

화학농약 대체용 dsRNA 농약 개발 및 산업화를 위한 정책 연구

Policy Research for Industrialization of dsRNA Pesticide
to Replace Chemical Pesticide



화학농약 대체용 dsRNA 농약 개발 및 산업화를 위한 정책 연구

Policy Research for Industrialization of dsRNA Pesticide
to Replace Chemical Pesticide



연구위원장

김용균 한국과학기술한림원 정회원, 안동대학교 교수

연구위원

나영은 농촌진흥청 농자재산업과 과장

이승환 한국과학기술한림원 정회원, 서울대학교 교수

요약문

Summary

진핵세포에서 일어나는 유전자 발현 조절 과정 가운데 하나로서 RNA 간섭 현상이 밝혀졌다. 이 과정은 RNA 사이의 염기서열 상보성에 기반하여 특이적으로 대상 유전자의 발현을 억제하는 데 특징을 갖는다. 이러한 선택적 억제 기작을 응용하여 병해충 및 잡초만을 대상으로 발생을 억제하는 것이 dsRNA 농약의 핵심 원리이다. 2023년 12월 22일 미국 환경청에서는 최초로 살포용 dsRNA 살충제를 등록시켰다. 이를 시초로 다양한 dsRNA 농약이 추가로 등록을 기다리게 되었다. 국내에서도 세계적 수준의 생명공학 기술을 바탕으로 현재 사용하는 화학 농약을 대체할 새로운 수단으로서 dsRNA 농약을 개발하려고 있어 농업 분야의 주력 산업으로 성장시킬 필요가 있게 되었다. 그러나 이를 구현하기 위해서는 해결되어야 할 난제들이 있다. 첫째로, 유럽연합과 우리나라는 형질전환 작물체를 재배할 수 없기에 dsRNA를 발현하는 GM 작물 육종보다는 살포용 dsRNA를 개발하여야 한다. 이때 dsRNA의 환경 중 화학적 안정성이 문제가 되고 있다. 이를 해결하기 위한 보다 효율적인 나노제제화 기술 개발이 더욱 필요하다. 둘째로 높은 RNA 간섭 효과를 주는 대상 병해충 및 잡초를 선별하고, 더불어 표적 유전자 탐색 기술이 필요하다. 급속도로 발전하는 염기서열 분석 기술로 대상 해충의 전체 발현유전체의 정보가 가능하다. 대상 병해충의 전체 발현체를 대상으로 대량 스크리닝을 통해 방제효과가 높은 dsRNA를 탐색하게 하는 시스템이 필요하다. 셋째로 dsRNA 대량 생산 단가를 낮추는 산업화 기술 개발이 필요하다. 이러한 기술적 목표를 해결하고 제반 행정 지원을 이루기 위해 해결되어야 할 연구과제 및 정부 차원의 등록제도 마련에 대한 체계적 접근을 다음과 같이 제시한다.



화학농약 대체용 dsRNA 농약 개발 및 산업화를 위한 정책 연구

Policy Research for Industrialization of dsRNA Pesticide to Replace Chemical Pesticide

1. 연구 지원 정책

- (1) dsRNA를 활용한 생물농약 개발 및 대량 스크리닝 기술 개발
- (2) Cell-free dsRNA 대량생산 산업화 기술 개발
- (3) dsRNA 농약 제형화 및 위해성 평가 기술 개발

2. 산업화를 위한 법제화 지원 정책

- (1) dsRNA 신규 등록을 위한 농약관리법 개정
- (2) dsRNA 시험 전용 비임상수탁기관(CRO) 및 벤처기업 협회 육성
- (3) dsRNA 농약 개발 및 등록 관련 국제화 교류 사업

목 차

Contents

I 서론	11
II. 정책 배경	15
01 작물 피해 및 농약 산업	16
02 dsRNA 농약 원리	23
03 dsRNA 농약 안전성	33
04 차세대 신규 dsRNA 농약의 산업 전망	37
III. 정책 제언	39
01 국내 dsRNA 농약 개발을 위한 R&D	40
02 차세대 dsRNA 농약의 신규 법제화 및 산업화 촉진	58
참고문헌	73



화학농약 대체용 dsRNA 농약 개발 및 산업화를 위한 정책 연구

Policy Research for Industrialization of dsRNA Pesticide to Replace Chemical Pesticide

표목차

〈표 2.1〉 살균제 출하량 기준 주요 식물병	17
〈표 2.2〉 밭에 발생한 주요 잡초(이 등, 2015)	18
〈표 2.3〉 주요 작물 병해충/잡초에 대한 연구개발 투자 현황	19
〈표 2.4〉 국내 농약 제조 및 수입 품목 현황	20
〈표 2.5〉 국내 농약관리법 변천	22
〈표 3.1〉 dsRNA 농약 개발 관련 기술선진국과 한국의 R&D 기술 격차	40
〈표 3.2〉 국내 농작물 및 산림의 주요 병해충/잡초	42
〈표 3.3〉 dsRNA 농약 개발 대상 해충 및 표적 유전자	42
〈표 3.4〉 dsRNA 농약 개발 대상 식물병 및 표적 유전자	46
〈표 3.5〉 dsRNA 농약 개발 대상 잡초 및 표적 유전자	48
〈표 3.6〉 소나무재선충 방제에 대한 기초 연구 자료	56
〈표 3.7〉 꿀벌 질환 병원체 방제에 대한 기초 연구 자료	57
〈표 3.8〉 국내 농약 원제 등록 현황	72
〈표 3.9〉 국내 기술로 개발된 신물질 농약(원제) 현황	72

목 차

Contents

그림목차

〈그림 2.1〉 동물 및 식물 유입생물 종 수	16
〈그림 2.2〉 시대별 작물보호 기술 변화	23
〈그림 2.3〉 RNA 간섭 세포 내 과정	24
〈그림 2.4〉 세 종류의 dsRNA 제조 기술	27
〈그림 2.5〉 살포 dsRNA의 천적에 대한 노출 경로와 위해성	34
〈그림 3.1〉 dsRNA 농약 등록 절차 및 사용 영역	41
〈그림 3.2〉 국내 dsRNA 농약 개발 단계	48
〈그림 3.3〉 IVT 방식의 바이오반응기 단계	49
〈그림 3.4〉 Cell-free dsRNA 대량생산 기술 단계	50
〈그림 3.5〉 dsRNA 키토산 제형화 기술	51
〈그림 3.6〉 Layered-double hydroxide 개념의 dsRNA 제형화 기술	52
〈그림 3.7〉 개발 단계별 dsRNA 제형화 기술 R&D 전략	52
〈그림 3.8〉 dsRNA 위해성 평가 기술 영역	53
〈그림 3.9〉 총채벌레 방제용 dsRNA 살충제 개발 R&D 추진 전략	55
〈그림 3.10〉 소나무재선충 방제용 dsRNA 농약 개발을 위한 R&D 추진 전략	56
〈그림 3.11〉 꿀벌에 처리된 dsRNA가 바로아응애로의 중간 수평 이동	58
〈그림 3.12〉 미국 EPA에 의한 농약 분류체계	59
〈그림 3.13〉 국내 농약관리법에 의한 농약 분류체계	61
〈그림 3.14〉 미국 품목 등록증 일부 발췌	70
〈그림 3.15〉 바이오벤처 활성화를 위한 민관협력 모델	71





화학농약 대체용 dsRNA 농약 개발 및 산업화를 위한 정책 연구

Policy Research for Industrialization of dsRNA Pesticide to Replace Chemical Pesticide

I 서론

I 서론

국내외 작물보호제 개발이 지속적으로 이뤄져 왔다. 화학농약 기반의 병해충/잡초 관리 기술은 대상 생명체의 저항성 발달과 인축 및 생태계 피해, 그리고 개발 비용과 시간의 증가로 대체 방제제 개발을 요구하였다. 일환으로 dsRNA 농약이 최근 미국을 중심으로 대두되었다. 비교적 잘 알려진 RNA 간섭 원리를 병해충/잡초 관리에 적용하려는 전략으로 개발된 dsRNA 농약은 이제 화학농약의 대체 수단으로 알려지기 시작하였다. 이에 과학기술을 기반으로 향후 국내 작물보호산업을 선도할 dsRNA 농약에 대한 정책연구는 시기적으로 필요하다고 본다.

본 정책과제에서 기본적으로 지향하는 바를 크게 두 가지로 본다. 첫째는 생물농약의 일환으로 기존의 화학농약을 대체할 수단으로서 dsRNA 농약 개발이 필요하다는 것이다. 둘째는 기존 화학농약이 방제하기 어려운 작물 및 양봉 산업에서의 바이러스 피해에 대한 효과적 방제 수단으로서 dsRNA 농약 개발의 필요성이다.

또한 본 정책 과제는 dsRNA 농약의 개발 방향에서 국내의 여건을 고려한 정책 제안의 방향 한계성을 두려 한다. 현재 dsRNA 농약이 적용되는 처리 기술은 크게 dsRNA 발현 GM 작물 품종 육성 기술과 살포용 dsRNA 처리 기술로 대별된다. 많은 EU 국가들과 더불어 우리나라에서는 GM 작물 재배가 제한되기에 본 정책 연구에서는 후자인 살포용 dsRNA 처리기술을 국내에서 개발하고 등록하는 방향으로 본 정책과제의 방향을 두려 한다.

끝으로, 제안된 정책을 통해 국내 작물보호시장에서 구현될 dsRNA 농약 처리는 단계적 방식으로 농산업 시장에 진출하도록 권장하려 한다. 즉, 스마트팜 중심의 dsRNA 처리 범위 한계에서 시설재배지로 확대하고, 궁극적으로 노지로 처리하는 단계별 처리 제한을 두고 안전한 dsRNA 농약 산업을 안착시키려 한다.

본 정책 보고서는 dsRNA를 이용한 새로운 작물보호기술의 원리 및 개발 과정을 정리하고 새로운 작물보호 기술로서 dsRNA 농약에 대한 국내외 기술 개발 현황 및 산업화 동향을 정리한다. 또한 미국의 EPA 기반의 dsRNA 살충제 등록화 과정을 살펴보면서 국내 dsRNA 농약의 등록 규정에 대한 방향을 제시하려 한다. 끝으로 이 기술을 농산업에 적용하기 위해 해결해야 할 연구과제들을 나열하면서 dsRNA 농약 개발에 대한 산업화 정책 방향을 제시한다.





화학농약 대체용 dsRNA 농약 개발 및 산업화를 위한 정책 연구

Policy Research for Industrialization of dsRNA Pesticide to Replace Chemical Pesticide

II 정책 배경

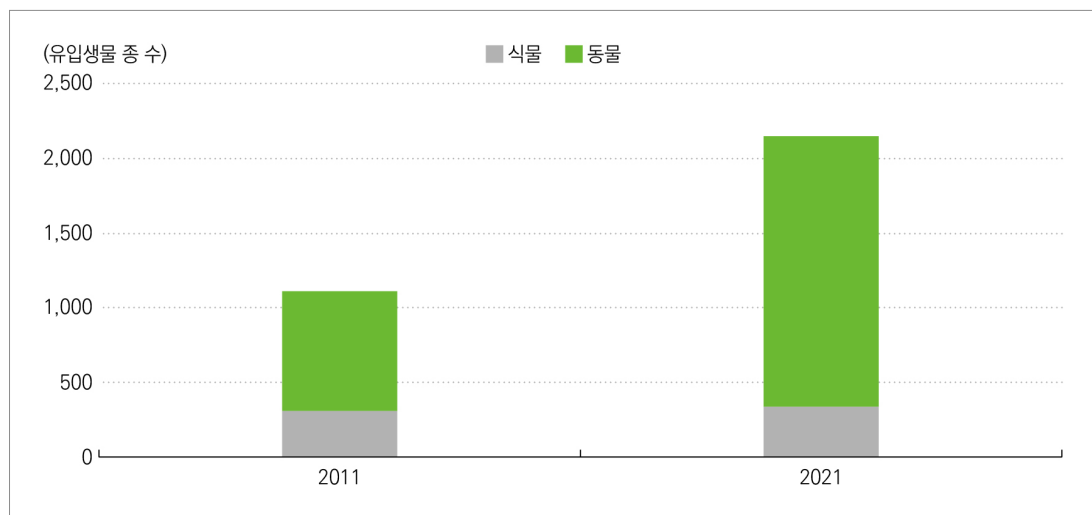
II 정책 배경

01 작물 피해 및 농약 산업

가. 병해충 및 잡초 발생 변화

불과 수십 년 내에 인구가 90억 명에 이를 것으로 추산되기에 세계 인구 증가와 더불어 식량 수요는 절대적이다. 그러나 매년 작물 수확량이 병해충으로 20~40%가 감소된다(Deutsch et al., 2018). 특히 전 세계적 기후변화는 작물의 생육 저해는 물론이고 병해충 발생에 지대한 영향을 주었다. 예를 들어, 기온이 섭씨 1도 상승하면 해충들에 의해 쌀, 옥수수, 밀의 전체 손실이 10~25% 증가할 수 있으며, 섭씨 2도 상승하면 약 2억 1,300만 톤의 농산물 손실이 발생한다(Bebber, 2015; Deutsch et al., 2018).

〈그림 2.1〉 동물 및 식물 유입생물 종 수



자료: Son et al.(2021). "Current Status of Alert Alien Species Management for the Establishment of Proactive Management Systems in Korea", Journal of Ecology and Environment, Vol.45, 1-18.

기후변화와 국제교역량 증대로 외래 생물의 침입사례가 증가하고 있다. 우리나라에 유입된 외래생물은 2011년 기준으로 총 1,109종(동물 800종, 식물 309종)으로 기록되었으나, 불과 10년이 지난 2021년에는 총 2,149종(동물 1,812종, 식물 337종)으로 약 두 배가량 급속하게 증가하였다(Son et al., 2021). 침입한 생물종은 잠복기를 가지고 있다가 번식에 유리한 환경 조건이 형성되면 본격적으로 팽창 및 확산이 시작된다. 이후 일정한 생태계 지위를 획득하면서 안정화되고 궁극적으로 귀화종으로 분류되기도 한다(Ruiz & Carlton, 2003). 이러한 외래 생물종은 토착 생물과의 경쟁, 먹이사슬 교란, 물질순환과 같은 물리 화학적 특성을 변화시켜 생물다양성을 해치는 것으로 알려지고 있다(Lee et al., 2013).

식물의 성장에 지장을 주는 병, 해충, 잡초 등 생물적 인자들을 방제하기 위해 수많은 방법이 개발되었음에도, 이들에 의한 작물의 생산량 감소는 세계적으로 점점 증가하고 있다. 농작물의 경우, 과일 23.4%, 곡류 34.5%, 사탕수수의 경우 55%의 손실이 병해충에 따른 피해로 파악되고 있으며, 미국의 경우 매년 91억 달러가 식물병에 의해, 77억 달러가 해충에 의해, 그리고 62억 달러가 잡초에 의해 손실을 보고 있다(Agrios, 2005).

나. 농약 시장 규모

농작물에 대한 병해충 및 잡초를 방제하기 위한 수단으로 화학농약에 주로 의존한다. 따라서 화학 시장 규모를 살펴보면 국내 농약 시장 규모 및 주요 병해충을 이해할 수 있다. 살균제 출하량을 기준으로 전체 시장 규모는 5,022.2억 원이며, 각 살균제 시장은 탄저병이 905.4억 원으로 가장 크고, 그 다음으로는 벼도열병이 700.0억 원 수준이다(<표 2.1>). 3위는 역병과 노균병, 4위는 벼 잎집무늬마름병, 5위는 겉무늬썩음병, 6위는 잣빛곰팡이병, 7위는 세균병, 그리고 8위는 흰가루병 순으로 나타났다.

<표 2.1> 살균제 출하량 기준 주요 식물병

순위	식물병	시장(억 원)
1	탄저병	905.4
2	벼도열병	700.0
3	역병과 노균병	428.8
4	잎집무늬마름병	337.6
5	겉무늬썩음병	265.7
6	잣빛곰팡이병	241.9
7	세균병(과수 화상병)	211.6
8	흰가루병	147.5

자료: 농업과학원(2020). 식물병해충 R&D 중장기 종합계획(안), 농촌진흥청.

해충은 수도재배지의 경우 벼멸구를 중심으로 매멸구, 흰등멸구, 애멸구, 끝동매미충 등 흡즙성 해충들이 주요 해충이다. 여기에 1980년대 후반 국내 침입이 확인된 벼물바구미와 1990년대부터 벼에 반점미를 유발하는 흑다리긴노린재, 가시점등글노린재, 미디표주박긴노린재 및 먹노린재의 피해가 가중되고 있다. 전작물의 경우 1980년대에 들어서면서 동남아 등 따뜻한 지역에서만 주로 발생하던 남방계 해충인 배추좀나방, 파밤나방, 담배거세미나방 등이, 최근에는 열대거세미나방까지 유입되어 해충으로 인한 피해가 우려된다. 시설재배지의 해충은 진딧물, 온실가루이, 총채벌레, 잎굴파리, 잎응애 등 미소곤충이 주를 이룬다.

잡초의 경우 논에서는 피(강피+물피)가 가장 문제가 되며, 다음은 물달개비 > 올방개 > 올챙이고랭이 > 벼풀 등의 순이다. 전작물에서 냉이가 가장 문제가 되며, 다음으로 독새풀 > 속속이풀 > 좀명아주 > 망초 등의 순이다. 여름작물에는 바랭이의 피해가 가장 높고, 쇠비름 > 깨풀 > 흰명아주 > 돌피 등의 순이다(〈표 2.2〉).

〈표 2.2〉 밭에 발생한 주요 잡초(이 등, 2015)

순위	겨울작물		여름작물		외래잡초	
	잡초명	중요도 ¹	잡초명	중요도	잡초명	중요도
1	냉이	6.5	바랭이	8.0	흰명아주	3.93
2	독새풀	5.5	쇠비름	7.8	개비름	2.27
3	속속이풀	3.5	깨풀	5.0	망초	2.02
4	좀명아주	3.4	흰명아주	4.6	좀명아주	1.82
5	망초	3.4	돌피	4.1	미국가막사리	1.50
6	벼룩나물	3.3	속속이풀	3.8	털별꽃아재비	1.14
7	황새냉이	3.1	중대가리풀	3.5	개망초	1.02
8	새포아풀	2.7	한련초	3.4	개쑥갓	0.71
9	바랭이	2.6	참방동사니	3.1	유럽점나노나물	0.59
10	광대나물	2.5	개비름	2.8	서양민들레	0.59

주: 중요도 = 상대빈도(%) + 상대지피도(%) / 2

자료: 농업과학원(2020). 식물병해충 R&D 중장기 종합계획(안), 농촌진흥청.

국내에도 2000년도 이후 외래병해충의 유입이 급증하고 있는데, 지난 120년간 기록된 외래병해충 89종 중 34종(병원체 20종, 해충 14종)이 2000년 이후 유입한 것으로, 그 중 소나무재선충병은 물론 최근 침입한 열대거세미나방, 과수화상병 등의 확산 및 대발생 피해가 우려되고 있다. 국내에서 고위험군으로 사회, 경제적 중요성이 높은 것으로 병 8종, 해충 11종 등 23종에 많은 연구개발 투자를 하고 있는데, 소나무재선충(140억), 이동성 멸구류(37억), 과수화상병(31억), 담배가루이(31억) 순이다(〈표 2.3〉).

〈표 2.3〉 주요 작물 병해충/잡초에 대한 연구개발 투자 현황

(단위: 천만 원)

병해충	연도	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	계
○ 과수화상병		-	-	-	-	-	-	42	97	109	70	318
○ 자두곰보병		-	-	-	-	-	7	19	24	24	-	74
○ 오리엔탈과실파리		-	-	-	-	-	-	33	46	49	44	172
● 벼줄무늬잎마름병		20	7	28	40	37	17	15	16	16	-	196
● 토마토반점위조병		15	15	-	-	40	29	31	9	19	7	165
● 토마토황화잎말림병		18	23	9	7	9	7	9	9	9	-	100
● 사탕무씨스트선충		-	-	-	7	21	17	17	17	-	-	79
● 소나무재선충		82	74	54	38	37	27	299	272	262	260	1,405
● 이동성 멸구류(3종)		29	17	7	15	17	46	56	64	42	76	369
● 담배가루이		27	50	53	49	41	44	-	-	23	21	308
● 미국선녀벌레		-	6	7	15	8	9	4	27	45	49	170
● 갈색날개매미충		-	-	-	-	-	11	43	40	37	36	167
● 꽃노랑총채벌레		15	15	-	-	-	-	-	-	27	28	85
● 유럽좁쌀바구미		-	-	-	-	-	8	8	8	29	27	80
● 외래 잡초류(4종)		-	-	-	-	-	-	-	20	27	35	82
◇ 키다리병		-	-	28	40	45	23	-	-	-	-	136
◇ 복숭아씨살이좀벌		-	-	-	-	18	18	23	5	24	15	103
◇ 풀무치		-	-	-	-	-	22	38	38	-	-	98

주: ○ 침입 우려 병해충; ● 외래 또는 이동성 병해충; ◇ 돌발 병해충

자료: 농업과학원(2020). 식물병해충 R&D 중장기 종합계획(안), 농촌진흥청.

세계 농약 판매액은 ('00) 292억 달러 → ('10) 412억 달러 → ('15) 512억 달러 → ('19) 598억 달러로 증가하고 있다. 이 가운데 제초제 31.7%, 살충제 30.3%, 살균제 29.8%, 기타 8.2%를 차지한다. 원제 생산기술·특허를 보유한 다국적기업이 농약 시장을 주도하고 있으며, 주요 농약업체는 바이엘(독일), 신젠타(스위스), 바스프(독일), 몬산토(미국) 등이다. 우리나라의 원제 수입의존도는 ('90) 39% → ('00) 71% → ('10) 91.1% → ('20) 95% → ('22) 91%로 증가하고 있다.

국내 농약 시장 규모는 2022년 기준 약 1조 8천억 원 수준이다. 농약 출하량은 전년도 19,014톤보다 5% 증가한 19,882톤이며, 매출액은 18,323억 원으로 전년도 16,076억 원보다 13.9% 증가하였다. 용도별 출하량을 살펴보면 살균제 7,535톤(36.3%), 살충제 5,264톤(25.4%), 제초제 6,293톤(30.3%), 생조제 및 기타 1,654톤(8.0%)이다. 작물별 점유율은 수도용 3,077톤(15.5%, 살균 1,140톤, 살충 740톤, 제초 1,197톤), 원예용 15,250톤(76.7%, 살균 5,902톤, 살충 4,338톤, 제초 5,010톤), 생조제 및 기타 1,555톤(7.8%)이다.

농약 수출액은 25,442만 달러로 전년도 21,927만 달러보다 16.0% 증가했으며, 이 가운데 원제가 11,392만 달러 그리고 완제품이 14,050만 달러를 차지하였다(〈표 2.4〉). 농약 수입액은 70,639만 달러로 전년도 68,240만 달러보다 3.5% 증가했으며, 이 가운데 원제가 59,972만 달러 그리고 완제품이 10,667만 달러를 차지하였다.

〈표 2.4〉 국내 농약 제조 및 수입 품목 현황

구분		제조품목		수입품목		계	
		품목수	등록수	품목수	등록수	품목수	등록수
살균제	수도	123	240	12	18	135	258
	원예	467	843	117	228	584	1,071
	소계	590	1,083	129	246	719	1,329
살충제	수도	94	183	7	14	101	197
	원예	444	748	104	231	548	979
	소계	538	931	111	245	649	1,176
제초제	수도	423	483	14	18	437	501
	원예	142	287	43	97	185	384
	소계	565	770	57	115	622	885
생조제	수도	2	4	1	1	3	5
	원예	43	76	17	29	60	105
	소계	45	80	18	30	63	110
균충제	수도	83	86	1	1	84	87
	원예	21	23	4	4	25	27
	소계	104	109	5	5	109	114
충초제	수도	2	2	-	-	2	2
	소계	2	2	0	0	2	2
기타제	수도	3	8	-	-	3	8
	원예	3	8	6	8	9	16
	소계	6	16	6	8	12	24
총 계		1,850	2,991	326	649	2,176	3,640

자료: 농촌진흥청, 농촌진흥청 농자재 주요통계(2023).

다. 작물보호 기술 변화

농작물을 안정적으로 생산하기 위해서 해충 관리는 필수적이며, 합성 화합물을 이용한 방제 기술은 보편화되어 있다. 1940년대 유기염소계 DDT 살충제를 필두로 전개된 화합물살충제 개발은 유기인계, 카바메이트계 및 피레스로이드계 살충제로 이어졌다. 그러나 이러한 화합물에 대하여 다양성이 높은 해충은 저항성 집단을 출현시켜 효과적 방제에 어려움을 주었으며, 새로운 작용점을 갖는 네오니코티노이드계 및 다이아마이드계 등의 합성 살충제를 개발하는 배경이 되었다(Nauen, 2006; Bass et al., 2015). 이들은 모두 곤충의 신경계 작용을 억제하는 것으로 유사한 신경생리를 갖는 인축에게도 위협을 주는 독성물질로 작용하게 된다.

화학농약에 대한 규제 강화는 생물농약의 발전으로 방향을 전환시켰다. 유럽연합은 2009년 이후 이러한 규제를 강화하여 특히 식품의 화학농약 잔류 기준치를 지속적으로 낮추었다. 이는 주요 글로벌 농약 업계에 농작물 잔류성에 대한 경각심을 더욱 불러일으켜 이에 대해 비교적 자유로운 생물농약으로의 개발 방향 전환을 모색하게 하였다.

또 다른 주요 이슈는 화학농약의 독성에 관련된 인축의 안전성 문제였다. 2015년 국제보건기구(WHO) 산하 국제암연구기관(IARC: International Agency for Research on Cancer)에서 가장 많이 판매되는 제초제의 원제인 글리포스페이트(glyphosphate)와 2,4-D에 대해 각각 Group 2A와 Group 2B 단계의 위해성을 갖는 발암성 의심물질로 분류하였다. 이러한 위해성은 살충제에서도 나타나 유럽식품 안전청(EFSA: European Food Safety Authority)은 2013년 네오니코티노이드(neonicotinoid) 살충제가 꿀벌 폐사의 주원인으로 주목하고 안전성 논란을 일으켰다. 이에 유럽연합에서는 꿀벌이 네오니코티노이드에 노출되는 것을 피하기 위해 종자처리에만 네오니코티노이드의 사용을 국한시키거나 전면 사용을 금지시키는 추세이다.

화학농약의 새로운 원제를 개발하는 것이 어려운 이유 중 하나는 병해충이 빠른 저항성을 획득하기 때문이다. 2014년에 조사한 저항성 계통은 곤충 586종, 진균 235종, 잡초 252종으로 보고하였다. 이러한 저항성을 극복하기 위해 농민들은 더 많은 양의 약제를 살포하거나, 혼합제를 사용하였고, 이는 복합저항성을 유도하여 문제의 심각성을 가중시켰다. 여기에 증가된 약제 살포량은 다시 잔류 문제를 일으켜 화학농약 문제를 동시 다발적으로 나타나게 하였다. 이에 따라 국내 농약관리법도 농약 등록 규제에 방향이 안정적 생산(57)에서 우수한 약효(81) 그리고 인축 안전한 농약(97)으로 관리 방향의 변화가 있었다(〈표 2.5〉).

〈표 2.5〉 국내 농약관리법 변천

항목	'57~'80년	'81~'96년	'97년~현재
정책 목표	• 농약 규격, 품질검사, 제조·수출입 및 취급 방법을 정하여 농업생산의 증가를 도모 - 농약의 안정적 공급	• 농약의 품질향상, 적정 사용을 도모하기 위하여 제조·수입·판매 사용에 관한 사항 규정 - 효과 우수 농약 정부 주도 개발	• 농약의 품질향상, 유통질서 확립, 농약 안전사용, 농업생산과 생활환경보전 기여 - 환경 친화적이고 안전한 농약 공급
주요 제도	• 농약의 수급 관리 • 영업 및 품목 허가제 • 공장 출하 전 검사제	• 농약 수급조절 및 관리기금 운영 • 영업 허가 및 품목 고시제 • 출하 전 자체검사제 및 유통검사제	• 긴급방제용 농약 수급조절 • 영업 및 품목 등록제(농촌진흥청) • 출하 전 자체검사제 및 유통검사제
주요 사업	• 수급계획 수립 시행(농수산부) • 제조/수입업 허가(농수산부) • 판매업·방제업 등록(관할 시도) - 신고제('57) → 소·도매 등록('78) • 공정규격 설정 및 허가 (농수산부) • 농약 시험성적 검토(자재검사소) • 농약 출하 전 검사(자재검사소)	• 긴급방제용 농약 수급 조절 (농수산부) • 제조/수입업 허가(농수산부) • 판매업·방제업(관할 시도) • 농약품목 고시제(농수산부) • 농약 시험성적 검토(농촌진흥청) • 유통농약 직권검사(자재검사소) * 출하 전 검사 폐지 → 자체검사제 도입	• 긴급방제용 농약 수급 조절 (농식품부) • 제조/수입업 등록(농촌진흥청) • 판매업: 시도 → 시군('03) • 수출입식물 방제업 (농림수산검역검사본부) • 농약품목 등록제(농촌진흥청) • 농약 시험성적 검토·평가(농과원) • 유통농약 직권검사(농관원)
주요 기술	• 고전적 주성분 위주의 제형 개발 • 농약 효과가 우수한 농약 개발	• 독성 및 잔류성이 적은 안전한 농약 개발 • 친환경, 생력화 제형 농약 개발	• 환경친화적 생물농약 개발 • 저투입 고효율성 농약 개발
주요 농약	• DDT, Parathion, Malathion 등 *등록농약 : 33('57) → 122('71)	• 아바멕틴, Acrinathrin 등 *등록농약 : 230('81) → 727('96)	• 에마멕틴, 비티제 등 *등록농약 : 734('97) → 2,142('22)

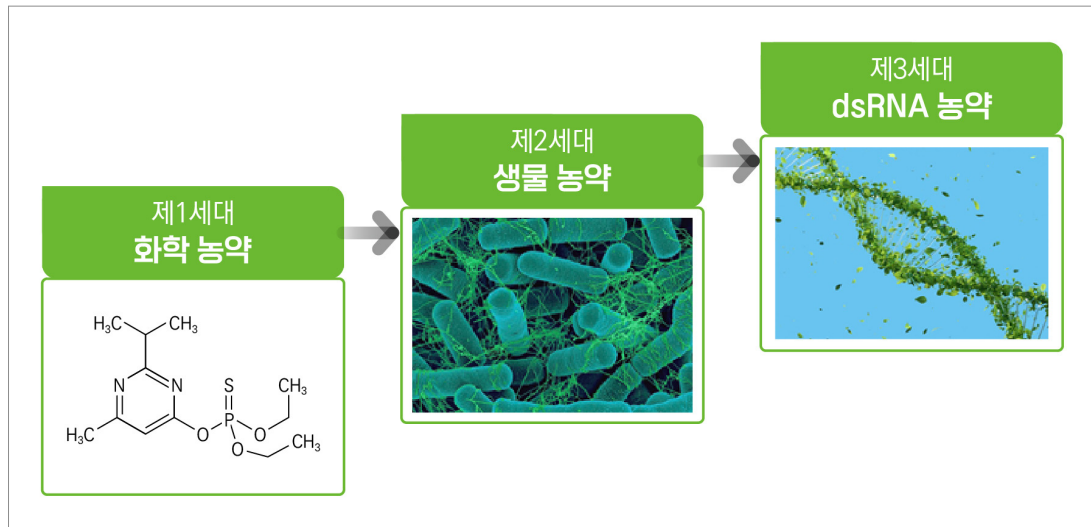
자료: 농촌진흥청.

새로운 화학농약 원제를 개발하기 위해서 이상의 화학농약의 문제점을 극복하기에는 개발의 비용 및 시간에서 현실성을 찾기 어려웠다. 초창기 화학농약 개발은 새로운 원제 개발을 위해 대량 스크리닝 기반으로 유용물질을 찾았다. 그러나 이러한 방식으로 새로운 원제를 찾을 수 있는 확률이 점점 낮아져 현재는 2십만 분의 1 이하로 떨어져 이를 수행하기 위한 생물검정 비용과 시간은 기하급수적으로 증가하였다. 따라서 화학농약 개발 비용이 제품당 2억8천만 달러 이상이 소요되었다(Park et al., 2019). 반면에 생물농약 개발비용은 이보다 훨씬 낮은 천오백만 달러에서 오천만 달러로 5배 이상 저렴하다.

화학농약의 단점을 보완하기 위한 노력의 일환으로 곤충성장조절제 및 생물농약 개발에 연구력이 집중되었다. 곤충의 탈피와 변태를 교란하는 곤충성장조절제는 높은 선택성으로 친환경 해충군 관리 기술로 주목을 받아왔으나, 본질적으로 합성화학물을 자연계에 살포한다는 점에서 더욱 안전한 생물농약으로 개발 관심이 옮겨졌다. 생물농약의 종류를 살펴보면 미생물농약, 생화학농약, 천적 그리고 유용유전자를 이용한 농자재를 포함하고 있다(Kim, 2014). 최근 double-stranded RNA (dsRNA)를 이용한 해충 방제는 살충의 목적으로 표적 해충에 특정 유전자를 이용한다는 점에서 넓은 의미에서 생물농약의 범주에 속할 수 있다.

과학적 기반을 통해 폭넓게 진행된 dsRNA 살충제 탐색은 2014년 dsRNA 발현 GM 작물 개발 및 이를 이용한 Monsanto 기업체 기반으로 산업화가 이룩되었다. 나아가 2023년 12월 살포용 dsRNA 살충제가 감자벌레를 방제할 목적으로 미국의 GreenLight Biosciences inc.에서 개발되었고, 비교적 빠른 소요 시간을 통해 미국 EPA 등록되었다. 향후 살충제는 물론이고, 살균제 및 제초제로 살포용 dsRNA 농약이 개발될 전망으로 전 세계 작물보호 시장의 일대 전환을 예고하고 있다(〈그림 2.2〉).

〈그림 2.2〉 시대별 작물보호 기술 변화



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

02 dsRNA 농약 원리

dsRNA를 농약으로 개발하는 것의 원리는 RNA 간섭(RNA interference: RNAi)에서 찾을 수 있다. RNAi는 1990년 초 보라색 페튜니아(*petunia*) 꽃을 육종하는 과정에서 발견한 전사후 유전자 발현억제(post-transcriptional gene silencing) 현상에서 기원한다. 이러한 전사후 유전자 발현억제의 원인물질이 dsRNA라는 것을 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에서 발견하게 되었다. 이후 초파리 및 다양한 생명체에서 dsRNA가 전사후 유전자발현 조절에 관여하는 것을 밝히게 되었다.

가. dsRNA 간섭 원리

1) RNAi 종류

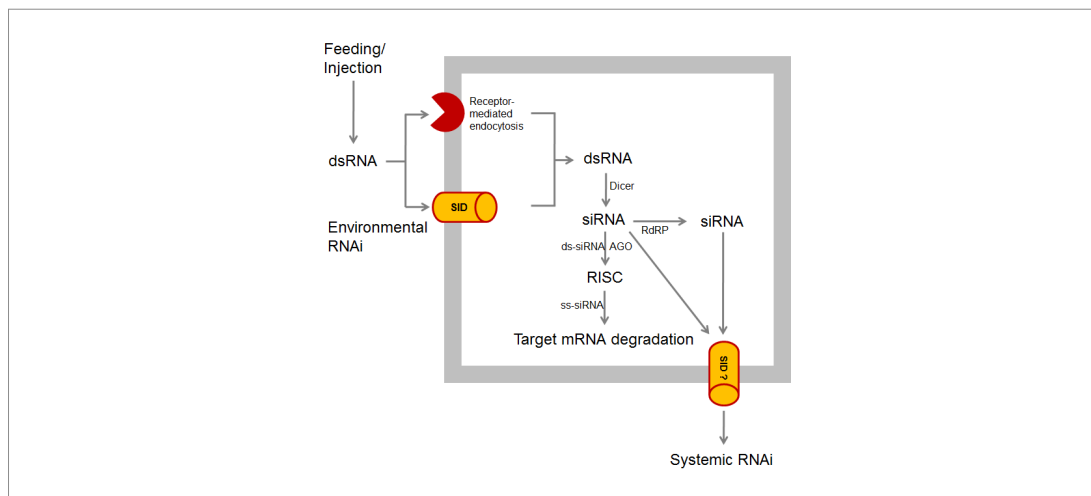
RNAi는 세포 자율적(cell-autonomous) RNAi와 세포 비자율적(non-cell-autonomous) RNAi로 나뉘게 된다(Whangbo & Hunter, 2008). 세포 자율적 RNAi는 세포 스스로 형성한 dsRNA 또는 외부로부터 주입된 dsRNA에 의해 자체 세포 내에서만 RNAi 과정이 국한될 경우이다. 반면에 세포 비자율적 RNAi는 dsRNA를 합성하지 않는 세포에서 RNAi 반응이 일어나는 경우이다. 이러한 세포 비자율적 RNAi는 다시 환경(environmental) RNAi와 전신(systemic) RNAi를 포함하게 된다.

환경 RNAi는 특정 세포가 주변으로부터 dsRNA를 획득하여 RNAi 반응을 일으키는 경우이다. 전신 RNAi는 dsRNA를 이웃하는 세포 또는 원거리 세포로 전달하는 경우이다. 따라서 다세포동물의 경우 전신 RNAi가 가능하면, 표적세포 이외의 세포는 환경 RNAi를 통해 dsRNA를 획득하고 세포 내에서는 세포 자율적 RNAi 반응이 일어나게 된다. 해충 방제 측면에서 보면 경구를 통해 들어온 dsRNA는 환경 RNAi를 통해 중장세포로 침입하게 되고, 이 중장세포가 다시 dsRNA를 혈강으로 내보내는 경우에 이 곤충은 전신 RNAi 기작을 가진다고 할 수 있다. 추가적으로 어미에 주입된 dsRNA가 어미는 물론이고 차세대 자손에 이르기까지 RNAi 효과를 유발하는 경우 이를 부모(parental) RNAi라 칭하게 된다(Bucher et al., 2002).

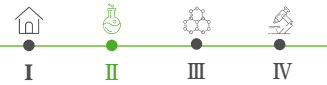
2) RNAi 작동 과정

여러 small RNA 종류 가운데 살충제 개발을 위해 dsRNA가 우선 고려되었다. 일단 dsRNA가 세포 내로 들어오면, RNase III의 일종인 Dicer 2(Dcr2)가 약 20bp 크기의 이중나선형 small interference RNA (ds siRNA)로 절단하게 된다(그림 2.3).

〈그림 2.3〉 RNA 간섭 세포 내 과정



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.



외부 유래 dsRNA가 세포막 단백질(SID: systemic RNA interference deficient)을 통해 세포 내로 침입하게 된다. 또는 수용체매개엔도사이토시스 과정을 통해 세포로 들어간다. 세포 내에서 Dicer라는 일종의 RNase III 분해효소가 20-25bp 크기의 double-stranded small interfering RNA(ds-siRNA)를 형성하고, 이는 다시 Argonaute(AGO)가 인식하여 RNA interference silencing complex(RISC)를 형성하게 된다. 여기서 다시 두 가닥이 단일 가닥으로 풀리면서 ss-siRNA가 상응한 표적 mRNA와 결합하게 된다. 이때 AGO의 효소 활성화로 대상 mRNA가 RISC에서 절단된다. 비록 곤충에서는 RdRP (RNA-dependent RNA polymerase)가 발표되지 않았지만, 선충은 이를 이용하여 다수의 siRNA를 증폭하여 이웃 세포로 이동하게 하는 systemic RNAi가 일어나게 된다.

이 절단된 siRNA는 RNA-induced silencing complex(RISC)에 의해 인식되고, 단일가닥의 siRNA(ss siRNA)로 풀리고 이 가운데 한 가닥은 guide RNA가 되어서 표적 mRNA와 상보적으로 결합하게 된다. 결합된 RNA 복합체는 RISC의 한 구성 성분인 Argonaute 2 (Ago2)에 의해 대상 mRNA가 절단되게 된다. Ago2는 PAZ(PIWI Argonaute and Zwiller)와 PIWI의 특징적 영역을 포함하는데, PAZ는 RNA와 결합하는 데 작용하고, PIWI 영역은 RNase H와 유사하게 대상 mRNA를 절단하는 데 관여한다. 따라서 *Dcr2* 또는 *Ago2* 유전자의 발현을 억제할 경우 RNAi 과정이 작동하지 않을 수 있다. 이를 현재 가장 많이 이용되고 있는 *vATPase* dsRNA를 표준 살충력으로 설정하고 다양한 RNAi 관여 인자를 유전적으로 무기능화하면서 RNAi 관여 인자를 동정하고 있다(Velez et al., 2016).

여러 생명체에 존재하는 RNA-dependent RNA polymerase(RdRP)는 siRNA를 다시 제2차 증폭할 수 있어 RNAi 효율을 극대화한다. 그러나 곤충의 경우는 RdRP를 가지고 있지 않아 RNAi 효율이 좋은 곤충류의 경우에는(Yu et al., 2013) 아직 확인되지 않은 경로로 siRNA의 증폭을 유도할 것으로 추정하고 있다.

3) 환경 RNAi 기작

환경 RNAi 기작은 세포 밖의 dsRNA가 세포 내로 이동하는 기작을 의미한다. 특정 세포가 dsRNA를 획득하는 방식은 크게 3가지 기작을 가진다고 알려져 있다. 첫째로 세포막에 존재하는 dsRNA 전용 운송채널이다. 가장 잘 알려진 대상은 예쁜꼬마선충에 존재하는 SID-1(systemic RNA interference deficiency-1)으로 dsRNA를 세포 내로 이동하는 데 관여하게 되며 이 유전자가 결여되면 RNAi가 일어나지 않게 된다(Winston et al., 2002). 그러나 SID-1은 dsRNA를 세포 밖으로 운송시키는 데는 관여하지 않는다(Jose et al., 2009). 또 다른 통로단백질은 SID-2로서 SID-1의 dsRNA 운송을 활성화시킨다(Winston et al., 2007). 이들 단백질들의 기능적 협력 관계에 대한 가설로서 SID-2가 SID-1의 구조를 변형하여 dsRNA 운송 능력을 높이거나, 직접 dsRNA를 SID-2가 결합하여 SID-1에 전달하거나 또는 SID-2가 엔도사이토시스를 활성화하는 기작이 제시되었다(Whangbo & Hunter, 2008).

곤충 게놈 정보를 이용하여 SID-1 유전자의 존재를 살펴본 결과(Huvenne & Smagghe, 2010), 파리목을 제외하고 다른 곤충 종류에서 발견되었다. 그러나 이들의 존재와 RNAi 효율 사이에 직접적 관계성을 찾기 어렵다. 예를 들어, 전신 RNAi가 잘 알려진 거짓쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*)의 경우 3개의 SID 유사 유전자가 존재하지만 이들의 발현을 각각 억제하는 경우에도 RNAi 효율에 영향을 주지 않았다(Tomoyasu et al., 2008). 유사하게 3개의 SID 유사 유전자를 가지고 있는 누에(*Bombyx mori*)의 경우에는 RNAi 효율이 매우 낮다(Xu et al., 2016). 반면에 SID 유전자가 없는 모기류에서는 오히려 전신 RNAi가 일어났다(Boisson et al., 2006; Volz et al., 2006).

둘째로 dsRNA가 세포로 침입하는 경로로 엔도사이토시스를 이용하는 방식이다. 초파리의 경우 SID 유전자가 없어도 환경 RNAi가 일어나게 된다. 예를 들어, 혈강으로 주입된 dsRNA는 혈구세포의 RNAi를 유발한다(Roignant et al., 2003; Gordon & Waterhouse, 2007; Miller et al., 2008). 또한 초파리 유래 세포주인 S2 세포의 경우에도 배양액에 존재하는 dsRNA에 대해서 RNAi 반응을 일으키게 된다(Saleh et al., 2006; Ulvila et al., 2006). 이는 SID 이외의 경로로 dsRNA가 세포 내로 들어갔다는 것을 의미하게 된다. 이를 탐색하기 위해 Saleh et al.(2006)은 S2 세포주를 이용하여 2,000개의 발현유전자들을 대상으로 dsRNA를 각각 실시하여 RNAi에 관여하는 인자들을 분석하였다. 즉, 우선 세포치사를 일으키는 dsRNA를 처리한 후 RNAi에 관여할 것으로 의심되는 유전자에 특이적 dsRNA 처리하여 RNAi 과정에 관여하는 것을 탐색하였다. 이 결과 clathrin heavy chain 유전자가 선발되었다. 이 유전자의 산물은 엔도사이토시스에 관여하는 것으로 dsRNA가 S2 세포에 들어갈 때 이 경로를 이용하는 것으로 추정되었다. 이를 증명하기 위해 엔도사이토시스에 관여하는 vacuolar H⁺ ATPase에 대한 특이적 억제자인 bafilomycin을 처리한 결과 RNAi 효과를 억제할 수 있었다. 또한 예쁜꼬마선충에서도 clathrin heavy chain 유전자의 발현을 억제할 경우 RNAi를 억제할 수 있었다. 이러한 결과는 엔도사이토시스가 dsRNA를 세포 내로 전달하는 데 여러 생명체에서 공통적으로 일어나는 경로라는 것을 의미하였다. 엔도사이토시스에 의해 dsRNA가 세포 내로 들어가는 과정을 직접 관찰하기 위해 dsRNA에 형광물질을 붙여 거짓쌀도둑거저리의 중장세포 내로 이동을 분석한 결과 엔도사이토시스 특이적 억제자의 처리에 따라 세포 내 이동이 억제되는 것을 관찰하였다(Xiao et al., 2015). 더욱이 “RNAi of RNAi” 연구전략을 이용하여 엔도사이토시스에 관여하는 유전자들이 dsRNA 이동에 관여하는 역할을 증명하였다.

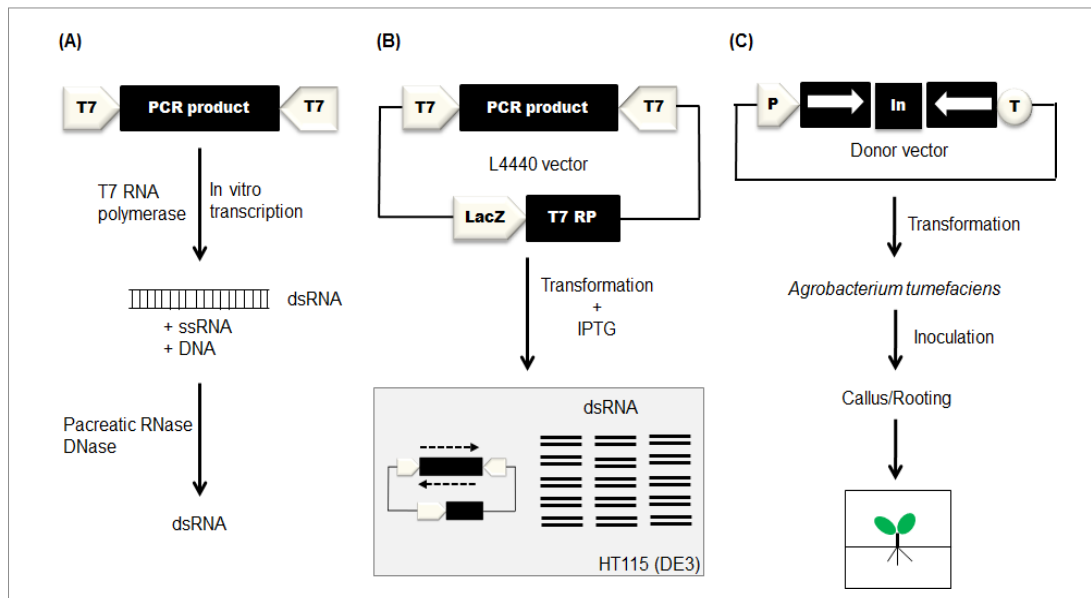
이동성메뚜기류(*Schistocerca gregaria*)에서는 이러한 엔도사이토시스에 scavenger receptor(SR)가 dsRNA의 특이적 수용체로서 관여하는 것으로 보여주었다(Wynant et al., 2014). SR-CI와 Eater의 두 종류 SR 단백질이 이러한 엔도사이토시스에 관여하는데(Ulvila et al., 2006), SR-CI는 포유동물의 class A에 속한 SR 단백질로서 이들은 음극성을 다수 띤 물질의 운송에 관여하는 것으로(Pearson et al., 1995) 이는 곤충류에서 SR-CI가 다수의 음극성을 띤 dsRNA에 대한 친화성을 가져 dsRNA 엔도사이토시스에 관여한 것으로 설명하고 있다.

셋째로 dsRNA가 세포로 침입하는 경로로 면역 작용에 관여하는 패턴 인식 SR을 이용하는 방식이다(Saleh et al., 2009). 이는 항바이러스 기작과 관련성을 갖는다. 즉, 바이러스에 감염된 세포가 바이러스 유래 dsRNA를 세포 밖으로 내보내면 이웃하는 세포가 이를 패턴 인식 scavenger receptor에 의해 세포 내로 이동시켜 자살세포 RNAi 기작으로 제거시키게 된다.

나. dsRNA 제조기술

크게 세 가지로 나뉘는 dsRNA 제조기술을 <그림 2.4>에서 요약하여 도해하였다. 이들 각각의 제조 과정에 대해서는 다음과 같이 설명된다.

<그림 2.4> 세 종류의 dsRNA 제조 기술



주: (A) 기내 제조기술 (B) 재조합 세균 이용 제조기술 (C) 형질전환작물. 그림에 있는 약어는 T7 RNA polymerase (T7), single-stranded RNA (ssRNA), T7 RNA polymerase (T7 RP), promoter (P), intron (In), terminator (T) 및 isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG)를 포함.

자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

1) 기내(in vitro) 제조기술(A)

dsRNA의 제작은 대상 유전자의 특정부위에 대한 PCR 클로닝으로부터 시작된다. 이때 정방향 및 역방향 프라이머의 5'말단에 T7 프라이머를 부착시켜 PCR을 실시한다. 결과적으로 얻은 PCR 증폭물은 기내 조건에서 T7 RNA polymerase를 첨가하면서 상보적 두 가닥의 RNA가 합성되도록 한다(<그림 2.4>의 (A)). 이후 주형 DNA와 single-stranded RNA를 각각 DNase와 RNase로 제거한 후 정량 분석하여 실험에 이용하게 한다.

2) 형질전환 세균을 이용한 dsRNA 제조기술(B)

세균 발현 dsRNA 제조 기술은 Timmons et al.(2001)의 방식을 기준으로 제작된다. 기내 제조기술과 동일하게 대상 유전자의 PCR을 실시한다. 이후 TA 클로닝벡터에 재조합한 후 L4440 벡터의 클로닝 위치에 상응한 제한효소로 삽입부를 잘라낸 후 다시 L4440 벡터에 재조합시킨다(〈그림 2.4〉의 (B)). 반면에 PCR 증폭물을 바로 L4440 벡터에 TA 클로닝을 위해서는 이 벡터를 EcoRV로 제한효소 처리 후 terminal transferase에 의해 T-tailing하여 사용할 수 있다(Kamath & Ahringer, 2003).

이 삽입부위는 두 개의 T7 프로모터 사이에 위치하게 된다. 재조합 L4440 벡터를 다시 RNase III가 결합된 대장균 HT115(DE3)에 형질전환한다. 이렇게 형질전환된 대장균은 isopropyl β -D-thiogalactoside(IPTG) 첨가에 의해 유도 발현되어 다량의 dsRNA를 생산하게 된다. 재조합 세균에서 생성된 dsRNA를 추출한 후 전기영동으로 분리하고, ethidium bromide 용액으로 염색한다. 이때 기내 조건에서 생성된 표준 dsRNA 양을 기준으로 Image Analyzer를 이용하여 정량화하여 과발현 세균 밀도에 따른 dsRNA 생성량을 산출한다. 이후 dsRNA 절대량은 세균 밀도와 회귀분석을 통해 계량화된다.

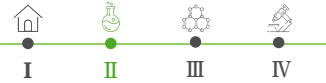
3) 형질전환작물을 이용한 제조기술(C)

형질전환된 식물체에서 dsRNA를 합성하게 한 후 이 작물의 해충이 섭식하면 곤충 체내에서 표적 유전자의 RNAi가 일어나 작물체가 해충저항성을 갖게 하는 기술이다. 형질전환 작물체를 제조하는 기술은 비티(*Bacillus thuringiensis*) 독소단백질을 작물 유전체에 삽입하여 제조하는 기술(Kim et al., 2015b)과 동일하다. 그러나 차이점은 유전자의 삽입구조에 있다. 즉, dsRNA를 만들기 위해서 앞에서 기술한 형질전환 세균의 재조합벡터 구조를 가질 필요가 없다. 이 보다는 머리핀(hairpin) 구조의 dsRNA를 만들어 식물체 핵 내에서 miRNA 처리과정과 같이 dsRNA를 형성하게 하는 것이다. 따라서 머리핀 구조의 dsRNA를 만들기 위해 대상 유전자 조각의 상보적 가닥을 직렬로 연결하되 이들 사이에 일부 조각 DNA(20-30bp)를 삽입하여 머리핀의 루프 모양을 갖게 한다(〈그림 2.4〉의 (C)).

이 구조에 5'말단에 발현율이 높은 프로모터를 연결하고 3' 말단에는 전사종료신호를 장착시키게 된다. 이러한 구조를 지닌 발현벡터를 근두암종병 세균(*Agrobacterium tumefaciens*)에 형질전환시킨다. 형질전환된 세균은 식물체 callus를 유도하고 이는 다시 식물체 뿌리를 형성하여 형질전환된 식물 개체를 만들게 한다.

다. dsRNA 처리 기술

제조된 dsRNA는 여러 방법으로 대상 세포 또는 생명체에 처리될 수 있다. 단순한 침지법으로 dsRNA가 담긴 용액에 세포 또는 개체를 담그면서 처리하는 방법부터 혈강 주입 및 섭식을 통하는 방법까지 다양하다.



1) 세포 처리 기술

세포배양액에 dsRNA를 혼합하여 세포에 환경 RNAi 기술로 도입시키는 방법이다. 예를 들어, Sf21 세포주에서 특정 유전자의 기능을 알아보기 위해 대상 유전자에 특이적 dsRNA 10 μ g을 150 μ l의 serum-free 배양액과 혼합한 후 이 세포가 포함된 각 well에 처리하고 27 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 환경 RNAi를 유도하게 된다(Sivakumar et al., 2007). 이후 정상 세포배양액을 첨가한 후 일정 기간 동안 배양한 후 표적 유전자의 발현 억제를 분석하게 된다.

2) 혈강 주입 기술

미량주사기를 통해 대상 곤충의 혈강에 주입하는 기술이다. RNAi 효율 면에서 우수하여 대부분의 유전자 기능 연구에서 dsRNA를 이용하는 dsRNA 처리 기술이다. 곤충에서 최초로 dsRNA 주입에 성공한 사례는 초파리를 대상으로 보고되었다(Kennerdell & Carthew, 1998). 초파리 알을 대상으로 포배엽기에 dsRNA를 65-110pL의 부피로 주입하여 *frizzled*과 *frizzled 2* 유전자들의 발현을 감소시켰다. 이러한 세포 내 주입 방식에서 세포외 혈강 주입은 다시 초파리 성충을 대상으로 실시되어 성공하였다(Dzitoyeva et al., 2001; Tomoyasu et al., 2008). 특히 거짓쌀도둑거저리의 경우는 전신 RNAi가 일어나 RNA 간섭 효율이 매우 높다(Tomoyasu & Denell, 2004). 유충의 경우는 체절사이 얇은 체벽을 통해 주입하고 성충은 날개 아래 막질부를 통해 주입하게 된다.

3) 섭식 처리 기술

dsRNA가 곤충의 체벽을 투과하여 체내로 들어갈 수 없기에 살충제 개발에 dsRNA를 적용하기 위해서는 먹이를 통해 섭식처리가 이뤄져야 한다. 최초의 dsRNA 경구효과는 Timmon & Fire(1998)가 예쁜꼬마선충을 통해 증명하였다. 곤충에서 섭식을 통한 dsRNA 처리 효과는 다양한 해충에서 그 효과가 인정되었다. 크게 세 가지 방식으로 dsRNA 섭식 처리가 해충 방제에 이용될 수 있다.

첫째로 합성된 dsRNA를 작물 또는 미끼에 직접 처리하는 방식이다. 노출된 환경에서 dsRNA의 안전성을 주기 위해 기내조건 또는 화학적으로 합성된 dsRNA를 나노제형화 기술을 포함한다(Zhang et al., 2010). 이 기술은 키토산과 같은 폴리머를 이용하여 제형화하는데 이는 키토산에 존재하는 아미노기와 RNA의 인산기 사이에 정전기적 인력에 의해 dsRNA를 폴리머에 부착시키고 이를 나노입자화하는 방법이다. 이를 통해 야외 조건에서 dsRNA의 화학적 안정성은 물론이고 곤충 체내로 들어간 후에도 중장 내강에서 다양한 RNase에 의한 분해(그림 2.4)를 막아줄 수 있는 장점을 갖게 된다.

둘째로 재조합세균을 이용하여 dsRNA를 발현시키고 균체를 처리하는 방식이다(Kim et al., 2015a). 이때 섭식 후 곤충 소화관에서 직접 또는 소화액의 도움으로 세균으로부터 빠져나온 dsRNA는 중장세포에 환경 RNAi 방식으로 세포 내로 침입하게 되고, 중장세포에서는 다시 내부

혈강으로 배출하면서 전신 RNAi를 유발할 수 있다. 멸강나방(*Mythimna separata*)을 대상으로 소화관에 발현되는 *chitinase* 유전자를 대상으로 dsRNA를 세균에서 발현시켜 처리한 결과 뚜렷한 살충효과 및 발육 지연 효과를 나타냈다(Ganbaatar et al., 2017). 이 연구에서는 섭식으로 처리된 dsRNA에 의해 대상 *chitinase* mRNA가 약 21nt 영역에서 축적되는 것을 확인하였다. 오리엔탈과실파리(*Bactrocera dorsalis*)의 경우 서로 다른 4가지 유전자를 대상으로 dsRNA 발현하게 하는 형질전환 대장균을 이용하여 각각 섭식 처리한 결과 35-100%의 발현 억제를 유도하였으며 이는 유의성 있는 살충효과로 이어졌다(Li et al., 2011). 보다 뚜렷한 살충효과는 딱정벌레목 해충에서 나타났다. 콜로라도감자해충(*Leptinotarsa decemlineata*)의 경우 상이한 5개의 유전자를 대상으로 형질전환된 세균을 섭식시킨 결과 모두 뚜렷한 발육억제 및 살충효과를 나타냈다(Zhu et al., 2011).

셋째로 dsRNA를 발현하는 형질전환 작물을 제조하는 방식이다. 이 기술을 특별히 식물유래(in planta) RNAi로 불린다. 이 식물유래 RNAi에서 dsRNA는 앞에서 기술한바와 같이 머리핀 모양으로 발현시키게 된다. 이는 dsRNA를 발현시키는 유전자의 상보적 두 가닥을 한 가닥의 DNA에 놓고 발현시키기 때문이다. 이들 상보적 서열 사이에는 인트론과 같은 서열을 삽입하여 머리핀의 루프 모양이 되게 한다. 이렇게 제작된 작물은 담배(Mao et al., 2007), 목화(Mao et al., 2011), 벼(Zha et al., 2011) 및 옥수수(Baum et al., 2007)를 포함하고 있으며 각각 안정적인 dsRNA를 공급하여 이상적인 RNAi 효율을 보여주었다.

이러한 기술들로 제작된 dsRNA가 RNAi 효율을 보이는 데 비교적 공통적 특징을 지니게 된다. 첫 번째로 dsRNA 농도가 RNAi 효율에 영향을 주게 된다. 이상적 효율을 주는 dsRNA의 농도는 곤충 및 대상 유전자에 따라 상이하기에 이에 대한 유효 농도가 결정되어야 한다. 반면 유효농도를 초과하는 경우 RNAi 효율이 더 이상 증가하지 않아 RNAi의 유전자 발현 억제에 한계성을 나타낸다(Meyering-Vos & Muller, 2007; Shakesby et al., 2009).

둘째로 dsRNA의 길이도 RNAi 효율에 영향을 미친다. 초파리 S2 세포주의 경우 최소한 211 bp 이상의 길이를 요구하였다(Saleh et al., 2006). 반면에 길이가 길어지면 비표적 유전자에 대한 RNAi 가능성이 높아져 가장 이상적 길이는 300-500bp 범위로 판단된다(Huvenne & Smagghe, 2010).

셋째로 dsRNA 염기서열 선정이 특이적 RNAi를 유도하는 데 변수로 작용한다. 비교적 중간 보존서열이 높은 영역을 dsRNA 제작에 이용될 경우 비표적 생명체에 대한 영향을 줄 수 있다(Kim & Kim, 2016).

넷째로 대상 곤충의 발육시기에 따라 RNAi의 효율은 상이할 수 있다. 비교적 어린 시기의 개체에서 RNAi 효율은 높은 것으로 알려졌다. 예를 들어, 유충기의 경우 어린 유충이 노숙 유충보다 감수성을 보여 흡혈성 노린재(*Rhodnius prolixus*)의 경우 4령 유충 이후는 dsRNA에 크게 둔감해졌다(Araujo et al., 2006). 또한 발육시기도 영향을 주어 밤나방(*Spodoptera frugiperda*)의 경우 성충보다는 유충에서 dsRNA에 대한 감수성이 높았다(Griebler et al., 2008).

라. dsRNA 처리 효과

기내 합성 기술로 제작된 dsRNA를 혈강 또는 섭식 방법으로 다양한 해충에 대해서 RNAi 효과가 검증되었다(Scott et al., 2013). 여기서는 dsRNA를 살충제로 개발하는 데 뚜렷한 방향성을 제시한 연구 결과들을 소개한다.

첫 번째로 dsRNA를 해충방제 기술로 이용한 연구 결과는 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)의 해독효소를 dsRNA로 억제하는 연구에서 볼 수 있다(Mao et al., 2007). 목화를 가해하는 이 곤충은 목화에서 비롯된 내충 물질인 gossypol에 방어하는 특이적 산화효소인 cytochrome P450 유전자(*CYP6AE14*)를 과발현하여 식물을 가해한다. 이때 *CYP6AE14*에 특이적 dsRNA를 발현하는 형질전환식물을 제작하였다. 이 dsRNA를 발현하는 식물을 가해하는 왕담배나방은 *CYP6AE14* 발현이 억제되면서 gossypol에 감수성으로 전환되어 생존율이 크게 떨어지게 되었다. 즉, 식물을 가해함으로써 경구를 통해 들어온 dsRNA가 증장에서 주로 발현되는 *CYP6AE14* 발현을 억제하여 치사율을 높인 것으로 해석된다. 유사한 형질 전환 작물을 이용한 예가 옥수수 뿌리를 가해하는 딱정벌레인 *Diabrotica virgifera virgifera*로서 v-ATPase A에 대한 dsRNA를 발현하는 옥수수를 제작하여 검정한 결과 경제적피해 수준 이하로 해충 밀도를 낮추어 옥수수 가해 정도가 격감되었다(Baum et al., 2007).

또 다른 방향의 dsRNA 살충제 처리 기술이 재조합 세균을 이용하여 개발되었다(Zhu et al., 2011). 이 기술을 감자를 가해하는 딱정벌레인 *L. decemlineata*에 처리한 결과 특정 액틴 유전자에 대한 특이적 dsRNA가 이 해충의 발육을 현격하게 억제하는 것으로 나타났다. 이 세균 발현 dsRNA 기술을 나비목 해충인 파밤나방(*S. exigua*)에 적용한 결과 키틴 합성효소를 대상으로 RNAi를 통해 뚜렷한 해충 방제 효과를 나타냈다(Tian et al., 2009). 세균 발현 dsRNA 기술은 흡수형 구기를 가진 오리엔탈과 실파리에서도 가능성을 보였다(Li et al., 2011).

dsRNA 살충제를 개발하는 데 또 하나의 방향성은 부모 RNAi를 이용하는 것이다. 딱정벌레류를 대상으로 주로 일어나는 현상으로 어미에게 dsRNA 처리한 결과 자식 세대에도 동일한 표적 유전자에 대한 RNAi 효과가 유발되는 데에서 비롯된다. 이 부모 RNAi를 이용하여 옥수수를 가해하는 *D. virgifera virgifera* 딱정벌레 배자 발육에 관여하는 호메오 유전자(예, *hunchback*) 또는 후생유전 조절 유전자(예, *brahma*)에 특이적 dsRNA를 어미에게 섭식 처리한 결과 어미는 물론이고 자손세대에 이르기까지 RNAi 효과가 전달되어 배자 발육을 억제하는 살충효과를 나타냈다(Khajuria et al., 2015).

한편 특이적인 섭식 습관을 가지고 있는 해충에 대한 dsRNA의 미끼처리 기술이 또 다른 응용성을 지닌다. 예를 들어, 바퀴나 흰개미와 같이 주거에 피해를 주는 해충의 경우 다량의 dsRNA를 이들 해충의 미끼에 처리하여 RNAi 효율을 기대하는 것이다(Zhou et al., 2008). 이 경우에도 환경에 노출되어 dsRNA의 분해를 막기 위해 나노제제화 기술이 요구된다.

나비목 해충을 대상으로 dsRNA로 방제하려는 경우 산누에나방과 곤충 또는 면역 유전자를 대상으로 하는 경우를 제외하고 비교적 다량의 dsRNA가 체내로 들어가야 유의성 있는 RNAi 효과를 기대하게 된다(Terenius et al., 2011). 비록 일부 나비목 해충은 전신 RNAi가 보고되지만 근본적으로 제2차 siRNA의 증폭이 결여되어 있어 다량의 dsRNA가 체내로 이입되어야 효과적인 RNAi의 효과를 거둘 수 있기 때문이다(Lim et al., 2016). 이를 보완하기 위한 전략으로 비티 생물농약과의 혼합 처리가 개발되었다(Kim et al., 2015a). 파밤나방의 경우 중장 세포막에 존재하여 세포와 세포 사이를 연결해 주는 인테그린(integrin) 단백질에 특이적인 dsRNA를 재조합세균으로 발현시키고, 여기에 비티의 Cry 독소단백질을 추가로 발현시킨 재조합대장균을 함께 처리한 결과 비티 단독의 살충효과보다 월등히 높은 방제 효과를 나타냈다. 유사하게 키틴합성효소(chitin synthase B)의 발현을 억제하는 dsRNA 처리도 비티 독소단백질에 대한 감수성을 높여주었다(Kim et al., 2017). 또 다른 나비목 해충인 조명나방(*Ostrinia furnacalis*)에서도 비티 독소단백질을 분해시켜 비티에 대한 저항성을 나타내는 개체에 dsRNA로 해당 분해효소(chymotrypsin)의 발현을 억제시킨 결과 비티의 살충력이 높아졌다(Guan et al., 2017). 이러한 혼합 처리 기술은 향후 비티에 저항성을 나타내는 나비목 해충에 대해서 dsRNA가 상승적 살충효과를 줄 수 있는 협력제로 개발이 가능하다는 응용 방향을 제시하였다.

dsRNA 이외에 small RNA를 이용한 해충 방제가 miRNA와 siRNA에서 각각 시도되었다. miRNA는 약 22 bp 길이의 단일가닥 소형 RNA이다. miRNA는 non-coding RNA로서 특정 mRNA의 3' UTR 영역에 상보적 염기서열로 결합하여 대상 mRNA의 가수분해를 유도하거나 번역을 억제하여 유전자 발현을 조절하게 한다(Behura, 2007). 해충방제의 목적으로 특이적 유전자 조절 가운데 곤충의 날개 발달에 관여하는 miRNA에 관한 연구가 진행되었다(Ling et al., 2015). 노랑초파리의 경우 *let-7* 돌연변이체는 소형 날개를 형성하게 하고, *bantam* miRNA는 날개원기(wing disc)의 위아래면 연결부위에 영향을 주고, *miR-9a* 결실 돌연변이체는 날개가장자리 결합을 보인다. 날개 분화 세포내 신호전달에 관해서 *iab-4* miRNA는 뒷날개 분화에 영향을 주고, *miR-315a*와 *miR-8*은 Wingless 신호를 조절한다. 이에 반해 *miR-1*은 Notch 신호를 조절한다. 특히 관심을 갖는 miRNA가 miR-2인데 이들은 무척추동물에 특이적으로 곤충에게 공통적으로 보이는 miRNA이다. 노랑초파리에서 *miR-2*는 Notch 신호전달에 관여하여 시맥 및 날개 가장자리를 형성하는 데 영향을 준다. miR-2는 누에(*Bombyx mori*)에서도 발견되어 Notch 신호전달에 관여하는 *abnormal wing disc(awd)*와 *fringe(fng)* 두 전사체의 발현을 억제하였다. 이러한 연구는 UAS/GAL4의 특정 유전자 발현시스템을 이용하여 miR-2 유전자 과발현을 통해 *awd*와 *fng*의 발현량 감소를 관찰하였고 더불어 누에 성충의 날개 발육 억제를 초래하게 하였다. 이러한 결과를 증명하기 위해 다시 *awd*와 *fng*를 각각 CRISPR/Cas9 유전자 가위 기술로 knock-out한 누에를 제작하고 이들이 동일한 날개 발육 억제를 초래하는 것을 관찰하여 이들이 miR-2의 대상 유전자들이라는 것을 재입증하였다. 실제로 miRNA를 섭식 처리하여 해충의 생존력을 낮추는 실험이 진행되었다(Jayachandran et al., 2013). 왕담배나방을 대상으로 miR-2002b의 유사체 합성물로 섭식 처리한 결과 트립신 소화효소 유전자의

발현을 억제하면서 약 40%의 유충 치사 효과 및 70% 생식력 감소 효과를 나타냈다.

siRNA를 이용한 해충 방제 기술이 시도되었다. dsRNA 살충제로 개발하는 데 가장 널리 이용되는 *coatome* β 와 *vATPase A* 유전자에 대해서 각각 siRNA를 제조하고 동시에 접종한 결과 이 두 유전자들에 대해서 RNAi 효과가 유발되었고 높은 살충력을 보여 주었다(Mao et al., 2015). 이러한 결과는 여러 종류에 대한 siRNA를 제조하여 처리하는 복합 RNAi 기술이 siRNA 처리에서 가능하여 이상적 살충효과를 줄 수 있는 가능성을 제공하였다. 더욱이 화학합성이 용이한 siRNA는 대량으로 제조하여 살포가 가능하기에 산업적으로 적용 가능성이 높다. 그러나 동일한 유전자를 대상으로 RNAi를 유도하지만 siRNA의 짧은 길이 때문에 제작 위치에 따라 RNAi 효율에 큰 차이를 보일 수 있다(Gong et al., 2013).

03 dsRNA 농약 안전성

가. 비표적 생명체 영향

1) 인축 독성

살포된 dsRNA가 인축 체내로 들어가는 경로는 경구, 경피 및 호흡을 통한 기관지로 구성될 수 있다. 경구로 들어간 dsRNA는 타액 소화효소 및 산성 위소화액을 통해 분해될 가능성이 높다(Petrick et al., 2013). 이를 통해 소장으로 들어온 dsRNA는 이자샘에서 분비된 핵산분해 효소에 의해 분해된다.

피부를 통해 들어오는 경로에서는 표피층의 물리적 방어선 및 피하지방층의 dsRNA와 같은 극성분자를 배척하는 현상 및 분해과정으로 체내로 이동하기 어렵다(Rodrigue & Petrick, 2020). 호흡을 통해 기관지로 들어온 dsRNA 또한 폐포에서 다시 이러한 물리화학적 장벽을 만나게 되며, 더욱이 폐포에 분포한 대식세포의 방어선을 통과하여야만 한다(Youngren-Ortiz et al., 2017). 이상의 경로를 뚫고 체내 세포 속으로 들어온 dsRNA는 염기서열 기반의 RNAi 또는 비서열적 장애를 유발을 의심하게 된다. 이에 대한 영향 평가가 필요하다.

2) 생태 독성

가) 살포된 dsRNA의 환경 중 안전성

dsRNA 살포에 따른 비표적 생명체에 노출되는 경로 및 지속기간은 여러 요인에 따라 달라질 수 있다. 이러한 요인은 활성 성분인 dsRNA 농도, 살포 시기, 살포 방법, 살포 횟수, 살포된 dsRNA의 이동 경로 및 dsRNA의 화학적 안정성 등이 포함될 수 있다(US EPA, 2014). 일반적으로 환경에서

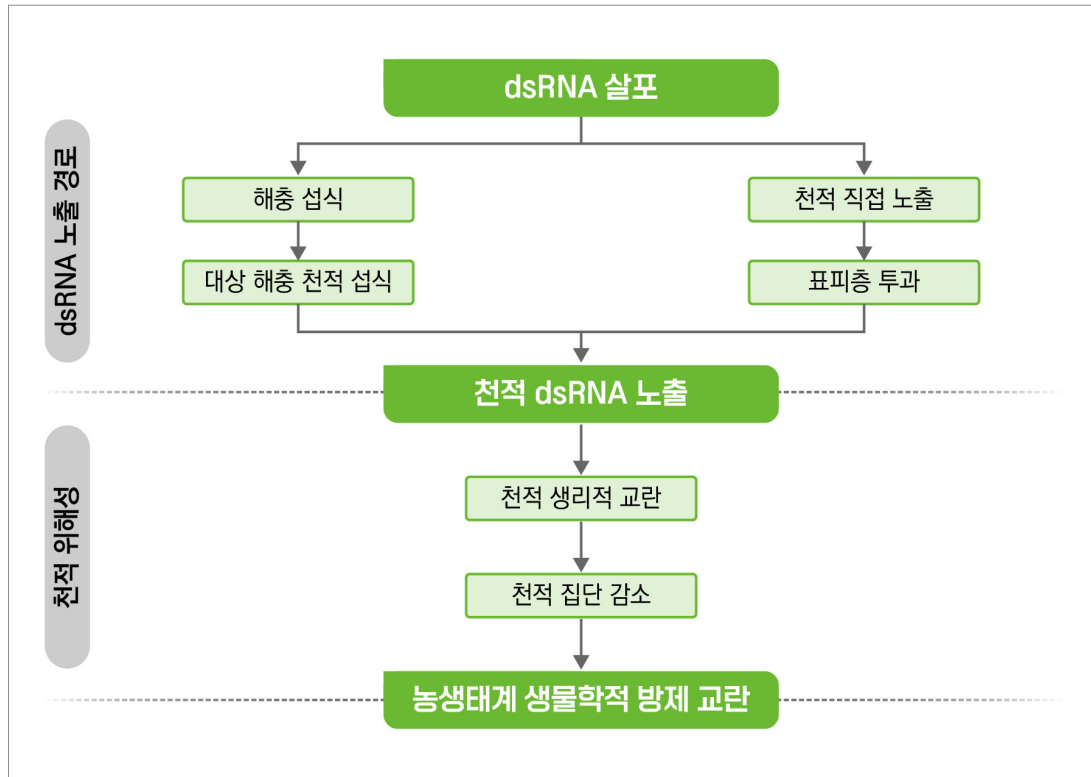
비제형화된 dsRNA의 안정성은 매우 낮아 토양 및 수생 환경에서 2일 이내에 dsRNA가 분해되는 것으로 보고되었다(Bachman et al., 2020). 그러나 이 dsRNA가 토양 입자 또는 식물체 표면에 흡착하는 경우 이러한 분해 속도에 영향을 주게 된다(Parker et al., 2019).

더욱이 dsRNA가 비생물적 및 생물적 분해를 방지하기 위해 제형화되는 경우 환경 중 안정화가 높아지기에 이들의 분해 시기는 예측하기 어렵다. 예를 들어, Mitter et al. (2017)은 최근 식물 바이러스를 표적으로 하는 병원체 특이적 dsRNA를 BioClay로 제형화하였을 때 환경 중 지속 기간이 30일 이상이라 발표하였다. 따라서 dsRNA 노출 평가는 제형화된 제제 형태를 고려해야 한다(Bachman et al., 2020).

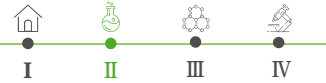
나) 비표적 생명체에 대한 dsRNA 노출 경로

살포된 dsRNA에 노출 가능성이 있는 다양한 비표적 생명체를 이들의 기능별로 구분하면 포식자/기생자, 화분매개자, 곤충을 먹이로 하는 조류 및 포유동물, 토양/수중 분해자로 나누어 볼 수 있다. 포식자와 기생충에 대해서 살포된 dsRNA가 크게 두 가지 주요 노출 경로를 가질 것으로 추정된다(〈그림 2.5〉).

〈그림 2.5〉 살포 dsRNA의 천적에 대한 노출 경로와 위해성



자료: 김용균(2017). "dsRNA를 이용한 해충방제 기술", 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.



우선 가장 가능성이 큰 경로는 피식자 또는 피기생자를 통한 dsRNA의 천적으로 노출을 고려할 수 있다. 우선 식식성 곤충이 살포된 dsRNA를 먹이와 함께 체내로 이동하게 된다. 이때 섭취한 dsRNA가 포식 또는 기생 활동을 통해 천적으로 이동하게 되는 경로이다. 이러한 피기생자와 기생자 사이의 dsRNA 이동이 꿀벌(*Apis mellifera*)과 이에 대한 기생자인 바로아응애(*Varroa destructor*) 사이에서 보고되었다(Garbian et al., 2012).

두 번째 dsRNA에 대한 잠재적 노출 경로는 천적의 체벽을 통한 직접적 전달 방식이다. 즉, 살포를 통해 천적의 몸 표면에 도달한 dsRNA가 비교적 큐티클 층이 얇은 체절간막(intersegmental membrane)을 통해 혈강으로 침입하는 방식이다. dsRNA의 체벽 통과가 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)에서 보고되었다(Pridgeon et al., 2008). 실제로 조명나방(*Ostrinia furnacalis*) 유충 당 0.5 μ g의 형광 표지 dsRNA를 처리한 경우 이러한 체벽통과가 가능하였다(Wang et al., 2021). 더욱이 적절한 제형화를 통해 dsRNA의 체벽 통과 가능성은 향상될 수 있다. 예를 들어, 콩진딧물(*Aphis glycines*)의 경우, 계면활성제와 더불어 처리된 나노제형의 dsRNA가 이러한 체벽 투과율을 크게 향상시켰다(Zheng et al., 2019). 최근 연구에서 Niu et al.(2019)은 완두수염진딧물(*Acyrtosiphon pisum*)에 국부적으로 처리된 dsRNA가 12분 이내에 흡수되는 것을 관찰했다.

다) 비표적 생명체에 대한 dsRNA 위해성

살포된 dsRNA에 노출된 천적은 이상의 경로를 따라 체내로 들어오면 최소한 두 가지, 즉 서열 특이적 또는 비특이적 방식으로 영향을 받게 된다. 서열 비특이적 위해성은 불필요하고 과도한 면역반응을 일으킬 수 있다. 이는 RNAi가 대부분 비표적 생명체의 선천적 항바이러스 면역 반응의 구성요소가기 때문이다.

둘째, dsRNA 처리 인자들과 같은 RNAi 기계의 포화이다. 꿀벌과 호박벌 및 누에에서 처리된 dsRNA에 의해 이를 억제하려는 dsRNAase 유전자의 과발현이 일어났다(Liu et al., 2013). 고용량의 dsRNA를 처리할 경우 무당벌레에서 이러한 서열 비특이적 반응을 일으키지만, 동일한 dsRNA의 비슷한 약량에서 다른 절지동물 종에서는 나타나지 않았다(Velez et al., 2016). 즉, dsRNA가 면역 체계의 불필요한 자극을 통해 서열 비특이적 방식으로 비표적 절지동물 종의 생존능력에 악영향을 미칠 수 있다. 그러나 환경위해성 평가(Environmental Risk Assessment: ERA) 관점에서 보면, 비표적 생명체에 대한 효과는 서열 특이적 위해성이 훨씬 더 관심의 초점이 된다.

dsRNA 농약은 표적 생명체의 발현 유전체를 특이적으로 겨냥하기에 비표적 생명체에 대한 영향력은 적을 것으로 기대된다. 그러나 해충 방제의 경우 비교적 길이가 긴 dsRNA가 RNAi 효율을 높이기 위해 자연히 유연관계가 높은 생명체에 대해서 위해성 평가는 수반되어야 한다. 특히, 유연관계가 높은 다양한 절지동물은 농생태에 생물 다양성에 중요한 역할을 담당하고 있어 이들에 대한 영향 평가는 농약 등록에 필수적이다. 이에 농약 등록을 위해서는 비표적 절지동물에 미칠 수 있는 잠재적 영향에 대한 환경 위해성 평가(ERA)가 이뤄져야 한다. 예를 들어, 최악의 상황을 가정하여 추정

환경 농도(Estimated Environmental Concentration: EEC)를 설정하고 환경 대표종을 대상으로 DP23211 옥수수에서 발현된 DvSSJ1 dsRNA 또는 IPD072Aa 단백질에 대한 노출 한계를 산출한 결과, 비표적 생명체에 대해서 무해한 것으로 판명되었다.

나. 수평 유전자 전달 가능성

상이한 종들 사이에 유전물질의 교환은 수평 유전자 전달(Horizontal Gene Transfer, HGT) 또는 측면 유전자 전달(Lateral Gene Transfer: LGT)로 명명된다. Crisp et al.(2015)은 인체 계놈의 계통발생학적 분석을 통해 145개의 다른 생명체 유전자가 인간 계놈에 유입되었다고 발표하였다. 특히 HGT는 세균 진화에 영향을 주어 항생제 내성, 독성 및 환경 스트레스에 대한 적응에 관여한다고 알려지게 되었다(Hall et al., 2017). HGT는 일반적으로 공생하는 생명체들 사이에 일어날 가능성이 높다(Adato et al., 2015). HGT는 원핵생물은 물론이고 진핵생물의 진화에 크게 영향을 주었다.

살포된 dsRNA 자체가 비표적 생명체에 노출된 후 HGT가 일어날 가능성은 높지 않다. 이유는 트랩스포존과 같은 유전자 전달체가 존재하지 않기 때문이다. 더욱이 dsRNA 형태로서 다시 DNA로 역전사가 이뤄져야 하기에 이러한 가능성은 낮다. 그러나 dsRNA가 형질전환체를 통해 전달되는 경우는 여러 시나리오를 통해 비표적 생명체에 전달될 가능성이 있다. 가장 많이 사용되는 HT115 대장균의 경우 벡터인 L4440의 플라스미드가 T7 프로모터 및 T7 RNA polymerase를 지니고 있다. 즉, 이러한 기능 유전체가 비표적 세균 및 기타 생명체에 전달될 가능성이 있다.

그러나 dsRNA 자체가 비교적 유연관계에서 거리가 먼 생명체 사이에 전달이 가능하다. 특히 생태계 먹이사슬을 통해 dsRNA의 HGT가 가능할 수 있다. 예를 들어 꿀벌(*Apis mellifera*)의 경우 외부기생체인 바로아응애(*Varroa destructor*)에게 dsRNA가 전달되었다(Garbian et al., 2012). 이는 섭식을 통해 꿀벌 체내로 들어온 dsRNA가 바로아응애가 꿀벌을 흡혈하는 먹이사슬의 상하위 영양단계에서 전달된 것으로 풀이된다. 또한 애멸구(*Laodelphax striatellus*)를 방제하기 위해 살포된 dsRNA가 천적인 늑대거미(*Pardosa pseudoannulata*)로 이동하는 것을 관찰하였다(Zhang et al., 2022).

04 차세대 신규 dsRNA 농약의 산업 전망

가. 글로벌 농약 산업 성장성

글로벌 농약 시장은 현재 급격하게 성장하고 있으며, 향후 3.1%의 연평균 성장률로 성장할 것으로 예상된다. 이 시장은 꾸준히 증가하는 세계인구로 인한 농작물 수요 증가에 따라 더욱 중요해지고 있다. 하지만 환경오염, 저항성 발생 등 화학농약 사용량 증가로 인한 문제가 중요한 이슈로 떠오르게 되었고 국제적으로 화학농약 사용량을 줄이기 위한 움직임을 보이고 있다. 이미 지난 2022년 12월 제15차 생물다양성협약 당사국총회(COP15)에서 2030년까지 화학농약을 50% 감축하는 권고안을 기술했다. EU 역시 EU 그린딜 농식품 분야 핵심인 ‘농장에서 식탁까지’(Farm to Fork: F2F) 전략으로 2030년까지 EU 역내 화학농약 사용량을 50% 감축하기로 계획했다. 이상기후와 병해충 증가로 인해 농약 사용량을 줄이기 어려운 상황에서 생물농약이 그 대안으로 주목받고 있다.

생물농약 시장은 2021년 56억 1천만 달러로 평가되었으며, 2022년 65억 1천만 달러에서 2029년 181억 5천만 달러로 성장하여 예측 기간 동안 연평균 성장률이 15.77%가 될 것으로 예상된다. 특히 유기농 식품, 환경친화적인 식품에 대한 수요 증가 및 통합 해충 관리(IPM)에 따른 지속 가능한 해충 방제에 대한 요구가 증가함에 따라 친환경적인 농약의 수요는 더욱 늘어날 것으로 예상된다. 이러한 트렌드와 예측을 바탕으로, 농약 시장은 전체적으로 견실한 성장을 이룰 것으로 보이며, 미래에는 더 많은 혁신적인 제품들이 시장에 선보일 것으로 전망된다.

나. dsRNA 농약의 산업화 가능성

여러 생물농약 중 dsRNA 농약은 최근 몇 년 동안 많은 주목을 받아 왔다. 이는 특히 생명공학의 발전이 농업 분야에 적용될 가능성이 높아지고 있다는 것을 의미한다. dsRNA 농약은 RNA 간섭(RNAi) 기술을 활용하여 병해충을 효과적으로 방제하는 데 사용된다. 이 기술은 특정 병해충의 생존에 필수적인 유전자를 무력화함으로써 작용한다. 이러한 방식은 화학농약에 대한 저항성을 가진 병해충에 대해서도 효과적일 수 있다.

미국의 Monsanto/Bayer 회사에서는 최초로 dsRNA를 발현시키는 GM 작물인 MON87411 옥수수를 2015년에 EPA로부터 승인받아 시판하였다. 최근에는 미국의 바이오기업 ‘GreenLight Biosciences Inc.’가 콜로라도 감자잎벌레를 방제하기 위한 dsRNA 농약 ‘Calantha’를 미국 환경보호청(EPA)에 등록했다. 이는 GM이 아니라 살포용 dsRNA를 활용하였다는 점에서 dsRNA를 이용한 농약 활용성을 높여준 획기적 사례로 여겨지고 있다.

미국의 AgroSpheres 회사에서는 dsRNA를 발현시키는 세균을 이용하여 배추좀나방을 방제하는 획기적 기술을 개발하여 산업화하고 있다. 또 다른 회사인 Trillium Ag에서는 앵타머를 이용하여

dsRNA를 제형화하는 데 성공하여 나비목 해충 방제에 걸림돌이던 곤충 자체의 저항 능력을 해결하여 방제 효과를 획기적으로 높였다. 이 회사들은 제품 출시를 눈앞에 두고 비교적 시장이 큰 나비목 해충을 공략하고 있다.

한편, 국내 기업인 '제놀루션'은 꿀벌 낭충봉아부패병 등에 대한 dsRNA 기반 꿀벌 치료제 연구에 대한 성과를 공유했다. 제놀루션은 꿀벌 dsRNA 치료제의 국내 동물용 의약품 품목허가 신청 승인을 추진하고 있다.

이러한 연구개발의 성과를 바탕으로, dsRNA 농약은 농업 분야에서 더욱 확대되어 다양한 농약(작물보호제)과 동물용 의약품으로 연구개발될 것으로 기대하고 있다. 특히 화학농약 감축 및 친환경적 식품 수요 증가라는 최근 트렌드와 dsRNA 농약의 특성이 일치하기 때문에 농업 분야에서의 dsRNA 농약의 발전 전망은 매우 밝을 것으로 보인다.

Ⅲ 정책 제언

III 정책 제언

01 국내 dsRNA 농약 개발을 위한 R&D

제안 배경에 보듯 다양한 분야에서 연구개발이 dsRNA 농약을 개발하는 데 요구된다. 이러한 배경 기술별로 기술선진국(=미국)과 비교하여 국내 연구 수준을 다음과 같이 정리하였다(〈표 3.1〉).

〈표 3.1〉 dsRNA 농약 개발 관련 기술선진국과 한국의 R&D 기술 격차

항목	기술 선진국	대한민국
dsRNA 제조기술	연구용 dsRNA 제조기술	비등
	산업용 dsRNA 제조기술	Cell-free 대량생산 기술 미흡
dsRNA 제형화 기술	세균 제형화 기술	비등
	키토산 제형화 기술	비등
	BioClay 제형화 기술	미흡
dsRNA 안전성 분석 기술	dsRNA 농약에 대한 포유동물 독성 분석 기술	미흡
	dsRNA 농약에 대한 생태 독성 분석 기술	미흡
dsRNA 등록제도	생물농약 기반 dsRNA 자체 등록 제도 구비	부재

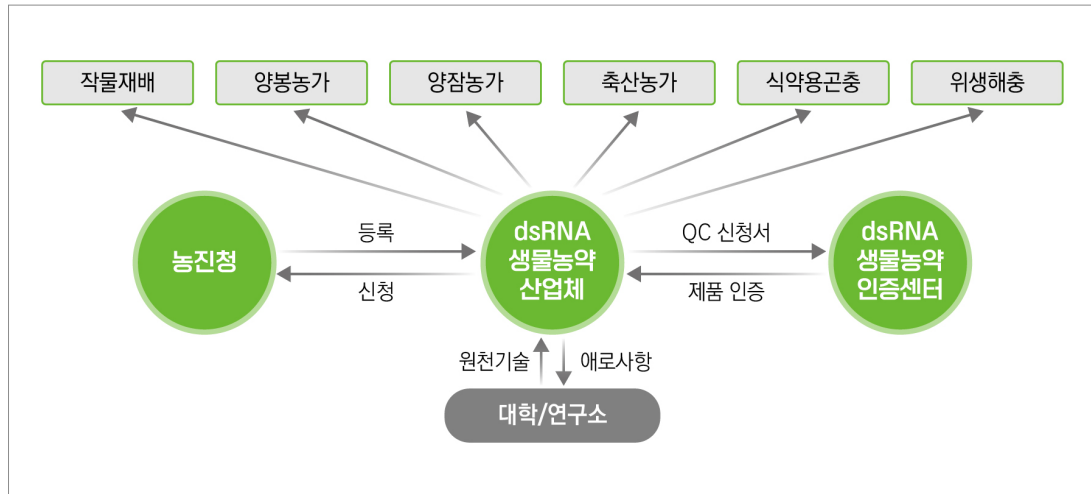
자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

향후 작물재배를 위해 dsRNA 생물농약은 다양한 작물에 살충제, 살균제, 제초제 역할을 담당하여 친환경 농자재로서 기존의 화학농약을 대체하게 된다. 양봉, 양잠 및 식약곤충 사육 농가에서는 각종 질병 병원체 및 매개체를 억제하는 데 dsRNA 생물농약을 사용하게 된다. 축산농가 및 인체 위생해충 분야에서는 모기, 진드기, 파리 및 바퀴벌레 등 각종 위생 방역 해충 퇴치를 위한 방제에 dsRNA 생물농약을 적용하게 된다.

대학, 연구소 및 산업체 컨소시엄을 통해 개발된 신규 dsRNA 생물농약은 약효, 약해 및 인축 독성 자료를 GLP수준으로 생산할 비임상시험수탁기관(Contract Research Organization: CRO)의 기능이 필요하다(〈그림 3.1〉). 이 기관에서는 dsRNA 생물농약의 성능면에서 제시된 기준을 인증하는 실험을 수행하여 소비자로 하여금 안정된 기능 약제로 인정할 수 있게 한다. 이렇게 객관적인 인증

자료와 농촌진흥청에서 제시한 가이드라인을 구비한 자료를 준비하여 산업체는 농촌진흥청에 등록 신청을 진행한다. 농촌진흥청에서는 이들 구비자료를 검토·평가하고 농약안전성심의위원회의 심의를 거쳐 등록 여부를 결정하여 산업체에게 통보하게 된다.

〈그림 3.1〉 dsRNA 농약 등록 절차 및 사용 영역



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

이러한 dsRNA를 이용한 농약 개발은 대학/연구소의 원천기술 개발과 이를 이용하려는 산업체 그리고 산업체의 상품화를 추진하기 위한 농촌진흥청의 등록기준 마련을 필요로 한다. 여기에 제품의 품질보증을 위한 비임상수탁기관의 역할이 필요하다.

최근 염기서열분석 기술의 획기적 발달에 힘입어 다양한 해충에서 주요 유전자의 탐색이 가능하여 전체 발현체를 대상으로 유용한 dsRNA 농약 개발이 가능하다. 그러나 이를 산업화로 이어지게 하는 데에는 해결해야 할 여러 핵심 기술들이 남아 있다.

가. dsRNA 농약 산업화를 위한 핵심 개발 기술

비록 신개념의 농약(작물보호제)이지만, RNAi 관련 핵심 연구 기반이 국내 대학과 연구기관의 연구실에서 갖추어진 상태이다. 따라서 개별 연구 기반을 하나의 방향인 dsRNA 농약 산업화로 모아 줄 필요가 있다. 이를 위해서는 다음의 네 가지 산업화 단계별 핵심기술이 필요하다.

- 1) dsRNA 농약 개발 대상 및 이에 대한 고효율 표적 유전자 선발 R&D
- 2) 저비용 dsRNA cell-free 대량생산 기술 R&D
- 3) dsRNA 농약 제형화 기술 R&D
- 4) dsRNA 농약 위해성 평가 R&D

〈표 3.2〉 국내 농작물 및 산림의 주요 병해충/잡초

작목 구분	식물병	해충	잡초
수도작	도열병 잎집무늬마름병 세균성잎마름병	벼멸구 애멸구 흰등멸구	피(강피, 물피) 물달개비 울방개
전작(채소, 곡류)	탄저병 역병 흰가루병 바이러스병	배추좀나방 파밤나방 담배거세미나방 노린재류 응애류 진딧물류 온실가루이 담배가루이 잎굴파리류	바랭이 쇠비름 깨풀 흰명아주
과수	과수화상병 검무늬썩음병 점무늬낙엽병 갈색무늬병 가지마름병 탄저병	응애류(사과응애, 점박이응애) 심식나방류 진딧물류 노린재류 매미충류	썩 쇠별꽃 닭의장풀 깨풀 토끼풀 별꽃
산림	소나무재선충병 참나무시들음병	소나무재선충 솔껍질깍지벌레	-
양봉	-	꿀벌응애	-

자료: 농업과학원(2020). 식물병해충 R&D 중장기 종합계획(안), 농촌진흥청.

1) dsRNA 농약 개발 대상 및 이에 대한 고효율 표적 유전자 선발 R&D

가) 기술현황

dsRNA 농약의 개발은 현재 해충과 식물 진균병을 중심으로 연구력이 모아졌다. 이러한 제한된 연구력이 국내 작물 피해 규모를 검토하여 dsRNA 개발 대상을 검토할 필요가 있다. 국내 농작물 및 산림 내 주요 병해충, 잡초를 요약하면 앞의 〈표 3.2〉와 같다. dsRNA를 농약으로 개발하기 위해서는 필수적 단계가 RNAi 효율이 치사로 이어질 수 있는 대상 유전자를 선발하는 것이다. 또한 이 유전자가 대상 생명체에만 선택적으로 공격하여 비표적(off-target) 피해를 줄여야 한다. 이를 해결하기 위한 유전자 선발 방향으로 곤충에 고유한 변태와 관련된 유전자에 대한 dsRNA 살충제 개발이 주목을 받아 왔다(〈표 3.3〉).

〈표 3.3〉 dsRNA 농약 개발 대상 해충 및 표적 유전자

대상해충	dsRNA 처리법	표적 유전자	살충력	문헌
바퀴(<i>Blattella germanica</i>)	혈강 주입	α -tubulin	100% (실내)	Lin et al. (2017)
	섭식	α -tubulin	20% (실내)	
집흰개미 (<i>Coptotermes formosanus</i>)	섭식	lipopolysaccharide-binding protein	96% (실내)	Chen et al. (2023)

대상해충	dsRNA 처리법	표적 유전자	살충력	문헌
사막메뚜기 (<i>Schistocerca gregaria</i>)	혈강 주입	clock	90% (실내)	Tobback et al. (2012)
완두수염진딧물 (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	살포	vATPase	81.2% (실내)	Niu et al. (2019)
복숭아혹진딧물 (<i>Myzus persicae</i>)	섭식	Peroxidase	62% (실내)	Yang et al. (2023)
		Hydrolase	55% (실내)	
		Ca ²⁺ binding protein	53% (실내)	
목화진딧물 (<i>Aphis gossypii</i>)	분무	Synapsin	66% (실내)	Qu et al. (2022)
	섭식	Chitin synthase 1	59% (실내)	Ullah et al. (2019)
흰등멸구 (<i>Sogatella furcifera</i>)	혈강 주입	β -catenin	95% (실내)	Liu et al. (2023)
		scalloped (downstream effector molecule in the wingless pathway of wing imaginal discs)	45% (실내)	
		yorkie (required for Raf-induced cardiac hypertrophy)	6% (실내)	
담배가루이 (<i>Bemisia tabaci</i>)	섭식	heat shock protein 70	82% (실내)	Chakraborty & Ghosh (2022)
		fasciclin 2	72% (실내)	
장님노린재 (<i>Apolygus lucorum</i>)	혈강 주입	LIM domain (Protein structural domains)	81% (실내)	Liang et al. (2021)
남쪽폴색노린재 (<i>Nezara viridula</i>)	섭식	α -coatomer protein	45% (실내)	Sharma et al. (2021)
신열대갈색노린재 (<i>Euschistus heros</i>)	혈강 주입	vATPaseA	30% (실내)	Castellanos et al. (2019)
	혈강 주입 (리포좀 제형화)	vATPaseA	45% (실내)	
썩덩나무노린재 (<i>Halyomorpha halys</i>)	섭식	putative ATPase	70% (실내)	Finetti et al. (2023)
		serine/threonine-protein phosphatase	50% (실내)	
		Inhibitor of apoptosis	50% (실내)	
초록장님노린재 (<i>Apolygus lucorum</i>)	섭식	α -amylase	96% (실내)	Vatanparast et al. (2017)
		juvenile hormone esterase	31% (실내)	
노린재류 (<i>Piezodorus guildinii</i>)	혈강주입	vATPase A	51% (실내)	Schvartzman et al. (2022)
벼멸구 (<i>Nilaparvata lugens</i>)	섭식 (키토산 제형)	chitin synthetase A	65.8% (실내)	Lyu et al. (2023)
굴나무이 (<i>Diaphorina citri</i>)	침지	Muscle protein 20	70% (실내)	Yu et al. (2017)
목화깍지벌레류 (<i>Phenacoccus solenopsis</i>)	섭식	fatty acyl-CoA reductase	30% (실내)	Tong et al. (2022)
포도매미충류 (<i>Euscelidius variegatus</i>)	혈강주입	muscle actin	96% (실내)	Abbà et al. (2019)
		ATP synthase β	86% (실내)	

대상해충	dsRNA 처리법	표적 유전자	살충력	문헌
꽃노랑총채벌레(<i>Frankliniella occidentalis</i>)	혈강 주입	vATPase	90% (실내)	Badillo-Vargas et al. (2015)
	섭식		100% (실내)	Khan et al. (2023)
	살포		55% (야외)	
유리알락하늘소(<i>Anoplophora glabripennis</i>)	섭식	vacuolar sorting protein SNF7	50% (실내)	Dhandapani et al. (2020)
		inhibitor of apoptosis	70% (실내)	
호리비단벌레(<i>Agrius planipennis</i>)	섭식 (형질전환 대장균)	Shibire (GTPase necessary for vesicle scission)	69% (실내)	Leelesh et al. (2020)
		heat shock protein	46% (실내)	
버들꼬마잎벌레(<i>Plagiodera versicolora</i>)	섭식	Actin	87% (실내)	Xu et al. (2021)
꽃가루떡정벌레(<i>Brassicoglyphus aeneus</i>)	섭식	α -coatomer protein	64% (실내)	Willow et al. (2021)
목화바구미(<i>Anthonomus grandis</i>)	섭식 (형질전환 대장균)	α -amylase	60% (실내)	Salvador et al. (2021)
		Cytochrome p450	20% (실내)	
콜로라도감자잎벌레(<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	섭식	Inhibitor of apoptosis	90% (실내)	Máximo et al. (2020)
		Heat shock protein 70	10% (실내)	
		Actin	90% (실내)	
서부옥수수부리벌레(<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>)	혈강주입	ADP ribosylation factor-like 1	60% (실내)	Pinheiro et al. (2018)
		Vacuolar H ⁺ ATPase 16 kDa subunit	80% (실내)	
붉은아자나무바구미(<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>)	혈강주입	catalase	80% (실내)	Al-Ayedh et al. (2016)
	섭식		30% (실내)	
거짓살도둑거저리(<i>Tribolium castaneum</i>)	섭식	cuticle protein gene	64% (실내)	Perkin et al. (2019)
	섭식	alpha tubulin	50% (실내)	Edwards et al. (2020)
	혈강주입	Voltage-gated sodium channel protein	80% (실내)	Abd El Halim et al. (2016)
조명나방(<i>Ostrinia furnacalis</i>)	섭식	Glutathione-S-transferases	54% (실내)	Zhang et al. (2018)
콩명나방(<i>Maruca vitrata</i>)	섭식 (형질전환 대장균)	Insulin receptor	70.8% (실내)	Al Baki et al. (2020)
파밤나방(<i>Spodoptera exigua</i>)	섭식	chymotrypsins	40% (실내)	Vatanparast & Kim (2017)
	섭식 (형질전환 대장균)	vATPaseA	48% (실내)	Martinez et al. (2021)
	섭식 (Guanyl 폴리머 제형)	Chitin synthase	53.3% (실내)	Christiaens et al. (2018)
이화명나방(<i>Chilo suppressalis</i>)	섭식	cytochrome P450	44% (실내)	Niu et al. (2022)

대상해충	dsRNA 처리법	표적 유전자	살충력	문헌
왕담배나방 (<i>Helicoverpa armigera</i>)	섭식 (키토산 제형)	Lipase	100% (실내)	Kolge et al. (2023)
	살포	Chitin Synthase	68% (실내)	Kolge et al. (2021)
배추좀나방 (<i>Plutella xylostella</i>)	섭식	arginine kinase	25% (실내)	Fu et al. (2020)
열대거세미나방 (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	섭식 (형질전환 대장균)	vATPase	70% (실내)	Parsons et al. (2018)
담배밤나방류 (<i>Heliothis virescens</i>)	혈강주입	Putative ATPase N2B	100% (실내)	Mogilicherla et al. (2018)
		Serine/ threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	100% (실내)	
		G protein- coupled receptor 161-like	80% (실내)	
멸강나방 (<i>Mythimna separate</i>)	섭식	α -tubulin	35% (실내)	Wang et al. (2018)
		β -tubulin	40% (실내)	
집파리 (<i>Musca domestica</i>)	섭식	Death-associated inhibitor of apoptosis 1	100% (실내)	Powell et al. (2017)
고자리파리류 (<i>Delia radicum</i>)	섭식	Death-associated inhibitor of apoptosis 1	100% (실내)	
바퀴(<i>Blattella germanica</i>)	혈강 주입	α -tubulin	100% (실내)	Lin et al. (2017)
	섭식	α -tubulin	20% (실내)	
이집트숲모기 (<i>Aedes aegypti</i>)	침지	chitin synthase-1	50% (실내)	Singh et al. (2013)
		chitin synthase-2	30% (실내)	
		heat shock protein 83	30% (실내)	
	섭식 (키토산 제형)	Subunit of the ESCRT III complex	46% (실내)	Das et al. (2015)
		Proto-oncogene tyrosine-protein kinase	26% (실내)	
	섭식 (키토산-TPP)	Inhibitor of apoptosis	60% (실내)	Khalil et al. (2023)
	섭식 (키토산 제형)	vestigial (vg) gene	30% (실내)	Ramesh Kumar et al. (2016)
열대집모기 (<i>Culex quinquefasciatus</i>)	섭식 (키토산 제형)	HMG CoA reductase	12% (실내)	Khalil et al. (2023)
	섭식 (키토산 제형)	Dynamin	17% (실내)	
	섭식 (키토산 제형)	Repressor of primer	18% (실내)	
	섭식 (키토산 제형)	juvenile hormone acid methyltransferase	35% (실내)	
예쁜가슴배고치벌 (<i>Meteorus pulchricornis</i>)	섭식	Cytochrom P450	40% (실내)	Xing et al. (2021)

자료: 김용균(2017). "dsRNA를 이용한 해충방제 기술", 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

곤충은 다른 생명체와 뚜렷이 구분되는 생리 현상이 탈피와 변태이다. 이를 수행하기 위해서는 다양한 특이적 유전자들의 발현이 요구된다. 이 가운데 엑다이손 호르몬에 반응하는 유전자들은 비교적 곤충에게서 특이적으로 발현되는 유전자들로 구성된다. Zhu et al.(2012)은 엑다이손 수용체(ecdysone receptor)를 대상으로 dsRNA 기술을 적용하였다. 이 유전자에 특이적 dsRNA를 형질전환담배를 제작하여 섭식 처리한 결과 왕담배나방과 파밤나방 모두에게 살충효과를 주었다.

또 다른 곤충의 특이적 유전자로서 유약호르몬에스테레이즈(JH esterase)가 RNAi의 대상으로 평가되었다(Chikate et al., 2016). 키틴은 일부 무척추동물인 갑각류와 곤충에 특이적으로 외골격을 이루게 하는 생체 물질이다. 이에 대한 RNAi는 선택성을 가질 수 있다. 또 다른 호르몬 수용체로서 탈피와 관련성이 높은 *HaHR3* 유전자의 dsRNA 처리도 왕담배나방의 발육을 억제하였다(Xiong et al., 2013). Tian et al.(2009)은 파밤나방을 대상으로 *chitin synthase A* 유전자에 특이적 dsRNA를 형질전환 세균을 통해 제작하고 처리한 결과 처리 농도에 비례하여 살충효과를 나타냈다. 따라서 생명체 특이적 대상 유전자 선별이 필요하다.

dsRNA 살충제를 개발하기 위해 다양한 표적 유전자를 대상으로 처리방법이 시도되었다. 일반적으로 방제 효과는 혈강주입에서 높았고, 딱정벌레류에서 우수하였다. 특별히 곤충류에서는 전신 RNAi가 일어나서 RNAi의 효과가 높은 딱정벌레류를 중심으로 목에 속한 곤충이 전신 RNAi 증상을 보여 dsRNA에 비교적 감수성을 보인다. 또한 총채벌레 또는 불완전변태류의 곤충에서도 높은 RNAi 효과를 나타내서 이들에 대한 적용도 가능하다. 많은 주요 해충류에서 RNAi 효과가 입증되어 왔다. 반면에 많은 나비목 해충의 경우는 특정한 분류군에서만 RNAi 효과를 기대할 수 있다. 따라서 특정 병해충을 선별하는 것이 특별한 제형화가 이뤄지지 않은 상태에서 우선 개발 대상으로 검토될 필요가 있다.

dsRNA를 이용하여 식물진균병을 방제하는 기술(〈표 3.4〉) 가운데 주목을 받는 것이 살포유도 유전자 침묵(Spraying Induced Gene Silencing: SIGS)이다. 즉 대상 진균의 특정 유전자를 대상으로 dsRNA를 제작하여 작물에 살포하여 표적 유전자의 RNA 간섭을 유발하여 곰팡이 성장과 이로 인한 병 발생을 억제한다. 그러나 SIGS는 야외 환경 조건에서 RNA의 불안정으로 RNA 간섭 효과가 낮아지게 된다.

〈표 3.4〉 dsRNA 농약 개발 대상 식물병 및 표적 유전자

대상 식물병균	기주	dsRNA 처리법	표적 유전자	살균력	문헌
잣빛곰팡이 (<i>Botrytis cinerea</i>)	토마토	살포	<i>DCL1</i>	80% 병반감소	Qiao et al. (2021)
	상추		<i>DCL1</i>	60% 병반감소	
	장미		<i>DCL1</i>	70% 병반감소	
	포도		<i>DCL1</i>	70% 병반감소	

대상 식물병균	기주	dsRNA 처리법	표적 유전자	살균력	문헌
잣빛곰팡이 (<i>Botrytis cinerea</i>)	상추	침지	<i>Bmp1</i>	30% 포자발아 억제	Spada et al. (2023)
			<i>Pls1</i>	10% 포자발아 억제	
			<i>Bmp3</i>	98.5% 균사성장 억제	Spada et al. (2021)
균핵버섯 (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	상추	살포	<i>DCL1</i>	80% 병반감소	Qiao et al. (2021)
	케일			80% 병반감소	
	배추		toxin biosynthesis (SS1G_01703)	85% 병반감소	McLoughlin et al. (2018)
누룩곰팡이 (<i>Aspergillus niger</i>)	토마토	살포	<i>DCL1</i>	70% 병반감소	Qiao et al. (2021)
	사과			70% 병반감소	
	포도			80% 병반감소	
토마토위조반점 바이러스 (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)	고추	살포	N protein	50% 감염율감소	Nilon et al. (2021)
	담배		NSs protein	40% 병발생 억제	Konakalla et al.(2022)
			N protein	80% 병발생 억제	
			NSm protein	30% 병발생 억제	Tabein et al.(2020)
			N protein	99% 병발생 억제	

자료: 김용균(2017). "dsRNA를 이용한 해충방제 기술", 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

이를 보완하기 위한 제형화 기술로서 BioClay라는 담체를 이용하는 기술이 개발되었다. 즉, 이층 구조의 점토 입자를 사용하는 BioClay 제형화 기술은 야외 환경 조건에서 RNA 내구성을 향상시켜 살균 효과를 증대할 수 있다(Niño-Sánchez et al., 2022). BioClay를 이용한 살포용 dsRNA가 잣빛곰팡이병의 병원체인 *Botrytis cinerea* 균사 성장억제 효과검증에 적용되었다. BioClay로 제형화된 dsRNA는 비제형화 dsRNA와 비교했을 때 병 억제 기간을 늘려 토마토 잎에서는 1~3주, 토마토 열매에서는 5~10일로 각각 방제 효과기간을 연장시켰다.

dsRNA의 잡초 방제에 대한 분자 메커니즘이 명확하지 않지만, 현재 연구들은 살포된 RNAi가 기공 또는 세포간극을 통해 세포로 흡수되고, 식물체 내에서 세포 사이나 체관을 통해 전신으로 이동하여 관련 유전자 침묵 현상 및 비유전적 방식의 유전자 침묵 유도를 초래한다고 보고되어 있다(표 3.5)). 실제로 덩굴등골나무라는 외래 침입종 잡초에 분무 방식으로 식물의 광합성 과정에서 중요한 역할을 하는 엽록소 a/b 결합 단백질의 유전자 침묵을 유도하였더니 잡초가 노랗게 시드는 병징이 확인되었다(Mai et al. 2021).

〈표 3.5〉 dsRNA 농약 개발 대상 잡초 및 표적 유전자

대상 잡초	dsRNA 처리법	표적 유전자	제조 효과	문헌
당귀등골나무 (<i>Mikania micrantha</i>)	분무	Chlorophyll a/b binding protein 10	노랑게 시드는 병징	Mai et al. (2021)
		Chlorophyll a/b binding protein 36		
		Chlorophyll a/b binding protein7		
		Chlorophyll a/b binding protein		
		Chlorophyll a/b binding protein80		

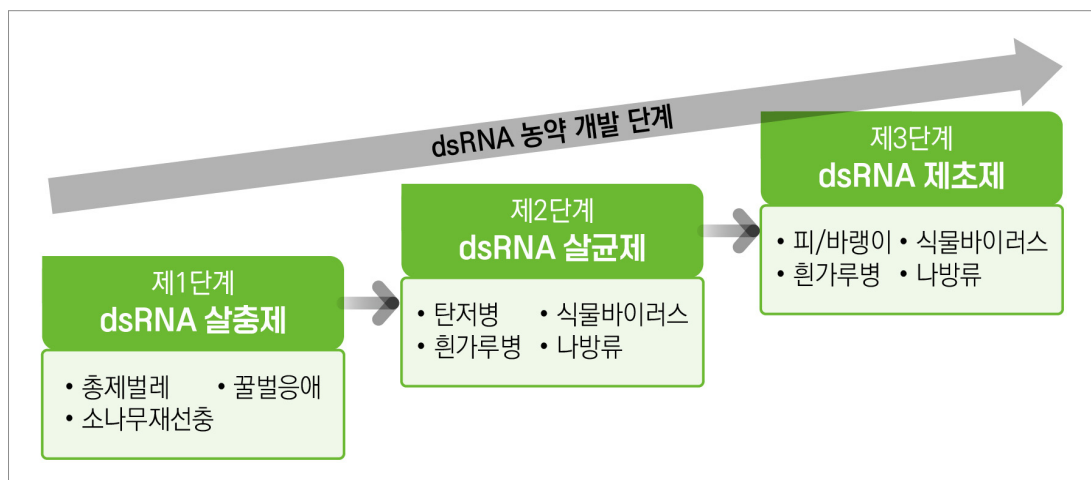
자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

이상의 dsRNA 농약 개발 R&D는 살충제, 살균제 및 제초제에 이르기까지 농약 시장 전 분야에서 이뤄지고 있다. 그러나 국내 연구진은 살충제에 주로 국한되어 있어, 살균제와 제초제에 대한 R&D도 늘려야 한다.

나) 개발방향

dsRNA 농약을 이용하여 방제해야할 대상 병해충은 가해에 따른 경제적 피해가 높은 고위험 병해충을 선발할 필요가 있다(〈그림 3.2〉). 또한 기존의 화학농약으로 방제가 어려운 난방제 병해충을 대상으로 dsRNA 농약을 개발할 필요가 있다. 특히 약제 저항성이 발달하여 기존의 사용 약제로 방제가 어려운 병해충을 대상으로 할 필요가 있다. 그리고 기존의 약제로 방제가 불가능했던 병해충을 dsRNA 농약 개발 대상으로 선발할 필요가 있다. 특히 식물병 바이러스의 경우는 방제 약제가 거의 전무한 상황에서 dsRNA는 효과적인 방제제로 개발될 수 있다.

〈그림 3.2〉 국내 dsRNA 농약 개발 단계



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

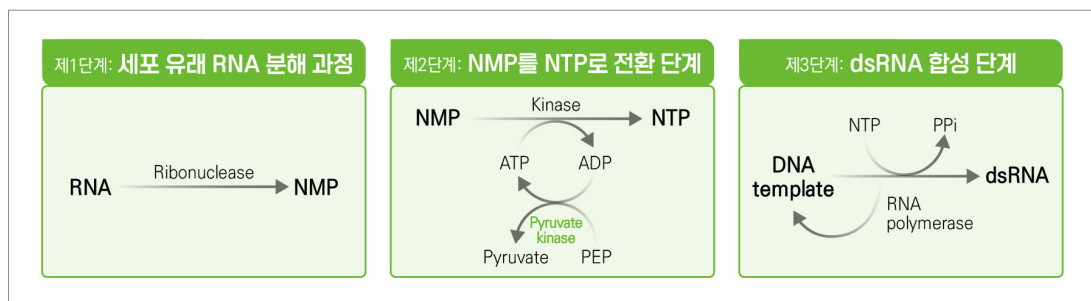
2) 저비용 dsRNA cell-free 대량생산 기술 R&D

가) 기술현황

dsRNA 생산은 시험관내 전사(In Vitro Transcription: IVT)를 기반으로 T7 RNA polymerase를 이용하여 NTP를 기질로 DNA template 대상으로 진행된다. 그러나 이러한 생산 방식은 소량 생산에 많은 비용이 소모된다. 이에 대한 대안으로 RNase III 효소 유전자를 제거한 HT115 대장균에서 T7 프로모터를 지닌 L4440 벡터를 통해 DNA template과 T7 RNA polymerase를 발현시켜 세균 세포에서 대량 생산하는 기술이 이용되었다. 그러나 이 세균을 이용한 대량생산은 낮은 생산효율의 한계를 가지며, 이렇게 생산된 dsRNA는 정제 과정에서 dsRNA의 불안정성과 높은 정제 비용으로 현실적 대안 기술이 되기 어려웠다. 또 다른 대안으로 cell-free dsRNA 합성 기술이 제안되었다(국제특허 WO 2016/160936 A1). 이를 기반으로 최근에 등록된 Ledprona가 dsRNA 농약을 3 g/L의 생산효율로 연간 3.5톤을 생산할 수 있게 되었다.

경제성을 바탕으로 둔 dsRNA 대량생산 기술의 원리는 합성 재료 가운데 하나인 NTP를 기존 세포에서 추출하여 IVT에 공급하는 IVT 방식의 바이오반응기로 크게 3단계로 구성된다.

〈그림 3.3〉 IVT 방식의 바이오반응기 단계



(1) 제1단계: 세포 유래 RNA 분해 과정

비교적 빠른 시간에 적은 비용으로 대량배양이 가능한 세균 또는 효모에서 RNA를 추출한다. 추출된 RNA는 RNA 가수분해효소를 통해 NMP로 분해하게 된다. 다음 단계를 위해 RNA 분해효소가 제거된다.

(2) 제2단계: NMP를 NTP로 전환 단계

대량으로 제공된 NMP가 RNA 합성에 이용되기 위해서는 다시 kinase의 촉매 반응으로 NTP로 전환되어야 한다. 이때 ATP가 필요하다. 사용된 ATP는 ADP로 전환되기에 pyruvate kinase가 phosphoenol pyruvate(PEP)를 기질로 pyruvate를 생성하면서 다시 ATP를 생성하게 된다.

(3) 제3단계: dsRNA 합성 단계

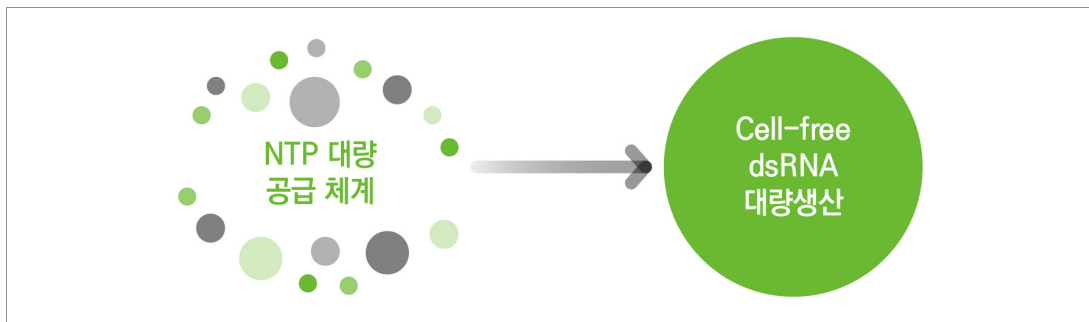
표적 DNA 주형을 대상으로 T7 RNA polymerase가 NTP를 이용하여 대량의 dsRNA를 생성하게 된다. 얻어진 dsRNA는 다시 RNA 추출로 순도 높은 dsRNA 농약을 제조하게 된다.

나) 개발 방향

이상의 기술이 산업화에 이용되려면 관련 기술 확보 및 생산 기반을 구축해야 한다. 이를 위해 다음(그림 3.4)의 기술 목표를 달성할 필요가 있다.

- 대장균 추출물에서 단위체(NMP) 분리 기술로서 0.4g/L 이상 생산 반응 조건 결정
- dsRNA 대량 합성 기술로서 최소 3g/L 이상의 반응 조건 결정
- 연중 dsRNA 대량 생산 바이오반응기 개발

〈그림 3.4〉 Cell-free dsRNA 대량생산 기술 단계



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

3) dsRNA 농약 제형화 기술 R&D

가) 기술현황

해충 방제를 위해 환경에 살포된 dsRNA의 화학적 안전성 및 체내로 이동이 용이한 제형화 기술이 dsRNA를 효과적인 살충제로 개발하는 데 요구된다. 크게 두 가지 전달 방법이 이용되고 있다.

첫째는 형질전환 작물을 통해 dsRNA를 생명체로 전달하는 방법이다. 이러한 종류의 첫 번째 제품이 2017년 6월 미국 규제 기관의 승인을 받았다. 이 형질전환체(MON87411)는 옥수수뿌리 해충인 *Diabrotica virgifera virgifera* (딱정벌레목: 잎벌레과)의 Snf7 단백질을 표적으로 하는 dsRNA를 발현한다. 생체막을 통한 단백질 수송에 관여하는 Snf7 유전자의 발현억제는 유충 사망률을 증가시키고 결과적으로 옥수수 뿌리 손상을 감소시켰다(Bolognesi et al., 2012). 특히 기존의 Bt 독소(Cry3Bb1) 생산 능력과 이 dsRNA 발현 특성이 결부되어 대상 해충의 방제를 극대화하였다.

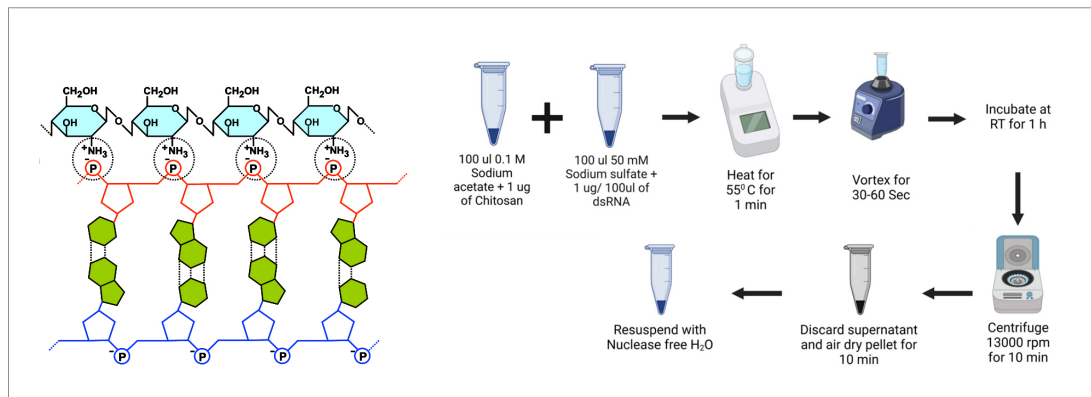
둘째로 dsRNA 자체 또는 제형화하여 직접 살포하는 형태이다. 미생물, 바이러스, 나노제형과 같은 매체를 통해 사용하거나 국소적으로 먹이 미끼(Zhou et al., 2008; Zhang et al., 2010)에 포함하여 살포하게 된다(San Miguel & Scott, 2016).

또한 dsRNA 농약에 대한 저항성을 억제하기 위한 제형화 기술이 요구된다. 중장에서 dsRNA의 분해를 억제하는 기술이 환경 RNAi의 효율을 증가하여 살충력을 높여줄 것이다. 예를 들어, 감자해충인 *L. decemlineata*의 경우 중장에서 생성되어 분비되는 두 가지 핵산분해효소의 발현을 억제하여 준 결과, 살충효과를 가진 dsRNA 처리에 대해서 중장 소화액에서 반감기를 늘려주고 RNAi 효율을 증가시키고 결국 살충효과를 현격하게 증가시켰다(Spit et al., 2017). 따라서 대상 해충의 중장에 분비되는 RNase의 종류를 파악하고 이들의 발현을 억제하거나 활성을 억제하는 기술이 dsRNA 살충제 개발의 중요한 방향이 될 수 있다.

나) 개발 방향

키토산 또는 BioClay를 이용한 나노제형화 기술이 요구된다. 키토산 제형은 전기적 인력에 의한 제형화 기술로서 dsRNA의 음극과 키토산의 아미노기의 양극 사이에 정전기적 인력에 기인된다(그림 3.5)). 제형화 기술로 비교적 재현성이 높아 이상적 dsRNA 제형화 기술이다. 그러나 dsRNA와 키토산 사이의 정량적 혼합 비율을 통해 이상적 제형화를 이루는 것이 핵심기술이 된다.

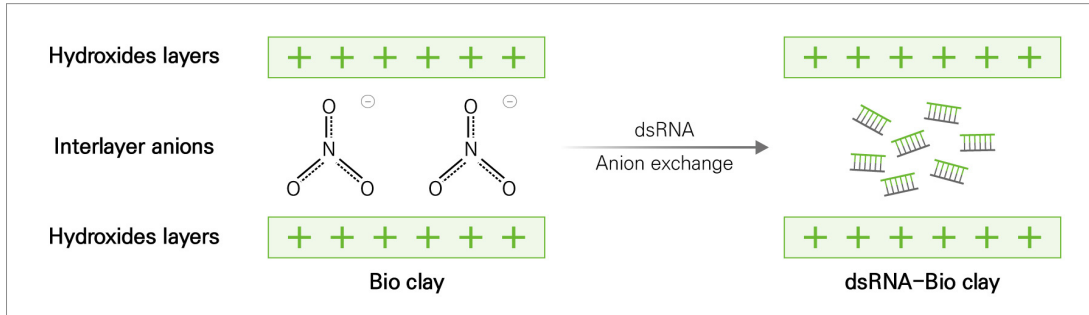
〈그림 3.5〉 dsRNA 키토산 제형화 기술



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

Bioclay 기술(그림 3.6))은 식물병 방제를 위한 제형화 기술로 살포된 dsRNA가 잎표면에서 오래 유지하거나 표피층을 지난 식물체 통도조직으로 침투하려는 목적으로 개발되어 다양한 dsRNA 처리 목적에 부합하는 제형이다.

〈그림 3.6〉 Layered-double hydroxide 개념의 dsRNA 제형화 기술

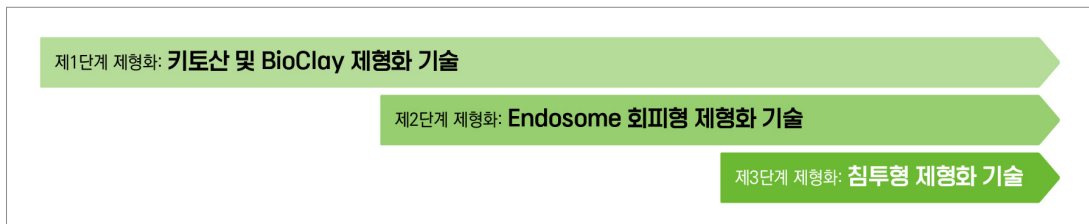


자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

기본적으로 키토산 제형화와 구분되는 것은 이중으로 dsRNA를 감싸는 형태로 제형화한다는 점에서 보다 안정적 구조로 여겨진다. 이를 기반으로 제형화 단계를 거쳐 dsRNA 농약을 제조하게 된다.

모기 유충 방제의 경우에서처럼, 세균 또는 이스트 발현시스템에서 생산된 dsRNA의 수중 분해 작용을 억제하고 먹이원으로 섭취할 수 있게 한다(Airs & Bartholomay, 2017). 모기와 꿀벌을 대상으로 Bait 처리용 제형화 기술 개발이 필요하다(〈그림 3.7〉).

〈그림 3.7〉 개발 단계별 dsRNA 제형화 기술 R&D 전략



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

4) dsRNA 농약 위해성 평가 R&D

가) 기술 현황

dsRNA 인축독성은 Petrick et al.(2016)이 진행한 상용화된 DvSnf7에 대한 dsRNA 평가에서 볼 수 있다. 이 연구의 단계는 다음과 같다.

- 우선 서열 기반 유사 유전자를 기반으로 독성의 작용점을 분석하였다.
 - 마우스를 대상으로 경구 독성을 진행하였다.
 - 이를 통해 체중 변화에서 조직변화까지 기존의 화학농약 독성 분석과 동일하게 진행하였다.
- dsRNA 생태 독성은 Bachman et al.(2016)이 진행한 상용화된 DvSnf7에 대한 연구 진행은 다음과 같다.

- 대상 생명체: 포식성 및 기생성 천적, 화분매개충, 토양 미생물, 설치류
- 추정 모수: MEEC(Maximum Expected Environmental Concentration)로서 식품 또는 토양에 존재할 수 있는 최대 허용량을 산출하여 이를 기준으로 실제 dsRNA 존재량과 비교하여 독성 평가에 이용된다.

국내에서도 2017년 국립생태원에서 서양꿀벌에 대한 dsRNA의 급성섭식독성 평가를 진행하였다(Lim et al., 2017). 여기서 사용된 dsRNA는 미국에서 최근 상용화된 SMARTSTAX PRO에 삽입된 dsRNA 시퀀스로, 서부옥수수뿌리벌레(WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* Leconte)를 방제하기 위해 옥수수에 발현시킨 dsRNA이다. 생태원에서는 이 dsRNA를 대량 발현시켜 꿀벌에 유해성평가를 시험해 본 결과 꿀벌성충에 급성섭식으로 처리 시 유해하지 않음을 확인할 수 있었다.

나) 개발 방향

인축독성에 대한 위해성 평가법 개발은 기존의 화학농약 독성 평가와 동일한 방법으로 진행되지만, 특별히 면역반응과 같은 직접 치사효과는 없고 기타 건강에 영향을 주는 종말점을 중심으로 위해성을 평가한다(〈그림 3.8〉).

생태독성 평가는 비표적 무척추동물 및 척추동물에 대한 영향평가를 포함한다. 특별히 천적을 포함한 다양한 무척추동물과 미생물에 대한 영향 평가가 폭 넓게 적용될 필요가 있다. 이는 곤충류, 기타 절지동물류, 설치류, 어류에 대한 서식지별 대표 생명체를 선발하여 평가할 필요가 있다. 또한 토양 미생물에 대한 영향 평가도 포함된다. 그리고 생태독성 평가에 이용되는 국내 대상 생명체에 대한 유전체 정보 분석이 필수적이므로, 이들에 대한 유전체 정보 분석이 이뤄져야 한다.

〈그림 3.8〉 dsRNA 위해성 평가 기술 영역



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

나. dsRNA 농약 산업화 현안 과제

최근 국내 농업 생산량에 위협을 주는 고위험군으로 바이러스를 매개하는 총채벌레류, 산림에 피해를 주는 소나무재선충 및 양봉 산업에 피해를 주는 꿀벌응애에 대한 방제 우려가 커지고 있다.

이들에 대한 연구 사례도 국내외로 진행되어 dsRNA 농약 개발 및 성공 확률이 높이는 이들을 중심으로 산업화를 시도하는 것이 새로운 방제제에 대한 의미를 갖게 한다.

1) 총채벌레 방제용 dsRNA 농약 개발

가) 기술 현황

약 7,000 종 이상의 총채벌레는 대다수가 화분매개충 등의 환경에 유리한 생명체이다. 그러나 이 가운데 일부가 해충으로 작물에 피해를 주고 있다. 특히 꽃노랑총채벌레, 대만총채벌레 그리고 파총채벌레가 직접적 피해는 물론이고 TSWV 바이러스를 매개하여 작물 피해를 가중시키고 있다.

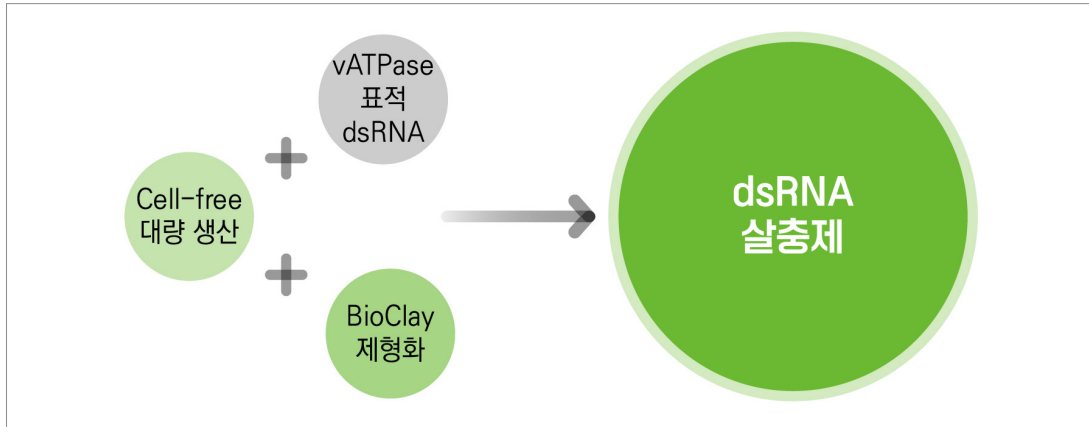
다양한 유전자에 대한 dsRNA 스크리닝 분석 결과 Snf7 및 vATPase 유전자에 대한 dsRNA가 살충력이 높은 것으로 판명되었다. 총채벌레 섭식을 통한 실내 RNAi 효과는 거의 100%에 이르지만, 야외 조건에서는 이러한 방제 효과가 현격하게 떨어졌다. 주된 이유가 야외 조건에서 낮은 화학적 안정성이 문제였다.

이를 해결하기 위해 키토산을 이용한 제형화가 이뤄졌다. 이러한 제형화는 자외선과 같은 조건에서 화학적 안정성을 유지하였다. 또한 총채벌레 장내 dsRNase와 같은 분해효소에 대해서도 저항성을 나타냈다. 현재 이 기술은 산업화를 이루기 위해 가장 현실적으로 실효성이 높은 대상 해충으로 간주되고 있다.

나) 개발 방향

Cell-free dsRNA 대량 생산 기술이 필요하다(그림 3.9)). 이를 통해 값싼 dsRNA를 대량 생산하여 산업화의 핵심기술을 이뤄야 한다. 키토산 제형화에 더불어 보조제의 첨가가 필요한데, 특히 전착제 첨가를 통해 잔효성을 높이는 기술이 필요하다. 그리고 주요 총채벌레에 대한 dsRNA 혼합제 개발이 필요하다. 이는 너무 좁은 작용 스펙트럼을 넓혀 시장성을 높여주게 된다. 또한 비표적 생명체에 대한 환경영향 평가가 실시되어야 하며, 천적 및 화분매개충 그리고 환경 미생물상에 대한 영향평가 이뤄져야 한다.

〈그림 3.9〉 총채벌레 방제용 dsRNA 살충제 개발 R&D 추진 전략



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

2) 소나무재선충 방제용 dsRNA 농약 개발

가) 기술 현황

소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)은 소나무와 유사 수종에 치명적 병원체로서 소나무시들음 병을 유발한다. 매개충인 솔수염하늘소가 1980년대 말에 일본으로부터 침입하여 부산 동래지역에서 감염 나무가 첫 발견된 이래 전국적으로 확산되었다.

RNA 간섭(RNAi)은 *B. xylophilus*를 포함한 선충류의 유전자 기능 연구에 유용하였다. 특히 단순한 dsRNA 용액에 침지하는 기술이 개발되어 이 기술을 이용한 기능 연구에 큰 도움을 주었다. 이 침지 기술은 다음과 같다.

- ① PCR을 통해 T7 프로모터를 표적 단편의 5'-말단에 연결하고, *in vitro* transcription 반응을 통해 dsRNA를 합성한다.
- ② 합성 신경자극제(예, resorcinol)와 혼합된 dsRNA 용액에 선충을 침지시킨다. 즉, 선충의 2령 약충(약 20,000개체)을 dsRNA(0.8 μ g/mL) 완충액에 25℃ 암실에서 24시간 동안 침지시킨다.
- ③ 처리된 선충은 다시 잣빛곰팡이(*Botrytis cinerea*)를 배양한 한천배지에 옮겨 발육을 유도한다.
- ④ 일정 발육을 진행시킨 후 표적 유전자 발현량을 대조구와 비교하여 qPCR로 분석한다.

이상의 침지법 기술을 통해 다양한 소나무재선충 유전자를 대상으로 dsRNA의 효과를 분석하였다(〈표 3.6〉).

〈표 3.6〉 소나무재선충 방제에 대한 기초 연구 자료

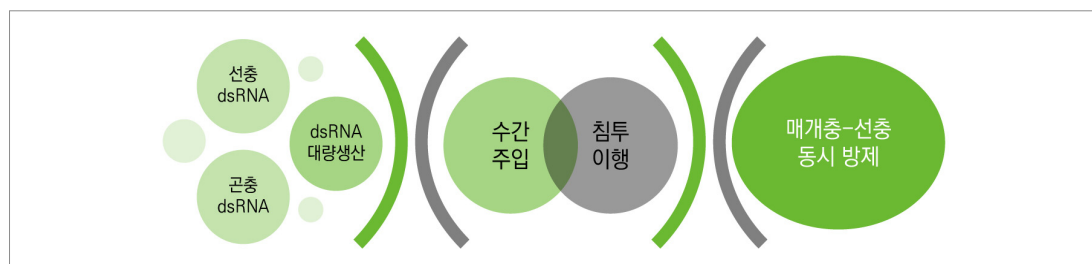
dsRNA 처리기술	표적 유전자	방제효과	참고문헌
침지	Pectate lyase 1	대조구 대비 자손 수 62배 감소	Qiu et al.(2016)
침지	Thaumatococin-Like Protein-1	33.3% 방제가	Meng et al.(2019)
침지	myosin heavy chain	약 32% 방제가	Park et al.(2008)
침지	tropomyosin		
침지	heat shock protein 70		
침지	cytochrome C		
침지	Glutathione S-transferases 12	약 90 이상 방제가	Hao et al.(2023)
침지	Glutathione S-transferases 40		
침지	Glutathione S-transferases 12 & 40		
침지	Cytochrome P450-33C9	99.9% 방제가	Qiu et al.(2019)
침지	major sperm proteins 10	66.4% 방제가	Huang et al.(2019)
침지	Cytochrome P450-33C9	13.7% 생식력 감소	Xu et al.(2015)
침지	Cytochrome P450-33C4	31.5% 생식력 감소	
침지	Cytochrome P450-33D3	20.5% 생식력 감소	
침지	Cathepsin L-like Cysteine Proteinase-1	30% 생식력 감소	Xue et al.(2019)
침지	Cathepsin L-like Cysteine Proteinase-2		
침지	Cathepsin L-like Cysteine Proteinase-3		
침지	Uridine diphosphate (UDP)-glycosyltransferases	33.4 % 재선충병 감소	Wang et al.(2022)

자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

나) 개발 방향

소나무 수간 주입형 dsRNA 농약을 개발한다. 이를 위한 제형화 기술이 요구된다(〈그림 3.10〉). 대상 유전자 선발 - CYP(cytochrome P450) 유전자를 대상으로 소나무재선충에 대한 dsRNA를 선발할 필요가 있다. 아울러 솔수염하늘소에 대한 유효한 dsRNA를 혼합 처리하여 매개충과 병원체를 동시에 방제하는 개발 방향을 설정할 필요가 있다.

〈그림 3.10〉 소나무재선충 방제용 dsRNA 농약 개발을 위한 R&D 추진 전략



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

3) 꿀벌응애 방제용 dsRNA 농약 개발

가) 기술 현황

전 세계적으로 주요 식량 작물 가운데 70%가 화분 매개충인 꿀벌에 의해 수분이 이뤄지고 있다(Klein et al., 2018). 따라서 꿀벌 화분매개에 의한 경제적 기여 가치는 약 145억 달러에 이르는 것으로 추산되고 있다. 2016년 미국 양봉업계에 따르면 꿀벌의 화분 매개에 의한 미국 내 총 수익은 4,111억 원으로 집계되었으며, 국내의 꿀벌에 의한 경제적 가치는 주요 과수작물과 과채류 작물 생산의 50% 이상으로 약 6조 원에 이를 것으로 추산된다(Jung, 2008). 그러나 2006년에 비롯된 봉군붕괴증상(Colony Collapse Disorder: CCD)은 막대한 경제적 피해를 주고 있다. CCD는 미국 플로리다주에서 발생한 이후 유럽과 남미 등 전 세계적으로 퍼져가고 있으며, 이에 대한 원인은 병해충, 농약, 기후변화, 장수말벌 등 다양한 요인들의 상호작용으로 나타나고 있다.

국내 양봉은 서양꿀벌(*Apis mellifera* L.)과 동양꿀벌(*Apis cerana* F.)이 차지하고 있다. 특히 동양꿀벌은 서양꿀벌 보다 국내 환경에 오랜 적응단계를 거치면서 특화된 냄새 감지 능력으로 국내 밀원을 이용하는 능력에서 국내 식물 생태계의 안정적인 화분매개자로서의 기능은 물론이고 각종 병해충에 대하여 높은 저항성을 보이고 있다(Jayakodi et al., 2015).

dsRNA를 이용한 꿀벌병 억제제의 국내 연구를 살펴보면 낭충봉아병 바이러스인 SBV의 외피단백질인 vp1(Major capsid protein Virion Protein 1)과 RdRp(RNA dependent RNA polymerase) 유전자의 염기서열 일부분을 표적으로 하여, 이들 유전자의 일부 절편에 해당하는 cDNA를 L4440 플라스미드 벡터에 클로닝하고 HT115 (DE3) 대장균 균주에 형질전환한 후 배양하여 dsRNA의 대량생산을 진행하였다. 이같이 생산된 dsRNA를 바이러스 억제제로써 사용하기 위해 성충 일벌에게 24시간 동안 총 3×10^7 copy의 바이러스를 경구 접종하고 96시간 경과 후의 바이러스 증식을 qPCR로 확인한 결과, 바이러스의 농도가 약 6배 감소한 것으로 확인하였다. 농도별 바이러스 억제의 차이를 확인하기 위해 $1.2\mu\text{g}/\text{일}$ 및 $4.8\mu\text{g}/\text{일}$ 의 농도로 vp1 dsRNA를 투여한 재래꿀벌 간의 SBV 검출량은 약 9.6배의 차이를 보여, 투여된 dsRNA의 양과 바이러스 억제에는 상관관계가 있었다.

꿀벌 질환 가운데 바이러스병과 외부 기생자인 바로아응애에 대한 방제효과가 검증되었다(〈표 3.7〉).

〈표 3.7〉 꿀벌 질환 병원체 방제에 대한 기초 연구 자료

꿀벌 병원체	dsRNA 처리법	표적 유전자	방제력	문헌
Bombus terrestris Israeli acute paralysis virus	살포	calmodulin	생존율 10% 증가	Piot et al.(2015a)
		VP586	바이러스병 80% 감소	Piot et al.(2015b)
		VP443		
		VP293		
바로아응애 (<i>Varroa destructor</i>)	살포	calmodulin	26% 응애 방제효과	Krishnan et al.(2021)
	섭식	allatostatin	85% 응애 방제효과	Campbell et al.(2016)
		CHH-like gene	55% 응애 방제효과	

자료: 김용균(2017). "dsRNA를 이용한 해충방제 기술", 한국응용곤충학회지, 56, 153-164.

나) 개발 방향

dsRNA의 중간 이행 성질(<그림 3.11>)을 이용한 바로아응애에 대한 선택적 dsRNA 농약을 개발한다.

〈그림 3.11〉 꿀벌에 처리된 dsRNA가 바로아응애로의 중간 수평 이동



자료: 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.

꿀벌 먹이를 통해 전달되기 위한 제형화 기술이 필요하다. 이때 다양한 꿀벌 바이러스에 대한 dsRNA를 혼합 처리하여 매개충과 병원체를 동시에 방제하는 개발 방향을 설정할 필요가 있다.

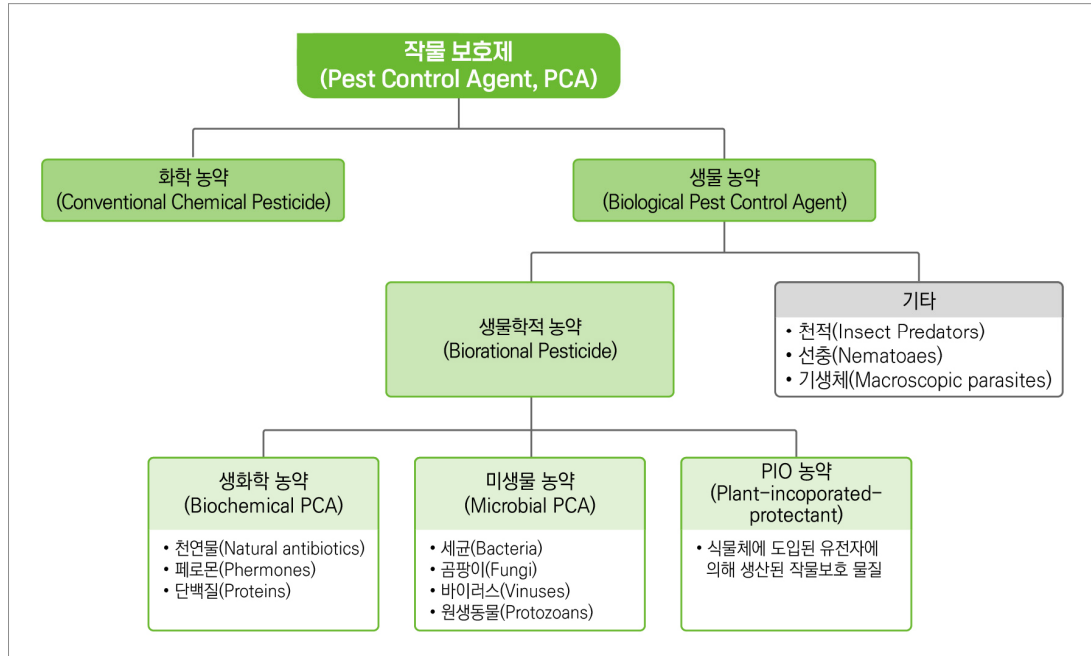
02 차세대 dsRNA 농약의 신규 법제화 및 산업화 촉진

가. 미국 및 대한민국의 농약관리법 상이점

1) US EPA의 농약 분류체계, 등록절차 및 시험성적서 요구사항

미국의 농약(작물보호제, Pest Control Agent: PCA)은 화학농약과 생물농약으로 분류된다(<그림 3.12>). 생물농약은 EPA 규제와 관련된 기본지침인 40CFR158.2121(U.S Federal Register 2007)과 EPA Series 885 미생물농약 지침서에 따라 관리된다. 생물농약은 다시 생물학적 농약(Biorational pesticide)과 천적 등 기타 항목으로 분류되며 이 중 생물학적 농약은 병해충 방제기능을 갖는 생화학물질(생화학 농약), 미생물(미생물 농약), 또는 유전자 도입기술이 적용된 식물(Plant Incorporated Protectant: PIP) 등을 소재로 제조된 활성물질 혹은 제품으로 정의된다. 여기에 살아있는 유전자변형생물체(Living Modified Organism: LMO) 식물의 병해충방제 기능성 유전자는 원칙적으로 포함하고 있으나, 별도 규정을 두고 따로 등록심사를 받도록 규정하고 있다.

〈그림 3.12〉 미국 EPA에 의한 농약 분류체계



자료: 경상국립대학교 산학협력단(2023). 국내외 생물농약 개발현황 및 평가체계 조사, 경상국립대학교.

미국 GreenLight Biosciences Inc.의 살포용 dsRNA 농약(Calantha)은 생화학 농약에 준해 평가되었으며 US-EPA에서 규정한 생화학물질의 규정은 다음과 같다.

- 천연에서 얻을 수 있거나, 동등한 구조와 기능을 갖는 물질
- 사람과 환경에 대한 노출 독성이 거의 없는 물질 혹은 합성유래 생화학물질의 경우에도 천연물질과 동등한 사용노출 정보를 가질 것
- 대상 생물(병해충)에 대해 무독성 작용기작을 가질 것
- 페로몬 등 신호화학물질류

생물농약 제품을 등록하기 위해서는 활성물질(AI) 및 제형과 관련된 효능 및 인축독성, 환경독성, 잔류독성, 내성 발생 등의 데이터가 포함된 자료가 필요하며 독성이 확인될 경우 이와 관련된 자료 또한 제출되어야 한다. 제품을 등록하기 위한 데이터를 확보하는 과정에는 최종 제품(EP)을 사용하여 시험해야 하며 일부 사항에서는 대체를 통해 연구 결과를 확보하거나 면제 사유를 제출해야 한다. 유전자변형 미생물의 경우 유전자변형 사용기술, 삽입 혹은 결손유전자 염기서열 및 제한효소지도, 해당 유전자의 제어특성 정보, 유전적 안정성 및 교환성, 특정 Tier II 조건에서의 환경 발현성 및 독성평가와 관련한 추가 요구 자료를 제출해야 한다.

US-EPA는 BPPD(Biopesticides and Pollution Prevention Division)라고 하는 생물농약 전담조직을 두고 있으며, 등록심사서류 제출 전 기업은 BPPD와의 사전 미팅 후 심사서류를 제출하며, 서류제출 후 심사기간은 12~18개월로 규정하고 있다. 생물농약 관련 규정은 OCSPP¹⁾와 OPPTS²⁾가 있으며 테스트 지침은 OCSPP를 사용한다.

2) 국내의 농약 분류체계, 등록절차 및 시험성적서 요구사항

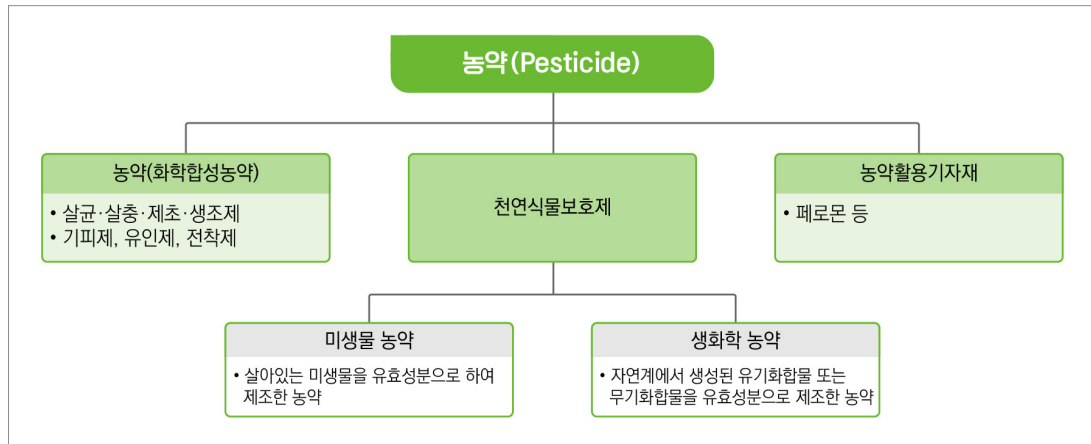
국내의 농약은 농약관리법에 따라 농약, 천연식물보호제, 농약활용기자재로 분류된다(〈그림 3.13〉). 농약은 농작물을 해치는 병해충을 방제하는 데에 사용하는 살균·살충·제초제 및 생리기능을 조절하는 생조제, 기타 기피·유인·전착제가 포함된다. 천연식물보호제에는 살아있는 미생물을 유효성분으로 하여 제조한 미생물 농약과 자연계에서 생성된 유기화합물 또는 무기화합물을 유효성분으로 제조한 생화학 농약이 포함된다. 마지막으로 농약활용기자재는 농약을 원료나 재료로 하여 농작물 병해충의 방제 및 농산물 품질관리에 이용하는 자재 및 살균·살충·제초·생조 효과를 나타내는 물질이 발생하는 기구 또는 장치가 해당된다.

농약은 병해충 및 잡초 방제의 목적에 효과가 있어야 하며, 사람, 환경, 작물에 부작용이 없도록 평가관리하고 있다. 국내의 농약 등록을 위한 평가체계는 원제 및 품목으로 구분하여 시행하고 있다. 농약회사는 원제를 등록하기 위하여 총 39항목의 시험성적서를 제출해서 안전성을 입증해야 하며, 세부적으로 ‘이화학’ 8항목[① 이화학분석성적서, ② 제조공정도, ③ 주부성분 규격, ④ 원제초록, ⑤ 공급증명서, ⑥ 원제시료, ⑦ 밀도 등 이화학분석 성적서, ⑧ 물리적 위험 성적서], ‘인축독성’ 19항목[① 급성 경구독성, ② 급성 경피독성, ③ 급성 흡입독성, ④ 피부 자극성, ⑤ 안점 막자극성, ⑥ 피부 감작성, ⑦ 급성 신경독성, ⑧ 급성 지발성 신경독성, ⑨ 90일 반복투여 경구독성, ⑩ 21일 또는 28일 반복투여 경피독성, ⑪ 90일 반복흡입독성, ⑫ 90일 반복투여경구 신경독성, ⑬ 28일 반복투여 경구 지발성신경독성, ⑭ 만성 반복투여경구독성, ⑮ 발암성, ⑯ 번식독성, ⑰ 기형독성, ⑱ 유전독성(복귀돌연변이, 염색체 이상, 소핵)], ‘환경생태독성’ 8~14항목[1단계: ① 어류급성독성(담수어), ② 물벼룩급성독성, ③ 녹조류생장저해, ④ 조류급성독성(경구, 섭식), ⑤ 지렁이급성독성, ⑥ 꿀벌급성독성, ⑦ 어류생물농축성, ⑧ 천적 또는 누에 급성독성; 2단계: ① 어류생활사독성, ② 물벼룩번식독성, ③ 조류번식독성, ④ 지렁이 번식독성]을 구성하고 있다.

1) OCSPP: SCA(독성물질관리법), FIFRA(연방 살충제, 살균제 및 쥐약법) 및 FFDCA(연방 식품, 의약품 및 화장품법)에 따라 규제 결정에 필요한 데이터를 제공하고자 승인된 과학적 방법론 및 절차 개요.

2) OPPTS: PPT에 있었던 시험 지침 및 요구사항과 연방 규칙(CFR) 제40장 1부 하단 R 부분, 미국 기술 정보 서비스(NTIS)의 출판물에 있었던 농약 프로그램 사무소(OPP), 경제 협력 개발 기구(OECD)에서 지침을 결합하여 개발한 시험지침.

〈그림 3.13〉 국내 농약관리법에 의한 농약 분류체계



자료: 농촌진흥청

농약회사는 원제 등록 이후에 품목을 등록하기 위하여 총 40항목의 시험성적서를 제출해서 안전성을 입증해야 하며, 세부적으로 ‘이화학’ 8항목[① 이화학분석성적서, ② 제조공정도, ③ 주부성분규격, ④ 원제초록, ⑤ 공급증명서, ⑥ 원제시료, ⑦ 밀도 등 이화학분석 성적서, ⑧ 물리적 위험 성적서], ‘인축독성’ 6항목[① 급성 경구독성, ② 급성 경피독성, ③ 급성 흡입독성, ④ 피부 자극성, ⑤ 안점막자극성, ⑥ 피부감작성], ‘생태독성’ 2~6항목[1단계: ① 어류 급성독성(담수어, 미꾸리), ② 물벼룩 급성독성; 2단계: ① 미꾸리 야외포장, ② 꿀벌엽상잔류독성, ③ 누에잔류독성, ④ 천적반야외; 3단계: ① 물벼룩 모의생태계, ② 조류 야외, ③ 조류 농축성, ④ 지렁이 야외, ⑤ 꿀벌 야외, ⑥ 천적 야외], ‘작물잔류’ 3항목[① 작물체 중 대사시험, 해당작물 잔류성 시험(대사물 포함), ② 저장안정성 시험, ③ 분석법(표준품)], ‘환경잔류’ 5항목[① 토양잔류시험(실내, 포장; 토양 2종; 대사물 포함), ② 수중 잔류성 시험, ③ 가수분해성 시험, ④ 수중 광분해성 시험, ⑤ 수계 분해성], ‘작물 약효’ 3항목[① 살균제, 살충제: (신규) 3 포장, (적용확대) 2 포장, ② 제초제: (신규) 5포장, (적용확대) 4 포장, ③ 생장조정제: 2 포장], ‘작물약해’ 3항목[① 살균제, 살충제: (등록시험) 신규 3포장, (적용확대) 2 포장→품종별 약해시험 별도, 혼용가부 약해, 주변작물 약해, ② 제초제: 신규 5 포장, (적용확대) 4 포장, 지역적응성시험: 5개 지대별, 후작물 약해시험: 농도별→품종별 약해 시험 별도, ③ 생장조정제: 2 포장 시험]을 구성하고 있다.

참고 1 농약 정의에 대한 한국과 미국 비교

농약관리법 (제2조)		FIFRA (SEC.2.[7 U.S.C 136] 및 e-CFR40 150조 제158항/제174항)	
구분	정의	구분	정의
농약	가. 농작물을 해치는 병해충을 방제하는 데에 사용하는 살균제·살충제·제초제 나. 농작물의 생리기능을 증진하거나 억제하는 데에 사용하는 약제 다. 그 밖에 농림축산식품부령으로 정하는 약제 (기피제, 유인제, 전착제)	Conventional pesticides	① 병해충·잡초를 방제(예방, 고사, 기피, 억제)에 사용하는 단일약제 및 혼합약제 (Any substance or mixture of substances intended for preventing, destroying, repelling, or mitigating any pest.) ② 식물생장조절제, 낙엽제(고엽제), 건조제로 사용하는 단일약제 및 혼합약제 (Any substance or mixture of substances intended for use as a plant regulator, defoliant, or desiccant.) ③ 질소억제제(Nitrogen stabilizer)
천연 식물 보호제	가. 진균, 세균, 바이러스 또는 원생동물 등 살아있는 미생물을 유효성분으로 하여 제조한 농약	Microbial pesticides	① 병해충·잡초를 방제(예방, 고사, 기피, 억제)에 사용하거나, 식물생장조절제, 낙엽제(고엽제), 건조제로 사용하는 살아있거나 죽은 미생물제제(진핵미생물, 원핵미생물, 바이러스) (A microbial agent intended for preventing, destroying, repelling, or mitigating any pest, or intended for use as a plant regulator, defoliant, or desiccant.)
농약 활용 기자재	나. 자연계에서 생성된 유기화합물 또는 무기화합물을 유효성분으로 하여 제조한 농약 가. 농약을 원료나 재료로 하여 농작물 병해충의 방제 및 농산물의 품질관리에 이용하는 자재 나. 살균·살충·제초·생장조절 효과를 나타내는 물질이 발생하는 기구 또는 장치	Biochemical pesticides	① Biochemical pesticide - 자연계(생물 또는 무생물)에서 생성된 물질 또는 그것과 구조적으로 유사하고 기능적으로 동일한 약제 (Is a naturally-occurring substance or structurally-similar and functionally identical to a naturally-occurring substance) - 인간과 환경에 최소한의 독성을 나타내는 것으로 증명된 물질 또는 자연계(생물 또는 무생물) 생성된 물질과 동등한 독성의 이력을 가진 합성유래 생화학 농약 (Has a history of exposure to humans and the environment demonstrating minimal toxicity, or in the case of a synthetically-derived biochemical pesticides, is equivalent to a naturally-occurring substance that has such a history) - 표적해충에 대해 무독성 작용방식을 갖음 (Has a non-toxic mode of action to the target pest(s)) ② Pheromone - 같은 종의 다른 개체들의 행동을 조절할 수 있는 생물이 생성한 화합물 또는 그것과 구조적으로 유사하고 기능적으로 동일한 합성 유래 약제 (A Pheromone is a compound produced by a living organism or is a synthetically derived

농약관리법 (제2조)		FIFRA (SEC.2.[7 U.S.C 136] 및 e-CFR40 150조 제158항/제174항)	
구분	정의	구분	정의
농약 활용 기자재	가. 농약을 원료나 재료로 하여 농작물 병해충의 방제 및 농산물의 품질관리에 이용하는 자재 나. 살균·살충·제초·생장조절 효과를 나타내는 물질이 발생하는 기구 또는 장치	Biochemical pesticides	substance that is structurally similar and functionally identical to a naturally-occurring pheromone, which, alone or in combination with other such compounds, modifies the behavior of other individuals of the same species.)
-	-	Plant- incorporated protectant (PIP)	① 식물이 함유한 보호제는 변형된 식물에서 생성된 살생물 물질 또는 유전물질(불활성 성분 포함) (Plant-incorporated protectant means a pesticidal substance that is intended to be produced and used in a living plant, or in the produce thereof, and the genetic material necessary for production of such a pesticidal substance. It also includes any inert ingredient contained in the plant, or produce thereof.)

자료: 농촌진흥청의 농약관리법과 미국 환경보호청(US EPA)의 FIFRA 기반으로 작성.

참고 2 원제 등록 시 평가대상 시험성적 종류

- 시험성적은 모두 일률적으로 평가되는 것이 아니라, 농약의 특성, 사용 용도 등에 따라 제출이 면제될 수 있음 (세부기준은 농촌진흥청 고시로 규정)

분야	시험성적(화학농약)	시험성적(천연식물보호제)		시험 대상	dsRNA 고려사항
		유효성분: 살아있는 미생물	유효성분: 자연계에서 생성된 유기·무기화합물		
이화학	1. 이화학적 분석 (분석방법 포함) * 원제의 <u>이화학적 성질·상태</u> 에 관한 자료 * 이화학적 <u>분석성적서</u> (조성비가 0.1% 이상인 그 밖의 성분은 모두 분석, 미동정 2%까지 허용) * 품질보증 기준, 분석법 등을 제시	1. 이화학적 분석 (분석방법 포함) * 유효미생물의 기원, 함량, 분석방법 및 동정자료 (DNA sequence 등), 유효미생물 이외의 오염 미생물 함량 및 허용수준에 대한 객관적 근거자료, 유전자 조작미생물의 경우 삽입균주와의 분리정량 방법 및 삽입유전물질의 검출법 등 제출	1. 이화학적 분석 (분석방법 포함) * 세부기준은 농약에 준하여 평가됨	원제자체	기원, 생산방법, 공정분석법 (표준품 포함), 불순물 등 *GMO는 화학농약 수준 평가
인축 독성	2. 인축 독성 시험 ① 급성경구독성 ② 급성경피독성 ③ 급성흡입독성 ④ 피부부식성 ⑤ 피부자극성 ⑥ 안구부식성 ⑦ 안점막자극성 ⑧ 피부감작성 ⑨ 급성신경독성 ⑩ 급성지발성신경독성 ⑪ 90일 반복투여 경구독성 ⑫ 21일 또는 28일 반복투여 경피독성 ⑬ 90일 반복흡입독성 ⑭ 28일 반복투여 신경독성 ⑮ 28일 반복투여 경구지발성 신경독성 ⑯ 만성반복투여경구독성 ⑰ 발암성 ⑱ 번식독성 ⑲ 기형독성 ⑳ 유전독성 ㉑ 동물체내 대사시험	2. 인축독성 시험성적서 [1단계] ① 급성경구독성/병원성시험 ② 급성경피독성 ③ 급성호흡기투여독성/병원성시험 ④ 급성정맥내 독성/병원성시험 ⑤ 면역독성 ⑥ 세포배양 [2단계] ① 반복투여경구독성 ② 유전독성 [3단계] ① 번식수정영향독성 ② 만성반복투여경구독성 ③ 발암성 ④ 유전독성 ⑤ 직업병노출성 사고사례	2. 인축독성 시험성적서 [제1단계] ① 급성 경구 독성 ② 급성 경피독성 ③ 급성 흡입 독성 ④ 안점막자극성 ⑤ 피부자극성 ⑥ 피부감작성 ⑦ 90일 반복 투여경구독성 ⑧ 21일 반복 투여경피독성 ⑨ 90일 반복 흡입독성 ⑩ 유전독성(2종 이상의 In vitro) ⑪ 기형독성 ⑫ 면역독성 ⑬ 직업병노출성(과민성노출사례) [제2단계] ① <u>유전독성(소핵 등)</u> ② <u>면역반응</u> [제3단계] ① <u>만성반복경구투여독성</u> ② <u>발암성</u>	원제× 실험동물* *실험동물: 래트, 마우스, 토끼, 기니피그, 달, 포유류, 피부모델 등	화학농약은 일괄 평가, 천연식물보호제는 개발비용 최소화를 위해 단계 평가(Tier) 사람·가축에 안전하다고 인정되는 경우에는 일부 면제 가능 독성우려 불순물(부성분)에 대한 독성시험이 요구될 수 있음

분야	시험성적(화학농약)	시험성적(천연식물보호제)		시험 대상	dsRNA 고려사항
		유효성분: 살아있는 미생물	유효성분: 자연계에서 생성된 유기·무기화합물		
인축 독성		1단계시험결과 독성영향이 관찰된 시험종으로 2,3단계 시험 하는 것을 권장. 또한, 1단계 및 2단계 시험성적 검토결과 3단계 만성반복투여경구독성시험에서 다른 시험종의 시험성적을 추가로 요구 가능	1단계 및 2단계 시험성적 검토결과에 따라 3단계 만성반복투여경구독성시험에서 다른 시험종의 시험성적을 추가로 요구 가능		
환경 생물 독성	3. 환경생물독성 시험성적서 [1단계] ① 담수어류급성독성 ② 물벼룩 급성독성 ③ 녹조류 생장저해 ④ 조류(鳥類) 급성독성(경구,섭식) ⑤ 지렁이 급성독성 ⑥ 꿀벌 급성독성(섭식,접촉) ⑦ 어류 생물농축성 ⑧ 천적 또는 누에 급성독성 [2~3단계] 1단계 평가결과 일정 수준의 위해성이 있을 경우 추가 평가 (번식독성, 야외시험 등)	3. 환경생물독성 시험성적서 [1단계] ① 담수어류영향 (병원성/감염성평가 포함) ② 담수무척추동물 영향 ③ 조류 영향 (병원성/ 감염성평가 포함) ④ 꿀벌 영향 (병원성/ 감염성평가 포함) ⑤ 토양미생물 영향 [2단계] 표적외 곤충 영향	3. 환경생물독성 시험성적서 [1단계] ① 조류 급성독성 ② 담수어류 영향 ③ 조류담수무척추 동물 영향 ④ 적용 외 식물 영향 ⑤ 표적외 곤충 영향 [2~3단계] 환경중 행적에 관한 시험	원제 × 환경생물* *환경생물: 담수어류, 물벼룩, 녹조류, 메추라기, 줄지렁이, 꿀벌, 누에 등	평가대상인 비표적 동식물의 범위 -화학농약은 보호대상 동식물 모두 평가 -천연식물보호제는 물질 특성에 따라 동식물 범위 설정하여 평가

자료: 농촌진흥청.

참고 3

천연식물보호제(생화학농약) 인축독성
평가 항목에 대한 한국과 미국 비교

농약관리법			FIFRA(e-CFR40 150조 제158항)		
시험항목	시험물질		시험항목	시험물질	
	원제	품목		원제	품목
[제1단계]			Tier I		
① 급성경구독성시험	○	○	Acute oral toxicity	○	○
② 급성경피독성시험	○	○	Acute dermal toxicity	○	○
③ 급성흡입독성시험	○	○	Acute inhalation toxicity	○	○
④ 안점막자극성시험	○	○	Primary eye irritation	○	○
⑤ 피부자극성시험	○	○	Primary dermal irritation	○	○
⑥ 피부감작성시험	○	○	Dermal sensitization	○	○
⑦ 90일 반복투여경구 독성시험	○	×	90-day oral(one species)	○	×
⑧ 21일 반복투여경피 독성시험	○	×	90-day dermal	△	×
⑨ 90일 반복흡입독성시험	○	×	90-day inhalation	△	×
⑩ 유전독성시험(2종 이상의 In vitro 시험)	○	×	Bacterial reverse mutation test	○	×
			In vitro mammalian cell assay	○	×
⑪ 기형독성시험	○	×	Prenatal developmental	○	×
⑫ 면역독성시험	○	×	-	-	-
⑬ 직업병노출성 사고사례	○	○	Hypersensitivity incidents	○	○
[제2단계]			Tier II		
① 유전독성시험(소핵시험 등)	○	×	In vitro mammalian cytogenetics	△	×
② 면역반응시험	○	×	Immunotoxicity	△	×
-	-	-	Prenatal developmental	△	×
-	-	-	Dermal outdoor exposure	△	×
-	-	-	Dermal indoor exposure	△	×
-	-	-	Inhalation outdoor exposure	△	×
-	-	-	Inhalation indoor exposure	△	×
-	-	-	Biological monitoring	△	×
[제3단계]			Tier III		
① 만성반복경구투여독성시험	○	×	Chronic oral	△	×
② 발암성시험	○	×	Carcinogenicity	△	×
-	-	-	Immune response	△	×
-	-	-	Reproduction and fertility effects	△	×
-	-	-	Mammalian spermatogonial chromosome aberration test	△	△
-	-	-	Companion animal safety	△	△

※ 주(注) ○ : 등록신청시 제출 △ : 조건부 제출 × : 불필요

자료: 농촌진흥청의 농약관리법과 미국 환경보호청(US EPA)의 FIFRA 기반으로 작성.

참고 4

천연식물보호제(생화학농약) 환경생물독성
평가 항목에 대한 한국과 미국 비교

농약관리법			FIFRA(e-CFR40 150조 제158항)							
시험항목	시험물질		시험항목		Terrestrial		Aquatic		Greenhouse	
	원제	품목			Food/Feed/Nonfood		Food/Nonfood		Food/Nonfood	
					원제	품목	원제	품목	원제	품목
[제1단계]			Tier I							
① 조류(鳥類) 급성독성시험	○	×	Avian Testing	Avian acute oral toxicity	○	○	○	○	△	△
				Avian dietary toxicity	○	○	○	○	△	△
② 담수어류 영향시험	○	○	Aquatic Organism Testing	Fish acute toxicity, freshwater	○	○	○	○	△	△
③ 담수무척추 동물 영향시험	○	○		Aquatic invertebrate acute toxicity, freshwater	○	○	○	○	△	△
④ 적용외 식물 영향시험	○	×	Nontarget Plant Test	Terrestrial Plant Toxicity, Seedling emergence	○	○	○	○	×	×
				Terrestrial Plant Toxicity, Vegetative vigor	○	○	○	○	×	×
⑤ 표적외 곤충 영향시험	○	×	Insect Testing	Nontarget Insect Testing	○	×	○	×	○	×
[제2단계]			Tier II							
환경중 행적에 관한 시험	○	×	Environmen- tal Fate Testing	Sediment and soil adsorption/desorption for parent and degradates	△	×	△	×	△	×
				Soil column leaching	△	×	△	×	△	×
				Laboratory volatilization from soil	×	△	×	×	×	△
				Hydrolysis	△	×	△	×	△	×
				Aerobic soil metabolism	△	×	×	×	△	×
				Photodegradation in water	△	×	△	×	△	×
				Photodegradation on soil	△	×	×	×	△	×
				Anaerobic soil metabolism	△	×	×	×	×	×
Aerobic aquatic metabolism	△	×	△	×	△	×				

농약관리법			FIFRA(e-CFR40 150조 제158항)								
시험항목	시험물질		시험항목		Terrestrial		Aquatic		Greenhouse		
	원제	품목			Food/Feed/Nonfood		Food/Nonfood		Food/Nonfood		
					원제	품목	원제	품목	원제	품목	
				Anaerobic aquatic metabolism	△	×	△	×	×	×	
				Dispenser – water leaching	×	△	×	×	×	×	△
-	-	-	Nontarget Plant	Seedling emergence	○	×	○	×	×	×	
				Vegetative vigor	○	×	○	×	×	×	×
[제3단계]				Tier III							
제2단계 환경 중 행적에 관한 시험에서 노출가능성이 있는 생물에 대한 확대시험	×	○	Aquatic Fauna Chronic, Life Cycle, and Field Studies	Freshwater fish/invertebrate testing	△	×	△	×	×	×	
				Marine/Estuarine fish/invertebrate animal testing	△	×	△	×	×	×	×
				Aquatic field fish/invertebrate testing	×	△	×	△	×	×	×
			Terrestrial Wildlife	Avian Reproduction	△	×	△	×	×	×	×
				Wild mammal acute toxicity	△	×	△	×	×	×	×
				Terrestrial field testing	×	△	×	△	×	×	×
			Beneficial Insects	Field testing for Pollinators	×	△	×	△	×	×	×
			Nontarget Plants	Nontarget plant	△	×	△	×	×	×	×

※ 주(注) ○ : 등록신청시 제출 △ : 조건부 제출 × : 불필요

※ 주(注) ○ : 등록신청시 제출 △ : 조건부 제출 × : 불필요

자료: 농촌진흥청의 농약관리법과 미국 환경보호청(US EPA)의 FIFRA 기반으로 작성.

나. 산업화 촉진을 위한 농약관리법 개정 추진

현재 국내에는 dsRNA 농약에 대한 별도의 기준이 없으므로, 신규로 농약을 판매하려는 업체는 화학농약 또는 천연식물보호제를 기준으로 농약등록 및 평가를 받아야 하는데, dsRNA는 기존 화학농약 및 천연식물보호제와 특성이 매우 다르므로 평가 과정에서 많은 논란이 예상된다. 따라서 기존 농약의 분류체계를 재조정 할 필요성이 제기되고 있다.

미국의 경우에는 지난 2023년 12월 21일 살포형 dsRNA 농약 원제(Ledprona)를 생화학농약 기준의 다음 개요로 등록하였다. 또한 유효성분, 즉 dsRNA가 0.8%로 아주 소량이 함유한 Calantha라는 제품을 세계 최초로 등록하였다(그림 3.14).

※ 미국 환경보호청(EPA)에 등록된 dsRNA 원제 개요

- 원제 개요
 - 원제명: Ledprona Technical
 - EPA 등록 번호: 94614-1
 - 제조사: GreenLight Biosciences Inc.
 - 주소: 9 실내 Drive Suite 300, Durham NC 27709, 미국
 - 발급 날짜: 2023년 12월 21일
 - 유효 기간: 2023년 12월 21일부터 2026년 12월 31일까지
- 원제 구성
 - 활성 성분: Ledprona (CAS# 2433753-68-3) 1.4%
 - 기타 성분: 98.6%
- 사용 및 적용
 - Ledprona Technical은 제조용으로만 사용되며, 승인된 용도 또는 USEPA 요구 사항을 준수하는 실험 목적으로만 살충제로 제조되어야 함.
 - 제품 사용은 연방법에 따라 라벨에 명시된 용도와 일치해야 함

〈그림 3.14〉 미국 품목 등록증 일부 발췌

 U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY Office of Pesticide Programs Biopesticides and Pollution Prevention Division (7511M) 1200 Massachusetts Ave., N.W. Washington, D.C. 20460		EPA Reg. Number: 94614-2	Date of Issuance: 12/21/2023
NOTICE OF PESTICIDE: ☒ Registration ☐ Reregistration (under FIFRA, as amended)		Term of license: Unconditional	
Name and Address of Registrant (include ZIP Code): GreenLight Biosciences, Inc. 9 Laboratory Drive, Suite 300 Durham, NC 27709		Name of Pesticide Product: Calantha™	
Notes: Changes in labeling affecting in substance from that accepted in connection with this registration must be submitted to and accepted by the Biopesticides and Pollution Prevention Division prior to use of the label in commerce. In any correspondence on this product, always refer to the above EPA Registration Number.			
On the basis of information furnished by the registrant, the above named pesticide is hereby registered under the Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA or the Act).			
Registration is in no way to be construed as an endorsement or recommendation of this product by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA). In order to protect health and the environment, the Administrator, on his or her motion, may at any time suspend or cancel the registration of a pesticide in accordance with the Act. The acceptance of any name in connection with the registration of a product under the Act is not to be construed as giving the registrant a right to exclusive use of the name or to its use if it has been covered by others.			
This product is unconditionally registered in accordance with FIFRA section 3(c)(3) provided that you:			
1. Submit and/or cite all data required for registration or registration review of your product when EPA requires all registrants of similar products to submit such data.			
2. The subject registration will automatically expire at midnight on December 31, 2026.			
Signature of Approving Official: MICHAEL MENDELSON Michael Mendelson, Chief Emerging Technologies Branch Biopesticides and Pollution Prevention Division (7511M) Office of Pesticide Programs EPA Form 8570-6		Date: 12/21/2023	

(GS2 Formulation, EPA Reg. No. 94614-E) [Text in brackets is optional]	
(Notes to reviewer are provided in curved brackets and will not appear on the final label) (Front of label booklet, ALL containers.)	
 GreenLight Biosciences™	LEDPRONA GROUP 35 INSECTICIDE
 Calantha™	
Bioinsecticide for control of Colorado Potato Beetle on potato plants	
Active Ingredient: Ledprona (CAS# 2433753-66-3) 0.6% Other Ingredients 99.4% TOTAL 100.0% * Calantha™ contains 0.067 lbs. of ledprona per gallon.	
Refer to inside of label booklet for additional precautionary information and Directions for Use including Storage and Disposal.	
Notice: Read the entire label before using. Use only according to label directions. Before buying or using this product, read Conditions, Disclaimer of Warranty, and Limitation of Liability statements at the end of the label booklet. If terms are unacceptable, return unopened at once.	
EPA Reg. No. 94614-E EPA Est. No. _____ [PPL20231031]	
Calantha™ is a trademark of GreenLight Biosciences, Inc., a wholly owned subsidiary of GreenLight Biosciences Holdings, PBC.	
GreenLight Biosciences • 9 Laboratory Drive, Suite 300 • Durham, NC 27709, U.S.A.	

ACCEPTED 12/21/2023 Under the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act as amended, for the pesticide registered under EPA Reg. No. 94614-2

KEEP OUT OF REACH OF CHILDREN CAUTION Prolonged or frequently repeated skin contact may cause allergic reactions in some individuals.

FIRST AID Have the product container or label with you when calling a poison control center or doctor, or going for treatment. For medical emergencies involving this product, call the poison control center at 1-800-222-1222.
--

[Net contents: _____ (Non-refillable)] [Net contents: _____ (Refillable)]
--

자료: 미국 환경보호청.

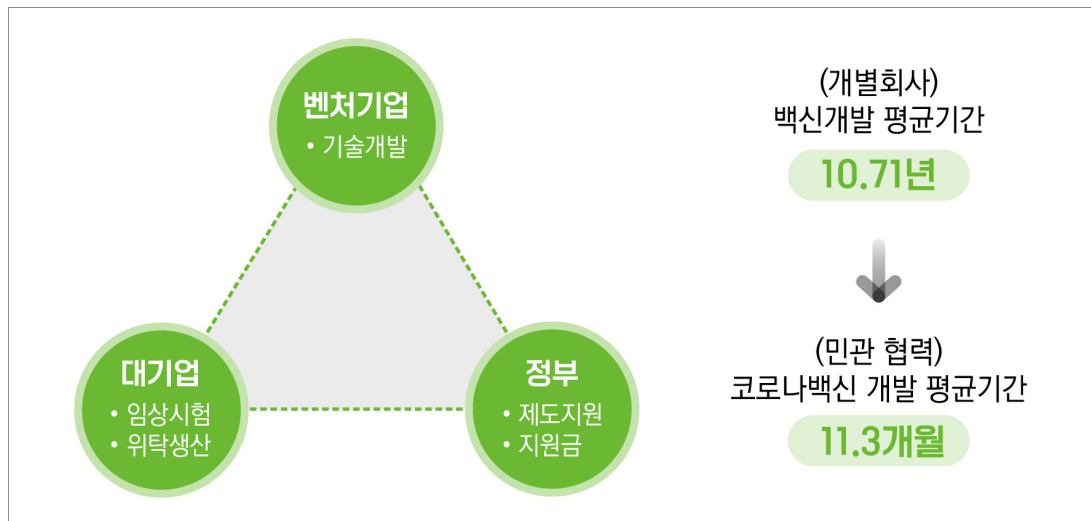
우리나라에서 농약은 「농약관리법」에 따라 관리되며, 유효성분으로 쓰이는 원료의 종류에 따라 화학농약과 천연식물보호제(일명 ‘생물농약’)로 구분되고 있다. 화학농약은 “화학적으로 합성한 유효성분으로 제조한 것”을 말하며, 천연식물보호제는 “살아있는 미생물 또는 자연계에서 생성된 유기화합물 및 무기화합물을 유효성분으로 제조한 것”을 말한다. 반면 미국은 생화학농약에 자연계에서 생성된 물질뿐만 아니라 자연계 물질과 동등한 독성을 갖는 합성 물질을 포함하고 있어 한국보다 포괄적인 개념을 갖고 있다.

따라서 대부분 수입에 의존하는 농약산업을 활성화하고 자립도를 높이기 위해서 국내에서 개발하는 dsRNA 농약의 분류체계를 재조명할 필요가 있다. 모든 농약을 ‘화학농약’, ‘천연식물보호제’ 및 ‘농약활용기자재’로 분류하고 있는데 dsRNA 농약을 기존 범주에 포함해야 할 것인지, 아니면 별도의 범주로 분류할지를 정해야 하는 시점에 와 있다. 농약의 분류체계를 재정립하고, 분류된 농약을 종류별로 차등 관리하기 위한 농약관리법령의 개정 검토가 필요하다.

다. dsRNA 농약 벤처기업 육성 및 협회 설립 방안

2022년 11월 과학기술정통부는 미래 첨단바이오 연구 및 산업 경쟁력을 좌우할 합성생물학을 본격 육성한다는 내용을 골자로 ‘국가 합성생물학 육성전략(이니셔티브)’을 발표하였다. 합성생물학이란 생명과학에 공학적 기술개념을 도입하여 인공적으로 생명체의 구성요소·시스템을 설계·제작·합성하는 학문·기술 분야로, 코로나19 백신개발 과정에서 합성생물학을 활용하여 개발기간을 획기적으로 단축했다(그림 3.15).

〈그림 3.15〉 바이오벤처 활성화를 위한 민관협력 모델



자료: 데일리메디신문. “화이자·모더나·AZ 코로나 백신 개발 ‘11.3개월’ 비결은”,
https://www.dailymedi.com/news/news_view.php?wr_id=870211 (2021.06.03.).

이러한 합성생물학은 기존 산업 영역을 넘어 화학·환경·에너지 등 전 산업에 미치는 막대한 파급력으로 인해 글로벌 기술패권 경쟁의 핵심 분야로 급부상하고 있다. 외국의 농업분야에서도 dsRNA를 이용한 천연식물보호제(생물농약)의 개발은 물론 이미 상용화 단계로 넘어서고 있다.

하지만 국내 농약의 원제 등록 현황은 527개이며(〈표 3.8〉) 이중에서 국내에서 개발한 원제 수는 8개로 1.5%에 그치고 있다(〈표 3.9〉, 농촌진흥청 내부보고서, 2023.12.31. 기준). 이에 우리나라도 이러한 합성생물학을 활용하여 dsRNA 농약을 개발할 수 있는 첨단바이오 벤처기업은 물론, 개발된 dsRNA 농약을 분석·검증할 수 있는 비임상수탁기관을 육성하고, 이를 지원할 수 있는 협회 등 민간자율기구를 설립하여 농약산업의 경쟁력을 강화하고 식량안보 및 수출산업의 초석을 마련해야 한다.

〈표 3.8〉 국내 농약 원제 등록 현황

구분	합계		국내 합성원제		수입원제	
	원제수	등록건수	원제수	등록건수	원제수	등록건수
살균제	177	1,736	57	99	162	1,637
살충제	173	1,879	59	111	166	1,768
제초제	144	1,173	33	46	143	1,127
생장조정제	27	125	3	6	27	119
기타약제	6	42	0	0	6	42
계	527	4,955	152	262	504	4,693

자료: 농촌진흥청, 농촌진흥청 농자재 주요통계(2023).

〈표 3.9〉 국내 기술로 개발된 신물질 농약(원제) 현황

구분	농약 원제명	개발회사	등록년도(상품화)
살균제	에타복삼 (Ethaboxam)	엘지생명과학	1997년
살충제	플루피라조포스(Flupyrzofos)	성보화학	1995년
	비스트리플루론 (Bistrifluron)	동부한농	2006년
제초제	피리벤족심 (Pyribenzoxim)	엘지생명과학	1996년
	플루세토설풀론 (Flucetosulfuron)	엘지생명과학	2004년
	메타미포프 (Metamifop)	동부한농	2007년
	메티오졸린 (Methiozolin)	목우연구소/리캠	2010년
	티아페나실 (Tiafenacil)	(주)팜한농	2017년

자료: 농촌진흥청, 농촌진흥청 농자재 주요통계(2023).

참고문헌

참고문헌

- 경상국립대학교 산학협력단(2023). 국내외 생물농약 개발현황 및 평가체계 조사, 경상국립대학교.
- 김용균(2017). “dsRNA를 이용한 해충방제 기술”, 한국응용곤충학회지, 제56권, pp. 153-164.
- 농업과학원(2020). 식물병해충 R&D 중장기 종합계획(안), 농촌진흥청.
- Airs, P. M. & Bartholomay, L. C.(2017). “RNA Interference for Mosquito and Mosquito-borne Disease Control”, *Insects*, Vol.8 No.1, e4.
- Araujo, R. N., Santos, A., Pinto, F. S., Gontijo, N. F., Lehane, M. J. & Pereira, M. H.(2006). “RNA Interference of the Salivary Gland Nitrophorin 2 in the Triatomine Bug *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA Ingestion or Injection”, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.36 No.9, pp. 683-693.
- Bachman, P. M., Huizinga, K. M., Jensen, P. D., Mueller, G., Tan, J., Uffman, J. P. & Levine, S. L.(2016). “Ecological Risk Assessment for DvSnf7 RNA: A Plant-incorporated Protectant with Aargeted Activity Against Western Corn Rootworm”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol.81, pp. 77-88.
- Bachman, P., Fischer, J., Song, Z., Urbanczyk-Wochniak, E. & Watson, G.(2020). “Environmental Fate and Dissipation of Applied dsRNA in Soil, Aquatic Systems, and Plants”, *Frontiers in Plant Science*, Vol.11, 21.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S. & Nauen, R.(2015). “The Global Status of Insect Resistance to Neonicotinoid Insecticides”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol.121, pp. 78-87.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T. & Roberts, J.(2007). “Control of Coleopteran Insect Pests through RNA Interference”, *Nature Biotechnology*, Vol.25 No.11, pp. 1322-1326.
- Bebber, D. P.(2015). “Range-expanding Pests and Pathogens in a Warming World”, *Annual Review of Phytopathology*, Vol.53 No.1, pp. 335-356.
- Behura, S. K.(2007). “Insect MicroRNAs: Structure, Function and Evolution”, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.37 No.1, pp. 3-9.
- Boisson, B., Jacques, J. C., Choumet, V., Martin, E., Xu, J., Vernick, K. & Bourgoign, C.(2006). “Gene Silencing in Mosquito Salivary Glands by RNAi”, *FEBS Letters*, Vol.

580 No.8, pp. 1988-1992.

- Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W., Mueller, G., Tan, J., Uffman, J., Wiggins, E., Heck, G. & Segers, G.(2012). "Characterizing the Mechanism of Action of Double-stranded RNA Activity Against Western Corn Rootworm (*Diabrotica Virgifera Virgifera* LeConte)", PLoS ONE, Vol.7 No.10, e47534.
- Bucher, G., Scholten, J. & Klingler, M.(2002). "Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera)", Current Biology, Vol.12 No.3, R85-R86.
- Chikate, Y. R., Dawkar, V. V., Barbole, R. S., Tilak, P. V., Gupta, V. S. & Giri, A. P.(2016). "RNAi of Selected Candidate Genes Interrupts Growth and Development of *Helicoverpa Armigera*", Pesticide Biochemistry and Physiology, Vol.133, pp. 44-51.
- Crisp, A., Boschetti, C., Perry, M., Tunnacliffe, A. & Micklem, G.(2015). "Expression of Multiple Horizontally Acquired Genes Is a Hallmark of Both Vertebrate and Invertebrate Genomes", Genome Biology, Vol.16, pp 1-13.
- Deutsch C. A., Tewksbury J. J., Tigchelaar M., Battisti D. S., Merrill S. C., Huey R. B. & Naylor, R. L.(2018). "Increase in Crop Losses to Insect Pests in a Warming Climate", Science 361, pp. 916-919.
- Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N. & Manev, H.(2001). "Intra-abdominal Injection of Double-stranded RNA into Anesthetized Adult *Drosophila* Triggers RNA Interference in the Central Nervous System", Molecular Psychiatry, Vol.6 No.6, pp. 665-670.
- Ganbaatar, O., Cao, B., Zhang, Y., Bao, D., Bao, W. & Wuriyanghan, H.(2017). "Knockdown of *Mythimna Separata* Chitinase Genes via Bacterial Expression and Oral Delivery of RNAi Effectors", BMC Biotechnology, Vol.17, pp 1-11.
- Garbian, Y., Maori, E., Kalev, H., Shafir, S. & Sela, I.(2012). "Bidirectional Transfer of RNAi between Honey Bee and *Varroa Destructor*: *Varroa* Gene Silencing Reduces *Varroa* Population", PLoS Pathogens, Vol.8 No.12, e1003035.
- Gong, L., Chen, Y., Hu, Z. & Hu, M.(2013). "Testing Insecticidal Activity of Novel Chemically Synthesized siRNA against *Plutella Xylostella* under Laboratory and Field Conditions", PLoS One, Vol.8 No.5, e62990.
- Gordon, K. H. J. & Waterhouse, P. M.(2007). "RNAi for Insect-proof Plants", Nat Biotechnology, Vol.25 No.11, pp. 1231-1232.
- Griebler, M., Westerlund, S.A., Hoffmann, K.H. & Meyering-Vos, M.(2008). "RNA Interference with the Allatoregulating Neuropeptide Genes from the Fall Armyworm *Spodoptera Frugiperda* and Its Effects on the JH Titer in the Hemolymph", Journal of Insect Physiology, Vol.54 No.6, pp. 997-1007.
- Guan, R., Li, H. & Miao, X.(2017). "RNAi Pest Control and Enhanced Bt Insecticidal Efficiency Achieved by dsRNA of Chymotrypsin-like Genes in *Ostrinia Furnacalis*",

- Journal of Pest Science, Vol.90, pp. 745-757.
- Huvenne, H. & Smagghe, G.(2010). "Mechanisms of dsRNA Uptake in Insects and Potential of RNAi for Pest Control: A Review", Journal of Insect Physiology, Vol.56 No.3, pp. 227-235.
- Jayachandran, B., Hussain, M. & Asgari, S.(2013). "An Insect Trypsin-like Serine Protease as a Target of MicroRNA: Utilization of MicroRNA Mimics and Inhibitors by Oral Feeding", Insect Biochemistry and Molecular Biology, Vol.43 No.4, pp. 398-406.
- Jayakodi, M., Jung, J. W., Park, D., Ahn, Y. J., Lee, S. C., Shin, S. Y., Shin, C., Yang, T. J. & Kwon, H. W.(2015). "Genome-wide Characterization of Long Intergenic Non-coding RNAs (lincRNAs) Provides New Insight into Viral Diseases in Honey Bees *Apis Cerana* and *Apis Mellifera*", BMC Genomics, Vol.16, 1-12.
- Jose, A. M., Smith, J. J. & Hunter, C. P.(2009). "Export of RNA Silencing from *C. elegans* Tissues Does Not Require the RNA Channel SID-1", Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol.106 No.7, pp. 2283-2288.
- Jung, C. E.(2008). "Economic Value of Honeybee Pollination on Major Fruit and Vegetable Crops in Korea", Korean Journal of Apiculture, Vol.23 No.2, 147-152.
- Kamath, R. S. & Ahringer, J.(2003). "Genome-wide RNAi Screening in *Caenorhabditis Elegans*", Methods, Vol.30 No.4, pp. 313-321.
- Kennerdell, J. R. & Carthew, R. W.(1998). "Use of dsRNA-mediated Genetic Interference to Demonstrate that Frizzled and Frizzled 2 Act in the Wingless Pathway", Cell, Vol.95 No.7, pp. 1017-1026.
- Khajuria, C., Vélez, A. M., Rangasamy, M., Wang, H., Fishilevich, E., Frey, M. L., Carneiro, N. P., Gandra, P., Narva, K. E. & Siegfried, B. D.(2015). "Parental RNA Interference of Genes Involved in Embryonic Development of the Western Corn Rootworm, *Diabrotica Virgifera Virgifera* LeConte", Insect Biochemistry and Molecular Biology, Vol.63, pp. 54-62.
- Kim, E. & Kim, Y.(2016). "A Freeze-drying Formulation and Target Specificity of Double-stranded RNA-expressing Bacteria to Control Insect Pests", Korean Journal of Applied Entomology, Vol.55 No.2, pp. 81-89.
- Kim, E., Park, Y. & Kim, Y.(2015a). "A Transformed Bacterium Expressing Double-stranded RNA Specific to Integrin $\beta 1$ Enhances Bt Toxin Efficacy against a Polyphagous Insect Pest, *Spodoptera Exigua*", PLoS One, Vol.10 No.7, e0132631.
- Kim, H. S., Noh, S. & Park, Y.(2017). "Enhancement of *Bacillus Thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Ca Toxicity against *Spodoptera Exigua* (Hübner) by Suppression of a Chitin Synthase B Gene in Midgut", Journal of Asia-Pacific Entomology, Vol.20 No.1, pp. 199-205.
- Kim, Y.(2014). Development and Application of Novel Biopesticides Using Insect Immunosuppression, in Park, Y. M., Chun, I. J., Kim, Y., Lim, U. T. & Lim, J. H.

- (eds.), Horticultural Crops: Development and Application of Novel Technologies, ANU Agriculture Science Technology, Institute, Andong, pp. 41-112.
- Kim, Y., Kim, E., Park, Y. & Kim, Y.(2015b). "Construction of a Transgenic Tobacco Expressing a Polydnviral Cystatin", Korean Journal of Applied Entomology, Vol.54 No.1, pp. 1-9.
- Klein, A. M., Boreux, V., Fornoff, F., Mupepele, A. C. & Pufal, G.(2018). "Relevance of Wild and Managed Bees for Human Well-being", Current Opinion in Insect Science. Vol.26, pp. 82-88.
- Lee, S. M., Park, C. M., Goo, J. M., Lee, H. J., Wi, J. Y. & Kang, C. H.(2013). "Invasive Pulmonary Adenocarcinomas versus Preinvasive Lesions Appearing as Ground-glass Nodules: Differentiation by Using CT Features", Radiology, Vol.268 No.1, pp. 265-273.
- Li, X., Zhang, M. & Zhang, H.(2011). "RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs", PLoS One, Vol.6 No.3, e17788.
- Lim, H. S., Jung, Y. J., Kim, I. R., Kim, J., Ryu, S., Kim, B., Lee, J. R. & Choi, W.(2017). "Acute Oral Toxicity of dsRNA to Honey Bee, *Apis mellifera*", Korean Journal of Environmental. Agriculture, Vol.36 No.4, pp. 241-248.
- Lim, Z. X., Robinson, K. E., Jain, R. G., Chandra, G. S., Asokan, R., Asgari, S. & Mitter, N.(2016). "Diet-delivered RNAi in *Helicoverpa armigera* - Progresses and Challenges", Journal of Insect Physiology, Vol.85, pp. 86-93.
- Ling, L., Ge, X., Li, Z., Zeng, B., Xu, J., Chen, X., Shang, P., James, A. A., Huang, Y. & Tan, A.(2015). "MiR-2 Family Targets *Awd* and *Fng* to Regulate Wing Morphogenesis in *Bombyx mori*", RNA Biology, Vol.12 No.7, pp. 742-748.
- Liu, J., Smagghe, G. & Swevers, L.(2013). "Transcriptional Response of *BmToll9-1* and RNAi Machinery Genes to Exogenous dsRNA in the Midgut of *Bombyx mori*", Journal of Insect Physiology, Vol.59 No.6, pp. 646-654.
- Mai, J., Liao, L., Ling, R., Guo, X., Lin, J., Mo, B., Chen, W. & Yu, Y.(2021). "Study on RNAi-based Herbicide for *Mikania micrantha*", Synthetic and Systems Biotechnology, Vol.6 No.4, pp. 437-445.
- Mao, J., Zhang, P., Liu, C. & Zeng, F.(2015). "Co-silence of the Coatome β and v-ATPase A Genes by siRNA Feeding Reduces Larval Survival Rate and Weight Gain of Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera*", Pesticide Biochemistry and Physiology, Vol.118, pp. 71-76.
- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., Huang, Y. P. & Chen, X. Y.(2007). "Silencing a Cotton Bollworm P450 Monooxygenase Gene by Plant-mediated RNAi Impairs Larval Tolerance of Gossypol", Nature Biotechnology, Vol.25 No.11, pp. 1307-1313.
- Mao, Y. B., Tao, X. Y., Xue, X. Y., Wang, L. J. & Chen, X. Y.(2011). "Cotton Plants

- Expressing CYP6AE14 Double-stranded RNA Show Enhanced Resistance to Bollworms”, *Transgenic Research*, Vol.20, pp. 665-673.
- Meyering-Vos, M. & Müller, A.(2007). “RNA Interference Suggests Sulfakinins as Satiety Effectors in the Cricket *Gryllus Bimaculatus*”, *Journal of Insect Physiology*, Vol.53 No.8, pp. 840-848.
- Miller, S. C., Brown, S. J. & Tomoyasu, Y.(2008). “Larval RNAi in *Drosophila*?”, *Development Genes and Evolution*, Vol.218, pp. 505-510.
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Xu, Z. P. & Carroll, B. J.(2017). “Induction of Virus Resistance by Exogenous Application of Double-stranded RNA”, *Current Opinion in Virology*, Vol.26, pp. 49-55.
- Nauen, R.(2006). “Insecticide Mode of Action: Return of the Ryanodine Receptor”, *Pest Management Science*, Vol.62 No.8, pp. 690-692.
- Niño-Sánchez, J., Sambasivam, P. T., Sawyer, A., Hamby, R., Chen, A., Czislawski, E., Li, P., Manzie, N., Gardiner, D. M., Ford, R., Xu, Z. P., Mitter, N. & Jin, H.(2022). “BioClay Prolongs RNA Interference-mediated Crop Protection against *Botrytis Cinerea*”, *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol.64 No.11, pp. 2187-2198.
- Niu, J., Yang, W. J., Tian, Y., Fan, J. Y., Ye, C., Shang, F., Ding, B. Y., Zhang, J., An, X., Yang, L., Chang, T. Y., Christiaens, O., Smagghe, G. & Wang, J. J.(2019). “Topical dsRNA Delivery Induces Gene Silencing and Mortality in the Pea Aphid”, *Pest Management Science*, Vol.75 No.11, pp. 2873-2881.
- Park, S. R., Park, J., Lim, S. H., Lee, J. Y. & Kim, B. G.(2019). “Current Status of New Plant Breeding Technologies and Crop Development”, *Korean Society of Breeding Science*, Vol.51 No.3, pp. 161-174.
- Parker, K. M., Barragán Borrero, V., van Leeuwen, D. M., Lever, M. A., Mateescu, B. & Sander, M.(2019). “Environmental Fate of RNA Interference Pesticides: Adsorption and Degradation of Double-Stranded RNA Molecules in Agricultural Soils”, *Environmental Science & Technology*, Vol.53 No.6, pp. 3027-3036.
- Pearson, A., Lux, A. & Krieger, M.(1995). “Expression Cloning of DSR-CI, a class-C Macrophage-specific Scavenger Receptor from *Drosophila Melanogaster*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.92 No.9, pp. 4056-4060.
- Petrick, J. S., Brower-Toland, B., Jackson, A. L. & Kier, L. D.(2013). “Safety Assessment of Food and Feed from Biotechnology-derived Crops Employing RNA-mediated Gene Regulation to Achieve Desired Traits: A Scientific Review”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol.66 No.2, pp. 167-176.
- Petrick, J. S., Friedrich, G. E., Carleton, S. M., Kessenich, C. R., Silvanovich, A., Zhang, Y. & Koch, M. S.(2016). “Corn Rootworm-active RNA *DvSnf7*: Repeat Dose Oral Toxicology Assessment in Support of Human and Mammalian Safety”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol.81, pp. 57-68.

- Pridgeon, J. W., Zhao, L., Becnel, J. J., Strickman, D. A., Clark, G. G. & Linthicum, K. J.(2008). "Topically Applied AaeIAP1 Double-stranded RNA Kills Female Adults of *Aedes Aegypti*", *Journal of Medical Entomology*, Vol.45 No.3, pp. 414-420.
- Roignant, J. Y., Carre, C., Mugat, R., Szymczak, D., Lepesant, J. A. & Antoniewski, C.(2003). "Absence of Transitive and Systemic Pathways Allows Cell-specific and Isoform Specific RNAi in *Drosophila*", *RNA*, Vol.9 No.3, pp. 299-308.
- Ruiz, G. M. & Carlton, J. T.(2003). *Invasive Species: Vectors and Management Strategies*. WA: Island Press, pp. 520.
- Saleh, M. C., Tassetto, M., van Rij, R. P., Goic, B., Gausson, V., Berry, B., Jacquier, C., Antoniewski, C. & Andino, R.(2009). "Antiviral Immunity in *Drosophila* Requires Systemic RNA Interference Spread", *Nature*, Vol.458, pp. 346-351.
- Saleh, M. C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H. & Andino, R.(2006). "The Endocytic Pathway Mediates Cell Entry of dsRNA to Induce RNAi Silencing", *Nature cell biology*, Vol.8 No.8, pp. 793-802.
- Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B., Smagghe, G., Zhu, K. Y. & Douglas, A. E.(2013). "Towards the Elements of Successful Insect RNAi", *Journal of Insect Physiology*, Vol.59 No.12, pp. 1212-1221.
- Shakesby, A. J., Wallace, I. S., Isaacs, H. V., Pritchard, J., Roberts, D. M. & Douglas, A. E.(2009). "A Water-specific Aquaporin Involved in Aphid Osmoregulation", *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.39 No.1, pp. 1-10.
- Sivakumar, S., Rajagopal, R., Venkatesh, G. R., Srivastava, A. & Bhatnagar, R. K.(2007). "Knockdown of Aminopeptidase-N from *Helicoverpa Armigera* Larvae and in Transfected Sf21 Cells by RNA Interference Reveals Its Functional Interaction with *Bacillus Thuringiensis* Insecticidal Protein Cry1Ac", *Journal of Biological Chemistry*, Vol.282 No.10, pp. 7312-7319.
- Son, S. H., Jo, A. R. & Kim, D. E.(2021). "Current Status of Alert Alien Species Management for the Establishment of Proactive Management Systems in Korea", *Journal of Ecology and Environment*, Vol.45, 1-18.
- Spit, J., Philips, A., Wynant, N., Santos, D., Plaetinck, G. & Vanden Broeck, J.(2017). "Knockdown of Nuclease Activity in the Gut Enhances RNAi Efficiency in the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa Decemlineata*, but Not in the Desert Locust, *Schistocerca Gregaria*", *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.81, pp. 103-116.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C., Aymeric, J. L., Barthel, A., Bebas, P., Bitra, K., Bravo, A., Chevalier, F., Collinge, D. P., Crava, C. M., de Maagd, R. A., Duvic, B., Erlandson, M., Faye, I., Felföldi, G., Fujiwara, H., Futahashi, R., Gandhe, A. S., Gatehouse, H. S., Gatehouse, L. N., Giebultowicz, J. M., Gómez, I.,

- Grimmelikhuijzen, C. J., Groot, A. T., Hauser, F., Heckel, D. G., Hegedus, D. D., Hrycaj, S., Huang, L., Hull, J. J., Iatrou, K., Iga, M., Kanost, M. R., Kotwica, J., Li, C., Li, J., Liu, J., Lundmark, M., Matsumoto, S., Meyering-Vos, M., Millichap, P. J., Monteiro, A., Mrinal, N., Niimi, T., Nowara, D., Ohnishi, A., Oostra, V., Ozaki, K., Papakonstantinou, M., Popadic, A., Rajam, M. V., Saenko, S., Simpson, R. M., Soberón, M., Strand, M. R., Tomita, S., Toprak, U., Wang, P., Wee, C. W., Whyard, S., Zhang, W., Nagaraju, J., Ffrench-Constant, R. H., Herrero, S., Gordon, K., Swevers, L. & Smagghe, G.(2011). "RNA Interference in Lepidoptera: An Overview of Successful and Unsuccessful Studies and Implications for Experimental Design", *Journal of Insect Physiology*, Vol.57 No.2, pp. 231-245.
- Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B. & Zhang, W.(2009). "Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera Exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-midgut Gene", *PLoS One*, Vol.4 No.7, e6225.
- Timmons, L., Court, D. L. & Fire, A.(2001). "Ingestion of Bacterially Expressed dsRNAs Can Produce Specific and Potent Genetic Interference in *Caenorhabditis Elegans*", *Gene*, Vol.263 No.1-2, pp. 103-112.
- Tomoyasu, Y. & Denell, R. E.(2004). "Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for Analyzing Adult Development", *Development Genes and Evolution*, Vol.214, pp. 575-578.
- Tomoyasu, Y., Miller, S. C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D. & Bucher, G.(2008). "Exploring Systemic RNA Interference in Insects: A Genome-wide Survey for RNAi Genes in *Tribolium*", *Genome biology*, Vol.9, pp. 1-22.
- Uvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R. A., Kocks, C. & Ramet, M.(2006). "Double-stranded RNA Is Internalized by Scavenger Receptor-mediated Endocytosis in *Drosophila* S2 Cells", *Journal of Biological Chemistry*, Vol.281 No.20, pp. 14370-14375.
- US EPA(2014). RNAi Technology: Program Formulation for Human Health and Ecological Risk Assessment. Scientific Advisory Panel Minutes No. 2014-02 (Arlington, VA). Available online at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/012814minutes.pdf>.
- Vélez, A. M., Khajuria, C., Wang, H., Narva, K. E. & Siegfried, B. D.(2016). "Knockdown of RNA Interference Pathway Genes in Western Corn Rootworms (*Diabrotica Virgifera Virgifera* Le Conte) Demonstrates a Possible Mechanism of Resistance to Lethal dsRNA", *PLoS One*, Vol.11 No.6, e0157520.
- Volz, J., Muller, H. M., Zdanowicz, A., Kafatos, F. C. & Osta, M. A.(2006). "A Genetic Module Regulates the Melanization Response of *Anopheles* to *Plasmodium*", *Cellular Microbiology*, Vol.8 No.9, pp. 1392-1405.
- Wang, M., Du, G., Fang, J., Wang, L., Guo, Q., Zhang, T. & Li, R.(2022). "UGT440A1 Is

- Associated with Motility, Reproduction, and Pathogenicity of the Plant-parasitic Nematode *Bursaphelenchus Xylophilus*", *Frontiers in Plant Science*, Vol.13, 862594.
- Wang, Y., Shi, J., Cui, H., Wang, C. & Zhao, Z.(2021). "Effects of NPF on Larval Taste Responses and Feeding Behaviors in *Ostrinia Furnacalis*", *Journal of Insect Physiology*, Vol.133, 104276.
- Whangbo, J. S. & Hunter, C. P.(2008). "Environmental RNA Interference", *Trends in Genetics*, Vol.24 No.6, pp. 297-305.
- Winston, W. M., Molodowitch, C. & Hunter, C. P.(2002). "Systemic RNAi in *C. elegans* Requires the Putative Transmembrane Protein SID-1", *Science*, Vol.295, pp. 2456-2459.
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H. & Hunter, C. P.(2007). "Caenorhabditis Elegans SID-2 Is Required for Environmental RNA Interference", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.104 No.25, pp. 10565-10570.
- Wynant, N., Santos, D., Van Wielendaele, P. & Vanden Broeck, J.(2014). "Scavenger Receptor-mediated Endocytosis Facilitates RNA Interference in the Desert Locust, *Schistocerca Gregaria*", *Insect Molecular Biology*, Vol.23 No.3, pp. 320-329.
- Xiao, D., Gao, X., Xu, J., Liang, X., Li, Q., Yao, J. & Zhu, K. Y.(2015). "Clathrin-dependent Endocytosis Plays a Predominant Role in Cellular Uptake of Double-stranded RNA in the Red Flour Beetle", *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.60, pp. 68-77.
- Xiong, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Xu, D. & Qiu, D.(2013). "Silencing the HaHR3 Gene by Transgenic Plant-mediated RNAi to Disrupt *Helicoverpa Armigera* Development", *International Journal of Biological Sciences*, Vol.9 No.4, pp. 370-381.
- Xu, J., Wang, X. F., Chen, P., Liu, F. T., Zheng, S. C., Ye, H. & Mo, M. H.(2016). "RNA Interference in Moths: Mechanisms, Applications, and Progress", *Genes*, Vol.7 No.10, 88.
- Xu, X. L., Wu, X. Q., Ye, J. R. & Huang, L.(2015). "Molecular Characterization and Functional Analysis of Three Pathogenesis-related Cytochrome P450 Genes from *Bursaphelenchus Xylophilus* (Tylenchida: Aphelenchoidoidea)", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.16 No.3, pp. 5216-5234.
- Xue, Q., Wu, X. Q., Zhang, W. J., Deng, L. N. & Wu, M. M.(2019). "Cathepsin L-like Cysteine Proteinase Genes Are Associated with the Development and Pathogenicity of Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus Xylophilus*", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.20 No.1, 215.
- Youngren-Ortiz, S. R., Gandhi, N. S., Espana-Serrano, L. & Chougule, M. B.(2017). "Aerosol Delivery of siRNA to the Lungs. Part 2: Nanocarrier-based Delivery Systems", *KONA Powder and Particle Journal*, Vol.34, pp. 44-69.
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., Huvenne, H. & Smagghe,

- G.(2013). "Delivery of dsRNA for RNAi in Insects: An Overview and Future Directions", *Insect Science*, Vol.20 No.1, pp. 4-14.
- Zha, W., Peng, X., Chen, R., Du, B., Zhu, L. & He, G.(2011). "Knockdown of Midgut Genes by dsRNA-transgenic Plant-mediated RNA Interference in the Hemipteran Insect *Nilaparvata lugens*", *PLoS One*, Vol.6 No.5, e20504.
- Zhang, H., Chen, J., Gao, J., Zhang, Q., Liu, X. & Han, Z.(2022). "New Insights into Transmission Pathways and Possible Off-target Effects of Insecticidal dsRNA Released by Treated Plants", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol.188, 105281.
- Zhang, X., Zhang, J. & Zhu, K. Y.(2010). "Chitosan/double-stranded RNA Nanoparticle-mediated RNA Interference to Silence Chitin Synthase Genes through Larval Feeding in the African Malaria Mosquito (*Anopheles gambiae*)", *Insect Molecular Biology*, Vol.19 No.5, pp. 683-693.
- Zheng, Y., Hu, Y., Yan, S., Zhou, H., Song, D., Yin, M. & Shen, J.(2019). "A Polymer/detergent Formulation Improves dsRNA Penetration through the Body Wall and RNAi-induced Mortality in the Soybean Aphid *Aphis glycines*", *Pest Management Science*, Vol.75 No.7, pp. 1993-1999.
- Zhou, X., Wheeler, M. M., Oi, F. M. & Scharf, M. E.(2008). "RNA Interference in the Termite *Reticulitermes flavipes* through Ingestion of Double-stranded RNA", *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.38 No.8, pp. 805-815.
- Zhu, F., Xu, J., Palli, R., Ferguson, J. & Palli, S. R.(2011). "Ingested RNA Interference for Managing the Populations of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*", *Pest Management Science*, Vol.67 No.2, pp. 175-182.
- Zhu, J. Q., Liu, S., Ma, Y., Zhang, J. Q., Qi, H. S., Wei, Z. J., Yao, Q., Zhang, W. Q. & Li, S.(2012). "Improvement of Pest Resistance in Transgenic Tobacco Plants Expressing dsRNA of an Insect-associated Gene *EcR*", *PLoS One*, Vol.7 no.6, e38572.

데일리메디신문. "화이자·모더나·AZ 코로나 백신 개발 '11.3개월' 비결은",

https://www.dailymedi.com/news/news_view.php?wr_id=870211 (2021.06.03.)

농촌진흥청 홈페이지, <https://www.rda.go.kr/>

미국 환경보호청 홈페이지, <https://www.epa.gov/>

부록

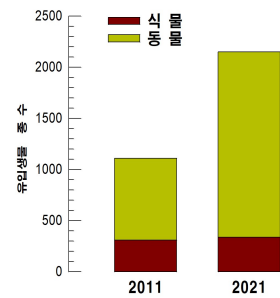
2024년 한림연구보고서

화학농약 대체용 dsRNA 농약 개발 및 산업화를 위한 정책 연구

작물 피해 및 농약 산업

국내 병해충 및 잡초 피해

- 국내 전체 종수: 5,850 여종
- 주요 병해충 및 잡초: 100여종
- 기후변화 및 교역량 증가: 외래종 유입 증가
- 작물 생산의 6 ~ 65% 피해



출처: Son et al. (2021)

주요 식물병

순위	식물병	시장(억원)
1	탄저병	905.4
2	벼도열병	700.0
3	역병과 노균병	428.8
4	앞집무늬마름병	337.6
5	겉무늬썩음병	265.7
6	잿빛곰팡이병	241.9
7	세균병(과수 화상병)	211.6
8	흰가루병	147.5

(출처: 농촌진흥청, 2020)



주요 해충

작목 구분	해충
수도	벼멸구, 애멸구, 흰등멸구
채소	배추좀나방, 파밤나방 담배거세미나방 노린재류, 응애류, 진딧물류 온실가루이, 담배가루이 앞굴파리류
과수	응애류(사과응애, 점박이응애) 심식나방류, 진딧물류 노린재류, 매미충류
산림	소나무재선충, 솔껍질깍지벌레
양봉	꿀벌응애

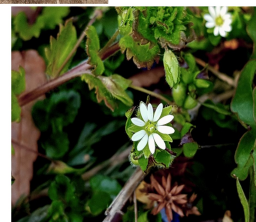
(출처: 농촌진흥청, 2020)



주요 잡초

작목 구분	잡초
수도	피(강피, 물피) 물달개비, 올방개
채소	바랭이, 쇠비름 깨풀, 흰명아주
과수	쑥, 쇠별꽃 닭의장풀, 깨풀 토끼풀, 별꽃

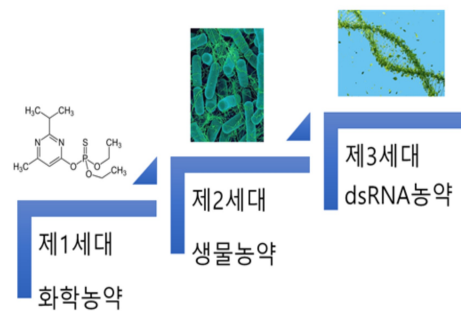
(출처: 농촌진흥청, 2020)



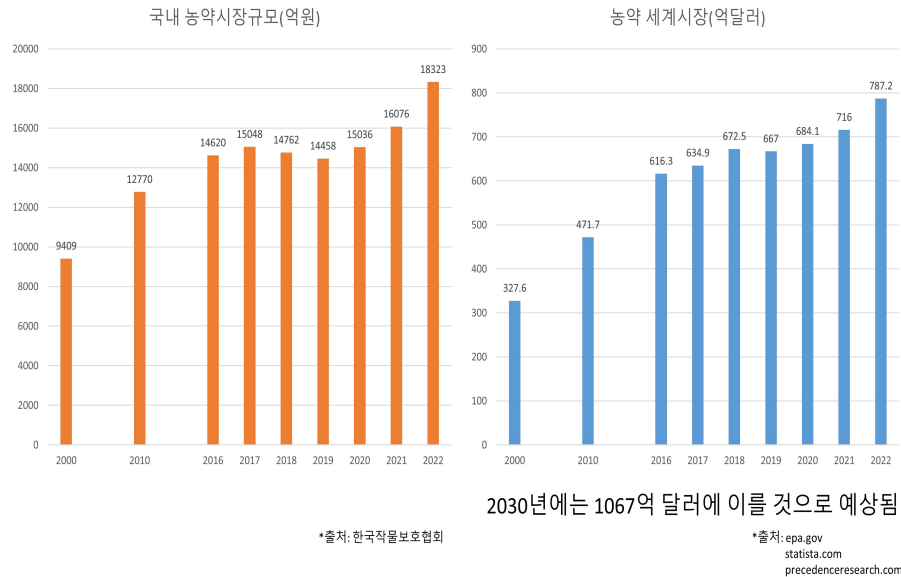
작물 보호 기술 변화

작물보호 기술

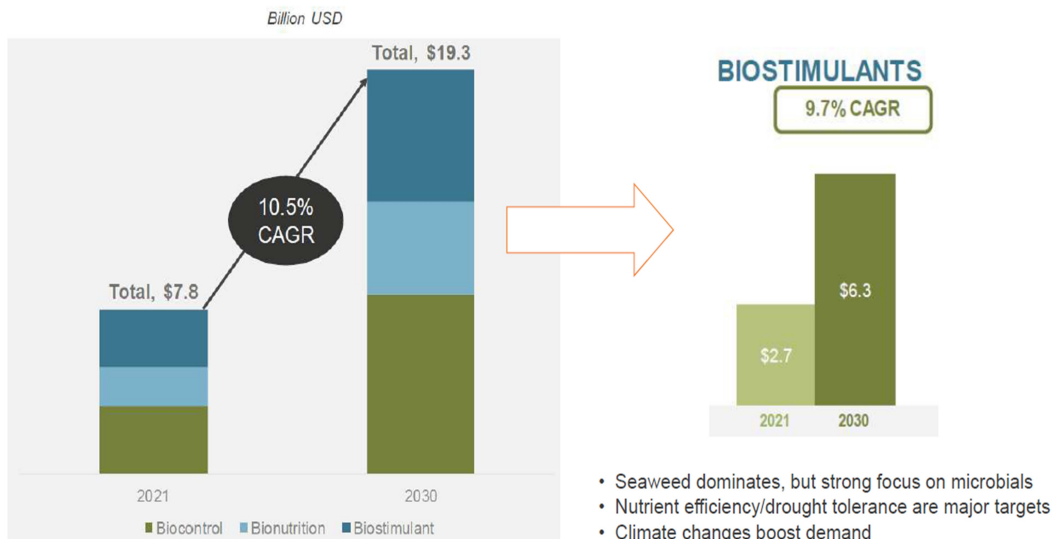
- 천연물 농약(1940년대 이전)
- 유기합성 농약(1940년대 ~ 현재)
- 생물농약(1962년 ~ 현재)
- dsRNA 농약(2023년 ~ 향후)



농약산업 규모



생물농약 시장 규모 증가 추세



국내 농약관리법 변천

항 목	'57 ~ '80년	'81 ~ '96년	'97년 ~ 현재
정책 목표	·농약규격 품질검사, 제조·수출입 및 취급 방법을 정하여 농업생산의 증진 을 도모 ·농약의 안정적 공급	·농약의 품질향상, 적정 사용을 도모하기 위 하여 제조·수입·판매 및 사용에 관한 사 항 규정 · 효과 우수 농약 정부 주도 개발	·농약의 품질향상, 유통질서 확립, 농약 안전사 용, 농업생산과 생활환경보전 기여 · 환경 친화적이고 안전한 농약 공급
주요 제도	·농약의 수급 관리 ·영업 및 품목 허가제 ·공장 출하전 검사제	·농약 수급조절 및 관리기금 운영 ·영업 허가 및 품목 고시제 ·출하전 자체검사제 및 유통검사제	·긴급방제용 농약 수급조절 ·영업 및 품목 등록제(농촌진흥청) ·출하전 자체검사제 및 유통검사제
주요 사업	·수급계획 수립 시행(농수산부) ·제조/수입업 허가(농수산부) ·판매업, 방제업 등록(관할 시도) ·신고제('57) → 소·도매 등록('78) ·공정규격 설정 및 허가(농수산부) ·농약 시험성적 검토(자체검사소) ·농약 출하전 검사(자체검사소)	·긴급방제용 농약 수급조절(농수산부) ·제조/수입업 허가(농수산부) ·판매업, 방제업(관할 시·도) ·농약품목 고시제(농수산부) ·농약 시험성적 검토(농촌진흥청) ·유통농약 직권검사(자체검사소) * 출하 전 검사 폐지 → 자체검사제 도입	·긴급방제용 농약 수급조절(농식품부) ·제조/수입업 등록(농촌진흥청) ·판매업: 시도 → 시군('03) ·수출입식품 방제업(농림축산검역본부) ·농약품목 등록제(농촌진흥청) ·농약 시험성적 검토 평가(농과원) ·유통농약 직권검사(농관원)
주요 기술	·고전적 주성분 위주의 제형 개발 ·농약효과가 우수한 농약개발	·독성 및 잔류성이 적은 안전한 농약 개발 ·친환경생약·제형농약개발	·환경친화적 생물농약 개발 ·저투입 고효율성 농약 개발
주요 농약	·DDT, Parathion, Malathion 등 *등록농약 : 33('57) → 122('71)	·아바멕틴, Acrinathrin 등 *등록농약 : 230('81) → 727('96)	·에마멕틴, 비티제 등 *등록농약 : 734('97) → 2,142('22)

출처: 농촌진흥청, 2023

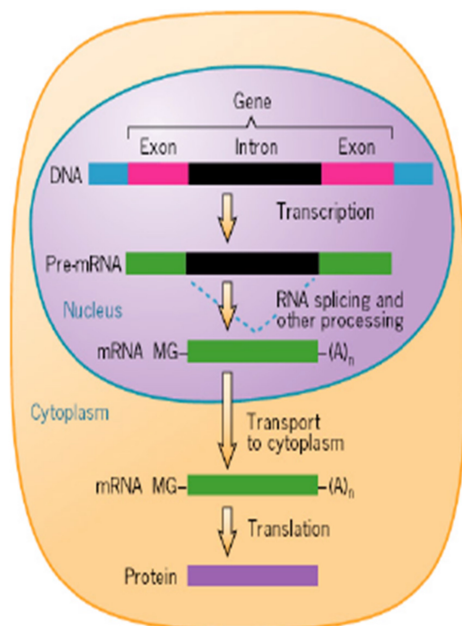
기존 방제기술 어려움

- 화학농약의 인축 및 환경 피해
- 생물농약의 불안정한 방제 효율
- 난 방제 병해충
 - 식물바이러스
 - 꿀벌기생체
- 증가된 개발 기간 및 비용 부담

dsRNA 병해충 방제 원리

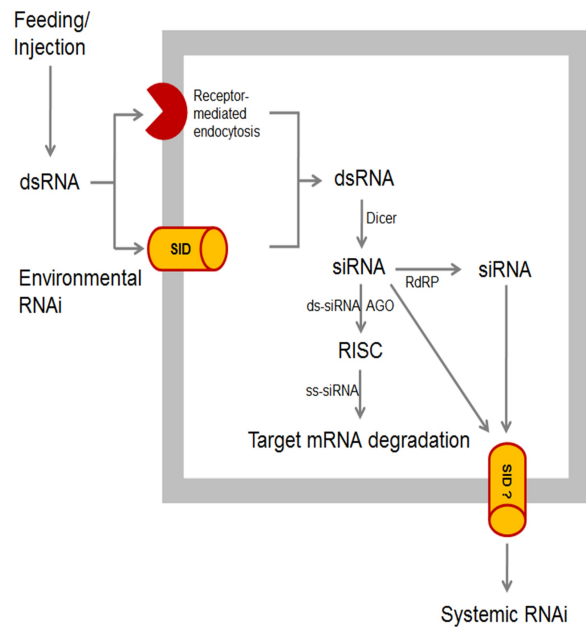
진핵생명체 조절단계의 다양성

1. 전사단계
2. RNA 가공 단계
3. mRNA 수송 단계
4. **mRNA 수명 조절**
5. 번역조절
6. 단백질 활성 조절



RNAi 과정

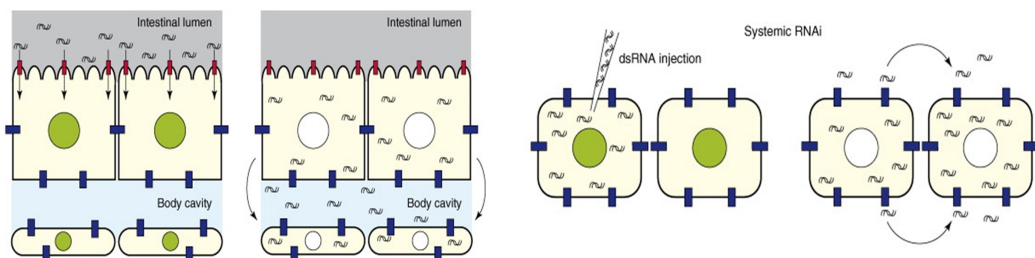
1. Exogenous dsRNA (several hundred bp)
2. Dicer (RNaseIII) → ~20 bp ds-siRNA
3. RISC (helicase)
ss-siRNA (antisense)
4. Ago2-siRNA complex
5. Ago2-(siRNA + Target mRNA) duplex
6. Cut target mRNA



김용균 (2017) 한응곤지 56, 153-164

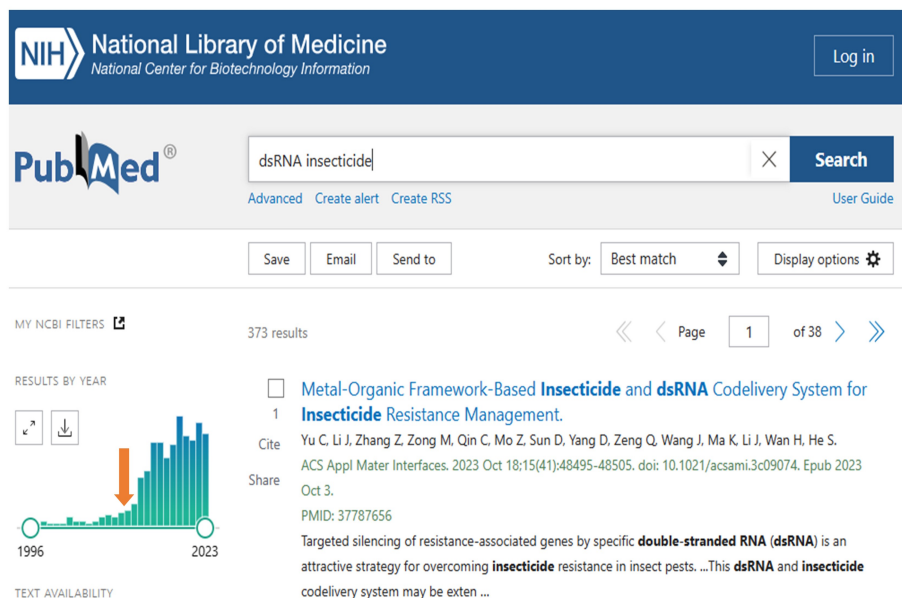
RNA 간섭(RNAi) 방식

- 환경 RNAi (environmental RNAi)
- 전신 RNAi (systemic RNAi)
- 부모 RNAi (parental RNAi)



RNAi 해충방제 산업화

dsRNA 살충제 개발 현황



MON87411



Crop: *Zea mays* L. - Maize, Corn

Developer: Monsanto Company (including fully and partly owned companies)

Method of Trait Introduction: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation

GM Traits: Glyphosate herbicide tolerance , Coleopteran insect resistance

Commercial Trait: (Stacked) Herbicide Tolerance (HT) + Insect Resistance (IR)

Gene Introduced	Gene Source	Product	Function
<i>cry3Bb1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kumamotoensis	Cry3Bb1 delta endotoxin	confers resistance to coleopteran insects particularly corn rootworm by selectively damaging their midgut lining
<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	herbicide tolerant form of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzyme	decreases binding affinity for glyphosate, thereby conferring increased tolerance to glyphosate herbicide
<i>dsnf7</i>	Western Corn Rootworm (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>)	double-stranded RNA transcript containing a 240 bp fragment of the WCR Snf7 gene	RNAi interference resulting to down-regulation of the function of the targeted Snf7 gene leading to Western Corn Rootworm mortality.

First sprayable dsRNA insecticide



First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets *Proteasome* Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*)

Thais B. Rodrigues*, Sambit K. Mishra¹, Krishnakumar Sridharan¹, Ethann R. Barnes¹, Andrei Alyokhin¹, Rich Tuttle¹, Wimalanathan Kokulapalan¹, David Garby¹, Nicholas J. Skotini¹, Yu-wen Tang¹, Brian Marley¹, Lorenzo Aulisa¹, Ronald D. Flanagan¹, Carole Cobb¹ and Kenneth E. Nares¹



Calantha™ anticipated to be GreenLight's first EPA-registered product

Foliar-applied RNA solution for protection against Colorado potato beetle

The problem: Colorado potato beetle causes hundreds of millions¹ of damage a year and develops rapid resistance.

Calantha™ subject to EPA approval (anticipated in 2023)

- Novel mechanism of action, proposed IRAC group 35
- GreenLight designed, developed, and manufactured
- Use rate of 9.4 grams per hectare

Details

- 2022 field season designed to develop commercial use pattern
- Use pattern and cost to grower on track to be cost-competitive to premium synthetic solutions
- Low risk for operators and consumers
- Low to no detectable residue
- Gearing up for commercial launch

CPB has a long history of resistance development and has documented insensitivity to 54 different active ingredients in nearly all existing insecticide MoA groups^{2,3}

Potato fields protected in 2021 WI field trials

Untreated, 30 days

9.4 g/ ha of GreenLight RNA

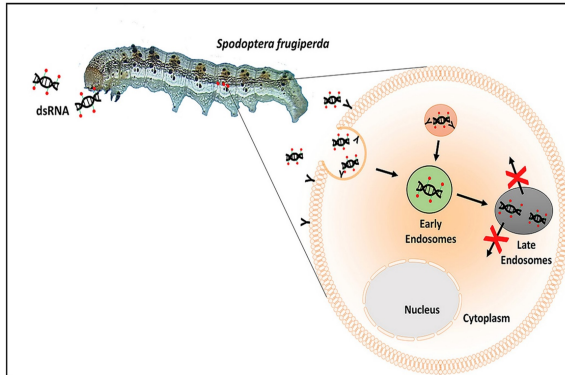


화학약제에 비해 빠른 RNAi 약제 개발 및 등록



dsRNA 방제제 적용범위

1. dsRNA 살충제



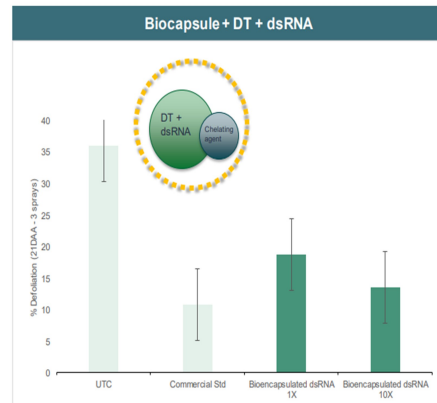
Contents lists available at ScienceDirect
Insect Biochemistry and Molecular Biology
journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmb



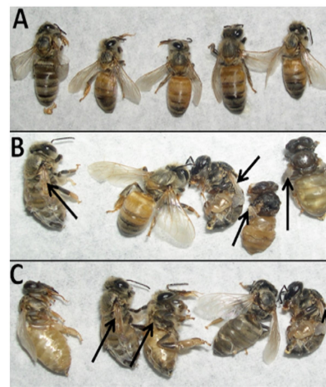
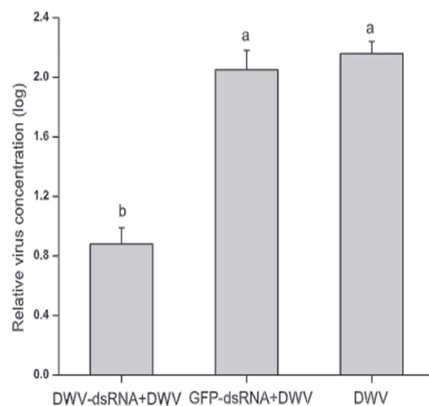
Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*

June-Sun Yoon, Dhandapani Gurusamy, Subba Reddy Palli*

Department of Entomology, University of Kentucky, Lexington, KY 40546, USA



2. dsRNA – 양봉(꿀벌 병 치료제)



Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion

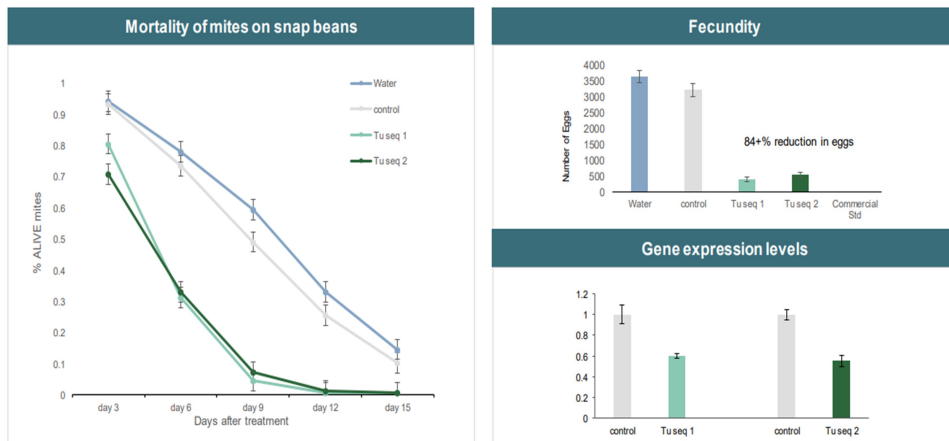
Insect Molecular Biology (2012) 21(4), 446–455

3. dsRNA 살비제



dsRNAs cause mite mortality and decreased fecundity

Two target sequences sourced from collaboration demonstrate efficacy against mites on snap bean

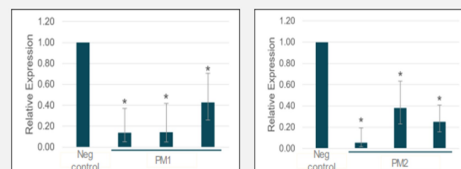


4. dsRNA 살균제



ID	Powdery mildew control on grapes in field trials		
	Percentage of disease control	Biological control program	Conventional control program
PM1	66% (bcd)	71% (bc)	92% (a)
PM2	72% (b)		

GreenLight sequences without formulations performed similarly to the biological standard in field trials.



Gene-specific qPCR analysis of target transcripts. Gene expression normalized to negative control showed significant decrease of targeted genes expression when treated with PM1 & PM2, respectively (95% Confidence Interval, * P<0.05; Tukey test)

5. dsRNA 살선충제

Target gene	Nematode species	Host plant	promoter	phenotype	Time point	References
Integrase	<i>M. incognita</i>	Tobacco	35S	>90% reduction in number of established nematodes	6-7 weeks after infection	Yadav et al., 2006
Splicing factor	<i>M. incognita</i>	Tobacco	35S	>90% reduction in number of established nematodes	6-7 weeks after infection	Yadav et al., 2006
Secreted peptide 16D10	<i>M. incognita</i> <i>M. arenaria</i> <i>M. javanica</i> <i>M. hapla</i>	Arabidopsis	35S	63-90% reduction in number of galls and gall size	4 weeks after infection	Huang et al., 2006
Major sperm protein	<i>H. glycines</i>	Soybean	ACT2	Upto 68% reduction in number of eggs	8 weeks after infection	Steeves et al., 2006
Putative transcription factor	<i>M. javanica</i>	Tobacco	35S	None	6 weeks after infection	Fairbairn et al., 2007
Ribosomal protein 3a	<i>H. glycines</i>	Soybean	FMV-sgt	87% reduction in number of female cysts	8 days after infection	Kirlik et al., 2009
Ribosomal protein 4	<i>H. glycines</i>	Soybean	FMV-sgt	81% reduction in number of female cysts	8 days after infection	Kirlik et al., 2009
Spliceosomal SR protein	<i>H. glycines</i>	Soybean	FMV-sgt	86% reduction in number of female cysts	8 days after infection	Kirlik et al., 2009
40S6, Ubiquitin-like	<i>H. schachtli</i>	Arabidopsis	35S	23-64% reduction in number of developing females	14 days after infection	Sinshu et al., 2009
38S5, cellulose binding protein	<i>H. schachtli</i>	Arabidopsis	35S	12-47% reduction in number of developing females	14 days after infection	Sinshu et al., 2009
8H07, SKP1-like	<i>H. schachtli</i>	Arabidopsis	35S	>50% reduction in number of developing females	14 days after infection	Sinshu et al., 2009
10A06, Zinc finger protein	<i>H. schachtli</i>	Arabidopsis	35S	42% reduction in number of developing females	14 days after infection	Sinshu et al., 2009
Y25, beta subunit of COP1 complex	<i>H. glycines</i>	Soybean	35S	81% reduction in number of nematode eggs	5 weeks after infection	Li et al., 2010a,b
Ptp-17, Pre-mRNA splicing factor	<i>H. glycines</i>	Soybean	35S	79% reduction in number of nematode eggs	5 weeks after infection	Li et al., 2010b
Cpn-1	<i>H. glycines</i>	Soybean	35S	96% reduction in number of nematode eggs	5 weeks after infection	Li et al., 2010b
Ppn7	<i>M. incognita</i>	Tomato	35S	Reduction in motility and infectivity of J2s	40 days after infection	Niu et al., 2012
AF531170, parasitism gene	<i>M. incognita</i>	Tomato	35S	54-59% reduction in number of developing females	7, 21, 30 days after infection	Choudhary et al., 2012
8D05, Parasitism gene	<i>M. incognita</i>	Arabidopsis	35S	Reduction in number of galls	8 weeks after infection	Xue et al., 2013
fp-14, FMRF amide like peptide	<i>M. incognita</i>	Tobacco	35S	Reduction in parasitic ability from 67-86%	30 days after infection	Papoulis et al., 2013
fp-18, FMRF amide like peptide	<i>M. incognita</i>	Tobacco	35S	Reduction in parasitic ability from 53-82%	30 days after infection	Papoulis et al., 2013
Ms-ser-1, serine protease	<i>M. incognita</i>	Tobacco	35S	Reduction in number of eggs per gram of root. Reduction in egg hatching ratio	28 days after infection	Antonino de Souza Junior et al., 2013
Ms-cpi-1, Cysteine protease	<i>M. incognita</i>	Tobacco	35S	Reduction in number of eggs per gram of root.	28 days after infection	Antonino de Souza Junior et al., 2013
Ms-asp-1+Ms-ser-1+Ms-cpi-1 (fusion)	<i>M. incognita</i>	Tobacco	35S	Reduction in number of eggs per gram of root.	28 days after infection	Antonino de Souza Junior et al., 2013
PV010	<i>P. vulvulus</i>	Walnut	35S	Reduction in number of nematodes	60 days after infection	Wallowage et al., 2013
Mc16D10L	<i>M. chitwoodi</i>	Potato	35S	65-68% Reduction in the number of egg masses	35, 55 days after infection	Dirn et al., 2014b
Mc16D10L	<i>M. chitwoodi</i>	Arabidopsis	35S	57 and 67% reduction in number of egg masses and eggs respectively	35, 55 days after infection	Dirn et al., 2014a
Ms-cpi-1	<i>M. incognita</i>	Tomato	35S	60-80% reduction in infection and multiplication	35 days after infection	Dutta et al., 2015b
Pp-pst-10	<i>P. penetrans</i>	Soybean	35S	Upto 40% reduction in number of nematodes	3 months after infection	Veira et al., 2015
Pp-unc-87	<i>P. penetrans</i>	Soybean	35S	Upto 50% reduction in number of nematodes	3 months after infection	Veira et al., 2015

RNA Interference: A Novel Source of Resistance to Combat Plant Parasitic Nematodes

Sagar Banerjee^{1,2,*}, Anamika Banerjee¹, Sarvajit S. Ghil², Om P. Gupta¹, Anil Dahuja¹, Pradeep K. Jain¹ and Anil Sinshi^{1*}

Front. Plant Sci. 8:834.

dsRNA 농약 개발 난제

1. 곤충 종별 자체 속성

- 일반적으로 딱정벌레 및 메뚜기류 높은 RNAi 효율
- 반면에 나비목 곤충의 낮은 RNAi 효율

대상해충	dsRNA 처리법	표적 유전자	살충력	문헌
바퀴(<i>Blattella germanica</i>)	혈강 주입	α -tubulin	100% (실내)	Lin et al. (2017)
집원개미(<i>Cryptotermes formosanus</i>)	섭식	α -tubulin	20% (실내)	Chen et al. (2023)
사막메뚜기(<i>Schistocerca gregaria</i>)	혈강 주입	clock	90% (실내)	Toback et al. (2012)
완두수염진딧물(<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	살포	vATPase	81.2% (실내)	Niu et al. (2019)
복숭아혹진딧물(<i>Myzus persicae</i>)	섭식	Peroxidase	62% (실내)	Yang et al. (2023)
		Hydrolase	55% (실내)	
		Ca ²⁺ binding protein	53% (실내)	
목화진딧물(<i>Aphis gossypii</i>)	분무	Synapsin	66% (실내)	Qu et al. (2022)
	섭식	Chitin synthase 1	59% (실내)	Ullah et al. (2019)
완두벌구(<i>Sogatella furcifera</i>)	혈강 주입	β -catenin	95% (실내)	Liu et al. (2023)
		scalloped (downstream effector molecule in the wingless pathway of wing imaginal discs)	45% (실내)	
		yorkie	6% (실내)	

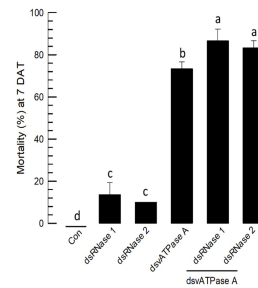
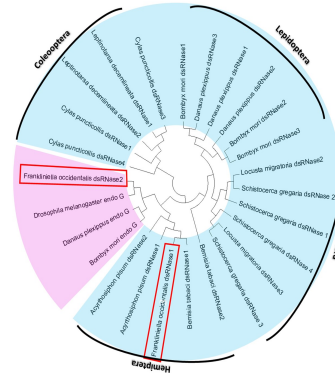
2. 대상 유전자별 dsRNA 방제효과 다양성

- 고효율 유전자류
 - 1) Proteasome 관련 유전자류
 - 2) vATPase
 - 3) 구조 관련 유전자류 - actin 또는 키틴합성유전자
 - 4) 호르몬 수용체
- 곤충마다 다른 효율을 보이기에 스크리닝을 통한 선발 필요성

대상 식물병균	기주	dsRNA 처리법	표적 유전자	살균력	문헌
잣빛곰팡이 (<i>Botrytis cinerea</i>)	토마토	살포	<i>DCL1</i>	80% 병반감소	Qiao et al. (2021)
	상추		<i>DCL1</i>	60% 병반감소	
	장미		<i>DCL1</i>	70% 병반감소	
	포도		<i>DCL1</i>	70% 병반감소	
	상추	침지	<i>Bmp1</i>	30% 포자발아 억제	Spada et al. (2023)
			<i>Pb1</i>	10% 포자발아 억제	Spada et al. (2021)
<i>Bmp3</i>			98.5% 균사성장 억제		
균핵버섯 (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	상추	살포	<i>DCL1</i>	80% 병반감소	Qiao et al. (2021)
	케일			80% 병반감소	
	배추		toxin biosynthesis (SS1G_01703)	85% 병반감소	McLoughlin et al. (2018)
누룩곰팡이 (<i>Aspergillus niger</i>)	토마토	살포	<i>DCL1</i>	70% 병반감소	Qiao et al. (2021)
	사과			70% 병반감소	
	포도			80% 병반감소	

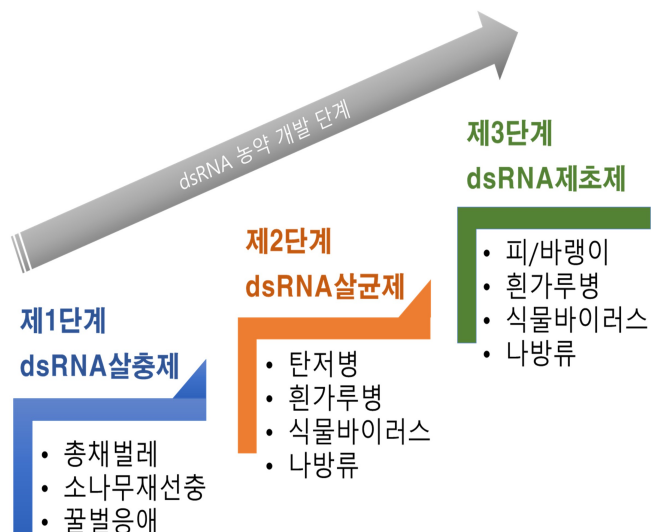
3. dsRNA 화학적 안정성

- 야외 환경 조건에서
 - 1) 자외선 노출
 - 2) 건조
- 곤충 체내에서
 - 1) 장내 효소 작용(예, dsRNase)
 - 2) 세포내 라이소좀 분해 작용



국내 dsRNA 농약 산업 정책 제안

국내 dsRNA 농약 개발 단계



dsRNA 농약 개발 관련 기술선진국과 한국의 R&D 기술 격차

항목	기술 선진국	대한민국
dsRNA	연구용 dsRNA 제조기술	비등
제조기술	산업용 dsRNA 제조기술	미흡
dsRNA 제형화 기술	세균 제형화 기술	비등
	키토산 제형화 기술	비등
	BioClay 제형화 기술	미흡
dsRNA 안전성 분석 기술	dsRNA 농약에 대한 포유동물 독성 분석 기술	미흡
	dsRNA 농약에 대한 생태 독성 분석 기술	미흡
dsRNA 등록제도	생물농약 기반 dsRNA 자체 등록 제도 구비	부재

1. dsRNA 방제제 등록 제도화

dsRNA 등록 제도

1. 약효 검정
2. 식물독성 검정
3. 인축 독성 검정
4. 비표적 생명체(NTO)
5. 잔류 검정 - 미적용

AGENCY:

Environmental Protection Agency (EPA).

ACTION:

Final rule.

SUMMARY:

This regulation establishes an exemption from the requirement of a tolerance for residues of Ledprona double-stranded (ds) RNA in or on potato when used as a foliar-applied insecticide for the selective control of Colorado potato beetle and in accordance with label directions and good agricultural practices. GreenLight Biosciences, Inc. submitted a petition to EPA under the Federal Food, Drug, and

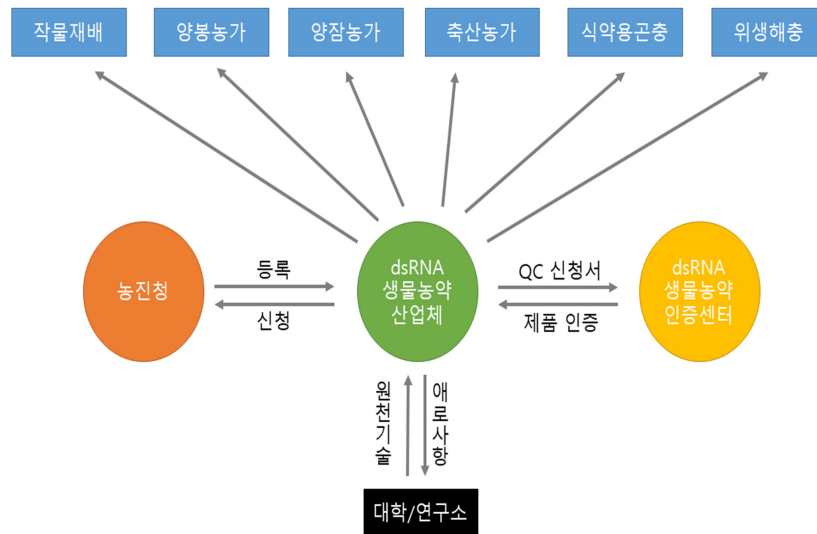
Start Printed Page 69040

Cosmetic Act (FFDCA), requesting an exemption from the requirement of a tolerance. This regulation eliminates the need to establish a maximum permissible level for residues of Ledprona dsRNA under FFDCA when used in accordance with this exemption.

DATES:

This regulation is effective October 5, 2023. Objections and requests for hearings must be received on or before December 4, 2023, and must be filed in accordance with the instructions provided in [40 CFR part 17/8](#) (see also Unit I.C. of the SUPPLEMENTARY INFORMATION).

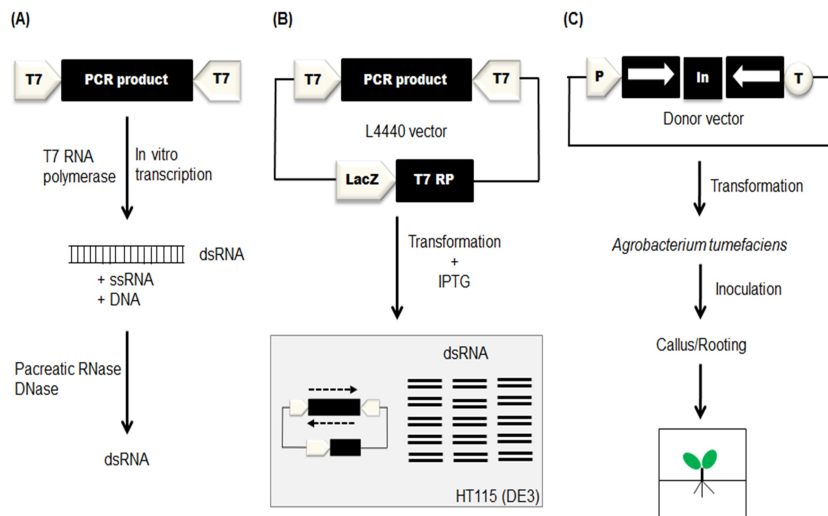
dsRNA 농약 등록 절차 및 사용 영역



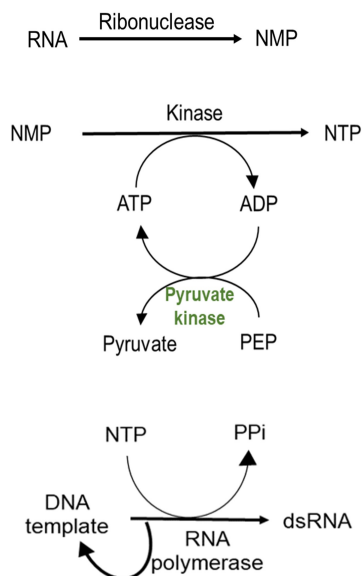
2. dsRNA 대량 생산 산업화 기술

dsRNA 합성

- Cell-free 합성 과정
- 재조합 세균(또는 바이러스)을 이용한 생합성 과정
- 형질전환 작물체

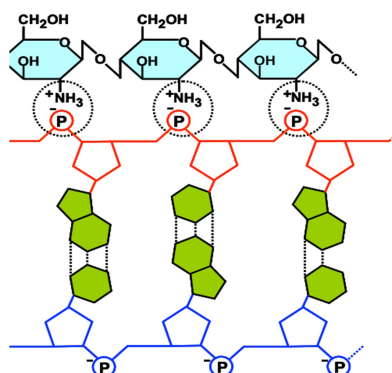


Cell-free dsRNA 대량생산 기술 단계

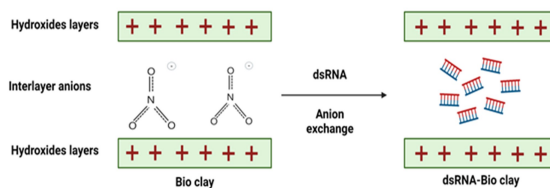


3. dsRNA 제형화 기술

효율적 제형화 기술 개발



키토산 나노제형화



LDH 나노제형화

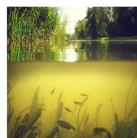
4. dsRNA 위해성 평가 기술

dsRNA 위해성 평가 기술 영역



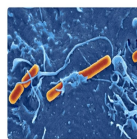
인축독성

- 급성 및 만성 독성
- 신체 장기 영향 평가
- 비표적(내분비계, 면역계 및 신경계) 영향 평가



생태독성

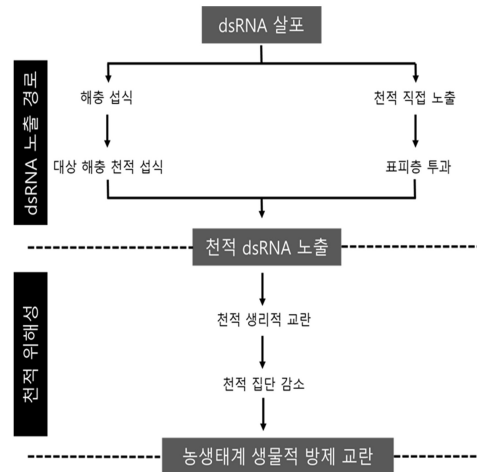
- 서식지별 대표 동물 독성 평가
- 표적 유전자 염기 서열 유사성
- 유용 무척추동물(화분매개충, 천적) 영향평가



유전자수평전달

- 근권 미생물 영향평가
- 장내 미생물 영향평가
- 농생태계 환경 미생물 영향 평가

살포 dsRNA의 천적에 대한 노출 경로와 위해성



결론

1. 연구 지원 정책

- (1) dsRNA를 활용한 생물농약 개발 및 대량스크리닝 기술 개발
- (2) Cell-free dsRNA 대량생산 산업화 기술 개발
- (3) dsRNA 농약 제형화 및 위해성 평가 기술 개발

2. 산업화를 위한 법제화 지원 정책

- (1) dsRNA 신규 등록을 위한 농약관리법 개정
- (2) dsRNA 시험 전용 비임상수탁기관(CRO) 및 벤처기업 협회 육성
- (3) dsRNA 농약 개발 및 등록 관련 국제화 교류 사업

KAST Research Report 2024
한림연구보고서 154

화학농약 대체용 dsRNA 농약 개발 및 산업화를 위한 정책 연구

Policy Research for Industrialization of dsRNA Pesticide to Replace Chemical Pesticide

발 행 일 2024년 12월
발 행 처 한국과학기술한림원
발 행 인 유욱준
전화 031) 726-7900
팩스 031) 726-7909
홈페이지 <http://www.kast.or.kr>
E-mail kast@kast.or.kr
편집/인쇄 경성문화사 02) 786-2999
I S S N 2799-5135
977279951300954 (세트)

- 이 책의 저작권은 한국과학기술한림원에 있습니다.
- 한국과학기술한림원의 동의 없이 내용의 일부를 인용하거나 발췌하는 것을 금합니다.



화학농약 대체용 dsRNA 농약 개발 및 산업화를 위한 정책 연구

이 사업은 복권기금 및 과학기술진흥기금 지원을 통한 사업으로
우리나라 사회적 가치 증진에 기여하고 있습니다.