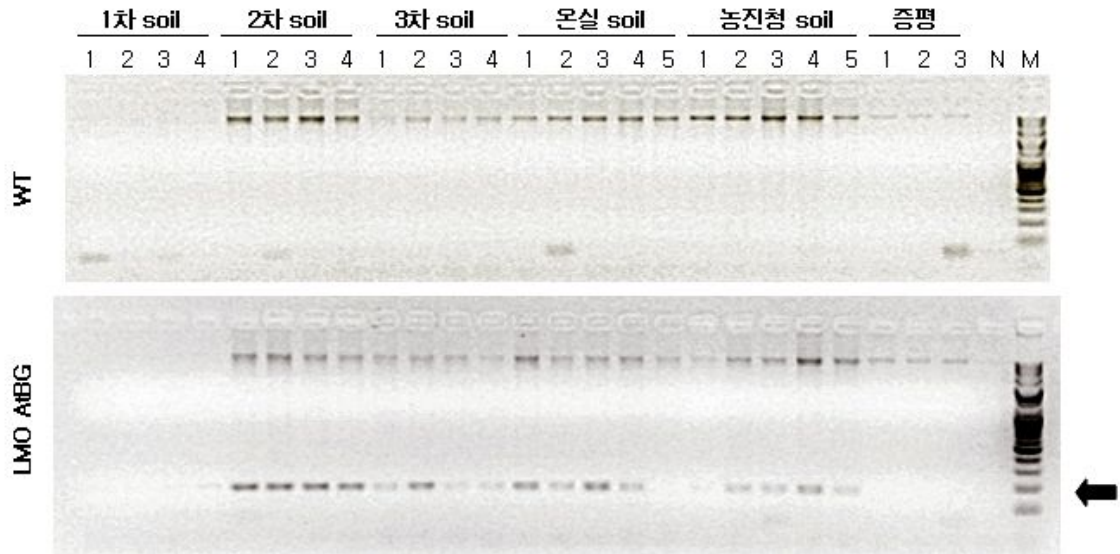


그림 1.5. PCR products of Bar primer amplified from soil samples; N: negative control.

표 1.3. Selection 배지에서 토양 세균, 진균과 사상균의 생장 (cfu/mg). 평균 표준편차

Site	Sampling date	Oilseed rape	LB	PDA-rs	YG-rs
증평	09.05.27	Non-GM	43.75±8.87	34.5±6.29	68.5±7.57
		GM	30.75±6.12	9±2.61	26.75±8.64
	09.06.26	Non-GM	52.5±36.25	51±11.23	120±24.16
		GM	99.25±80.26	14.5±3.79	83.75±34.71
	09.07.29	Non-GM	29±3.78	0	106.75±31.99
		GM	15.25±3.66	0	191.5±50.11
수원	09.08.10	Non-GM	9.4±7.67	4.4±0.24	12.2±4.38
		GM	22.8±23.82	8.8±2.04	33.8±21.31
증평	09.11.26	Non-GM	2.66±1.66	19.66±1.20	34.66±10.03
		GM	0.66±0.33	17±0.57	38±8.08

- 2010년에 (주)에프엔피 격리포장에서 GM 유채(AtBG1 유채, line 28-02)와 모품종인 한라유채(WT 유채)를 각각 3 plot을 재배하여 실험을 실행하였음. 이 시험구에서 2010년 4월 29일, 6월 1일과 6월 29일에 각각 GM 유채 2주, non-GM 유채 2주를 무작위로 선택하였다. 토양을 털어낸 뿌리를 300 mL의 3차 증류수에 씻고 30분 동안 8000 rpm에서 원심분리하

여 상층액은 버리고 남은 토양만 실온에서 말린 후 근권토양을 채취한 후, 잘 섞어서 냉동고에 보관하였음

- 각 시기와 장소별로 채취한 토양은 10배 연속희석법을 이용하여 희석한 후 LB 배지에서 배양. 이때 CFU는 50-100 사이를 유지하도록 하였으며 이후 colony hybridization protocol에 따라 10% SDS로 3분간 cell membrane을 파괴하고 soln B, C를 통해서 wash와 단백질 변성과정을 거친 후, soln D를 이용해 step 사이의 solution들을 wash 했음
- 유리된 DNA를 Hybond N-membrane에 정착시키고 southern blot protocol에 따라 membrane에 흡착된 DNA를 UV light fixation 처리한 후, probe가 들어있는 hybridization buffer로 하루 밤 동안 처리했음. 이후 일련의 wash과정을 거치고, assay 과정을 거친 후, CDP star와 kodak film을 이용해서 현상한다. 이때는 1시간의 노출시간을 주었다. 이 과정에서 사용되는 primer는 AtBG1 gene에 대응하는 것으로 염기 서열은 다음과 같음

Forward: TTG GAT CAC ATT TAA CGA GCC - biotin

Reverse: CAA CTC GGA CTC TTA GGA TCA G - biotin

- 이러한 과정을 거쳐 얻은 결과물은 그림 1.6과 같음. 이는 토양을 3차 증류수에 10^3 으로 희석해 50-100 CFU의 수를 보인 plate 즉, 50,000 - 100,000 colony를 colony hybridization 한 결과임. 만약 HGT가 일어나서 target gene이 해당식물에서 토양미생물로 이동했다면, probe에 의해 필름에 발색반응이 일어나게 됨. 하지만 결과물을 보면 전혀 반응이 일어나지 않았다. 이는 HGT가 일어나지 않았음을 증명하는 결과로 볼 수 있음



Colony hybridization in LB plate (WT)



Colony hybridization in LB plate (GM)





그림 1.6. LB 배지에서 colony hybridization 결과

라. GM 유채와 non-GM 유채 및 근연종과의 교잡을 검정

- GM 유채와 non-GM 유채 및 교배가능한 근연종과의 교잡을 검정하기 위한 실험을 진행하고 있음. GM 유채와 모품종인 한라 유채의 유묘는 2009년 11월 26일 (주)에프앤피로부터 수령하였으며, 교배 대상으로 사용할 내한유채(IT 031572), 갯무(IT 216870), 무(IT

102377), 갓(IT 218456), 배추(IT 100460), 양배추(IT 223334)는 국립농업유전자원센터 농업 유전자원센터로부터 종자를 분양 받아 사용하였음

- 2009년 10월 28일에 종자상태에서 저온 처리된 내한유채, 갓무, 무, 갓, 배추, 양배추를 파종 하였으며, 2009년 12월 4일에 (주)에프엔피로부터 수령한 GM 및 WT 유채와 함께 지름 29 cm × 높이 20cm의 포트에 유묘 1주씩 정식하였음. 발효:버미큘라이트:부산물퇴비(풍산비료, 콤스타):펠라이트 = 2:2:1:1(v/v)의 부피비율로 섞어 사용하였고, 정식 후 28/22°C (day/night), 단일 조건의 유리 온실에서 재배하였음 (그림 1.7)

<p align="center">GM 유채 (<i>Brassica napus</i>)</p>	<p align="center">WT 유채(한라) (<i>Brassica napus</i>)</p>
	
<p>내건성 강화 형질전환 유채</p>	<p>GM 유채의 모품종</p>
<p align="center">내한유채(IT 031572) (<i>Brassica napus</i>)</p>	<p align="center">갓(IT 218456) (<i>Brassica juncea</i>)</p>
	
<p>목포 51호(목포시험장 육성품종)</p>	<p>거제시 홍남리 바닷가 잡초형 수집종</p>





<p style="text-align: center;">무(IT 102377) (<i>Raphanus sativus</i> var. <i>sativus</i>)</p>	<p style="text-align: center;">갯무(IT 216870) (<i>Raphanus sativus</i> var. <i>raphanistroides</i>)</p>
	
<p>제주 수집종, 재래종</p>	<p>제주시 남제주군 마라리 수집종, 야생근연종</p>
<p style="text-align: center;">배추(IT 100460) (<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>)</p>	<p style="text-align: center;">양배추(IT 223334) (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)</p>
	
<p>내병불압3호, 국내육성종</p>	<p>그랜드마트, 아시아종묘 육성품종</p>

그림 1.7. 온실에서 재배중인 GM 유채와 근연종(2010년 2월 촬영)

- 교잡을 위하여 각각의 식물체는 종자준화와 녹식물체준화를 하여 개화를 유도하였으며, 갯, 순무, 무, 유채는 개화가 유도되어 2010년 6월 18일부터 7월 9일까지 각 품종별 개화된 꽃에서 3개의 꽃봉우리에서 교배를 실시하였으며, 개화 약 2일전의 꽃봉우리를 사용하여 수술을 제거하고 GM 유채의 당일 개화된 꽃을 따서 수분수로 사용하였음. 교배 조건으로 온도 28~30℃(수분시), 오전 10:00~11:30까지 교배하였으며, 교배 후 기름종이를 이용하여 피대하였음. 인위교배가 아닌 벌을 통한 교배 정도를 알아보기 위하여 꽃무늬호박벌((주)그린아그로텍)을 6월 18일 온실내 방사하여 7월 9일까지 3주간 교배를 유도하였음
- 교배 후 각 근연종에서 종자가 열린 개체를 7월 21일, 8월 20일, 9월 8일 내한유채와 갯에서 수확할 수 있었고, 나머지 무, 갯무, 배추와 양배추에서는 교배 후 종자를 얻지 못하였음. 교배 후 얻어진 종자에서 교배 여부를 조사하기 위하여 수확한 종자를 10월 4일 포트에 심고 식물체 조직을 충분히 얻기 위하여 12월 20일까지 재배하여 잎에서 DNA를 추출하였고, 12월 23일 PCR을 통하여 교배 여부를 확인하였음

- 또한, 벌을 통한 자연교배 정도를 알아보기 위하여 벌을 방사하여 활동 후 얻어진 종자 전체를 2010년 12월 24일에 파종하여 본엽이 3~5매 되었을 때 2011년 1월 13일 바스타(바이엘, 독일)를 1ml/L 농도로 처리하여 교배 여부를 확인하였음

표 1.4. GM 유채와 근연종간 교배 후 채종과 교배 확인 결과

line	교배일	수확일	종자갯수	PCR 검정결과
내한유채	6월 18일	8월 20일	42	교배 안됨
내한유채	6월 21일	9월 8일	1	교배 안됨
갯	6월 18일	7월 21일	2	교배 안됨
갯	6월 21일	7월 21일	9	1개체 교배
갯	6월 25일	7월 21일	1	교배 안됨

- 채취한 시료는 DNeasy Plant Mini Kit을 이용하여 genomic DNA를 추출하였고 내재유전자와 도입유전자를 검출할 수 있는 각각의 primer로 PCR을 하였음
- 내재유전자인 Actin을 검출할 수 있는 primer의 sequence는
5'-AACTGGGATGATATGGAGAA-3' (forward),
5'-CCTCCAATCCAGACACTGTA-3' (reverse)
- 도입유전자인 Bar를 검출할 수 있는 primer의 sequence는
5'-CTACCATGAGCCCAGAACGACG-3' (forward),
5'-CTGCCAGAAACCCACGTCATGCCAGTTC-3' (reverse) 임

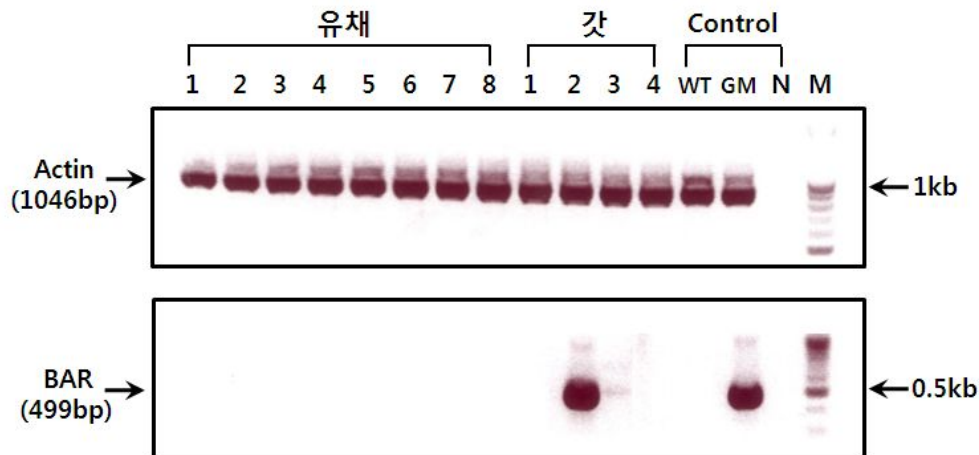


그림 1.8. PCR 전기영동 결과. (WT: 한라유채, GM: AtBG1 유채, N: negative control, M: 100bp DNA ladder)

- GM 유채와 근연종간의 인위교배를 통한 유전자 교잡 가능성과 빈도를 알아보기 위한 실험에서 표 1.4와 그림 1.8에서 확인된 것과 같이 내한유채와 갯에서 교배 후 종자를 얻었고, 그 중에서 갯에서 교배된 1개체를 확인할 수 있었음 (그림 1.9).



인위교배 후 수확한 종자 파종



인위교배 확인된 갓 개체

그림 1.9. 인위교배 후 얻어진 종자와 PCR 확인 후 확인된 갓 식물체

- 벌을 통한 자연교배 정도를 유도하기 위한 실험에서 수확된 모든 개체에서 바스타를 통한 교배여부를 확인한 결과 교배된 개체를 발견할 수 없었음 (표 1.5, 그림 1.10).

표 1.5. 벌 방사 후 얻어진 각 작물의 종자와 교배여부

line	수확일	종자갯수	바스타 처리 결과
한라유채	7월 6일	327	교배 안됨
한라유채	7월 21일	160	교배 안됨
내한유채	6월 28일	1,767	교배 안됨
내한유채	7월 6일	533	교배 안됨
내한유채	7월 21일	672	교배 안됨
내한유채	8월 20일	2,834	교배 안됨
갓	6월 28일	98,925	교배 안됨
갓	7월 8일	3,769	교배 안됨
갓	8월 20일	3,259	교배 안됨
무	6월 28일	603	교배 안됨
무	7월 8일	343	교배 안됨
무	9월 3일	712	교배 안됨
갓무	6월 28일	6	교배 안됨
갓무	7월 8일	4	교배 안됨
갓무	9월 6일	57	교배 안됨



벌을 통한 교배 후 수확한 종자 파종



바스타 처리 후 교배 확인(생존개체 없음)

그림 1.10. 벌을 통한 교배 후 얻어진 종자의 바스타 처리 전·후 식물체

마. AtBG1 유체의 화분특성 조사

- 화분립의 크기 측정은 2010년 6월 10일에 내한유채, 한라유채, GM유채 각각의 그룹에서 4주를 선택하여 실험에 사용하였음. 선택된 개체 당 꽃을 3개씩 고르고 각각의 꽃에서 화분을 취하여 하나의 프레파라트를 만들어 실험하였음. Slide glass 위에 Lugol 용액(Fluka 62650)을 1~2방울 떨어뜨린 후 그 위에 모아진 화분을 넣고 잘 섞어주고 3~5분 정도 염색하였음. 염색된 화분은 cover glass를 덮어 광학현미경(Olympus BX41)으로 화분을 관찰하였음. 관찰된 화분 중 형태가 분명하게 나타난 것들을 골라 촬영하고, 현미경용 스케일바를 사용하여 크기를 측정해 주었음. 개체 당 10개씩의 화분립을 대상으로 극축의 길이(PL: polar axis length)와 적도면의 지름(ED: equatorial diameter)을 측정하여 크기를 비교하였음 (그림 1.11).



그림 1.11. 유채 화분립의 모양과 측정 위치(PL: polar axis length, ED: equatorial diameter)

- 화분립의 크기 데이터는 유채의 종류, 개체, 꽃의 3가지 요소가 순서대로 속해 있는 구조이기 때문에, 이를 고려하기 위해 3수준 위계적 분산분석 (three-level hierarchical ANOVA)를 수행하였음. 분석결과 극축의 길이는 내한, 한라, GM유채 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 반면, 적도면의 지름은 유채의 종류 간에 유의한 차이가 뚜렷하게 나타났으며 ($P < 0.0001$), GM, 내한, 한라 순으로 감소하였음 (표 1.6, 그림 1.12).

표 1.6. 극축의 길이와 적도면의 지름 데이터의 위계적 분산 분석을 통한 유채의 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	2	3.020	0.0502	42.541	< 0.0001
plant[type]	9	11.435	< 0.0001	19.377	< 0.0001
flower[type, plant]	24	3.094	< 0.0001	2.943	< 0.0001

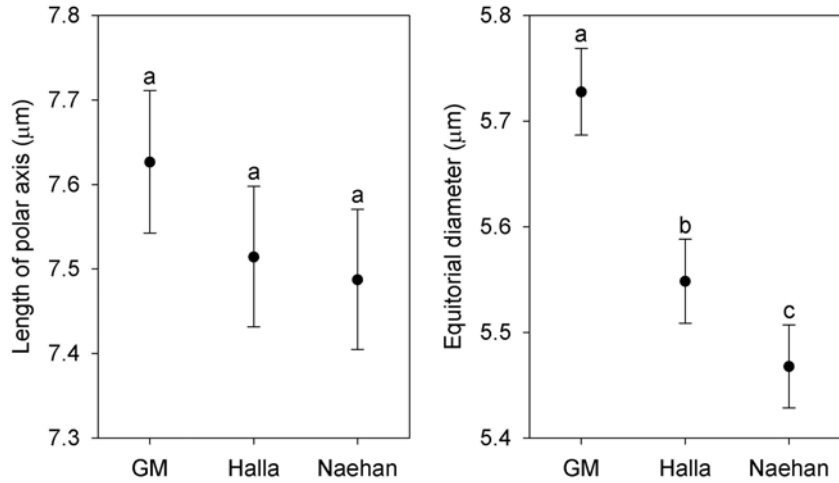


그림 1.12. GM, 한라, 내한 유체의 극축의 길이와 적도면의 지름 비교 (평균과 95%신뢰구간, 같은 문자는 Tukey's HSD 검정 결과 유의한 차이가 없음을 나타냄).

- 화분 염성도를 이용한 활력 측정은 2010년 6월 24일에 내한유체, 한라유체, GM유체 각각의 그룹에서 3개체를 선택하여 실험에 사용하였음. 선택된 개체 당 3개의 꽃을 취하여 각각의 꽃을 반복으로 하여 프레파라트를 만들어 실험하였음. Slide glass 위에 ppp-test 용액 [Peroxidase indicator reagent, Sigma 390-1 1vial, 3% hydrogen peroxide 200 μ l, 5ml Trizmal 6.3 buffer(Sigma 903C) in 45ml deionized water] 1~2방울을 떨어뜨리고 그 위에 모아진 화분을 넣어 잘 섞어 주었음. 3~5분정도 화분을 염색하고, 염색된 화분은 cover glass를 덮어 광학현미경(Olympus BX41)을 사용하여 관찰하였음 (Rodriguez-Riano and Dafni, 2000). 염성도는 약 300개 정도의 화분립을 대상으로 측정하였으며, 활력을 가진 화분은 완전한 검은색으로, 활력을 잃거나 손상된 화분은 연한 갈색이나 손상된 모습으로 보였음 (그림 1.13)

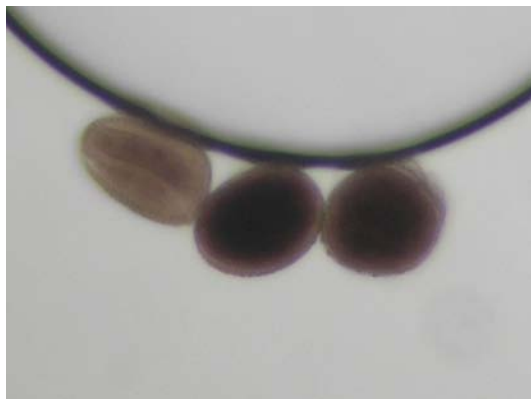


그림 1.13. 염성도 테스트를 이용한 화분 활력

- 화분의 염성도 데이터는 유체의 종류와 각 종류에 속한 개체를 고정요인으로, 각 꽃에서 나온 화분의 개수를 공변량 (covariate)으로 두어 분산분석을 수행하였음. 그 결과 염성도는 GM, 한라, 내한 유체 간의 차이가 검출되지 않았음 (표 1.7, 그림 1.14)

표 1.7. 염성도 데이터의 분산 분석을 통한 유체의 종류 (type)와 개체 (plant), 공변량인 화분 개수(npol)에 대한 유의성 검정 결과

Source	df	F ratio	P value
type	2	0.4750	0.6281
plant[type]	6	1.2295	0.3396
npol	1	0.4465	0.5130

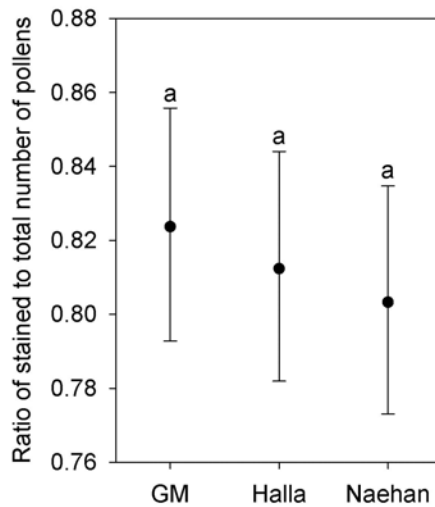


그림 1.14. GM, 한라, 내한 유체 화분의 염성도 비교 (평균과 95% 신뢰구간, 같은 문자는 Tukey's HSD 검정 결과 유의한 차이가 없음을 나타냄).

바. AtBG1 유체의 화분 비산거리 측정

- GM 유체의 화분(pollen)의 비산거리를 측정하기 위하여 에프앤피(주) 격리포장에 그림 1.15와 같이 시험구를 설치하였음. 화분 채취 이전에 풍향 및 풍속계를 설치하여 풍향 및 풍속을 측정하였음. 화분채취는 2010년 6월 11일과 6월 18일에 시행하였다. 화분 수집기는 지면으로부터 80cm 높이로 설치하였으며, 한 거리 당 2개의 슬라이드글라스를 올려놓았음. 슬라이드글라스는 바세린을 얇게 도포한 다음 65°C 드라이오븐에 넣어 슬라이드글라스에 바세린이 녹아 착상되도록 처리하여 실험에 사용하였음. 슬라이드글라스는 오전 11시부터 오후 1시 사이에 2시간동안 노출시켰다. 화분 포집이 완료된 슬라이드글라스는 슬라이드박스에 담아 실험실로 옮겨와 광학현미경(Olympus, BX41)을 이용하여 슬라이드글라스의 가시면적(5.75×2.5 cm)에 있는 모든 화분을 계수하였음
- 유체 화분 비산 거리를 측정하는 기간 동안 대체적으로 북서풍이 불어온 것으로 나타났음 (그림 1.16). 이는 본 실험에서 설치한 방향과는 반대 방향으로 화분 채집에 있어서 불리한 조건이었다. 이런 이유에서인지 채집된 화분의 수가 매우 적게 나타났다. 그 결과를 보면 0m와 1m 사이에서 급격히 감소하는 경향으로 나타났고, 최대 비산거리는 1m로 6월 11일 line 2에서 기록되었음. 최대 수량검출은 6월 11일 line 2번 0.1m와 0.2m에서 15.5 ± 12.5 와 15.5 ± 3.5 개로 최고치를 기록하였음 (표 1.8)

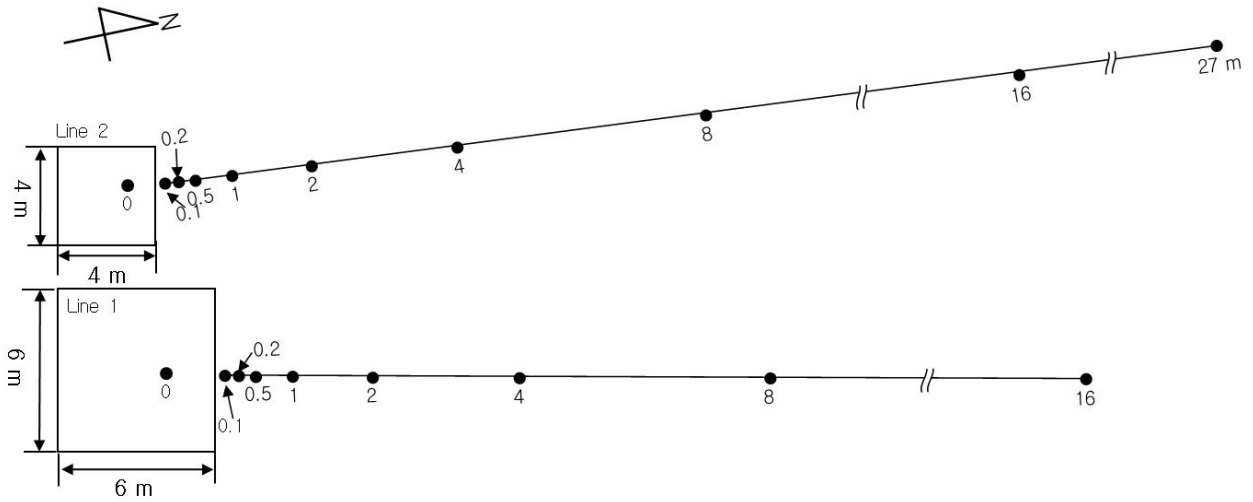


그림 1.15. 시험구 설치 모식도(●: 화분포집용 스텐드, 거리 단위: m)

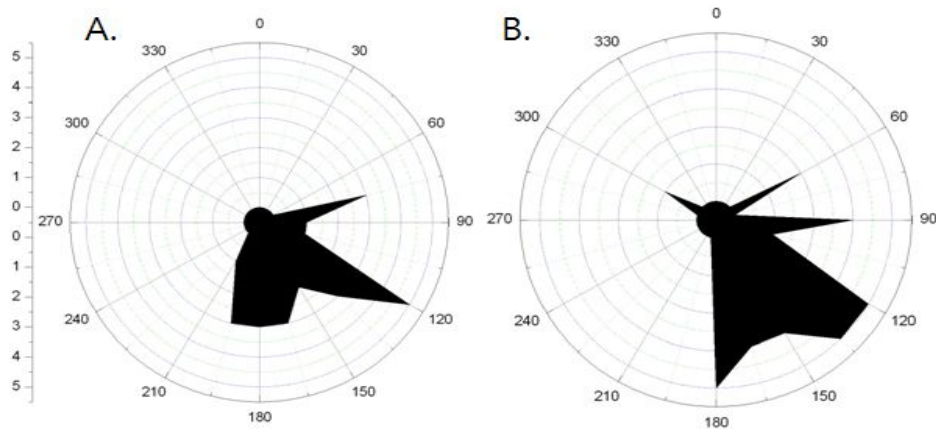


그림 1.16. 화분 수집 기간 동안 풍향 및 풍속 측정 결과(A: 6월 11일, B: 6월 18일)

표 1.8. 유체의 화분 비산 거리 측정 결과

거리(m)	2010. 6. 11		2010. 6. 18	
	line 1	line 2	line 1	line 2
0	3 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	6.5 ± 4.5
0.1	1.5 ± 0.5	15.5 ± 12.5	1.5 ± 1.5	11.5 ± 10.5
0.2	9 ± 8	15.5 ± 3.5	7 ± 3	4 ± 4
0.5	1	3.5 ± 1.5	0	0
1	0	0.5 ± 0.5	0	0
2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
8	0	0	0	0
16	0	0	0	0
27	-	0	-	0

사. GM 유채 재배 격리포장 주변 모니터링

- GM 유채가 재배중인 충북 증평군 도안면 소재의 에프앤피(주)의 격리포장을 기준으로 반경 약 1 km 이내에 재배중이거나 자생하고 있는 십자화과 식물 중 유채, 갓, 케일 등 유채을 모니터링 하였음 (그림 1.17, 1.18). 모니터링은 2010년 5월 14일과 20일에 시행하였고, 도로변을 기준으로 하여 조사하였음. 조사지점에서 식물체가 발견되면 GPS(Garmin. GPSmap 60CS)로 위치를 표시하였음. 또한 발견된 식물체에서 종자를 채집하기 위해 약 한달 후인 2010년 6월 11일, 18일, 29일에 걸쳐 식물체의 생존 여부를 확인하였고, 종자를 채집하였음 (표 1.9)



그림 1.17. 격리포장 주변 위성사진



그림 1.18. 격리포장 1 km 이내에서 발견된 유채

표 1.9. 식물체 채취 장소






지역 번호	사진	좌표		격리포장과 의 거리(m)	식물
		N	E		
1		36°49'18"	127°36'17"	970	갯, 유채
2		36°48'47"	127°36'50"	600	갯
3		36°48'47"	127°36'51"	620	갯
4		36°48'47"	127°36'50"	590	갯
5		36°48'45"	127°36'35"	240	케일

표 1.9. 계속

지역 번호	사진	좌표		격리포장과 의 거리(m)	식물
		N	E		
6		36°48'41"	127°36'50"	630	갯
7		36°48'40"	127°36'51"	670	갯, 유채
8		36°49'03"	127°36'46"	1,100	갯
9		36°48'31"	127°37'07"	1,300	갯, 유채

표 1.9. 계속

지역 번호	사진	좌표		격리포장과 의 거리(m)	식물
		N	E		
10		36°49'22"	127°36'57"	1,100	갯, 유채
11		36°49'15"	127°36'54"	690	유채, 갯

- 조사지점에서 채취한 모든 종자를 이용하여 식물체의 종을 동정하였고, 이후 2010년 10월 1일에 모든 개체에서 일부 종자(약 500-1400립)를 파종하여 식물체의 잎을 이용하여 종을 확인하였음. 그리고 발아한 개체수를 확인하여 발아율을 계산하였음. 2010년 10월 29일 본엽이 3-5매가 되었을 때 제초제인 바스타(바이엘, 독일)를 1 ml/L 농도로 처리하여 2-3주 후 유전자 이동 여부를 검정하였음 (그림 1.19)
- 남은 종자는 2010년 12월 24일에 파종하여 2011년 1월 13일에 바스타를 같은 농도로 처리한 후 유전자 이동 여부를 검정하였음. 조사 지역에서 총 11곳에서 십자화과 식물로 추정되는 개체가 발견되었음. 갯으로 추정되는 식물은 밭과 노지 등 총 9곳, 밭에서 재배중인 케일 1곳, 유채와 갯 모두 발견된 밭 1곳으로 최소 2개체부터 최대 500개체 이상으로 존재하였음. 격리포장 주변에 재배중이거나 자생하고 있는 십자화과 식물로의 유전자이동 오염 여부를 확인하기 위하여 채취된 모든 종자를 파종한 결과 발아율은 0-92%로 개체 간에 큰 차이를 보였음. 또한 바스타를 이용한 GM 식물의 존재 여부를 조사한 결과 생존한 개체는 발견할 수 없었음 (표 1.10)



모니터링된 유채 및 갓 종자의 수확 후 파종

모니터링 개체의 바스타 처리 후
유전자 오염 여부 확인(생존개체 없음)

그림 1.19. 유채 모니터링 후 얻어진 종자의 바스타 처리 전·후 식물체

표 1.10. 격리포장 주변에 재배 혹은 자생하고 있는 유채 또는 근연종의 모니터링

지역번호	식물체 종류	채집된 종자수	발아율	바스타 처리 후 생존 개체
1	갓	5,272	90	0
	유채	739	78	0
	유채	3,365	60	0
	유채	4,802	68	0
	유채	6,040	62	0
	유채	2,680	66	0
	유채	592	14	0
	유채	1,899	62	0
	유채	2,588	73	0
7	갓	683	22	0
	갓	3,879	59	0
	갓	480	10	0
	갓	312	32	0
	유채	2,402	2	0
	유채	500	0	0
	유채	1,157	0	0
	갓	1,653	0	0
9	유채	2,782	10	0
	유채	1,632	27	0
	갓	1,371	7	0
	유채	668	15	0
	유채	396	79	0
	유채	522	92	0
	유채	4,626	55	0
	유채	6,852	0	0
10	유채	5,972	2	0
	갓	2,230	70	0
	갓	4,762	77	0
	갓	2,275	12	0
	갓	1,897	40	0
11	갓	3,336	86	0
	유채	65	15	0

2. GM 벤투그래스

가. 토양의 물리화학적 특성 분석

- 충북 증평군 도안면 소재의 (주)에프엔피 격리포장에서 GM 벤투그래스 (AtBG1)와 모품종인 WT 벤투그래스 재배 토양의 물리화학적 특성을 분석하였음. 시험구의 크기는 1 × 7.4 m로 GM plot과 WT plot 각각 3plot씩 만들었음
- GM 벤투그래스와 WT 벤투그래스 재배 전 토양시료와 재배 후 토양시료의 채취는 각각 2010년 4월 29일과 2011년 6월 21에 시행하였음. 토양시료는 토양 코어(지름 3 cm)를 이용하여 20 cm 깊이까지 채취하였음. 채취한 토양은 실험실로 옮겨와 실온에서 7일간 건조하고, 2 mm 체로 쳐 체를 통과한 토양을 실험에 사용하였음.
- 수분함량은 음건토양 약 10 g을 105℃ 드라이오븐에서 24시간동안 건조시킨 뒤 무게를 측정하여 감소한 무게를 백분율로 환산하여 산출하였음. 토양 pH는 50 mL tube에 10 g의 토양과 20 mL의 증류수를 넣고(w/v = 1:2), 30분간 흔들었음. 그 후 약 1 시간동안 정치시킨 뒤 pH meter로 3회 측정하여 평균값을 산출하였음. 유기물함량은 토양 약 2 g을 600℃ 작열로에서 6시간 동안 태운 뒤 무게를 측정하여 감소한 무게를 백분율로 환산하여 산출
- 토성은 비중계를 이용하여 분석하였음. 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 측정. 그리고 캡이 있는 메스실린더에 토양 100 g을 넣고 5% calgon 용액과 300 mL의 증류수를 추가로 넣은 다음 16시간동안 정치시킴. 증류수를 이용하여 총 부피를 1 L로 맞춘 뒤 실온이 될 때까지 정치시켰음. 이후 메스실린더를 상하뒤집기를 20회 반복하였고, 40초 뒤 비중계를 이용하여 1차 비중(R_{40s})을 측정하였음. 이때 거품이 생긴 경우 butanol 1방울을 떨어뜨려 거품을 제거한 뒤 측정하였음. 2차 비중(R_{2hr}) 측정을 2시간 후에 측정하였고, 다음 식에 의하여 sand, clay 및 silt의 비율을 계산하였음

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

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

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

- 전질소(total-N), 유효인산(available phosphate), 치환성 칼륨(exchangeable K), 치환성 칼슘(Ca), 치환성 마그네슘(Mg) 및 치환성 나트륨(Na)의 함량은 서울대학교 농업생명과학대학 농생명과학공동기기원(NICEM)에 분석을 의뢰하였음
- GM 벤투그래스와 WT 벤투그래스 재배토양의 토양물리화학적 특성을 분석한 결과 표 2.1과 같이 중성의 양질사토(loamy sand)였고, 채취한 토양 간에 물리화학적 특성의 차이는 발견되지 않았음

표 2.1. 벤틀그래스 재배 토양의 물리화학적 특성 분석 결과(평균±표준오차, n=3)

	2010		2011	
	WT	GM	WT	GM
Water content (%)	0.94±0.05	1.01±0.01	1.12±0.08	1.11±0.13
pH	6.69±0.10	6.47±0.06	5.90±0.05	5.82±0.04
sand (%)	81.0±0.92	81.0±0.67	84.4±0.33	84.1±0.36
clay (%)	5.77±0.34	4.41±0.34	4.07±0.00	4.75±0.35
slit (%)	13.23±0.6	14.59±0.33	11.53±0.33	11.20±0.02
Organic matter content (%)	3.48±0.14	3.47±0.23	2.13±0.23	2.39±0.27
Total-N (%)	0.12±0.001	0.11±0.005	0.09±0.005	0.11±0.004
Available-P (mg/kg)	46.91±6.44	50.58±3.61	530.1±4.6	669.01±15.5
Exchangeable K (mg/kg)	31.83±0.72	28.88±1.43	41.3±2.80	46.17±2.54
Exchangeable Ca (mg/kg)	899.4±27.9	869.7±46.9	803.8±78.9	840.8±25.1
Exchangeable Mg (mg/kg)	109.0±1.6	102.2±5.9	102.1±9.3	103.0±2.4
Exchangeable Na (mg/kg)	43.81±0.96	43.89±1.96	38.69±2.55	39.60±1.37

나. GM 벤틀그래스가 토양미생물 군집 구조에 미치는 영향

- 2010년 충북 증평군 도안면 소재의 (주)에프앤피 격리포장에서 GM 벤틀그래스(AtBG1)와 모품종인 벤틀그래스(WT 벤틀그래스)를 각각 3 plot을 재배하여 실험을 실행하였음. 시험구는 6 m x 7.4 m 면적으로 이 시험구에서 2010년 4월 29일, 6월 1일과 6월 29일에 plot 당 직경 3cm의 core를 사용하여 20cm 깊이로 5번씩 무작위적으로 채취하고, 잘 섞어서 냉동고에 보관하였음
- 채취한 토양 0.8 g으로 FastDNA SPIN Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하여 세균과 진균을 검출할 수 있는 각각의 primer로 PCR을 하였음. 세균을 검출할 수 있는 primer의 sequence는

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(8F),

5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(1492R)

진균 primer의 sequence는

5'-CAAACCTGGTCATTTAGAGGA-3'(EF3RCNL),

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(ITS4)

이며 8F와 EF3RCNL의 5'에는 ABI 3130에서 data를 분석하기 위한 표지로서 FAM이란

형광 dye를 labeling하였고 PCR로 증폭된 fragment는 polymorphism이 높은 제한효소 (*HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*)로 잘라 ABI 3130의 Genemapper program으로 분석. 분석된 수치는 PRIMER (version 6.0, UK)를 통해 NMDS (non-metric multidimensional scaling)와 ANOSIM (analysis of similarities)을 수행

- 세균 군집의 경우 벤틀그래스 계통에 따른 유의한 차이는 없었으나, *HaeIII*로 분해하였을 때 토양채취 시기에 따른 유의한 차이가 있었음 (표 2.2, 그림 2.1). 진균 군집의 경우 *HaeIII*로 분해하였을 때 벤틀그래스 계통과 채취시기에 따른 유의한 차이가 관찰되었음. 반면 *HinfI*로 분해하였을 때에는 채취시기에 따른 차이만 유의했음

표 2.2. 2010년 벤틀그래스 토양시료 T-RFLP 프로파일의 ANOSIM 분석 (NS, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

	Bacterial 16S rRNA T-RF		Fungal ITS T-RF	
	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
벤틀그래스 line				
WT vs. TR	0.222 NS	-0.086 NS	0.494 *	-0.148 NS
Sampling month				
Global R	0.704 ***	0.132 NS	0.638 ***	0.210 *
Apr vs. 1 Jun	0.315 *	-0.130 NS	0.481 *	0.185 NS
Apr vs. 29 Jun	1.000 **	0.296 **	0.889 **	0.426 NS
1 Jun vs. 29 Jun	0.796 **	0.241 NS	0.519 **	0.037 NS

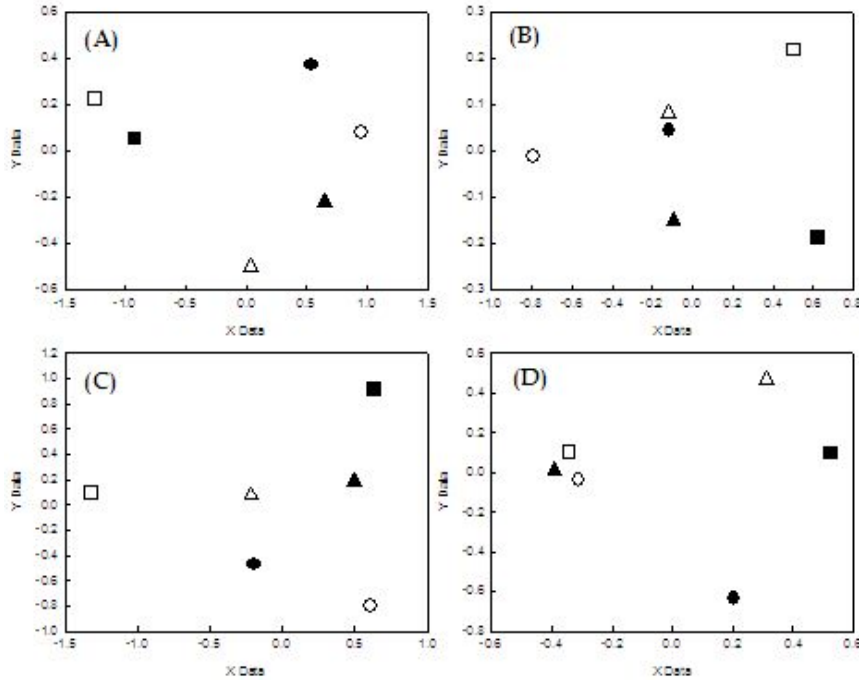


그림 2.1. 2010년 (주)에프엔피에서 채집한 벤투그래스의 근권토양에서 16S와 ITS 염기서열의 T-RF 프로파일에 대한 NMDS 분석 결과. 평균값을 표시함. (A: 세균-*HaeIII*, B: 세균-*HhaI*, C: 진균-*HaeIII*, D: 진균-*HinfI*, ○: WT 4월, △: WT 6월 1일, □: WT 6월 29일, ●: GM 4월, ▲: GM 6월 1일, ■: GM 6월 29일)

- 2011년 충북 증평군 도안면 소재의 (주)에프엔피 격리포장에서 GM 잔디(*AtBG1*)와 모품종인 벤투그래스(WT 잔디)를 각각 3 plot을 재배하여 실험을 진행. 실험구는 6 m x 7.4 m 면적으로 이 실험구에서 2011년 6월 21일, 8월 22일, 10월 21일과 12월 9일에 plot 당 직경 3cm의 core를 사용하여 20cm 깊이로 5번씩 무작위적으로 채취하고, 잘 섞어서 냉동고 보관
- 채취한 토양 0.8 g으로 FastDNA SPIN Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하여 세균과 진균을 검출할 수 있는 각각의 primer로 PCR을 하였음. 세균을 검출할 수 있는 primer의 sequence는

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(8F),

5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(1492R)

진균 primer의 sequence는

5'-CAAACCTGGTCATTTAGAGGA-3'(EF3RCNL),

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(ITS4)

이며 8F와 EF3RCNL의 5'에는 ABI 3130에서 data를 분석하기 위한 표지로서 FAM이란 형광 dye를 labeling하였고 PCR로 증폭된 fragment는 polymorphism이 높은 제한효소(*HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*)로 잘라 ABI 3130의 Genemapper program으로 분석하였다. 분석된 수치는 PRIMER (version 6.0, UK)를 통해 NMDS (non-metric multidimensional scaling)와 ANOSIM (analysis of similarities)을 수행

- 분석결과 세균 군집 뿐 아니라 진균 군집에서도 GM과 non-GM 벤투그래스 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있었으며, 진균 군집의 경우 채집 시기에 따른 차이도 관찰되었음 (표 2.3, 그림 2.2).

표 2.3. 2011년 잔디 토양시료 T-RFLP 프로파일의 ANOSIM 분석 (* P<0.05; ** P<0.01)

	Bacterial 16S rRNA T-RF		Fungal ITS T-RF	
	<i>Hae</i> III		<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I
Grass line				
WT vs. TR	0.204 *		0.352 **	0.287 **
Sampling month				
Global R	0.074		0.377 **	0.525 **
Jun vs. Aug	-0.056		0.796 *	0.407 *
Jun vs. Oct	0.37 *		0.389 *	0.241 *
Jun vs. Dec	0.056		0.519 *	0.87 *
Aug vs. Oct	0.278		0.389 *	0.426
Aug vs. Dec	-0.037		0.611 *	0.574 *
Oct vs. Dec	-0.037		0.241	0.611 *

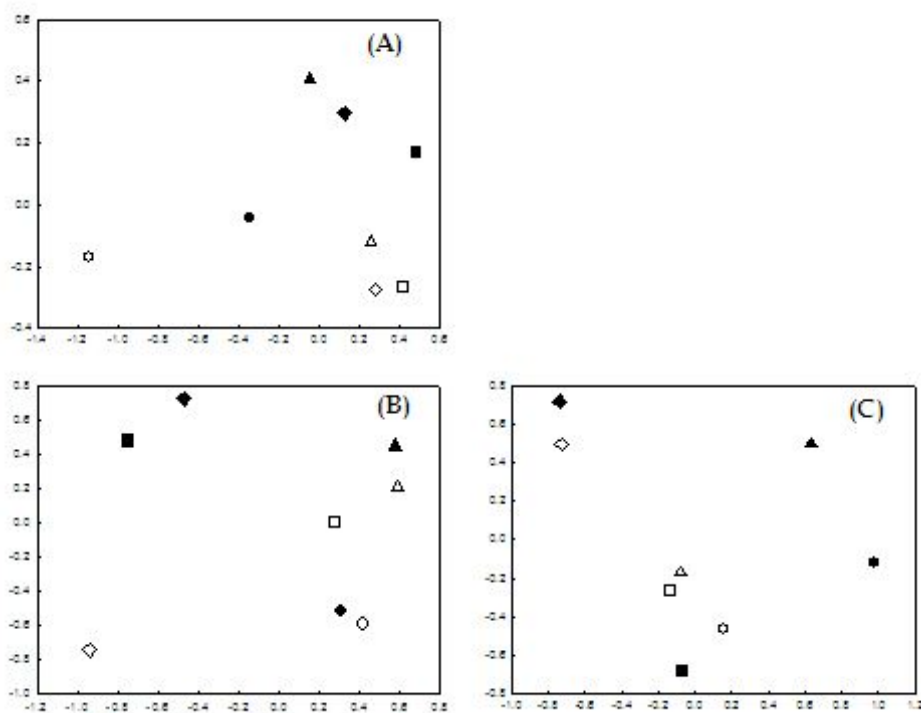


그림 2.2. 2011년 (주)에프엔피에서 채집한 잔디의 근권토양에서 16S와 ITS 염기서열의 T-RF 프로파일에 대한 NMDS 분석 결과. 평균값을 표시함. (A: 세균-*Hae*III, B: 진균-*Hae*III, C: 진균-*Hinf*I, ○: WT 6월, △: WT 8월, □: WT 10월, ◇: WT 12월, ●: GM 6월, ▲: GM 8월, ■: GM 10월, ◆: GM 12월)

다. GM 벤토그래스로부터 토양미생물로의 수평유전자전이

- 2010년 충북 증평군 도안면 소재의 (주)에프앤피 격리포장에서 GM 벤토그래스(AtBG1)와 모품종인 벤토그래스(WT 벤토그래스)를 각각 3 plot을 재배하여 실험을 실행하였음. 시험구는 6 m x 7.4 m 면적으로 이 시험구에서 2010년 4월 29일, 6월 1일과 6월 29일에 plot 당 직경 3cm의 core를 사용하여 20cm 깊이로 5번씩 무작위적으로 채취하고, 잘 섞어서 냉동고에 보관하였음
- 각 시기와 장소별로 채취한 토양은 10배 연속희석법을 이용하여 희석한 후 LB 배지에서 배양. 이때 CFU는 50-100 사이를 유지. 이후 colony hybridization protocol에 따라 10% SDS로 3분간 cell membrane을 파괴하고 soln B, C를 통해서 wash와 단백질 변성과정을 거친 후, soln D를 이용해 step 사이의 solution들을 wash한다. 유리된 DNA를 Hybond N-membrane에 정착시킴. southern blot protocol에 따라 membrane에 흡착된 DNA를 UV light fixation 처리한 후, probe가 들어있는 hybridization buffer로 하루 밤 동안 처리한다. 이후 일련의 wash과정을 거치고, assay 과정을 거친 후, CDP star와 kodak film을 이용해서 현상. 이때는 1시간의 노출시간을 주었음. 이 과정에서 사용되는 primer는 gene에 대응하는 것으로 염기 서열은 다음과 같음

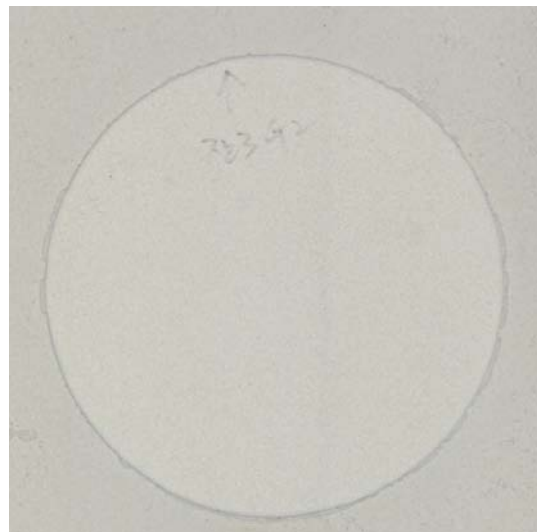
Forward: TTG GAT CAC ATT TAA CGA GCC - biotin

Reverse: CAA CTC GGA CTC TTA GGA TCA G - biotin

- 이러한 과정을 거쳐 얻은 결과물은 그림 2.3과 같다. 이는 토양을 3차 증류수에 10³으로 희석해 50-100 CFU의 수를 보인 plate 즉, 50,000 - 100,000 colony를 colony hybridization 한 결과임. 만약 HGT가 일어나서 target gene이 해당식물에서 토양미생물로 이동했다면, probe에 의해 필름에 발색반응이 일어나게 됨. 하지만 결과물을 보면 전혀 반응이 일어나지 않았다. 이는 HGT가 일어나지 않았음을 증명하는 결과로 볼 수 있음



Colony hybridization in LB plate (WT)



Colony hybridization in LB plate (GM)

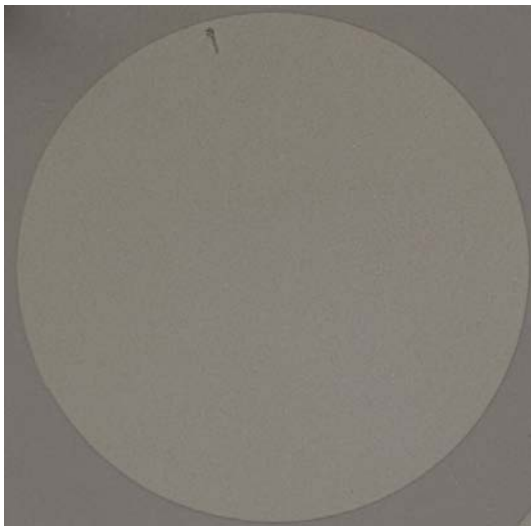
그림 2.3. LB 배지에서 colony hybridization 결과

- 2011년 충북 증평군 도안면 소재의 (주)에프엔피 격리포장에서 GM 벼트그래스(AtBG1)와 모품종인 벼트그래스(WT 벼트그래스)를 각각 3 plot을 재배하여 실험을 실행. 시험구는 6 m x 7.4 m 면적에 모품종과 GM 벼트그래스를 재식. 이 시험구에서 2011년 6월 21일, 8월 22일, 10월 22일, 12월 9일에 plot 당 직경 3cm의 core를 사용하여 20cm 깊이로 5번씩 무작위적으로 채취하고, 잘 섞어서 냉동고에 보관
- 각 시기와 장소별로 채취한 토양은 10배 연속희석법을 이용하여 희석한 후 LB 배지에서 배양. 이때 CFU는 50-100 사이를 유지하도록 함. 이후 colony hybridization protocol에 따라 10% SDS로 3분간 cell membrane을 파괴하고 soln B, C를 통해서 wash와 단백질 변성 과정을 거친 후, soln D를 이용해 step 사이의 solution들을 wash한다. 유리된 DNA를 Hybond N-membrane에 정착시킴. southern blot protocol에 따라 membrane에 흡착된 DNA를 UV light fixation 처리한 후, probe가 들어있는 hybridization buffer로 하루 밤 동안 처리. 이후 일련의 wash과정을 거치고, assay 과정을 거친 후, CDP star와 kodak film을 이용해서 현상. 이때는 1시간의 노출시간을 주었음. 이 과정에서 사용되는 primer는 gene에 대응하는 것으로 염기 서열은 다음과 같음

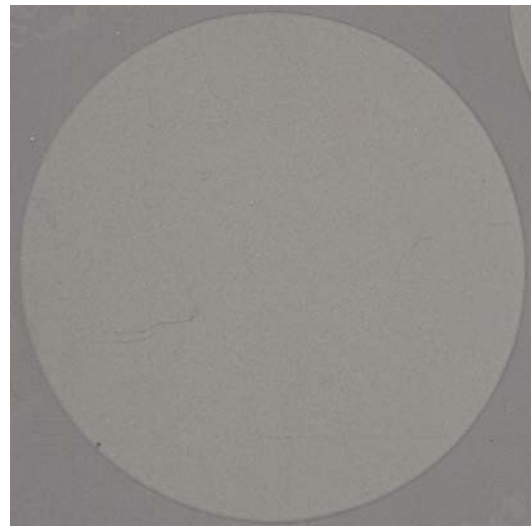
Forward: TTG GAT CAC ATT TAA CGA GCC - biotin

Reverse: CAA CTC GGA CTC TTA GGA TCA G - biotin

- 이러한 과정을 거쳐 얻은 결과물은 그림 2.4와 같음. 이는 토양을 3차 증류수에 10^3 으로 희석해 50-100 CFU의 수를 보인 plate 즉, 50,000 - 100,000 colony를 colony hybridization 한 결과임. 만약 HGT가 일어나서 target gene이 해당식물에서 토양미생물로 이동했다면, probe에 의해 필름에 발색반응이 일어나게 됨. 하지만 결과물을 보면 전혀 반응이 일어나지 않았음. 이는 HGT가 일어나지 않았음을 증명하는 결과로 볼 수 있음



Result of colony hybridization in LB plate
(Bent grass wild type)



Result of colony hybridization in LB plate
(Bent grass GMO)

그림 2.4. LB 배지에서 colony hybridization 결과

라. GM 벤트그래스의 화분 특성 조사

○ GM 벤트그래스와 WT 벤트그래스의 화분 특성을 조사하기 위하여 에프앤피(주)에서 2010년 4월 29일에 각각 4개의 화분을 수령하여 재배하였다. 하지만 GM 벤트그래스에서 추대 및 개화가 되지 않아 화분의 특성을 조사할 수 없었음

마. 벤트그래스의 화분 비산거리 측정

○ GM 벤트그래스가 추대 및 개화가 되지 않는 이유로 WT 벤트그래스를 이용하여 실험을 수행하였다. 우선 벤트그래스의 화분 비산거리를 측정하기 위하여 충북 증평군 도안면 소재의 에프앤피(주) 격리포장에 그림 2.5와 같이 시험구를 설치하였음. 각각의 화분 사이즈는 폭 30cm, 높이 30cm로 총 28개를 사용하여 실험에 사용하였음. 화분채취 전에 풍향 풍속계를 설치하여 풍향 및 풍속을 측정하였음. 화분채취는 2010년 5월 14일, 2010년 5월 20일, 2010년 6월 1일, 2010년 6월 8일에 시행하였음. 화분 수집기는 지면으로부터 60cm 높이로 설치하였으며, 한 거리 당 2개의 슬라이드글라스를 올려놓았다. 슬라이드글라스는 바세린을 얇게 도포한 다음 65°C 드라이오븐에 넣어 슬라이드글라스에 바세린이 녹아 착상되도록 처리하여 실험에 사용하였음. 슬라이드글라스는 10시 30분부터 1시 30분 사이에 일광이 제일 좋은 시간을 선택하여 약 2시간 30분동안 노출시켰음. 화분 포집이 완료된 슬라이드글라스는 슬라이드박스에 담아 실험실로 옮겨와 광학현미경(Olympus, BX41)을 이용하여 슬라이드글라스의 가시면적(5.75×2.5 cm)에 있는 모든 화분을 계수하였음

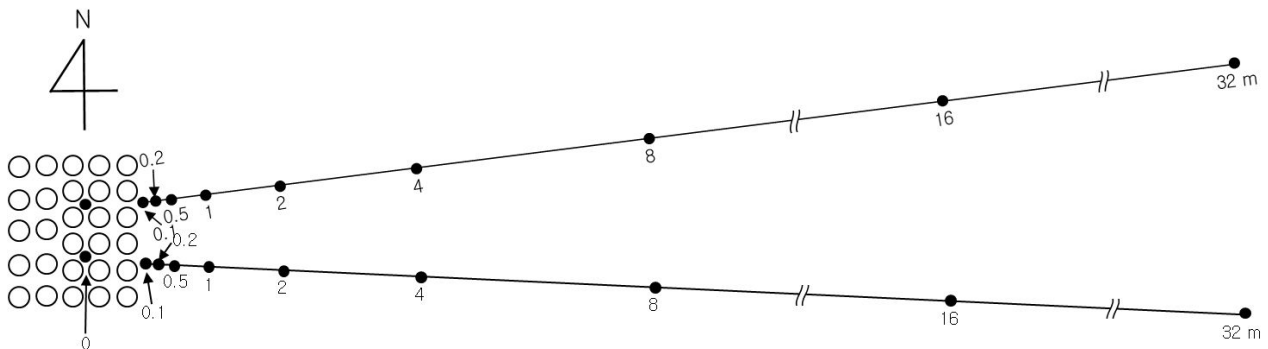


그림 2.5. 시험구 설치 모식도(○: 벤트그래스 pot, ●: 화분포집용 스탠드, 거리단위: m)

○ 풍향 및 풍속의 측정 결과 5월 20일은 주로 북동풍, 6월 1일은 서풍, 북풍 북서풍 마지막으로 6월 8일은 남서풍이 주로 불어온 것으로 나타났음 (5월 14일 풍향, 풍속 결과는 기기 상의 문제로 측정되지 않음) (그림 2.6). 본 실험에서 설치한 스탠드의 방향은 동쪽으로 설치가 되어 있어 설치방향과 풍향이 일부 일치하지 않은 경우도 있었음. 벤트그래스 화분의 비산거리를 측정한 결과 0m와 4m 사이에서 급격히 감소하는 경향으로 나타났음. 최대 비산거리는 16m로 5월 14일 line 2, 6월 1일 line 1에서 기록되었음. 최대 수량검출은 5월 14일 line 2번 0.1m에서 147 ± 44 개로 최고치를 기록하였음 (그림 2.7)

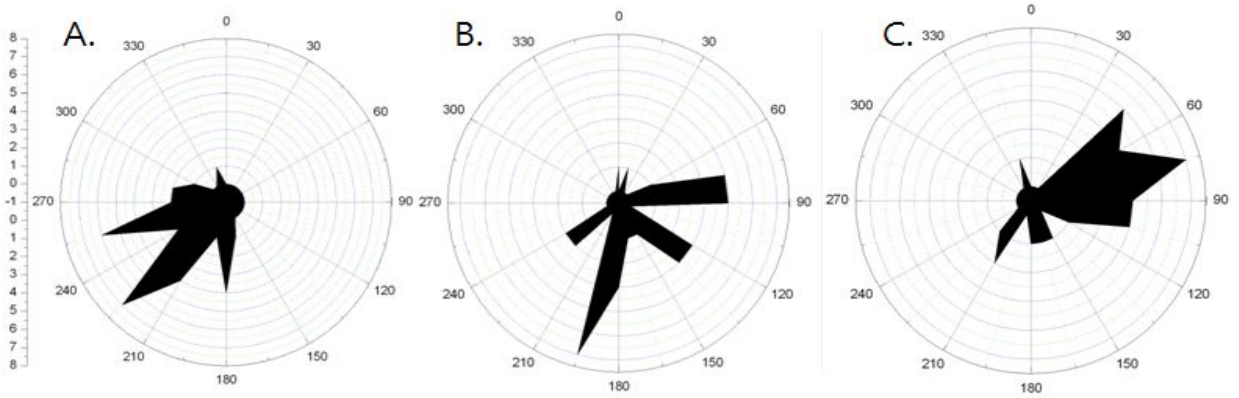


그림 2.6. 화분 채집 기간동안 풍향 및 풍속 측정 결과(A: 5월 20일, B: 6월 1일, C: 6월 8일).

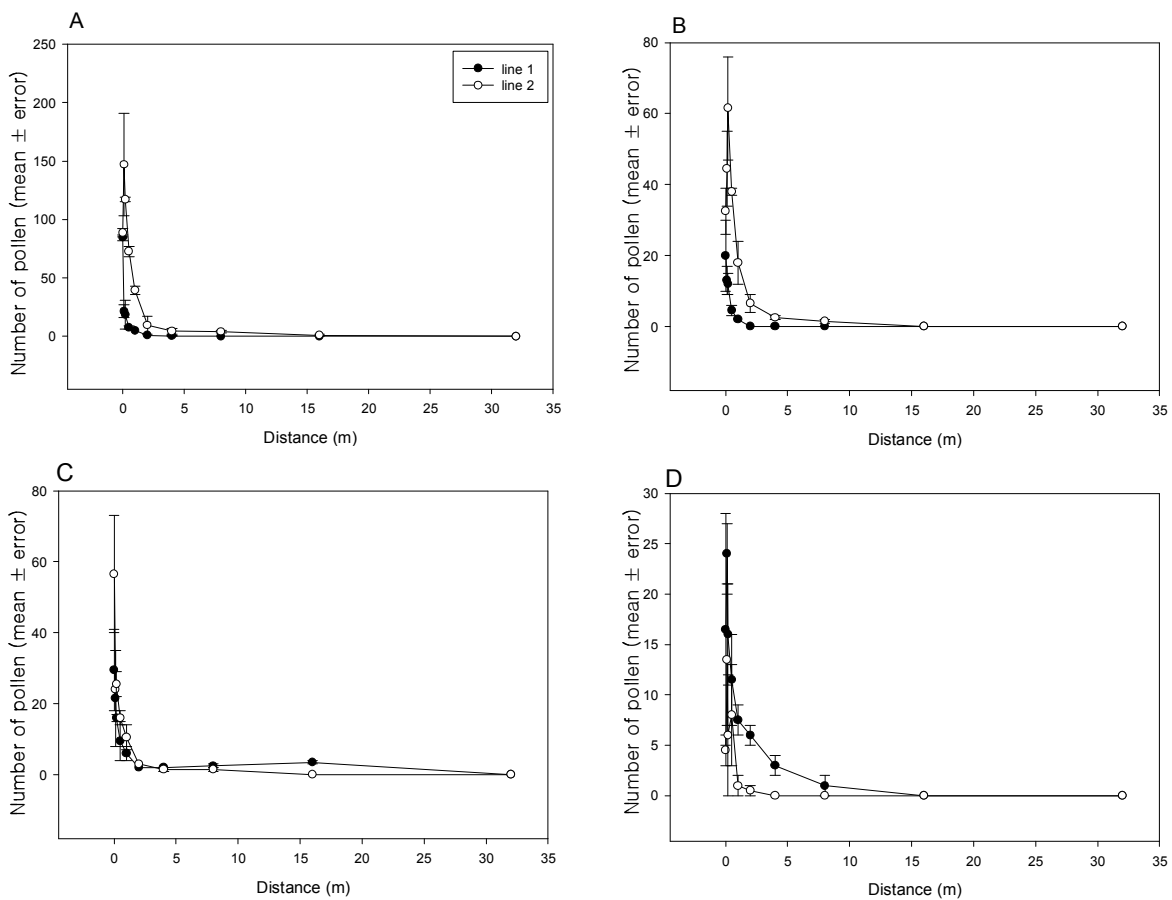


그림 2.7. 벤틀그래스의 화분 비산 거리 측정(A: 2010년 5월 14일, B: 2010년 5월 20일, C: 2010년 6월 1일, D: 2010년 6월 8일)

바. GM 벤틀그래스 재배 격리포장 주변 모니터링

- GM 벤틀그래스가 재배중인 충북 증평군 도안면 소재의 에프앤피(주)의 격리포장을 기준으로 반경 약 1 km 이내에 자생하고 있는 벼과 식물을 모니터링 하였음 (그림 2.8, 2.9). 모니터링은 2011년 6월 16, 27, 29일에 시행하였고, 도로변, 소하천 둑 그리고 농로를 기준으로 하여 조사하였음. 조사지점에서 식물체가 발견되면 GPS(Garmin. GPSmap 60CS)로 위치를

표시한 뒤, 뿌리를 포함한 식물체를 채집하였음. 채집된 식물체는 원색 대한식물도감 검색표, 잡초도감 등을 참고로 하여 정밀 동정하였음. 단, 본 조사에서 이용된 GM 벨트그래스가 개화되지 않음을 감안하여 종자의 채취는 시행하지 않았음. 본 조사 결과 조사지점에서 총 17종의 벼과 식물이 자생하고 있음을 확인할 수 있었음 (표 2.4)



그림 2.8. 격리포장 주변 위성사진



그림 2.9. 격리포장 주변에서 발견된 겨이삭 군락지

표 2.4. 식물체 채취 장소

지역 번호	사진	좌표		격리포장과 의 거리(m)	식물
		N	E		
1		36°48'98 "	127°36'38 "	200	겨이삭
2		36°48'98 "	127°36'38 "	200	산겨이삭
3		36°48'90 "	127°36'38 "	197	큰김의털
4		36°48'89 "	127°36'39 "	225	산겨이삭
5		36°48'89 "	127°36'39 "	225	속털개밀

표 2.4. 계속

지역 번호	사진	좌표		격리포장과 의 거리(m)	식물
		N	E		
6		36°48'89 "	127°36'39 "	225	참새귀리
7		36°48'89 "	127°36'39 "	225	포아풀
8		36°48'90 "	127°36'53 "	421	겨이삭
9		36°48'90 "	127°36'53 "	421	뚝새풀
10		36°48'91 "	127°36'37 "	184	들묵새

표 2.4. 계속






지역 번호	사진	좌표		격리포장과 의 거리(m)	식물
		N	E		
11		36°49'09 "	127°36'06 "	392	강아지풀
12		36°49'13 "	127°36'06 "	440	가는보리풀
13		36°49'13 "	127°36'06 "	440	김의털아재비
14		36°49'13 "	127°36'06 "	440	속털개밀
15		36°49'13 "	127°36'06 "	440	큰김의털

표 2.4. 계속








지역 번호	사진	좌표		격리포장과 의 거리(m)	식물
		N	E		
16		36°49'06 "	127°36'09 "	392	개억새
17		36°49'04 "	127°36'11 "	281	갈풀
18		36°48'96 "	127°36'18 "	107	갈풀
19		36°49'15 "	127°36'05 "	472	가는보리풀
20		36°49'13 "	127°36'07 "	448	바랭이

표 2.4. 계속

지역 번호	사진	좌표		격리포장과 의 거리(m)	식물
		N	E		
21		36°49'17 "	127°36'06 "	499	살눈포아풀
22		36°49'34 "	127°36'13 "	751	큰참새귀리
23		36°49'44 "	127°36'25 "	907	포아풀
24		36°49'37 "	127°36'23 "	799	겨이삭
25		36°49'11 "	127°36'02 "	466	꼬리새

3. GM 유채 및 벤투그래스의 포장실험에서 격리포장 주변의 모니터링 지침서

- GM 작물의 개발과정에서 형질전환 작물의 기능 검정 뿐 아니라 환경위해성평가를 위하여 GM 작물의 포장실험은 반드시 필요하며, ‘유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률’(LMO법) 제22조와 시행령 제23조에 의거하여 포장실험 등 환경방출과 관련한 실험을 하는 경우 관계중앙행정기관의 장으로부터 승인을 받도록 규정하고 있음
- 특히 GM 작물의 환경방출실험 승인을 위해 LMO법 통합고시 별표 4-3 ‘농업용유전자변형 생물체의 환경방출실험 심사자료’에서는 도입유전자의 이동가능성 및 방지대책 등의 안전 관리대책을 요구하고 있으며, 별표 4-4 ‘농업용유전자변형생물체의 실험용 격리포장 구비요건’에서는 포장근처에 교잡 가능한 동종 또는 근연 야생종의 분포를 조사할 것을, 별표 4-5 ‘농업용유전자변형생물체의 관리방법과 조치사항’에서는 유전자변형식물을 재배하는 구역 및 그 근방에 해당 식물과 교배가 가능한 식물의 식생을 최소한으로 제한할 수 있는 조치를 할 것을 명시하고 있음. 따라서 GM 작물의 격리포장 실험에서 격리포장 외부로의 도입 유전자의 이동여부를 확인하기 위한 모니터링은 필수적임

나. 모니터링 조사 지역 범위의 설정

- 조사 지역의 범위를 설정하기 위해서는 우선적으로 교잡 가능한 거리에 대한 추정이 필요. 농림수산물부고시 제2008-100호 종자관리요강을 기준으로 작물별 교잡 가능 거리를 설정할 수 있으며, 이것을 GM 작물의 포장실험에서 조사 지역의 범위를 설정하는 기준으로 활용할 수 있음 (표 3.1). 이에 따르면 유채의 경우 원원종은 망실재배를 원칙으로 하며, 원종 및 보급종은 이 품종으로부터 1,000m이상 격리되어야 하고, 산림 등 보호물이 있을 경우 500m까지 단축할 수 있도록 명시되어 있음
- 벤투그래스의 경우 종자관리요령에 관리방법에 대한 언급이 되어 있지 않아 조사 범위를 설정하기에 어려움이 있음. 이런 경우에는 앞서 보고된 연구 자료 혹은 논문 등을 참고로 하여 조사지역을 설정하여야 함. GM 벤투그래스의 경우 시험포장으로부터 약 3.8km 떨어진 곳의 근연종에서 유전자이동이 보고된 바 있고(Reichman 등, 2006), Watrud 등(2004)에 의하면 시험포장에서 약 21km 떨어진 곳까지 유전자이동이 되었음을 보고한 바 있음. 이를 감안한다면 벤투그래스의 모니터링은 최소 반경 1km부터 시작하여 최대 20km까지도 모니터링이 이루어져야 할 것임
- 식물의 특성에 따라 중요한 조사 지점은 지역 내에서도 달라질 수 있는데, 유채는 주로 교란지에서 자라기 때문에 도로변이나 전답을 중심으로 주변을 조사하여야 할 것이다. 반면에 겨이삭같이 벤투그래스와 교잡가능한 식물은 산지에서도 분포하므로, 더욱 다양한 환경에서 조사가 이루어져야 함
- 조사 지역의 범위를 결정하면 알아보기 쉽도록 지도 상에 반경을 표시하며, 휴대용 GPS를 이용하여 정확한 조사 위치를 확인함 (그림 3.1)

표 3.1. 작물별 최소 격리거리

작물명	최소 격리 거리(m)
벼	3
길보리, 쌀보리, 맥주보리	3
밀	3
콩	3
옥수수	300
감자	50
고구마	3
팥	3
땅콩	3
참깨	500
들깨	5
유채	1,000
녹두	3
무	1,000
배추	1,000
양배추	1,000
고추	500
토마토	300
오이	1,000
참외	1,000
수박	1,000
호박	1,000
파	1,000
양파	1,600
당근	1,000
상추	60
시금치	1,000
티머시	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
레드톱	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
톨웨스큐	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
메도우 웨스큐	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
오차드 그라스	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
페러니얼 라이그라스	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
리드카나리 그라스	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
브롬 그라스	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
켄터키 블루그라스	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
알팔파	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
버어즈 풋트레포일	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
화이트 크로바	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
레드 크로바	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
엘사이크 크로바	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
수단그라스	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
이탈리안 라이그라스	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
헤어리베치	200(2hr 미만), 100(2hr 이상)
호밀	300
나리	20
글라디올러스	20
프리자	20
구근아이리스	20
튤립	20
과수	5



그림 3.1. 격리포장 주변 위성사진

다. 조사 식물과 조사 시기의 선정

- 모니터링 조사 지역 내에 있는 모든 식물을 대상으로 교잡 여부를 조사할 필요는 없으며, 격리포장 내의 GM 작물과 교잡이 가능하다고 보고된 식물에 대해서만 모니터링을 실시
- 유채의 경우 *Brassica rapa*, *B. juncea*, *B. adpressa*, *Raphanus raphanistrum*이 유채와 방입수분이 가능하다고 판단하고 있으며, 교잡율은 매우 낮지만 유채와 야생 *Brassica oleracea*와의 방입수분도 가능한 것으로 알려져 있다. 전세계적으로는 총 23종이 유채와 교잡이 가능하다고 보고되어 있지만, 유채를 웅성배우체로 하여 교잡을 하였을 때에는 동속으로 *B. carinata*, *B. juncea*, *B. maurorum*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. rapa* 등 6개 종이, 이속으로는 *Diplotaxis erucooides*, *D. muralis*, *Hirschfeldia incana*, *Raphanus sativus*, *Sinapis arvensis* 등 5종이 있음. 본 연구에서는 국내에 생육하고 있는 야생근연종인 *B. juncea*와 *B. rapa*와 *B. olearacea*, *R. sativus* 등 교잡 가능한 이종 작물 3종, 그리고 동종인 유채를 포함하여 모두 5종의 식물을 조사 대상으로 선정하였음 (그림 3.2)
- 벨트그래스(*Agrostis stolonifera*)의 경우 *Agrostis* 속 식물은 전세계적으로 200여종이 광범위하게 존재하는 것으로 알려져 있지만, 산림청 국가표준식물목록에 따르면 국내에서 *Agrostis* 속 식물은 검정겨이삭, 검은겨이삭, 흰겨이삭, 영성겨이삭, 아기겨이삭, 겨이삭, 산겨이삭, 긴겨이삭 그리고 민메기이삭 이상 9종이 서식하는 것으로 알려져 있다(국가표준식물목록, 이명제외). 하지만 이들 9종의 식물이 GM 벨트그래스와 교잡이 가능하기 위해서는 격리포장의 설치 장소와 *Agrostis* 속 식물의 서식지가 일치하여야 하므로 가장 우선적으로 *Agrostis* 속 식물의 자생지를 확인하여야 함 (표 3.2). 국내에서 자생하는 9종의 *Agrostis* 속 식물의 자생지를 보면 검정겨이삭은 전국 고산지대, 검은겨이삭-백두산지역 및 고산지대, 흰겨이삭-습지(전국), 영성겨이삭-평양인근 및 경남, 아기겨이삭-한국 북부 강가, 겨이삭-산지(전국), 산겨이삭-산지(전국), 긴겨이삭-금강산 이북 및 강원, 민메기이삭-한국 중부 고산지대에서 자생하는 것으로 알려져 있음. 따라서 전국의 산지에 분포하는 겨이삭과 산겨이삭이 주된 모니터링 대상이 될 것임 (그림 3.3). 또한 교잡이 가능한 야생근연종 또는 재배종이 있다고 하더라도 개화기가 일치하지 않는다면 자연환경에서 실제 교잡은 이루어

지지 않을 것이므로, 환경방출실험을 하고 있는 작물의 개화기에 맞추어 모니터링을 실시하여야 하며, 개화기가 부분적으로라도 일치하는 식물을 대상으로 조사를 하여야 함. 또한 실제 교잡이 이루어졌는지 확인을 하려면 포장 외부의 식물체로부터 성숙한 종자를 수확하여 분석을 해야 함

표 3.2. 한국에 자생하는 *Agrostis* 속의 분포도 및 개화기

번호	국 명	학 명	분 포	개화기~결실기
1	검정겨이삭	<i>Agrostis flaccida</i> var. <i>trinii</i> (Turcz. ex Litv.) Ohwi	전국고산지대	8월 ~ 9월
2	검은겨이삭	<i>Agrostis canina</i> L.	백두산 부근, 중부 고산지대	7월 ~
3	흰겨이삭	<i>Agrostis alba</i> L.	제주, 경남(지리산), 평북(낭림산), 함평남북 습지, 북반구 북부 전반	5월 ~ 6월
4	영성겨이삭	<i>Agrostis divaricatissima</i> Mez	경남, 평안남도, 함경북도, 평양근처	6월 ~ 10월
5	애기겨이삭	<i>Agrostis stolonifera</i> L.	한국 북부 강가	5월 ~ 6월
6	겨이삭	<i>Agrostis clavata</i> var. <i>nukabo</i> Ohwi	전국	5월 ~ 6월
7	산겨이삭	<i>Agrostis clavata</i> Trin. var. <i>clavata</i>	전국	6월 ~ 8월
8	긴겨이삭	<i>Agrostis scabra</i> Willd	강원, 함경북도지역	6월 ~ 8월
9	민메기이삭	<i>Agrostis canina</i> for. <i>mutica</i> (Gaudin) Jansen & Wacht.	한국 중부 고산지대	5월 ~ 6월



그림 3.2. 격리포장 1 km 이내에서 발견된 유채



그림 3.3. 격리포장 주변에서 발견된 겨이삭

라. 모니터링 실시 및 기록

- 조사 지역과 조사 대상 식물이 결정되면 이에 따라 모니터링을 실시한다. 조사 범위 내에서 교잡 가능한 식물이 관찰되면 GPS를 이용하여 위치를 기록하고, 사진을 촬영하여 기록을 남긴다. 그리고 야장에는 조사 지점, 식물 종명, 개체 수, 격리포장으로부터의 거리 등을 기록함 (예: 표 3.3). 식물체의 수가 많을 때에는 방형구법 등을 이용하여 단위 면적 내의 밀도를 추정함
- 격리포장 내 GM 작물과의 교잡이 이루어졌는지를 확인하려면 종자가 성숙하는 시기에 동일한 위치를 재조사하여 종자를 수확함

표 3.3. 모니터링 장소

지역 번호	좌표		격리포장으로부 터의 거리(m)	식물체 종류	식물체 수
	N	E			
1	36°49'18"	127°36'17"	970	<i>B. juncea</i> , <i>B. napus</i>	138
2	36°48'47"	127°36'50"	600	<i>B. juncea</i>	4
3	36°48'47"	127°36'51"	620	<i>B. juncea</i>	1
4	36°48'47"	127°36'50"	590	<i>B. juncea</i>	18
5	36°48'45"	127°36'35"	240	<i>B. oleracea</i>	6
6	36°48'41"	127°36'50"	630	<i>B. juncea</i>	84
7	36°48'40"	127°36'51"	670	<i>B. juncea</i> , <i>B. napus</i>	250
8	36°49'03"	127°36'46"	690	<i>B. juncea</i> , <i>B. napus</i>	5
9	36°48'31"	127°37'07"	1100	<i>B. juncea</i>	46
10	36°49'22"	127°36'57"	1300	<i>B. juncea</i> , <i>B. napus</i>	13
11	36°49'15"	127°36'54"	1100	<i>B. juncea</i>	500

마. 교잡여부의 확인

- 격리포장 주변에 교잡가능한 동종 또는 근연종의 분포를 확인한 다음에는 최종적으로 교잡이 실제로 일어났는지의 여부를 확인하는 것이 필수적임. 교잡 가능한 식물의 종자를 받아

시킨 뒤 조직에서 DNA를 추출한 뒤 PCR을 이용하여 도입유전자를 직접 검출할 수도 있지만, 조사해야 할 종자의 숫자가 많은 경우 형질전환 작물에 선발표지유전자로 주로 도입되는 항생제 또는 제초제를 이용하여 이에 저항성을 갖는 식물체를 일차적으로 골라낸 뒤 PCR을 하는 것이 시간을 줄일 수 있는 방법임 (예 표 3.4)

표 3.3. GM 유체로부터 비유전자변형 유체와 갖으로 유전자이동 된 개체 선별을 위한 스크리닝 결과

	<i>Brassica napus</i>			<i>Brassica juncea</i>		
	No. of collected seeds from a mother plant	Germination rate (%)	No. of herbicide tolerant seedlings	No. of harvested seeds from the collected plant	Germination rate (%)	No. of herbicide tolerant seedlings
Site 1	739	78	0	5272	90	0
	3365	60	0			
	4802	68	0			
	6040	62	0			
	2680	66	0			
	592	14	0			
	1899	62	0			
	2588	73	0			
Site 7	2402	2	0	683	22	0
	500	0	0	3879	59	0
	1157	0	0	480	10	0
	2782	10	0	312	32	0
				1653	0	0
Site 8	65	15	0			
Site 10	1632	27	0	1371	7	0
	668	15	0			
	396	79	0			
	522	92	0			
	4626	55	0			
	6852	0	0			
	5972	2	0			
Site 11				2230	70	0
				4762	77	0
				2275	12	0
				1897	40	0
Total	50279		0	28150		0

바. 모니터링 결과에 따른 추가 모니터링 실시 여부 판단

- 본 연구에서는 조사 반경 내에서 격리포장 외부로 유전자 이동이 관찰되지 않았으므로, 조사 지역의 범위를 더 확장시키지 않았음. 그렇지만, 조사 범위 내에서 유전자 이동이 관찰되고, 격리포장과 멀리 떨어진 지점에서 교잡이 확인된다면, 조사 지역의 범위를 더욱 확대하여 추가 모니터링을 실시할 필요가 있음. 조사 범위가 넓어질수록 많은 인력과 시간이 필요하므로, 불필요한 조사를 줄이기 위해서는 조사 범위를 500m 또는 1km 단위로 점차적으로 확대시켜 나가는 것이 바람직할 것임

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표 달성도

1. 최종 연구개발 목표

- GM 유채와 벤트그래스의 환경방출실험 및 평가
- GM 작물 검증을 위한 고감도 분석법 개발
- GM 작물의 환경위해성평가 가이드라인 개발
- GM 작물의 사후 모니터링을 위한 기법 개발

2. 연구개발의 단계별 목표

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
1차년도 (2009)	GM유채 및 벤트그래스의 환경방출실험 및 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 유채 EVENT 선발과정 정리 - GM 유채(EVENT, FnPBnTg 2802)의 환경방출 실험포장 조성 및 재배실험 - 도입유전자의 insertion site 확인 및 주변염기서열 확인 - EVENT의 농업형질 및 변형 후 개선된 특성 조사 - EVENT의 분자생물학적 분석 - 도입 유전자 산물의 allergen DB 검색 - 사용한 벡터의 염기서열 분석 - GM벤트그래스의 선발과정 정리 - GM 벤트그래스의 표현형질 및 농업 형질 특성 조사 - GM 벤트그래스의 분자생물학적 분석 	100%
	GM 작물검정을 위한 고감도 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - Bioinformatic tool을 이용한 GM 유채 및 벤트그래스의 형질전환에 사용된 vector의 구성에 관한 염기서열 분석 - 벡터 내 기능성유전자의 <i>in-silico</i> 분석을 통한 primer 제작 - 최적 PCR 조건 최적화 및 검증 	100%
	유전자변형 유채와 잔디 연구의 안전관리 지침 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 선행국의 안전관리 전략, 지침 및 이행방안 조사 - 타화수분 작물의 위해요소 동정 (유전자이동성 등의 연구 동향 조사) - 유채와 잔디의 생물학적 및 농업적 특성 자료의 수집·분석 (온실, 포장) - 유채와 잔디의 생태학적 자료 수집·분석 (국내외) - 실험실, 온실, 포장실험 시의 작업형태 조사·분석 	100%
	GM 유채의 모니터링 기법	<ul style="list-style-type: none"> - GM 유채의 화분 특성 조사 및 화분 비산 거리 검정 	100%

	개발	<ul style="list-style-type: none"> - 격리포장 주변 식물체와의 교잡 가능성 모니터링 - GM 유체가 토양생태계에 미치는 영향 검정 	
2차년도 (2010)	GM유채 및 벤토그래스의 환경방출실험 및 평가	<ul style="list-style-type: none"> - GM 유채와 벤토그래스의 생물학적 특성 조사 계속 - 형질전환 작물의 농업적 특성 조사 - 변형후의 개선된 특성 및 성질 조사 (수분함량 정량적 측정) - GM유채 및 벤토그래스의 단백질 특성 분석 알려지 검정(2010년 추가 등록된 DB 없음) - 선발된 GM유채 및 벤토그래스의 분자 생물학적 분석 - i-PCR을 이용한 GM 벤토그래스의 유전자 삽입 위치 및 주변 서열 분석 - GM유채 및 벤토그래스의 표현형질 조사 및 결과 정리 - 포장 주변 식물상 조사 및 포장시험 성적 분석 제2협동과제 수행) 	100%
	GM 작물검정을 위한 고감도 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - Bioinformatic tool을 이용한 GM 유채 및 벤토그래스의 형질전환에 사용된 vector의 구성에 관한 염기서열 분석 - 벡터 내 기능성유전자의 <i>in-silico</i> 분석을 통한 primer 제작 - 최적 PCR 조건 최적화 및 검증 - GM 작물 검증 시험 및 진단키트 개발을 위한 항체 개발 	100%
	유채의 환경위해성평가 가이드라인 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 유채 및 스트레스내성 작물의 환경위해요소 동정 - 유채 관련 위해요소의 확률평가 동향조사 - 수용생물체와 도입형질의 특성자료 수집 (온실, 포장) - 유채의 환경위해성평가 가이드라인 작성 	100%
	GM 유채와 벤토그래스의 모니터링 기법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - GM 유채의 화분비산 거리 검정 - GM 유채가 토양생태계에 미치는 영향 검정 - 격리포장 주변 식물체와의 교잡 가능성 모니터링 - GM 벤토그래스가 토양생태계에 미치는 영향 검정 	100%
2차년도 (2010)	GM유채 및 벤토그래스의 환경방출실험 및 평가	<ul style="list-style-type: none"> - GM 유채와 벤토그래스의 생물학적 특성 조사 계속 - 형질전환 작물의 농업적 특성 조사 - 변형후의 개선된 특성 및 성질 조사 (수분함량 정량적 측정) - GM유채 및 벤토그래스의 단백질 특성 분석 알려지 검정(2010년 추가 등록된 DB 없음) - 선발된 GM유채 및 벤토그래스의 분자 생물학적 분석 - i-PCR을 이용한 GM 벤토그래스의 유전자 삽입 위치 및 주변 서열 분석 	100%

		- GM유채 및 벤토그래스의 표현형질 조사 및 결과 정리 - 포장 주변 식물상 조사 및 포장시험 성적 분석 제2협동과제 수행)	
	GM 작물검정을 위한 고감도 분석법 개발	- Bioinformatic tool을 이용한 GM 유채 및 벤토그래스의 형질전환에 사용된 vector의 구성에 관한 염기서열 분석 - 벡터 내 기능성유전자의 <i>in-silico</i> 분석을 통한 primer 제작 - 최적 PCR 조건 최적화 및 검증 - GM 작물 검증 시험 및 진단키트 개발을 위한 항체 개발	100%
	유채의 환경위해성평가 가이드라인 개발	- 유채 및 스트레스내성 작물의 환경위해요소 동정 - 유채 관련 위해요소의 확률평가 동향조사 - 수용생물체와 도입형질의 특성자료 수집 (온실, 포장) - 유채의 환경위해성평가 가이드라인 작성	100%
	GM 유채와 벤토그래스의 모니터링 기법 개발	- GM 유채의 화분비산 거리 검정 - GM 유채가 토양생태계에 미치는 영향 검정 - 격리포장 주변 식물체와의 교잡 가능성 모니터링 - GM 벤토그래스가 토양생태계에 미치는 영향 검정	100%

※ 연구개발 목표의 성격: 본 연구에서 ‘가이드라인’과 ‘지침’은 위해성평가 또는 심사와 관련한 법적 효력을 가진 의무준수사항을 의미하지 않으며, 다만 위해성평가와 안전관리를 과학적 사실과 증거에 기반하여 합리적, 비용효과적으로 수행하기 위하여 위해성평가자가 자율적으로 이행할 수 있는 방안 또는 참고로만 활용됨

제 2절 관련분야에의 기여도

- 국내에서 많은 GM 작물 개발 연구가 진행되고 있음에도 불구하고 아직까지 상업화 단계에 이르지 못한 원인에는 강력한 승인 규제, 소비자의 부정적 인식, 연구 기술 및 인프라 부족 등 여러 원인이 있으나 그 중 한 원인으로 안전성평가를 위한 가이드라인 부재에 따른 안전성평가 연구의 어려움이 있음
- 본 연구과제에서는 GM 유채와 벤토그래스의 환경위해성평가 가이드라인을 개발하여 경위해성평가 연구를 지원코자 하였음. 특히 현재 많은 연구가 진행 중이지만 아직까지 세계적으로 널리 상업화가 되지 않은 스트레스내성 형질에 대한 환경위해성평가를 고찰하여 향후 안전성평가 수행에 활용할 수 있도록 하였음
- 환경위해성평가는 식품안전성평가와는 다르게 작물별, 도입 유전자별(형질별), 도입 지역별 등으로 안전성평가 항목 및 검토 부분이 다르기 때문에 정형화된 가이드라인 개발이 어려움. 연구에서는 GM 작물 안전성평가에 대한 기본 사항 및 문제형성 및 선택, 유채와 벤토그래스의 생물학적 특성 등 기본사항을 분석하여 기술함으로써 안전성평가 연구자가 각

상황에 맞게 응용하여 연구를 지원할 수 있도록 하였음

- 또한 안전성평가 연구 지원을 위하여 안전성평가 관련 국제기구의 동향과 전문 번역서를 편찬하여 연구에 활용할 수 있도록 하였음
- GM 작물의 환경방출실험에서 GM 작물로부터 일반 작물 또는 야생근연종으로의 화분비산을 통한 도입유전자 유출이 우려되고 있다. 따라서 환경방출실험의 안전관리는 GM 작물과 격리포장 주변의 교잡가능한 종과의 교잡을 검출하고 방지하는데 중점을 둠
- 본 연구에서는 GM 작물의 환경방출실험시의 안전관리를 위한 모니터링의 방법을 GM 유채와 벤투그래스의 모니터링을 소개하였음. 우선 작물별 품종 순도 유지를 위한 격리거리와 문헌조사를 통하여 교잡가능한 종을 확인함으로써 모니터링의 범위를 결정하였고 일정 범위 내에 분포하는 교잡 가능한 종을 대상으로 모니터링을 실시하였음. 이와 같이 제시된 모니터링 방법은 GM 작물의 포장실험시 도입유전자의 확산을 방지하는데 활용이 될 것으로 기대됨

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 타 연구에의 응용

- 연구결과는 시책건의 또는 지침서, 안내서 등으로 제안하여 많은 관련 연구자들이 활용할 수 있도록 추진 예정임
- 개발된 지침서는 교재화하여 관련 대학, 연구소 등에 배포하여 GM 작물 개발연구를 지원하는데 활용함
- 농업생명공학과 관련된 정보 사이트 (농업생명공학 홈페이지, GMO 실용화사업단 홈페이지, 한국바이오안전성정보센터 등)에 업로드하여 관련 연구자를 지원함

제 2절 기업화 추진방안

1. 조기 산업화 추진

- GM 유채와 잔디의 안전성 평가로 인한 품종출원 가능
- GM 유채와 잔디를 바이오매스 증산 및 에너지 원자재 공급
- GM 유채와 잔디의 과학적 안전성 확보로 유사 연구개발의 활성화
- 방출실험 결과를 통한 비식용 유채와 잔디의 산업화 기반 마련

2. GM 작물 환경위해성 평가 자료제공

- 국내 GM작물의 환경방출실험의 평가 가이드라인 제시
- GM 유채와 잔디 개발의 효율적 안전관리 방안과 환경위해성평가 지침 제공을 통한 실용화 및 국가의 LMO 안전관리 정책지원
- 국내개발 GM 유채와 잔디의 환경위해성 심사청구를 위한 위해성평가 보고서 마련

3. 모니터링 사용 지침서 마련

- GM 유채와 잔디의 환경방출실험에서 유전자이동으로 인한 도입유전자의 확산을 모니터링할 수 있는 기법의 확립 및 기법 제공

4. GM 작물 환경위해성 자료작성 검사 기술 제공

- GM 작물의 고감도 검사시스템을 구축 및 상용화함으로써 진단키트로의 활용 가능함

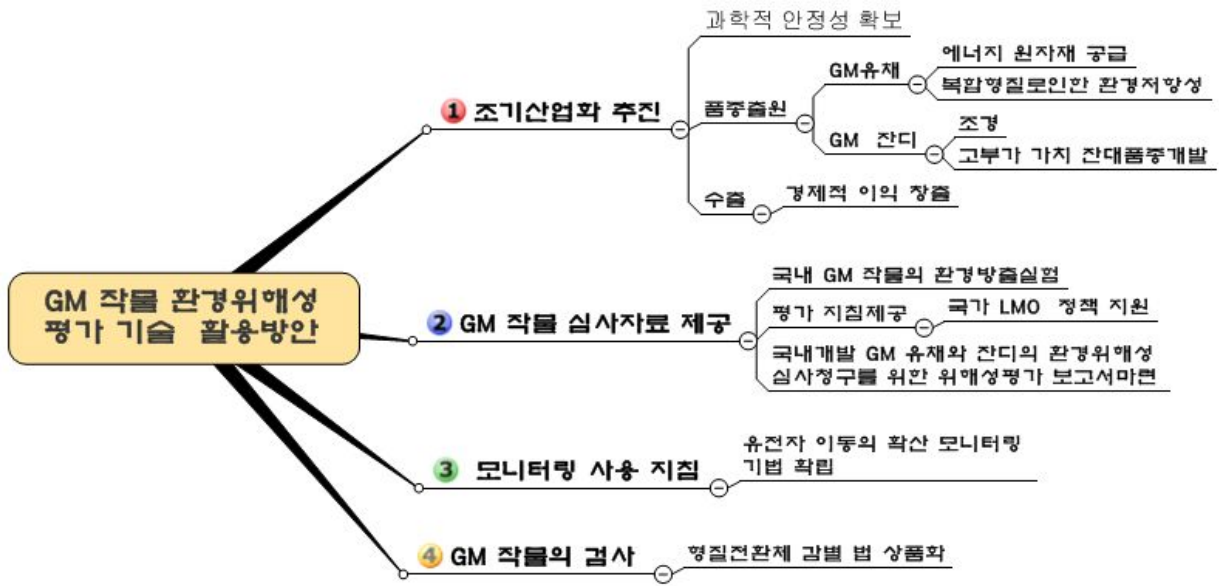


그림 21. 목적별 환경위해성 평가 활용방안 및 기대성과

제 6 장 참고문헌

제 1절. GM유채와 벤투그래스의 환경방출실험 및 평가

- Akiyama H, Makiyama D,(2010) Novel Detection System for the Genetically Modified Canola (*Brassica rapa*) Line RT73. *Anal. Chem.* 1;82(23):9909-16.
- Albani D, Sardana R (1992) A *Brassica napus* gene family which shows sequence similarity to ascorbate oxidase is expressed in developing pollen. Molecular characterization and analysis of promoter activity in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 2(3):331-42.
- Al-Ahmad H, Gressel J (2006) Mitigation using a tandem construct containing a selectively unfit gene precludes establishment of *Brassica napus* transgenes in hybrids and backcrosses with weedy *Brassica rapa*. *Plant Biotechnol J.* 4(1):23-33.
- Auger B, Baron C, Lucas MO, Vautrin S(2009) *Brassica* orthologs from BANYULS belong to a small multigene family, which is involved in procyanidin accumulation in the seed. *Planta.* 230(6):1167-83.
- Cheng L, Li HP, Qu B (2010) Chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by particle bombardment of cotyledons. *Plant Cell Rep.* 29(4):371-81.
- De Silva J, Robinson SJ, Safford R (1992) The isolation and functional characterisation of a *B. napus* acyl carrier protein 5' flanking region involved in the regulation of seed storage lipid synthesis. *Plant Mol Biol.* 18(6):1163-72.
- Facciotti MT, Bertain PB, Yuan L (1999) Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase. *Nat Biotechnol.* 17(6):593-7.
- Girin T, Stephenson P, Goldsack CM (2010) Brassicaceae INDEHISCENT genes specify valve margin cell fate and repress replum formation. *Plant J.* 63(2):329-38.
- Hails RS, Rees M, Kohn DD(1997) Burial and seed survival in *Brassica napus* subsp. *oleifera* and *Sinapis arvensis* including a comparison of transgenic and non-transgenic lines of the crop. *Proc Biol Sci.* 22;264(1378):1-7.
- Hernández M, Río A(2001) A rapeseed-specific gene, acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. *J. Agric Food Chem.* 49(8):3622-7.
- Stålberg K, Ellerström M (1993) Deletion analysis of a 2S seed storage protein promoter of *Brassica napus* in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol.* 23(4):671-83.
- Sharma R, Damgaard D(2006) Detection of transgenic and endogenous plant DNA in digesta and tissues of sheep and pigs fed Roundup Ready canola meal. *J. Agric Food Chem.* 8;54(5):1699-709.
- Shirsat AH, Wilford N (1991) Expression of a *Brassica napus* extensin gene in the vascular system of transgenic tobacco and rape plants. *Plant Mol Biol.* 17(4):701-9.
- Venkatramesh M, Karunanandaa B (2003) Expression of a *Streptomyces* 3-hydroxysteroid

oxidase gene in oilseeds for converting phytosterols to phytostanols. *Phytochemistry*. 62(1):39-46.

제 2절. GM 작물의 고감도 분석법 표준화 및 검정방법 개발

- Chen M, Tang Y, Zhang J, Yang M, Xu Y.(2010) RNA interference-based suppression of phosphoenolpyruvate carboxylase results in susceptibility of rapeseed to osmotic stress. *J. Integr. Plant Biol.* 52(6):585-92.
- Farwell AJ, Vesely S, Nero V (2007) Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. *Environ Pollut.* 147(3):540-5.
- Hong H, Datla N, Reed DW, Covello PS, MacKenzie SL, Qiu X (2002) High-level production of gamma-linolenic acid in *Brassica juncea* using a delta6 desaturase from *Pythium irregulare*. *Plant Physiol.* 129(1):354-62.
- Koning A, Jones A, Fillatti JJ (1992) Arrest of embryo development in *Brassica napus* mediated by modified *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Plant Mol Biol* 18(2):247-58.
- Kumar R, Raclaru M, Schüsseler T(2005) Characterisation of plant tocopherol cyclases and their overexpression in transgenic *Brassica napus* seeds. *FEBS Lett.*28;579(6):1357-64.
- Lassner MW, Lardizabal K, Metz JG (1996) A jojoba beta-Ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. *Plant Cell.* 8(2):281-92.
- Prakash A, Luthra PM (2012) Insilico study of the A(2A)R-D (2)R kinetics and interfacial contact surface for heteromerization. Prakash A, Luthra PM. *Amino Acids.* Jan 26. [Epub ahead of print]
- Saji H, Nakajima N, Aono M (2005) Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environ Biosafety Res.* 4(4):217-22.
- Sander L, Child R, Ulvskov P, Albrechtsen M (2001) Analysis of a dehiscence zone endo-polygalacturonase in oilseed rape (*Brassica napus*) and *Arabidopsis thaliana*: evidence for roles in cell separation in dehiscence and abscission zones, and in stylar tissues during pollen tube growth. *Plant Mol Biol.* 46(4):469-79.
- Schäfer UA, Hegedus DD, Bate NJ, Hannoufa A (2004) A ROS repressor-mediated binary regulation system for control of gene expression in transgenic plants. *Transgenic Res.* 13(2):109-18.
- Subramaniam S, Mathiyalagan R, Jun Gyo I, Bum-Soo L, Sungyoung L, Deok Chun Y. (2011) Transcriptome profiling and insilico analysis of *Gynostemma pentaphyllum* using a next generation sequencer. *Plant Cell Rep.* 30(11):2075-83.
- Taverniers I, Windels P (2005) Event-specific plasmid standards and real-time PCR methods for transgenic Bt11, Bt176, and GA21 maize and transgenic GT73 canola. *J. Agric Food Chem.* 20;53(8):3041-52.
- Wu G, Zhang L, Wu Y, Cao Y, Lu C (2010) Comparison of five endogenous reference genes for

specific PCR detection and quantification of *Brassica napus*. *J. Agric Food Chem.* 10;58(5):2812-7.

Ye C, Wu S, Yang Q, Ma C, Yang G, Wang B (2005) Cloning, sequencing and salt induced expression of PEAMT and BADH in oilseed rape (*Brassica napus*). *DNA Seq.* 16(5):364-71.

Young LW, Cross RH (2005) A high- and low-temperature inducible *Arabidopsis thaliana* HSP101 promoter located in a nonautonomous mutator-like element. *Genome.* 48(3):547-55.

제 3절. 유채와 벼트그래스의 환경위해성평가 가이드라인 개발

A caryo-geographical study of the genus *Agrostis*. *Cytologia.* 1938. 8:452-467.

A Multigene-Transfer Strategy to Control Pathogens and Enhance Environmental Stress Tolerance in Creeping Bentgrass. The United States Golf Association. 1999.

A Utah flora. Great Basin Naturalist Memoir. No.9. Brigham Young University, Provo, UT, 1987. 894pp.

Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science.* 2000. 40:923-940.

Agrobacterium tumefaciens-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. *Plant Cell Reports.* 2004. 22:645-652.

Agrobacterium-mediated transformation of creeping bentgrass using GFP as a reporter gene. *Hereditas.* 2000. 133:229-233.

Agrostis. In: *Flora Europaea*. 5. Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledenes). Cambridge University Press, Cambridge. 1980.

Applied Weed Science. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ. 1999.

Belanger, F.C., T.R. Meagher, P.R. Day, K. Plumley, and W.A. Meyer. 2003. Interspecific hybridization between *Agrostis Stolonifera* and related *Agrostis* species under field conditions. *Crop Sci.* 43:240-246

Bentgrass Distribution Surveys and Habitat Suitability Maps Support Ecological Risk Assessment in Cultural Landscapes *Weed Science.* 2011. 59(2):145-154.

Bermudagrass *Cynodon dactylon* (L.) Pers. and Zoysiagrass (*Zoysia japonica*) Establishment After Preemergence Herbicide Applications. *Weed Technology.* 2002. 16(3):597-602.

Bjorkman, S.O. 1954. Chromosome studies in *Agrostis* II: *Hereditas Lund.* 40: 254-258.

Bjorkman, S.O. 1960. Chromosome studies in *Agrostis*. II. 254-258.

Booth, C.D. and C.J. Swanton. 2002. Assembly theory applied to weed communities. *Weed Sci.* 50: 2-13.

Bradshaw, A.D. 1958a. Natural hybridization of *Agrostis tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. *New Phytologist.* 57: 66-84.

Characteristics of creeping bentgrass clones (*Agrostis stolonifera* L.) from a salinity-tolerant population after surviving drought stress. *HortScience.* 1983.

18(6):sec.1.

- Chromosome studies in *Agrostis* II: *Hereditas* Lund. 1954. 40:254-258.
- Chromosome studies in *Agrostis*. II. 1960 254-258.
- Collet, C., H. Frochot and J-M. Guehl. 1996. Growth dynamics and water uptake of two forest grasses differing in their growth strategy and potentially competing with forest seedlings. *Can. J. of Bot.* 74: 1555-1561.
- Colonization and differentiation in the clonal perennial *Agrostis stolonifera*. *J. Ecol.* 1990b. 78:949-961.
- Competitiveness of *Agrostis* interspecific hybrids in turfgrass swards. *Crop Sci.* 2009. 49:2275-2284.
- Contributions from breeding forage and turf grasses. CSSA Special Publication Number 15. Crop Science Society of America. Madison, WI. 31-48.
- Controlling transgene escape in genetically modified grasses. *Turf Proceedings.* 2004.
- Controlling Transgene Escape in GM Creeping Bentgrass. *Molecular Breeding.* 2005. 6(2):185-188.
- Davies, W.E. 1953. The breeding affinities of some British species of *Agrostis*. *Brit. Agric Bull.* 5: 313-315.
- Determination of the Potential Impact from the Release of Glyphosate- and Glufosinate-Resistant *Agrostis stolonifera* L. in Various Crop and Non-Crop
- Determining gene flow of transgenic creeping bentgrass and gene transfer to other bentgrass species. *Diversity.* 2000. 16(1/2):36-39.
- Duich, J.M. 1985. The bent grasses. *Weeds, Trees and Turf.* 24: 72,74,78,104.
- Ecological and physiological characteristics of weeds. In: Altieri, M.A. and M. Liebman. *Weed Management in Ecosystems.* CRC Press. Boca Raton, FL. 1988.
- Ecological genetics of salt resistance in the clonal perennial, *Agrostis stolonifera* L. *New Phytol.* 1989. 113:453-458.
- Ecosystems. Weed Science Society of America. 2003.
- Effect of local shading and drought both singly and combined on tiller ramets of *Agrostis stolonifera* L.. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2001. 4:1336-1338.
- Effects of SAG12-ipt expression on cytokinin production, growth and senescence of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) under heat stress. *Plant Growth Regulation.* 2009. 57(3):281-291.
- Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment. *Plant Cell Reports.* 1997. 16:874-878.
- Epidemiology of *Anguina agrostis* on Highland Colonial Bentgrass. *Journal of Nematology.* 1994. 26(3):315-323.
- Escape and establishment of transgenic glyphosateresistant creeping bentgrass *Agrostis stolonifera* in Oregon, USA: a 4-year study. *Journal of Applied Ecology.* 2008. 45:486-494.
- Escape and Persistent Presence of Transgene from GM Bentgrass. *Biosafety Information*

- Centre. (<http://www.biosafety-info.net/bioart.php?bid=506>)
- Escaped GM grass could spread bad news. *naturenews*. 2006.
- ESCAPED GM GRASS IGNITES CONCERN. Biosafety Information Centre (<http://www.biosafety-info.net/bioart.php?bid=424>)
- Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in nonagronomic habitats. *Molecular Ecology*. 2006. 5:4243-4255.
- Evaluation of Drought and Salinity Tolerance in Transgenic Creeping Bentgrass. M.S. Thesis, Michigan State University, East Lansing. 2000. p.81.
- Evaluation of Viability, Shedding Pattern, and Longevity of Pollen from Genetically Modified (GM) Herbicide-tolerant and Wild-type Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *Journal of Plant Biology*. 2009. 52(6):630-634.
- Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with CP4 EPSPS as a marker. *PNAS*? October 5, 2004. 101(40):14533-14538.
- FATE AND IMPACT OF GENE MIGRATION FROM TRANSGENIC CREEPING BENTGRASS PRODUCTION FIELDS. OREGON STATE UNIVERSITY submitted to Federal Noxious Weed List. Animal and Plant Health Inspection Service. USDA. 2002a.
- Field evaluation of herbicide resistance in transgenic *Agrostis stolonifera* L. and inheritance in the progeny. *International Turfgrass Society Research Journal*. 1997. 8:337-344.
- Fundamentals of Weed Science. Academic Press. San Diego, CA. 1999.
- Gardner, D.S., T.K. Danneberger, E. Nelson, W. Meyer and K. Plumley. 2003. Relative fitness of glyphosate-resistant creeping bentgrass. *HortScience* 38(3):455-459.
- Gene flow from transgenic creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) in the Willamette Valley, Oregon. *Research Journal*. Volume 9. International Turfgrass Society. Toronto, Canada. 2001.
- Gene Flow from Transgenic Glyphosate-Resistant Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) at the Landscape Level. Maria Luz Zapiola for the degree of Doctor of Philosophy in Crop Science presented on October 22, 2009.
- Generation of Herbicide Resistant Creeping Bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) Plants by Electroporation-Mediated Direct Gene Transfer into Protoplasts. *Journal of Turfgrass Management*. 1999. 2(4):35-41.
- Giddings, G.D., N.R. Sackville Hamilton, and M.D. Hayward. 1997b. The release of genetically modified grasses. Part 2: The influence of wind direction on pollen dispersal. *Theor. Appl. Genet.* 94:1007.1014.
- Glufosinate Reduces Fungal Diseases in Transgenic Glufosinate-Resistant Bentgrasses (*Agrostis* spp.). *Weed Science*. 2003. 51:130-137.
- GM creeping bentgrass: a case study of gene flow from a perennial, outcrossing species. Third International Conference on coexistence between Genetically Modified GM and nonGM based agricultural supply chains Seville Spain 2021 November 2007. 2008. p.79-82.
- GM grass trials blocked. *Nature Biotechnology*. 2008. 26:482.

- Greenhouse evaluation of fitness-related reproductive traits in roundup-tolerant transgenic creeping bentgrass (*Agrostis Stolonifera* L.). *In Vitro Cell Dev. B.* 2004. 40:266-273.
- Griffiths, D.J. 1951. The liability of seed crops of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) to contamination by wind-borne pollen. *J. Agric. Sci.* 40: 19-31.
- Hancock, D.M, and C. Mallory-Smith. 2004. Response of 4 glyphosate resistant and 2 susceptible lines of bentgrass to seed burial depth, length of burial, and location. *Proc. Western Soc. of Weed Sci.* 57:123.
- Herbage productivity of a range of grass species in association with white clover. *Grass and Forage Sci.* 1990. 45:57-64.
- Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass. *USGA Green Section Record.* 1995. 33(2):16-18.
- Hill, M. O. and P.A. Stevens. 1981. The density of viable seed in soils of forest plantations in upland Britain. *J. Ecol.* 69:693-709.
- Hitchcock, A.S. 1950. *Manual of the grasses of the United States.* USDA Misc. Publ. #200.
- Holm, L., J. Doll, E. Holm, J. Pancho, J. Herberger. 1997. *WORLD WEEDS; Natural Histories and Distribution.* JohnWiley & Sons, Inc.
- Holm, L.G., J.V. Pancho, J.P. Herberger, and D.L. Plucknett. 1991. *A Geographical Atlas of World Weeds.* Krieger Pub. Co. Malabar, FL.
- Hubbard, C.E. 1984. *Grasses.* Penguin Books Ltd. UK. 3rd Edition.
- Hurley, P.J., and A.K. Luhar. 2005. An evaluation and inter-comparison of AUSPLUME, CALPUFF, and TAPM: Part 1. The Kincaid and Indianapolis field datasets. *Clean Air Environ. Qual.* 39:39.45.
- Identification of Escaped Transgenic Creeping Bentgrass in Oregon. *ISB News Report.* 2007.
- Illustrierte Floa von Mittel Europa. Carl Hanser. Munich, Germany. 1935.
- Impact of the introduced grass *Agrostis stolonifera* on vegetation and soil fauna communities at Marion Island, sub-Antarctic. *Biological Conservation.* 1998. 85:223-231.
- Interference between sown grasses and the growth of rhizome of *Elymus repens* (couchgrass). *Agriculture, Ecosystems, and the Environment.* 1990. 33:11-22. MacBryde, B. 2002. Literature review of the *Agrostis* spp. and related genera of North America. Personal communication.
- Interspecific hybridization between *Agrostis Stolonifera* and related *Agrostis* species under field conditions. *Crop Sci.* 2003. 43:240-246.
- Introduction to Weeds and Herbicides. Pennsylvania State University Cooperative Extension. University Park, PA. 1996.
- Invasive Plants: Guide to Identification and the Impacts and Control of Common North American Species . p.386-388.
- Is purple loosestrife (*Lythrum salicaria*) an invasive threat to freshwater wetlands? Conflicting evidence from several ecological metrics. *Wetlands.* 2001. 21:199-209.
- Jackson, S.T., and M.E. Lyford. 1999. Pollen dispersal models in quaternary plant ecology:

- Assumptions, parameters, and prescriptions. *Bot. Rev.* 65:39-75.
- Johnson, P.G., and T.P. Riordan. 1999. A review of issues pertaining to transgenic turfgrasses. *HortScience* 34:594-598.
- Jones, K. 1956a. Species differentiation in *Agrostis*. I. Cytological relationships in *Agrostis canina* L. *J. Genet.* 54: 370-376.
- Jones, K. 1956b. Species differentiation in *Agrostis*. II. The significance of chromosome pairing in the tetraploid hybrids of *Agrostis* subspecies. *J. Genet.* 54: 377-393.
- Jones, K. 1956c. Species differentiation in *Agrostis*. III. *Agrostis gigantea* Roth. and its hybrids with *A. tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. *J. of Genet.* 54: 394-399.
- Jutila, H. M. 1998. Seed banks of grazed and ungrazed Baltic seashore meadows. *J. Vegetation Sci.* 9:395-408.
- King, J. 1962. The *Festuca-Agrostis* grassland complex in southeast Scotland. *J. Ecol.* 50: 321-355.
- Knowles, R.P. 1966. Isolation requirements for smooth brome grass. Forty-eighth Annual Report of the International Crop Improvement Association, 1966, Rochester, NY. p. 93-95.
- Lateral Spread of Glyphosate-Resistant Transgenic Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera*) Lines in Established Turfgrass Swards. *Weed Technology.* 2004. 8(3):773-778.
- Lee, L., C.L. Laramore, P.R. Day and N.E. Tumer. 1996. Transformation and regeneration of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) protoplasts. *Crop Science* 36:401-406.
- Long-distance GM pollen movement of creeping bentgrass using modeled wind trajectory analysis. *Ecological Applications.* 2007. 17:1244-1256.
- Loux, M. M. and S. K. Harrison. 2002. Survival of glyphosate-tolerant creeping bentgrass in glyphosate tolerant corn and soybean. *Abstr. Weed Sci. Soc. Am.* 42:19-20.
- M. Bollman, M. Storm, G. King, and P.K. Van de Water. 2004. Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with CP4 EPSPS as a marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14533-14538.
- Manual of Grasses for North America. Utah State Univ. Press. 2007. p.152-154.
- Manual of the grasses of the United States. USDA Misc. Publ. 1950. #200.
- Mesotrione Controls Creeping Bentgrass (*Agrostis Stolonifera*) in Kentucky Bluegrass. *Weed Technology.* 2007. 1(2):402-405.
- Morphological plasticity and mineral nutrient capture in two herbaceous species of contrasted ecology. *New Phytol.* 1987. 107:403-414.
- Natural hybridization of *Agrostis tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. *New Phytologist.* 1958a. 57:66-84.
- Nurminiemi, M., J. Tufto, N. Nilsson, and O.A. Rognli. 1998. Spatial models of pollen dispersal in the forage grass meadow fescue. *Evol. Ecol.* 12:487-502.
- Oregon Seed Certification Service Handbook 2001. Oregon State University Extension Service. Corvallis, OR. 2001a.

- Parodi, L.R. 1951. Una nueva especie de graminæ del genero *Agrostis* del delta del Rio Parana. Rev. Argent. Agron. 18: 143-146.
- Phenotypic performance and environmental risk assessments of genetically modified herbicide-tolerant *Zoysia* grass (*Zoysia japonica* Steud.). 한국육종학회 학술발표회 발표요지. 2007. 제38권 1호:19~19.
- Plant Science: An Introduction to World Crops. WH Freeman Press. San Francisco, CA. 1974.
- Ploidy levels and somatic chromosome number variation in *Agrostis stolonifera*. Acta. Bot. Neerl. 1993. 42:73-80.
- Preliminary Checklist of the Vascular Flora of Connecticut. Report of Investigations No. 8, State Geological and Natural History Survey of Connecticut. 1979. p.12.
- Production of transgenic creeping bentgrass *Agrostis stolonifera* var. *palustris* plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using hygromycin selection. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2005. 81:131-138.
- Progress and Benefits to Humanity from Breeding Cool-Season Grasses for Turf. In: Sleper, D.A., K.H. Asay, and J.F. Pedersen. 1989.
- Promoter analysis in transient assays using a GUS reporter gene construct in creeping bentgrass (*Agrostis palustris*). Journal of Plant Physiology. 2003. 160:1233-1239.
- Rampton, H.H. and T.M. Ching. 1970. Persistence of crop seeds in soil. Agronomy Journal 62:272-277.
- Relative fitness of glyphosate-resistant creeping bentgrass lines in Kentucky bluegrass. HortScience. 2003. 38:455-459.
- Response of Glyphosate-Resistant and Glyphosate-Susceptible Bentgrass (*Agrostis* spp.) to Postemergence Herbicides. Weed Technology. 2005. 9(3):549-559.
- Review: gene flow from glyphosate-resistant crops. Pest Manag. Sci. 2008. 64:42-?440.
- Rognli, O.A., N. Nilsson, and M. Nurminiem. 2000. Effects of distance and pollen competition on gene flow in the wind pollinated grass *Festuca pratensis* Huds. Heredity 85:550.560.
- Roundup Ready glyphosate-resistant bentgrass.
http://grounds-mag.com/mag/grounds_maintenance_battle_bents/
- Roundup Ready® Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) Event ASR368. Petition for Determination of Nonregulated Status: 2003.
- Scire, J.S., D.G. Strimaitis, and R.J. Yamartino. 1990. Guide for the CALPUFF dispersion model (version 5.0). Earth Tech, Concord MA.
- Selective Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera*) Control in Cool-Season Turfgrass1. Weed Technology: April. 2006. 20(2):340-344.
- Sell, P., and G. Murrell. 1996. Flora of Great Britain and Ireland, Vol. 5, *Butomaceae* . *Orchidaceae*. *Agrostis* L. (pp. 186-191). Cambridge Univ. Press, Cambridge, England, U.K.
- Sokolovskaya, A.P. 1938. A caryo-geographical study of the genus *Agrostis*. Cytologia. 8:

452-467.

- Species differentiation in *Agrostis*. I. Cytological relationships in *Agrostis canina* L. J. Genet. 1956a. 54:370-376.
- Species differentiation in *Agrostis*. III. *Agrostis gigantea* Roth. and its hybrids with *A. tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. J. of Genet. 1956c. 54:394-399
- Spread of herbicide-resistance from genetically modified creeping bentgrass into the wild. http://www.natureinstitute.org/nontarget/reports/bentgrass_001.php
- State Noxious - Weed Seed Requirements Recognized in the Administration of the Federal Seed Act. Marketing and Regulatory Program. AMS. Livestock and Seed Program Seed Regulatory and Testing Branch. USDA. 2002b.
- Teyssonneyre, F., C. Picon-Cochard, R. Falcimagne and J.F. Soussana. 2002. Effects of elevated CO₂ and cutting frequency on plant community structure in a temperate grassland. *Global Change Biol.* 8:1034-1046
- The breeding affinities of some British species of *Agrostis*. *Brit. Agric Bull.* 1953. 5:313-315.
- The distribution of cytotypes in ecologically contrasting populations of the clonal perennial *Agrostis stolonifera*. *Evolutionary Trends in Plants.* 1992. 6:93-98.
- The intersection of ecological risk assessment and plant communities: an analysis of *Agrostis* and *Panicum* species in the northeastern U.S. *Plant Ecology.* 2011.
- The pattern of distribution of *Agrostis* and *Festuca* plants of various genotypes in a sward. *New Phytol.* 1972. 71:937-945.
- The release of genetically modified crops in the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *Plant J.* 2003. 33:19-46.
- The seasonal productivity, quality and response to nitrogen of four indigenous grasses compared to *Lolium perenne*. *Journal of the British Grassland Society.* 1976. 31:197-207.
- The solute and water relations of *Agrostis stolonifera* L. ecotypes differing in their salt tolerance. *New Phytologist.* 1981. 87:615-629.
- The World's Worst Weeds: Distribution and Biology. University Press of Hawaii. Honolulu. 1979.
- Thompson, K., and J. P. Grime. 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *J. Ecol.* 67:893-921.
- Tolerance to salt, partial anaerobiosis and osmotic stress in *Agrostis stolonifera*? L.. *New Phytologist.* 1977. 79:605-612.
- Tracking the pollen of transgenic bentgrasses. *Golf Course Management.* 2001. 69(5):53-57.
- Transgenic creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) plants regenerated from protoplasts. <http://openagricola.nal.usda.gov/Record/IND20598736>
- Transgenic creeping bentgrass with delayed dollar spot symptoms. *Mol. Breeding.* 2003. 11:95-101.
- Transgenic plants of colonial bentgrass from embryogenic callus via

- Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2004. 77:165-171.
- Transgenic plants of creeping bent grass harboring the stress inducible gene, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, are highly tolerant to drought and NaCl stress. *Plant Growth Regulation*. 2005. 47:129-139.
- Trials of confined and unconfined field level for ecological risks assessment of genetically modified zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). 한국식물생명공학회 춘계학술대회 발표논문초록집. 2005. p.196.
- Turfgrass Weeds and Their Management. In: Watschke, T.L., P.H. Dernoeden, and D.J. Shetlar: *Managing Turfgrass Pests*. CRC Press. New York, NY. 1995.
- Una nueva especie de graminiae del genero *Agrostis* del delta del Rio Parana. *Rev. Argent. Agron*. 1951. 18:143-146.
- US courts thwart GM alfalfa and turf grass. *Nature Biotechnology*. 2007. 25:367.
- USDA/APHIS Permit 97-087-02r for field testing genetically engineered creeping bentgrass plants: Environmental assessment and finding of no significant impact. U.S. Department of Agriculture. Riverdale, MD. 1997.
- Velvet bentgrass (*Agrostis canina* L.) is the likely ancestral diploid maternal parent of allotetraploid creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). *Genet Resour Crop Evol*. 2010. 57:1065-1077.
- Wang, Z.Y., R. Lawrence, A. Hopkins, J. Bell, and M. Scott. 2004. Pollen-mediated transgene flow in the wind-pollinated grass species tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Mol. Breed*. 14:47.60.
- Watrud, L.S., E.H. Lee, A. Fairbrother, C. Burdick, J.R. Reichman, Weed-Crop Ecology. Breton Publishers. North Scituate, MA. 1984.
- Weeds of the Northeast. Cornell University Press. 1997.
- Welsh, S.L., N.D. Atwood, S. Godrich and L.C. Higgins, eds. 1987. A Utah flora. Great Basin Naturalist Memoir. No.9. Brigham Young University, Provo, UT, 894pp.
- White Paper: Perspectives on creeping bentgrass, *Agrostis stolonifera* L.. USDA/APHIS/BRS. 2005.
- Wipff, J.K. and C. Fricker. 2001. Gene flow from transgenic creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) in the Willamette Valley, Oregon. *Research Journal*. Volume 9. International Turfgrass Society. Toronto, Canada.

제 4절. GM 유체와 벤프그래스의 모니터링 기법 개발

박수현 (2009) 세밀화와 사진으로 보는 한국의 귀화식물. 일조각

이인용, 박재읍, 문병철, 서석철, 신공식, 우미옥, 권순종 (2009) 흑명나방저항성벼의 잡초화 및 유전자 이동 가능성. *한잡초지* 29:46-55

Andersson MS, Carmen de Vicente M (2010) Gene Flow between Crops and Their Wild Relatives. The Johns Hopkins University Press, Baltimore

Bae TW, Vanjildori E, Song SY, Nishiguchi S, Yang SS, Song IJ, Chandrasekhar T, Kang

- TW, Kim JI, Koh YJ, Park SY, Lee J, Lee Y-E, Ryu KH, Riu KZ, Song P-S, Lee HY (2008) Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *J Env Qual* 37:207-218
- Cai L, Zhou BW, Guo XL, Dong CH, Hu XJ, Hou MS, Liu SY. 2008. Pollen-mediated gene flow in Chinese commercial fields of glufosinate-resistant canola (*Brassica napus*). *Chinese Science Bulletin* 53:2333-2341
- Chadoeuf R, Darmency H, Maillet J, Renard M (1998) Survival of buried seeds of interspecific hybrids between oilseed rape, hoary mustard and wild radish. *Field Crop Res* 58:197-204
- Chun YJ, Kim DI, Park KW, Kim H-J, Jeong S-C, An JH, Cho KH, Back K, Kim HM, Kim C-G (2011) Gene flow from herbicide-tolerant GM rice and the heterosis of GM rice-weed F2 progeny. *Planta* 233:807-815
- Crawley MJ, Brown SL (1995) Seed limitation and the dynamics of feral oilseed rape on the M25 motorway. *Proc. R. Soc. Lond. B* 259:49-54
- D'Hertefeldt T, Jørgensen RB, Pettersson LB (2008) Long-term persistence of GM oilseed rape in the seedbank. *Biol Lett* 4:314-317
- FitzJohn RG, Armstrong TT, Newstrom-Loyd LE, Wilton AD, Cochrane M (2007) Hybridisation within Brassica and allied genera: evaluation of potential for transgene escape. *Euphytica* 158:209-230
- Ford CS, Allainguillaume J, Grilli-Chantler P, Cuccato G, Allender CJ, Wilkinson MJ (2006) Spontaneous gene flow from rapeseed (*Brassica napus*) to wild *Brassica oleracea*. *Proc R Soc B* 273:3111-3115
- Huangfu C-H, Qiang S, Song X-L (2011) Performance of hybrids between transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and wild *Brassica juncea*: An evaluation of potential for transgene escape. *Crop Protection* 30:57-62.
- Hüsken A, Dietz-Pfeilstetter A (2007) Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Transgenic Res* 16:557-569
- Kawata M, Murakami K, Ishikawa T (2009) Dispersal and persistence of genetically modified oilseed rape around Japanese harbors. *Environ Sci Pollut Res* 16:120-126
- Kim, C-G, Lee B, Kim DI, Park JE, Kim H-J, Park KW, Yi H, Jeong S-C, Yoon WK, Harn CH, Kim HM (2008) Detection of gene flow from GM to non-GM watermelon in a field trial. *J Plant Biol* 51:74-77
- Kim C-G, Park KW, Lee B, Kim DI, Park J-Y, Kim H-J, Park JE, An JH, Cho K-H, Jeong S-C, Choi KH, Harn CH, Kim HM (2009a) Gene flow from genetically modified to conventional chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci* 176:406-412
- Kim C-G, Kim DI, Kim H-J, Park JE, Lee B, Park KW, Jeong S-C, Choi KH, An JH, Cho K-H, Kim YS, Kim HM (2009b) Assessment of gene flow from genetically modified anthracnose-resistant chili pepper (*Capsicum annuum* L.) to a conventional crop. *J Plant Biol* 52:251-258
- Lee SY, Kim MS, Kim HJ, Ahn JH, Baek SH, Shin WC, Kim HS (2007) Pollen-mediated

- gene flow between glufosinate ammonium-tolerant GM and non-GM rice. *J Plant Biotechnol* 34:47-53
- Mizuguti A, Yoshimura Y, Shibaike H, Matsuo K (2011) Persistence of feral populations of *Brassica napus* originated from spilled seeds around the Kashima Seaport in Japan. *JARQ* 45:181-185
- Nishizawa T, Nakajima N, Aono M, Tamaoki M, Kubo A, Saji H (2009) Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations. *Environ Biosafety Res* 8:33-44
- Pessel FD, Lecomte J, Emeriau V, Krouti M, Messean A, Gouyon PH (2001) Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *Theor Appl Genet* 102:841-846
- Pivard S, Adamczyk K, Lecomte J, Lavigne C, Bouvier A, Deville A, Gouyon PH, Huet S (2008) Where do the feral oilseed rape populations come from? A large-scale study of their possible origin in a farmland area. *J Appl Ecol* 45:476-485
- Rieger MA, Lamond M, Preston C, Powles SB, Roush RT (2002) Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 296:2386-2388
- Saji, H, Nakajima N, Aono M, Tamaoki M, Kubo A, Wakiyama S, Hatase Y, Nagatsu M (2005) Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environ Biosafety Res* 4:217-222
- Schafer MG, Ross AA, Londo JP, Burdick CA, Henry Lee E, Travers SE, Van de Water PK, Sagers SL (2011) The establishment of genetically engineered canola populations in the U.S. *Plos One* 6:e25736
- Scheffler JA, Dale PJ (1994) Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Res* 3:263-278
- Scheffler JA, Parkinson R, Dale PJ (1993) Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Res* 2:356-364
- Shim SI, Lee B-M, Kang BH (2001) Potential risk of genetically modified plants in Korean ecosystem: a proposal for unintended effects on Korean wild species. *Kor J Crop Sci* 46:157-163
- Yoshimura Y, Beckie HJ, Matsuo K (2006) Transgenic oilseed rape along transportation routes and port of Vancouver in western Canada. *Environ Biosafety Res* 5:67-75

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 GM 유채와 벤투그래스의 환경위해성평가 및 안전관리 기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 GM 유채와 벤투그래스의 환경위해성평가 및 안전관리 기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.