흑명나방 저항성벼 (Cry1Ac1)의 병해 저항성 및 병원균으로의 유전자 전이

남효송^{1,2} · 심홍식² · 유상미² · 이세원² · 권순중³ · 김명곤⁴ · 이용훈^{1,2*}

¹전북대학교 환경생명자원대학 생명공학부, ²농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과,
³농촌진흥청 국립농업과학원 생물안전성과, ⁴전북대학교 환경생명자원대학 바이오식품공학과

Evaluation of Disease Resistance of a Leaffolder-resistant (*Cry1Ac1*) Rice Event and Gene Transfer to Plant Pathogens

Hyo Song Nam^{1,2}, Hong-Sik Shim², Sang-Mi Yu², Se Won Lee², Soon Jong Kwon³,
Myung-Kon Kim⁴ and Yong Hoon Lee^{1,2*}

¹Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Deokjin-dong, Jeonju, Jeonbuk 561-756 Korea
²Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea
³Biosafety Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea
⁴Bio Food Technology, Chonbuk National University, Deokjin-dong, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea
(Received on January 1, 2009; Accepted on November 14, 2009)

The genetically modified leaffolder-resistant (*Cry1Ac1*) rice plant was evaluated for the changes of resistance by comparing the occurrence of major diseases with a japonica type Korean rice variety, Nakdong which was the mother plant of the transgenic rice event, in greenhouse and field conditions. There was no difference in the occurrence of sheath blight and *Helminthosporium* blight between the two varieties in the fields. We couldn't find any difference of resistance for fungal blast and bacterial leaf blight by artificial inoculation in greenhouse. There was also no difference in the susceptibility to sheath blight in artificial inoculation tests confirming the results in the fields. The possibility of gene transfer of *Bar* and *Cry1Ac1* from the genetically modified rice plant to naturally infected pathogens such as *Fusarium moniliforme* and *Pyricularia oryzae* in the field conditions was tested by PCR. And the possible transfer of those genes by continuous inoculation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Rhizoctonia solani* was also tested. However, we couldn't find any possibility of transfer of the genes in natural and artificial conditions.

Keywords : Event, Gene transfer, GMO, Leaffolder

벼, 콩, 옥수수 등 수 많은 종류의 유전자 변형식물이 시험중이거나 포장에서 재배되고 있는데, 이러한 유전자 변형작물은 화학농약의 절감과 수량의 증가에 기여한 것은 사실이나 인류의 건강이나 생물 중 다양성에 해를 끼칠 가능성이 있어, 이의 재배와 이용에 여전히 많은 논란이 있다.

대부분의 유전자 변형작물은 품종별로 특징적인 특성과 목적을 가지고 있다. 이러한 유전자 변형작물(GMO; genetically modified organisms)은 본래의 특성 이외의 다

른 특성에 대해 하나하나 개별적으로 분석 및 평가되어야 할 필요성이 있으며, 환경에 대한 유해성 및 안전성에 대한 체계적인 검토가 절실한 실정이다.

흑명나방은 벼의 중요한 해충으로 발생시기와 발생량이 연도에 따라 크게 다르며, 보통 7월 하순부터 출수기에 걸쳐 벼 잎을 세로로 말아 그 속에서 잎 살을 갉아 먹으므로 잎이 말라 죽게 하는데, 포장에서는 8월 하순부터 피해가 심하게 나타나며, 피해를 받게 되면 곡식의 낱알이 여물지 않는 특징이 있다. 흑명나방은 발생초기에 방제를 해야 하는데 시기가 조금만 늦어져도 방제효과가 낮아지고, 농약을 뿌려도 유충이 벼 잎을 세로로 말고, 벼 잎 속에서 생존하여 농약이 유충의 몸에 잘 닿지 않아서 방제효과가 낮은 특징이 있어 저항성 작물에 의한 방제

*Corresponding author

Phone) +82-63-850-0841, Fax) +82-63-850-0834

Email) yonghoonlee@jbnu.ac.kr

가 가장 효율적이라고 할 수 있다.

최근에 국외에서는 흑명나방을 살충하는 *Bt* 유전자를 벼에 삽입하여 저항성을 발휘하는 품종이 개발되어 포장에서 저항성 평가가 이루어지기도 하였다(Ye 등, 2003). 국내에서는 농촌진흥청 국립농업과학원에서 국내 토양에서 분리된 미생물에서 내충성 유전자를 분리한 후 이를 다시 식물체내에서 높은 효율로 발현되도록 내충성 유전자의 염기서열을 변형(50% 이상)시켜 형질전환 벼를 만들었다.

현재 포장에서 재배중인 유전자 변형식물의 대부분은 선발마커로 세균의 항생제 저항성 유전자나 제초제 저항성 유전자를 함유하고 있는데, 이러한 유전자변형식물의 항생제 내성유전자나 제초제 저항성 유전자가 다시 미생물로 전이되는 것에 대한 우려가 제기되고 있다(Smalla 등, 1997; Davis, 1994). 최근에는 유연관계가 적은 세균에서 세균(Mazodier 등, 1989; Trieu-Cuot 등, 1987), 세균에서 효모(Heinemann과 Sprague, 1989), 포유류 세포에서 포유류 세포(Courvalin, 1995) 또는 식물세포에서 식물세포(Hooykaas, 1989)로의 유전자 전이에 대한 보고가 있었다. 또한 염기서열분석에 의하면, 진화과정에서 식물체로부터 세균으로의 유전자 전이가 이루어졌을 가능성이 있는 것으로 보고되었다(Smith 등, 1992; Doolittle 등 1990). 하지만, 식물의 유전자가 세균으로 전이되었다는 것이 현재까지 실험적으로 증명된 적은 없다(Broer 등, 1996). 그러나, 완전한 유전자가 전이되는 것은 어려울 수도 있지만, 작은 유전자 단편의 재조합 등의 가능성은 항상 있다고 할 수 있다(Smith 등, 1991).

본 실험에서는 흑명나방 저항성벼와 모본으로 사용된 낙동벼를 이용해 두 품종간의 병해 발생양상 및 주요 병해에 대한 저항성 차이 여부를 포장과 온실에서 지역을 달리하여 3개년에 걸쳐 조사하였고, 저항성 발현을 위해 사용된 유전자와 마커로 삽입된 유전자가 식물병원균으로 전이되는지의 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

병 발생 조사. 흑명나방 저항성 벼와 이를 육성하기 위하여 모본으로 사용된 낙동벼 간의 병 발생정도의 차이를 비교하기 위하여 유전자변형식물(Genetically modified plants)을 검정할 수 있는 시설이 갖추어진 격리포장에서 실시하였다. 2006년에는 수원시 서둔동의 국립농업과학원 농업생명자원부 격리포장에서, 2007년과 2008년에는 충남 예산의 충남농업기술원 격리포장에서 흑명나방 저항성 벼와 낙동벼를 재배하면서 전 생육기간에 걸쳐 주

요 병해 발생 양상을 비교 조사하였다.

유묘 저항성 검정. 흑명나방 저항성 벼와 낙동벼의 주요 병해에 대한 저항성 차이를 확인하기 위하여 벼의 주요 세균병인 흰잎마름병(Bacterial leaf blight)과 진균병인 잎집무늬마름병(Sheath blight) 및 도열병(Fungal blast)에 대한 유묘 저항성을 검정하였다. 흰잎마름병균(*X. o. pv. oryzae*)은 PSA(peptone sucrose agar) 배지에 28°C에서 2일간 배양 후 10 mM MgCl₂에 희석 후 OD₆₀₀=0.5(약 10⁸ cfu/ml)로 조정된 다음 벼의 유묘기와 출수기전에 잎에 가위 접종하였다. 도열병균(*Pyricularia grisea*)에 대한 유묘 검정은 일본형벼 침해 레이스(KJ101, KJ105, KJ107, KJ201, KJ301, KJ401)와 인도형벼 침해 레이스(KI1113, KI1117, KI207, KI409)를 배양하여 포자를 유도시킨 다음 병원균의 포자를 5 × 10⁵ 농도로 각각의 식물체에 접종한 후 1일간 습실처리 하였다. 이를 온실에 보관하면서 2주일 후 발병상태를 조사하였다. 한편, 잎집무늬마름병균은 PDA(potato dextrose agar)에서 10일 정도 배양 후 형성된 균사와 균핵을 이용하여 유묘의 줄기에 접종한 후 발병정도를 조사하였다.

핵산분리. 도열병균, 잎집무늬마름병균 및 키다리병원균을 50 ml의 감자한천액배지에 25°C에서 7일간 배양 후 한 겹의 cheese cloth를 통과하여 균사를 수확한 다음 액체질소를 이용하여 각 균사체를 얼린 다음 막자 사발을 이용하여 미세분말로 균질화하고, microcentrifuge tube에 옮긴 후 각 tube에 균사체를 1 g 당 1 ml의 2 × CTAB (2% cetyltrimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCL (pH8.0))을 넣고 55°C에서 1시간 배양한 후 8,000 rpm으로 4°C에서 15분 동안 원심분리하였다. 상등액을 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v)로 2회 추출한 후 수용액층에 isopropanol을 첨가하여 DNA를 침전시킨 다음 70% ethanol로 DNA 침전물을 씻고 100 ug의 RNase A가 들어있는 0.5 ml의 TE 완충액 (1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH8.0))에 용해한 후 37°C에서 1시간 동안 배양하여 RNA를 분해한 다음 반응물을 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v)로 2회 그리고 chloroform으로 1회 추출한 다음 수용액 층에 ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 DNA 침전물을 씻은 후 -20°C에 보관하였다. 흰잎마름병균은 PSA배지에 2일간 배양 후 균총을 긁어내어 2 ml microcentrifuge에 넣고 NaCl로 3회 씻어낸 후 bacterial gDNA 분리 kit를 이용하여 제조회사의 매뉴얼에 따라 분리하였다. 흰잎마름병균은 peptone sucrose agar (1% polypeptone, 1% sucrose and 0.2% L-glutarmate)나 LB 배지에 28°C에서 2일간 배양한 후 균을 획득하였다. 이

균을 5 M NaCl을 이용하여 씻은 후 SDS와 proteinase K를 각각 2% 및 250 ug/ml 함유한 Tris-EDTA 완충액 (pH 8.0) 600 μ l에 현탁하였다. 이 현탁액을 37°C에서 1 시간 동안 처리한 후 5 M NaCl을 100 μ l 첨가한 후 잘 섞어 주었다. Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB)-NaCl 용액을 8 μ l 첨가한 후 65°C에서 10분간 배양한 후 DNA는 phenol chloroform isoamyl alcohol (25:24:1)을 이용하여 분리하였다.

특히, 형질전환식물체와 병원균의 지속적인 접촉에 의한 유전자 전이여부를 조사하기 위하여 잎집무늬마름병균과 흰잎마름병균을 흑명나방저항성벼와 낙동벼에 접종한 후 15일 후 재분리 하였다. 이와 같은 접종과 분리를 5~6회 반복하면서 위에서 기술한 바와 같이 각각의 핵산을 분리하여 보관한 후 PCR을 통하여 *Cry1Ac1*과 *Bar* 유전자의 전이여부를 조사하였다.

PCR(Polymerase Chain Reaction). 식물에 삽입된 흑명나방저항성(*Cry1Ac1*) 유전자와 삽입에 마커로 이용된 제초제 저항성(*Bar*) 유전자의 식물병원균으로의 전이여부를 조사하기 위하여 포장에서 분리한 병원균의 핵산을 분리하여 주형으로 사용해 PCR을 실시하였다. *Cry1Ac1* 유전자의 전이여부를 확인하기 위해서는 *Cry1Ac1F*-BHI 5' (5'-ga ctg gat CCA TGG ACA ACA ACC CAA AC-3')와 *Cry1Ac-XhoI* 3' (5'-g act ctc gag TTA AAG ATT GTA CTC AGC-3') 프라이머를 사용하였고, *Bar* 유전자의 전이여부를 확인하기 위해서는 *BarF* (5'-ATG AGC CCA GAA CGA CGC CCG-3')와 *BarR* (5'-TCA GAT CTC GGT GAC GGG CAG-3') 프라이머를 사용하였다.

PCR은 위에서 분리한 DNA와 1 $\times$ Taq buffer, 2 mM $MgCl_2$ 및 각각의 dNTP 0.25 mM과 2 U EX-taq 중합효소(Takara)를 총 25 μ l가 되게 혼합한 후 최초 94°C에서 1 분간 반응시킨 후 94°C에서 45초간의 변성반응, 55°C에서 45초간의 중합반응 및 72°C에서 45초간의 신장반응을 29회 반복한 후 72°C에서 10분간 반응을 시켰다. 핵산중합 반응 후 산물은 0.8% agarose gel로 전기영동을 실시한 다음 ethidium bromide로 염색 후 관찰하였다.

결과 및 고찰

주요병해 발생 양상. 현재 세계 최대의 곡물 생산국이면서 수출국인 미국을 비롯한 주요 생산국에서는 유전자 변형작물의 재배가 일반화되고 있는데, 2007년 유전자 변형작물 재배국은 23개 국으로 미국, 아르헨티나, 브라질, 캐나다, 인도, 중국 등에서의 재배면적이 꾸준히 증가하고 있다. 미국의 경우 2007년 기준으로 옥수수는 약 75%, 콩은 90% 이상이 유전자 변형작물인 것으로 알려져 있고, 우리나라에서도 유전자 변형작물의 상용화를 위해서 많은 연구가 진행되고 있다. 하지만, 유전자 변형작물은 식량의 증산과 안전적 생산이라는 긍정적 역할 동시에 환경과 인류에 대한 유해 가능성에 대한 우려와 같은 부정적인 측면이 상존하고 있다.

먼저, 흑명나방저항성벼의 병해에 대한 저항성 변화 여부를 확인하기 위하여 모본으로 사용된 낙동벼와의 병해 발생 차이여부를 비교 조사하였다. 2006년도에는 수원의 농촌진흥청 GMO 검정 포장에서 잎집무늬마름병(*R. solani*),

Table 1. Diseases occurred in the fields in 2006 and 2007

Disease	Species	Surveyed date	Level	% Occurrence ^a		
				Plants	Leaves	Panicles
Sheath blight	<i>Rhizoctonia solani</i>	'06.9.10	1-3	30-60	-	-
	"	'07.9.14	0-1	5-15	-	-
Leaf blast	<i>Pyricularia griseae</i>	'06.7.30	0	<1	<0.1	-
	"	'07.9.14	0	<1		<0.1
Panicle blast	"	'06.9.20	0	<1		<0.1
	"	'07.9.14	0	<1		<0.1
Brown spot	<i>Bipolaris oryzae</i>	'06.9.20	0-1	20-30	<0.1	-
	"	'07.9.14	0	5-30	<0.2	
False smut	<i>Ustilaginoidea virens</i>	'06.9.20	0	-	-	-
Bakanae disease	<i>Fusarium moniliforme</i>	'06.7.30	0	<0.01	-	-
Bacterial leaf blight	<i>Xo. pv. oryzae</i>	'06.9.20.	0	0	-	-
Bacterial grain rot	<i>Burkholderia glumae</i>	'06.9.20.	0	0	-	-
	"	'06.9.20.	0	<1	-	<0.1

^aThe occurrence of the disease was surveyed in the isolated fields for the experiment of genetically modified plants in Suwon, Gyeonggi and Yesan, Chungnam, 2006 and 2007, respectively.

잎도열병(*P. griseae*), 목도열병, 깨씨무늬병(*Bipolaris oryzae*), 이삭누룩병(*Ustilaginoidea virens*), 키다리병(*Fusarium moniliforme*), 흰잎마름병(*X. o. pv. oryzae*), 세균성벼알마름병(*Burkholderia glumae*) 등이 관찰되었고, 2007년도에는 충남 예산의 포장에서 병 발생을 조사한 결과 잎집무늬마름병, 잎도열병 및 목도열병, 깨씨무늬병, 세균성벼알마름병 등의 병해가 조사되었다(Table 1). 한편 2008년도에는 예년에 비해 키다리병의 발병률이 높았으나, 발생분포가 일정하지 않아 저항성의 차이를 비교하기는 어려웠고, 다른 병해들의 경우, 병 발생률이 낮아 포장에서 자연발병에 의한 저항성 정도를 비교하기는 곤란하였다.

본 실험결과는 포장을 달리하여 비교적 발생률이 높았던 2006년도와 2007년도의 병해 중 대표적인 해의 병 발생 정도를 중심으로 서술하고자 한다. 발생소장 조사가 가능하였던 잎집무늬마름병의 발병 정도는 2006년도에는 흑명나방 저항성벼와 대조품종인 낙동벼간에 전혀 차이가 없을 정도로 비슷한 발병율을 보였으며(Fig. 1), 2007년도에는 낙동벼에서 잎집무늬마름병의 발병주율이 약간

Fig. 1. Comparison of sheath blight occurrence between leafroller-resistant rice (*Cry1Ac1*) and Nakdong. The occurrence of the disease was surveyed in the isolated field for the experiment of genetically modified plants in Suwon, 2006.

Fig. 2. Comparison of Helminthosporium blight occurrence between leafroller-resistant rice (*Cry1Ac1*) and Nakdong. The occurrence of the disease was surveyed in Yesan, 2007.

높은 경향을 보였으나, 두 품종간의 유의성은 찾아볼 수 없었다(data not shown). 포장에서 비교적 발병율이 높았던 깨씨무늬병의 발생정도도 두 품종간에 비슷한 경향을 보였다(Fig. 2).

유묘 저항성 차이. 벼 흰잎마름병균의 레이스에 따른 저항성 차이를 비교하기 위하여 벼 흰잎마름병 K1, K2 및 K3레이스를 벼의 유묘기와 출수기전에 접종하여 조사한 결과 각각의 레이스에 감수성을 보였으며, 흑명나방저항성 벼와 대조품종인 낙동벼 간에도 큰 차이가 없었다(Fig. 3).

또한, 도열병균의 접종에 따른 저항성 차이를 비교하기 위하여 일본형벼 침해 레이스(KJ101, KJ105, KJ107, KJ201, KJ301, KJ401)와 인도형벼 침해 레이스(KI1113, KI1117, KI207, KI409)를 혼합하여 유묘기에 접종하여 저항성 정도를 비교한 결과 두 품종 모두 감수성을 보여 저항성 정도의 차이가 없었다(data not shown).

유전자 전이. 현재 우리나라에서 쌀을 제외하고는 자급률이 옥수수과 밀은 1% 미만, 콩은 약 11% 정도에 불과한 실정으로 이들 3대 곡물 대부분을 수입에 의존하고 있으며, 그 수량은 국내 전체 곡물 수입량의 95% 이상을 차지하고 있다. 식량의 자급률을 높이기 위하여 이모작 등의 많은 노력이 경주되어 왔으나 그 성과는 제한적이었다. 이러한 문제의 해결책으로 형질전환작물의 재배가 제시되고 있지만, 유전자 변형작물의 광범위한 재배로 환경에 대한 안전성의 한 측면에서 우려되는 것은 저항성 유전자와 마커로 사용한 유전자가 환경에 누출되어 다른 생물체로 전이될 가능성이 있다는 것이다. 최근 *nptII* 유전자를 가진 형질전환 식물체의 DNA로 *Acinetobacter* sp. BD413를 형질전환 시킨 예가 보고된 바가 있으나(Gebhard and Smalla, 1998), 일반적인 자연 환경조건에서 식물체로부터 세균으로의 유전자 전이와 어느 정도 연관성이 있

Fig. 3. Resistance to the races of bacterial leaf blight caused by *X. o. pv. oryzae*. Each plant was inoculated by scissor clip inoculation method. A pair of scissors was dipped into bacterial suspension of each race (ca. 1×10^7 cfu/ml) and leaf tips were cut 3 cm below the tip. The inoculated plant was stored in the greenhouse and the picture was taken 2 weeks after inoculation.

을지는 확실하지 않다. 한편 식물체의 DNA는 부식된 식물잔해에서 토양으로 방출될 수 있는 우려가 있고(Widmer, 1997), 토양입자에 도입된 DNA는 어느 정도 nuclease의 분해로부터 보호되어(Lorenz와 Wackernagel, 1994; Khanna와 Stotzky, 1992), 농경지에는 지속적으로 형질전환 식물체로부터 DNA가 농축될 가능성이 있다. 일반적인 토양 조건에서 자연 형질전환의 선결조건은 생태계에 존재하는 자유 DNA(free DNA)의 이용 가능성, 형질전환 능력의 획득과 획득한 DNA가 세균 계층으로 안전하게 도입되는 것으로, 이러한 DNA와 형질전환 능력이 있는 세균을 이용하여 형질전환 식물체의 DNA를 세균에 도입시키려는 많은 시도가 있었으나 아직까지 성공된 사례는 없다(Nielsen 등, 1997; Broer 등, 1996).

본 실험에서는 흑명나방저항성벼에서 병원균으로 유전

자가 전이되는지를 알아보기 위하여 포장에서 발병한 도열병균과 키다리병균을 분리하여 DNA를 분리한 후 PCR을 통해 내충성유전자(*CryIAcI*) 및 제초제저항성 유전자(*Bar*)의 전이여부를 조사하였다. 조사결과 각각의 저항성 유전자는 병원균으로 전이되지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 4). 한편, 키다리병균의 DNA를 이용하여 제초제 저항성 유전자의 전이여부 조사시 비특이적인 PCR 밴드가 형성되었는데, 이는 저항성 유전자와는 관련이 없었다.

식물의 유전자가 세균으로 전이되었다는 것이 현재까지 실험적으로 증명된 적은 없을 지라도, 그 가능성을 부인할 수는 없다. 본 실험에서는 포장에서 자연 발병한 병원균 이외에 벼의 대표적인 병해인 도열병균과 흰잎마름병균이 여러세대를 거쳐 흑명나방저항성벼와 계속적으로 접촉하였을 때 저항성 유전자가 전이되는지의 여부를

Fig. 4. PCR products for the detection of the transfer of *CryIAcI* (left panel) and *Bar* (right panel) gene from leafhopper-resistant rice plant to plant pathogens. The fungus *F. moniliforme* (upper row) and *P. grisea* (lower row) was isolated from naturally infected rice plants in the field. The PCR was performed using the primers specific for *CryIAcI* and *Bar* gene. M; DNA size marker, Con; positive control.

Fig. 5. PCR products for the detection of the transfer of *CryIAcI* (left) and *Bar* (right) gene from leafhopper-resistant rice plant to plant pathogens. The *R. solani* (upper row) and *X. o. pv. oryzae* (lower row) was inoculated and re-isolated consecutively at 15 day interval from each rice plant. M; DNA size marker, Con; positive control.

확인하기 위하여 흰잎마름병원균과 잎집무늬마름병원균을 15 일 간격으로 접종과 분리를 계속하였다. 이렇게 5~6회 동안 접종과 분리를 계속한 병원균으로부터 DNA를 분리하여 내충성유전자(Cry1Ac1) 및 제초제저항성 유전자 (Bar)가 병원균으로 전이되었는지를 조사한 결과 두 유전자는 전이되지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 5). 최근에 세균간 또는 세균에서 효모로의 유전자 전이에 대한 보고가 있었으나, 식물체내의 유전자가 세균으로 전이된 예는 현재까지 실험적으로 증명된 적이 없다(Broer 등, 1996). 본 실험에서도 저항성유전자나 제초제저항성 유전자가 자연 상태 또는 계속적인 접촉에 의해서 병원균으로 전이되지는 않은 것으로 확인되었다.

세균의 항생제 저항성 유전자는 형질전환 식물체의 선발 마커로 자주 이용되고 있다. 세균 유전자의 식물체로의 도입은 상동성이 높은 유전자가 식물체에 존재함을 의미해 식물체로부터 세균으로의 유전자 전이 가능성을 높게 할 수도 있어, 이러한 저항성 유전자를 유전자변형식물체의 육성에 사용하는 것에 논란의 여지가 많다. 최근까지 식물체로부터 세균으로의 유전자 전이가 일어났다는 실험적인 증거는 없으나, 자연적 형질전환(natural transformation), 즉 세균이 능동적으로 생태계에 존재하는 자유 유전자(free DNA)를 받아 드릴 수 있는 능력은 식물 DNA가 세균으로 전이되는 방식중의 하나로서, 현재 토양 또는 수생 세균 중 약 40종이 자연적 형질전환 능력이 있는 것으로 보고되어 있다(Lorenz와 Wackernagel, 1994). 또한, 미시 생태계에서는 토양 입자 내에 흡착된 세균 DNA가 형질전환능력이 있는 세균에 도입될 가능성이 있고, 토양에서 계속해서 존재할 가능성도 있다(Nielsen 등, 1997; Lorenz와 Wackernagel, 1994; Khanna와 Stotzky 1992). 이와 같은 점을 고려할 때 본 실험의 결과는 저항성 유전자의 병원성 미생물로의 전이에 대한 우려를 덜어주는 결과가 될 수도 있을 것이나, 이에 대한 지속적인 관찰과 조사는 계속적으로 필요할 것이다.

요 약

유전자 변형 흑명나방 저항성벼의 주요 병해에 대한 저항성 변화를 온실과 포장에서 모본으로 사용된 낙동벼와 비교하였다. 포장에서 벼잎집무늬마름병과 벼깨씨무늬병의 발병 정도는 큰 차이가 없었다. 온실에서 인위적으로 병원균을 접종하여 벼도열병과 흰잎마름병에 대해 저항성 변화여부를 조사한 결과에서도 두 품종간에 큰 차이를 보이지 않았고, 인위접종한 벼잎집무늬마름병에 대한 감수성도 두 품종간에 비슷하여 포장에서의 결과와 같은

경향을 보였다. 형질전환 벼의 제초제 저항성 유전자(Bar 유전자)와 흑명나방 저항성유전자(Cry1Ac1 유전자)가 병원균으로 전이되는가의 여부를 조사하기 위하여 포장에서 발병한 도열병과 키다리병원균을 분리한 후 DNA를 추출하여 PCR을 실시한 결과 두 유전자 모두 병원균으로 전이되지 않은 것으로 확인되었다. 또한, 병원균과 저항성벼의 지속적인 접촉에 의한 유전자 전이 가능성을 확인하기 위하여 잎집무늬마름병원균과 흰잎마름병원균을 계대접종한 후 DNA를 분리하여 조사한 결과에서도 저항성 유전자의 전이는 일어나지 않은 것으로 확인되어, 본 실험에서는 자연상태와 인위적인 조건 모두에서 유전자 전이를 찾아 볼 수 없었다.

참고문헌

- Broer, I., Droge-Laser, W. and Gerke, M. 1996. Examination of the putative horizontal gene transfer from transgenic plants to agrobacteria. In: Transgenic Organisms and Biosafety (Schmidt, E.R. and Hankeln, T., Eds.), pp. 67-70. Springer Verlag, Berlin.
- Courvalin, P. 1995. Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie.* 318: 1207-1212.
- Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264: 375-382.
- Doolittle, R. F., Feng, D. F., Anderson, K. L. and Alberro, M. R. 1990. A naturally occurring horizontal gene transfer from a eukaryote to a prokaryote. *J. Mol. Evol.* 31: 383-388.
- Gebhard, F. and Smalla, K. 1998. Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1550-1554.
- Heinemann, J. A. and Sprague, G. F. 1989. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* 340: 205-209.
- Hooykaas, P. J. J. 1989. Transformation of plant cells via *Agrobacterium*. *Plant Mol. Biol.* 13: 327-336.
- Khanna, M. and Stotzky, G. 1992. Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1930-1939.
- Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58: 563-602.
- Mazodier, P., Petter, R. and Thompson, C. 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585.
- Nielsen, K. M., Gebhard, F., Smalla K., Bones, A. M. and Van Elsas, J. D. 1997. Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. *Theor. Appl. Genet.* 95:

- 815-821.
- Nielsen, K. M., van Weerelt, D. M., Berg, T. N., Bones, A. M., Hagler, A. N. and van Elsas, J. D. 1997. Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1945-1952.
- Smalla, K., Wellington, E. M. H. and van Elsas, J. D. 1997. Natural background of bacterial antibiotic resistance genes in the environment. In: Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, pp. 43-57. Norwegian Biotechnology Advisory Board, Oslo.
- Smith, M. W., Feng, D.-F. and Doolittle, R. F. 1992. Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfers. *Trends Biochem. Sci.* 17: 489-493.
- Smith, J. M., Dowson, C. G. and Spratt, B. G. 1991. Localized sex in bacteria. *Nature* 349: 29-31.
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C. and Courvalin, P. 1987. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 48: 289-294.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Donegan, K. K. and Reed, G. L. 1997. Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field. *Mol. Ecol.* 6: 1-7.
- Ye, G. Y., Yao, H. W., Shu, Q. Y., Cheng, X., Hu, C., Xia, Y. W., Gao, M. W. and Altosaar, I. 2003. High levels of stable resistance in transgenic rice with a cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) under field conditions. *Crop protection* 22: 171-178.