

Research Article

Open Access

## Protox 제초제저항성 벼 재배가 토양미생물 군집에 미치는 영향

오성덕, 안병옥, 김민경, 손수인, 류태훈, 조현석, 김창기,<sup>1</sup> 백경환,<sup>2</sup> 이기종\*

농촌진흥청 국립농업과학원, <sup>1</sup>한국생명공학연구원 바이오평가센터, <sup>2</sup>전남대학교 응용생물공학부 분자생명공학전공

### Effects of Protox Herbicide Tolerance Rice Cultivation on Microbial Community in Paddy Soil

Sung-Dug Oh, Byung-Ohg Ahn, Min-Kyeong Kim, Soo-In Sohn, Tae-Hun Ryu, Hyun-Suk Cho, Chang-Gi Kim,<sup>1</sup> Kyoung-Whan Back<sup>2</sup> and Kijong Lee (National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-707, Korea, <sup>1</sup>Bio-Evaluation Center, KRIBB, Cheongwon 363-883, Korea, <sup>2</sup>Division of Applied Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea)

Received: 9 January 2013 / Revised: 28 February 2013 / Accepted: 8 March 2013

© 2013 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### Abstract

**BACKGROUND:** Rice (*Oryza sativa*) is the most important staple food of over half the world's population. This study was conducted to evaluate the possible impact of transgenic rice cultivation on the soil microbial community.

**METHODS AND RESULTS:** Microorganisms were isolated from the rhizosphere of GM and non-GM rice cultivation soils. Microbial community was identified based on the culture-dependent and molecular biology methods. The total numbers of bacteria, fungi, and actinomycete in the rhizosphere soils cultivated with GM and non-GM rice were similar to each other, and there was no significant difference between GM and non-GM rice. Dominant bacterial phyla in the rhizosphere soils cultivated with GM and non-GM rice were *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria*. The microbial communities in GM and non-GM rice cultivated soils were characterized using the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The DGGE profiles showed similar patterns, but didn't show

significant difference to each other. DNAs were isolated from soils cultivating GM and non-GM rice and analyzed for persistence of inserted gene in the soil by using PCR. The PCR analysis revealed that there were no amplified protox gene in soil DNA.

**CONCLUSION(S):** These data suggest that transgenic rice does not have a significant impact on soil microbial communities, although continued research may be necessary.

**Key Words:** GMO, Protox, Rice, Soil microbial community

#### 서론

제초제내성 대두가 상업적으로 재배된 1996년 이후 유전자변형(Genetically modified, GM) 작물의 재배면적은 해마다 증가하고 있다. 2011년 전 세계 유전자변형 작물의 재배면적은 1억 6,000만 ha(James, 2011)로, 대한민국 국토면적(221,336km<sup>2</sup>)의 약 7.2배에 해당된다. 유전자변형 작물 중 제초제내성 대두, 옥수수, 유채, 면화의 재배면적은 약 9,400만 ha로 전 세계 유전자변형 작물 재배면적의 59%를 차지하고 있다. 일반적으로 제초제내성 작물은 glyphosate나 glufosinate 제초제에 내성을 가짐으로써 잡초방제에 소요되는 노동력과 농기계 사용 절감에 따른 경제적 이익(Owen, 2000), 무경운 농업에 의한 토양 환경 보존 및 화석연료 사용 절감에 따른

\*교신저자(Corresponding author)

Tel: +82-31-299-1142, Fax: +82-31-299-1122;

Email: leekjong@korea.kr

기후 변화 대응 효과(Brookes and Barfoot, 2006) 등의 장점이 있다. 반면 도입 유전자의 이동(gene flow)에 의한 슈퍼잡초 발생 가능성(Ellstrand, 1992)과 생태계 교란(Conner *et al.*, 2003) 등의 우려로 유전자변형 작물의 이용에 대한 논란은 계속되고 있다. 현재 국내에서는 유전자변형 작물의 재배가 이루어지고 있지 않지만, 유전자변형 작물 개발 연구의 확대에 상용화에 앞서 유전자변형 작물이 환경에 미칠 수 있는 요인들의 면밀한 분석이 필요하다.

원핵생물은 생존을 위한 방법으로 접합(conjugation), 형질도입(transduction), 형질전환(transformation) 등을 통해 종간 또는 종내에서 유전자 이동이 일어나며(Ochman *et al.*, 2000), 다양한 환경에서 배양 가능한 원핵생물 중 약 90종에서 유전자 전달이 일어나는 것으로 보고되었다(de Vries and Wackernagel, 2005). 항생제저항성 유전자를 도입한 감자의 *in vitro* 실험에서는  $2 \times 10^{-17}$  빈도로  $\beta$ -lactamase 유전자가 감자줄기썩음병원균 *Erwinia chrysanthemi*로 이동되었다(Jonas *et al.*, 2001). 따라서 제조제내성 유전자변형 작물의 대규모 재배로 제조제내성 유전자 전달에 의한 생태계 교란 가능성 논란이 제기되기도 하였으나(de Vries and Wackernagel, 2005), 아직까지 포장에서 재배된 유전자변형 작물로부터 세균으로의 유전자 전달에 관한 명확한 증거는 보고된 바 없다(Kim *et al.*, 2010). 국내에서는 제조제내성 고추(Lee *et al.*, 2007), 해충저항성 배추(Sohn *et al.*, 2010), 비타민 E 강화 콩(Lee *et al.*, 2011) 등의 형질전환 작물 재배가 근권 토양과 미생물상에 미치는 영향에 대하여 보고된 바 있다.

유전자변형 작물의 상용화를 위해서는 환경위해성 평가를 통한 안전성 검정이 필수적이며, 특히 우리나라에서 주곡으로 오랜 기간 동안 이용해온 벼는 토양 미생물상을 비롯한 농업 환경 영향에 대한 자세한 연구가 필요하다. 프로토포르피린노젠 옥시다아제(Protoporphyrinogen oxidase, Protox)는 엽록소/헴 생합성 경로의 핵심적인 효소로 protoporphyrinogen IX (Proto IX)를 protoporphyrin IX (Proto IX)로 산화시키는데 촉매 역할을 한다. Protox 저해 제조제가 작용하면 Protox의 산물인 Proto IX가 세포질에 축적되며, 이로 인해 광조건에서 막이 과산화되면 세포가 사멸하게 된다. 본 연구에서는 토양 미생물인 *Myxococcus xanthus*로부터 유래한 protox 유전자를 도입한 제조제내성 벼(Jung *et al.*, 2004)의 포장 재배가 토양 미생물에 미치는 영향을 분석하기 위하여 근권 토양의 화학분석, 토양 미생물 군집밀도 등을 비형질전환 벼인 동진벼 및 추청벼와 비교 조사하였다. 또한 분자생물학적 기술을 이용하여 토양 미생물의 전체 군집변화와 도입 유전자의 이동성을 분석함으로써 환경위해성 연구 및 유전자변형 벼의 위해성평가 가이드라인을 구축하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 토양시료

토양 미생물(*Myxococcus xanthus*)에서 유래한 protopor-

phyrinogen oxidase(protox) 유전자가 도입된 형질전환 벼(CPPO06), 모본(동진벼)과 참고품종인 추청벼를 표준재배법에 따라 한국생명공학연구원 LMO격리포장에 이양하고 재배하면서, 영양생장기와 생식생장기 등 생육단계별로 토양 시료를 채취하였다. 토양 시료는 Kim 등(2008)의 방법에 따라 식물체를 뿌리째 뽑아 비 근권 토양을 제거한 토양을 군집밀도 분석에 이용하였으며, 풍건 후 2 mm의 표준망체로 거른 토양은 화학성 분석에 이용하였다.

### 미생물 군집 분석

채취한 토양 10 g에 멸균한 0.85% NaCl 90 mL를 첨가하고 진탕 배양기에서 30분간 200 rpm으로 현탁하였다. 현탁액은 일련의 희석과정을 거친 후 28°C 조건에서 도말하여 세균, 진균 및 방선균을 배양하였으며, 각각 cycloheximide(0.05 g/L)를 첨가한 R2A agar(NA, Difco, MI) 배지에서 2일간, chloramphenicol(0.02%)을 첨가한 R2A agar 배지에서 4일간, Sodium caseinate agar 배지에서 5일간 배양한 후 계수하였다. 배양된 미생물 수는 페트리디쉬에 나타난 균체를 3 반복 계수한 평균값을 생균수(colony forming unit, CFU/g 건조)로 산출하였다.

### DGGE를 이용한 미생물 군집 분석

형질전환 벼와 비 형질전환 벼를 재배한 토양 미생물 간의 군집 변화를 알아보기 위해 Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) 분석을 하였다. FastDNA Spin Kit(Qbiogen, USA)로 토양 미생물 DNA를 추출하고, 진정 세균의 미생물상 변이 여부를 분석하기 위하여 16S rRNA의 V9 부위를 증폭하는 1070f(5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3')와 여분의 G+C clamp(CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCGCCCCCGCCCC)가 부가된 1392r(5'-ACGGCGGTGTGTAC-3') primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 각각 5  $\mu$ L 10 x PCR buffer, 10 ng 주형 DNA, 25 pmol 양방향 프라이머, 200  $\mu$ M dNTP, 2.5 U *f-Taq* DNA polymerase(Solgent, Daejeon, Korea)를 첨가한 후 최종 부피를 50  $\mu$ L로 하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 과정을 30번 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 Dcode Universal Mutation Detection System(Bio-Rad, Hercules, USA)을 사용하여 변성제인 formamide가 40-70%로 농도 구배된 8% acrylamide gel에서 전기영동하였다. 전개된 DNA를 SYBR Green I(Cambrex BioScience, USA)과 EtBr로 염색하여 UV trans-illuminator에서 관찰하였다.

### 우점세균 동정

식물뿌리의 존재에 의해 토양 미생물이 영향을 받는 토양 내의 공간을 근권이라고 하는데 근권의 토양부분에서 세균을 동정하기 위하여 FastDNA Spin Kit로 DNA를 추출하고, 27mf(5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')와

1492r(5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 세균의 전체 16S rRNA 부위를 증폭하였다. PCR 반응물의 조성과 조건은 미생물 군집 분석 방법과 동일하게 수행하였으며, 1% agarose gel에서 확인된 DNA를 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 삽입하고 *E. coli* DH5a에 형질전환하여 배양하였다. 형성된 콜로니를 무작위로 선발하여 DNA clean kit(Bioneer, Daejeon, Korea)로 정제하고 우점세균의 동정을 위해서 특이적인 27mf와 519r(5'-ACGG GCGGTGTGTAC-3') primer를 사용하여 삽입 절편을 증폭하였다.

### 근권 토양 화학분석

토양 화학분석은 농촌진흥청의 토양 및 식물체 분석법(NIAST, 2000)에 준하여 형질전환 벼와 비 형질전환 벼의 근권 토양을 음지에서 건조시키고 2 mm체를 통과한 토양을 분석하였다. pH와 EC는 토양과 증류수를 1:5로 혼합하여 30 분간 진탕한 후 현탁액을 측정하였으며, 유기물 함량은 Walkley와 Black법(Walkley and Black, 1934), 유효인산은 Bray No. 1법(Bray and Kurtz, 1945)으로 각각 분석하였다. 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 나트륨 등 치환성양이온은 1N Ammonium acetate(pH=7.0)로 침출한 후 유도결합플라즈마가 장착된 원자발광분광기(ICP-730-ES)로 분석하였다.

### 유전자 잔존성 조사

형질전환 벼로부터 근권 주변 미생물로의 수평적 유전자 이동성 여부를 확인하기 위하여 근권 토양에서 DNA를 분리하고 PCR증폭을 통해 토양 내 잔존성을 조사하였다. 도입유전자(protox)를 증폭할 수 있는 primer(Protox F, 5'-ATG CATCACATGCCAAGA-3', R, 5'-CTACCCTACGGTG CATGAGAAGT-3')와 벼의 내재유전자(Actin)를 증폭할 수 있는 primer(Actin F, 5'-AICTTGGCCTTGGIAGTIG-3', R, 5'-GTACCCGCATCAGGCATCTG-3')를 사용하여(Jung *et al.*, 2004) PCR 반응을 실시하였으며, PCR 반응물의 조성 과 조건은 미생물 군집 분석에 이용된 방법과 동일하게 하였다.

## 결과 및 고찰

### 근권 토양 미생물상 분석

Protox 제초제내성 벼 재배가 근권 토양의 미생물상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 생육단계에 따른 제초제내성 벼(CPPO06)와 비 형질전환 벼(동진벼, 추청벼)의 근권 토양에 대한 세균, 방선균 및 진균의 밀도를 비교 분석하였다(Table 1). 제초제내성 벼와 비 형질전환 벼에서의 근권 토양 유래 세균, 방선균 및 진균의 밀도는 유의성이 없어( $P>0.05$ ), 제초제내성 벼 재배에 의한 근권 토양 미생물상의 영향은 비 형질전환 벼 재배와 유사할 것으로 추정되었다. 그러나 protox 저해 제초제가 아닌 관행제초제를 처리하여 재배한 제초제내성 벼[CPPO06(C.C)]의 토양 세균 밀도는 생식생장기에 증가하였다( $P<0.05$ ). 식물 뿌리에서 배출되는 삼출물은

미생물 군집 및 활성의 변화를 초래하며, 근권 토양 미생물상의 변화는 유기물의 분해와 순환에 영향을 주어(Sharma *et al.*, 2005) 식물의 생육이나 병원균 성장 등에 직·간접으로 영향을 끼칠 수 있다(Miethling *et al.*, 2000). 그러나 식물체의 생육상태와 근권 미생물과의 상호작용에 의해 미생물의 군집은 변화될 수 있으며(Kardol and Bezemer, 2006), 생식생장기에 증가된 세균 군집밀도는 수확 이후 안정화되었기 때문에( $P>0.05$ ), 군집밀도 증가는 생육시기에 의한 일시적인 변화로 추정되었다. 배양 가능한 미생물에 대한 유전자변형 작용의 영향을 간단하게 분석할 수 있는 평판배양법은 glufosinate 제초제내성 벼와 비 형질전환 벼를 재배한 토양의 미생물 군집 분석에 이용되었으며 본 연구와 유사하게 차이가 없다고 보고하였다(Kim *et al.*, 2008).

**Table 1. Number of microbial population in the GM and non-GM rice cultivation soil**

Soil Microbes	Samples	Growth stage		
		Vegetative	Reproductive	Post-harvest
Bacteria ( $\times 10^6$ CFU/g) <sup>z</sup>	CPPO06	24.2 <sup>a</sup>	19.1 <sup>a</sup>	5.50 <sup>a</sup>
	CPPO06(C.C)	22.3 <sup>a</sup>	24.7 <sup>b</sup>	5.30 <sup>a</sup>
	Dongjinbyeo	22.0 <sup>a</sup>	16.8 <sup>a</sup>	6.20 <sup>a</sup>
	Chucheongbyeo	20.0 <sup>a</sup>	16.2 <sup>a</sup>	5.70 <sup>a</sup>
Fungi ( $\times 10^4$ CFU/g)	CPPO06	5.42 <sup>a</sup>	5.42 <sup>a</sup>	5.40 <sup>a</sup>
	CPPO06(C.C)	4.59 <sup>a</sup>	4.59 <sup>a</sup>	4.47 <sup>a</sup>
	Dongjinbyeo	5.13 <sup>a</sup>	5.13 <sup>a</sup>	3.67 <sup>a</sup>
	Chucheongbyeo	4.73 <sup>a</sup>	4.73 <sup>a</sup>	4.80 <sup>a</sup>
Actinomycete ( $\times 10^6$ CFU/g)	CPPO06	2.87 <sup>a</sup>	2.86 <sup>a</sup>	1.63 <sup>a</sup>
	CPPO06(C.C)	2.14 <sup>a</sup>	2.79 <sup>a</sup>	1.70 <sup>a</sup>
	Dongjinbyeo	2.21 <sup>a</sup>	2.23 <sup>a</sup>	2.00 <sup>a</sup>
	Chucheongbyeo	2.34 <sup>a</sup>	2.57 <sup>a</sup>	1.87 <sup>a</sup>

<sup>z</sup> colony forming unit(CFU)/g fresh soil weight $\pm$ standard deviation from three replications.

### 벼 재배 토양의 우점종 동정

제초제내성 벼 재배에 의한 토양 내 우점 미생물의 변화를 확인하기 위하여 근권 토양으로부터 DNA를 분리하고 미생물의 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. 근권 토양에서 동정된 세균들의 분포를 phylum 수준에서 비교한 결과(Table 2), 제초제내성 벼와 비 형질전환 벼의 근권 토양에는 *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*가 우점하는 것으로 나타났다. 대상 작물별 또는 생육시기에 따라 제초제내성 벼와 비 형질전환 벼를 재배한 우점 미생물의 점유율은 다소 차이를 보였지만, 우점종은 유사한 것으로 나타났다. 우점종의 생태적 변화가 명확하게 드러날 정도의 차이를 나타내지 않아 제초제내성 벼 재배에 의한 근권 토양 미생물의 우점종 변화에 대한 영향은 크지 않은 것으로 판단되었다. 동일한 지역에서도 재배되는 품종에 따라 토양 서식 미생물의 미세한 군집 차이에

**Table 2. Bacteria isolated from the rhizosphere soils cultivated with GM and non-GM rice in the fields**

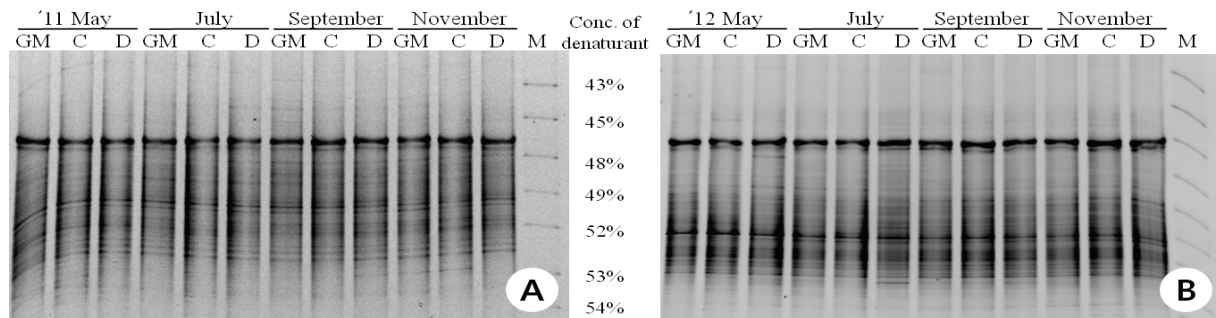
Growth stage	Community	CPPO06	CPPO06(C.C)	Dongjinbyeo	Chucheongbyeo
		Composition (%)			
Vegetative	Acidobacteria	5.7	6.1	5.6	5.8
	Actinobacteria	11.7	10.0	9.3	9.6
	Bacteroidetes	3.8	4.4	4.6	4.6
	Cyanobacteria	0.8	1.3	0.9	0.9
	Firmicutes	8.5	9.1	10.6	9.8
	Planctomycetes	1.3	1.1	1.1	1.3
	Proteobacteria	31.8	29.3	28.4	30.8
	Verrucomicrobia	1.7	0.8	0.6	1.0
	Etc	34.8	37.9	38.8	36.2
Reproductive	Acidobacteria	6.9	6.1	6.2	6.2
	Actinobacteria	5.8	7.2	4.7	5.0
	Bacteroidetes	4.3	4.0	4.5	4.6
	Cyanobacteria	1.0	1.7	1.0	0.5
	Firmicutes	9.3	7.2	7.0	8.6
	Planctomycetes	1.3	1.2	1.2	1.4
	Proteobacteria	37.5	39.7	36.3	34.7
	Verrucomicrobia	0.8	1.0	1.3	0.6
	Etc	32.9	32.0	37.8	38.3

의해 근권 내에는 서로 다른 미생물이 다양하게 존재할 수 있다(Filion, 2008; Sohn *et al.*, 2010). 전분 조성을 변경한 형질전환 감자(SIBU SI)는 모본(SIBU)과는 근권 미생물 군집의 차이를 보이지 않았으나 다른 종의 비 형질전환 감자(SOLANA)와는 근권 미생물의 차이가 나타났는데(Filion, 2008) 본 연구에서도 이러한 차이는 동일 지역이라 하더라도 품종에 의한 토양 미생물의 군집 차이에 의해 나타난 결과로 추정되었다.

**DGGE 분석에 의한 토양 미생물 군집**

제초제내성 벼와 비 형질전환 벼를 재배한 토양 DNA를 추출하고 16S rRNA를 특이적으로 증폭하여 DGGE 분석법

으로 근권 토양 미생물 군집을 비교하였다(Fig. 1). 제초제내성 벼, 동진벼(모본)와 추청벼(재배종)의 시기별 근권 토양 DGGE profile은 거의 유사하였다. DGGE profile을 기반으로 밴드가 나타난 양상을 분석한 결과, 공시재료인 벼의 종류에 따른 그룹이 형성되기 보다는 토양의 채취 시기에 따라 그룹이 형성되는 것으로 나타나 제초제내성 벼 재배에 의한 토양 미생물 군집의 변화는 거의 일어나지 않을 것으로 추정되었다. Glufosinate 제초제내성 벼 재배토양의 시기별 DGGE 분석(Kim *et al.*, 2008)에서도 유사한 profile 결과가 나타났으며 특정 시기의 밴드 패턴 차이는 시료 채취 지점의 토양 이질성에 기인하는 것으로 추정되었다. 토양 미생물 군집변이에 대한 DGGE 분석은 재배 품종, 시료 채취 시기



**Fig. 1. DGGE of 16S rRNA fragments from GM and non-GM rice cultivation soil. Lanes: GM, protox herbicide tolerant (CPPO06); C, CPPO06(C.C, conventional herbicide treatment); D, Dongjinbyeo (control), M, DGGE Marker.**

**Table 3. Chemical properties in the rhizosphere soils cultivated with GM and non-GM rice**

Year	Samples	pH	EC (dS/cm)	Ex. C (cmol <sup>+</sup> /kg)				T-N (%)	Av. P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	O.M (g/kg)
				Ca	Mg	K	Na			
2011	CPPO06	7.6 <sup>ab</sup>	0.6 <sup>ab</sup>	7.9 <sup>ab</sup>	2.0 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	170.6 <sup>a</sup>	9.9 <sup>a</sup>
	CPPO06(C.C)	7.6 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	7.5 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	162.3 <sup>a</sup>	10.5 <sup>a</sup>
	Donjinbyeo	7.8 <sup>b</sup>	0.7 <sup>b</sup>	8.1 <sup>b</sup>	2.0 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	227.7 <sup>b</sup>	11.6 <sup>b</sup>
	Chucheongbyeo	7.6 <sup>ab</sup>	0.6 <sup>ab</sup>	8.0 <sup>ab</sup>	1.9 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	173.2 <sup>a</sup>	11.0 <sup>ab</sup>
2012	CPPO06	7.5 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	7.5 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	0.6 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	181.9 <sup>a</sup>	7.2 <sup>a</sup>
	CPPO06(C.C)	7.4 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	7.2 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	133.1 <sup>ab</sup>	6.0 <sup>a</sup>
	Donjinbyeo	7.8 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	8.1 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.09 <sup>ab</sup>	174.1 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>
	Chucheongbyeo	7.5 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	7.9 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	0.6 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.07 <sup>b</sup>	144.7 <sup>a</sup>	5.1 <sup>a</sup>

Different letters are significantly different according to the *F*-distribution at *P*<0.05

및 지역의 토양 이질성 등에 영향을 받을 수 있기 때문에 (Kim *et al.*, 2008), 형질전환 작물에 의한 토양 미생물 군집 비교 연구 시에는 동일한 지역에서 형질전환에 사용된 모본을 반드시 대조구로 사용하여 비교해야 한다.

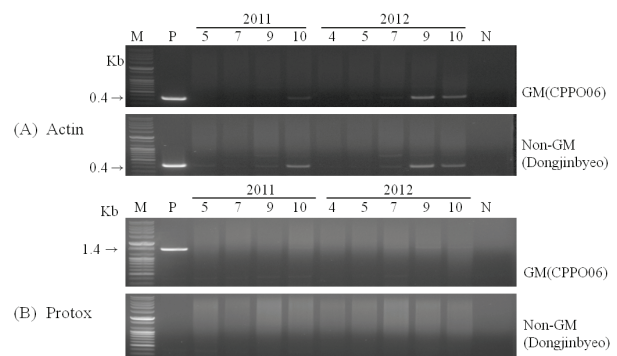
#### 벼 재배포장의 토양 화학성 분석

토양 미생물 군집의 변화에 의한 토양 화학성 변화는 상호 반응하므로 토양 pH, 유효인산, 전기전도도, 양이온, 전질소, 유기물 함량 등을 분석하여 제조제내성 벼와 비 형질전환 벼 재배에 의한 근권 토양의 화학성 변화를 조사하였다(Table 3). 토양 pH는 7.4-7.8로서 우리나라 논 토양의 평균 pH인 5.8(Jung *et al.*, 2001)보다 다소 높았으며 생육 적정범위 (pH 5.5-6.5)보다 다소 높은 것으로 나타났다. 토양 유기물은 토양 비옥도를 판정하는 중요한 지표로 토양 물리성을 개선하고 토양 미생물의 활동을 왕성하게 하는데 본 시험포장의 경우 유기물 함량이 적정범위인 25-30 g/Kg 보다 낮게 나타났다. 유효인산은 논작물 생육 적정범위인 80-120 mg/kg과 유사하거나 다소 높은 것으로 나타났으며, 치환성양이온은 적정범위인 칼륨(0.25-0.30 cmol<sup>+</sup>/kg), 칼슘(5.0-6.0 cmol<sup>+</sup>/kg), 마그네슘(1.5-2.0 cmol<sup>+</sup>/kg)과 비교하였을 때 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. Protox 제조제와 관행제조제를 처리한 형질전환 벼의 근권 토양에서의 전질소, 유효인산, 치환성 양이온은 유의한 것으로 나타났다. 이러한 차이는 제조제내성 벼 재배에 따른 변화라기보다는 시험 지역의 토양 환경이 반영된 변화로 짧은 기간내에 조성된 논 포장의 영향으로 추정되었으며, 합리적인 평가를 위해서는 적절한 토양 개량이 필요할 것으로 예상되었다. 본 연구에서는 재배 2년차에 안정화되어 나타나지 않았지만 미세한 토양 환경의 화학성 변화를 정확하게 판단하기 위해서는 작물 생육기간 동안 연속적인 분석을 통한 비교가 필요할 것으로 예상되었다.

#### 수평적 유전자 이동성 조사

형질전환 시 도입된 유전자의 근권 토양 미생물로의 수평적 유전자 이동을 위해서는 우선 충분한 양의 DNA가 토양 내에 존재해야만 가능하다. 도입 유전자의 잔존성을 확인하기

위하여 식물체 및 식물체를 재배한 근권 토양으로부터 DNA를 분리하고 도입 유전자를 특이적으로 증폭하는 primer로 PCR을 수행하였다(Fig. 2). 식물체의 PCR 결과, 제조제내성 벼는 도입 유전자와 내재 유전자가 함께 증폭되었지만, 비 형질전환 벼는 내재 유전자 밴드만 검출되었다. 근권 토양 DNA의 내재 유전자 PCR 결과, 생육중기까지는 증폭된 밴드가 검출되지 않다가 생육후기인 9월과 10월 토양 DNA에서 증폭된 밴드가 나타났지만 월동 후 차년도에 채취한 4월 토양 DNA에서는 증폭된 밴드를 검출할 수 없었다. 도입 유전자(protox)는 전체 생육시기에 걸쳐 증폭된 밴드가 나타나지 않아 토양 내 잔존성은 내재 유전자보다 낮을 것으로 예상되어 근권 토양 미생물로의 수평적 유전자 이동 가능성은 희박할 것으로 추정되었다. Widmer 등(1997)은 형질전환체 선발에 이용된 항생제 저항성 *npdI* 유전자가 담배와 감자의 경우 각각 77일, 137일간 토양 내에 잔존할 수 있다고 보고하였으나, PCR 분석을 통해 토양 내 도입 유전자는 수개월 내에 분해되어 검출할 수 없는 것으로 확인하였다. 작물을 재배하는 토양에서 식물 DNA의 토양 내 잔존성은 핵산 가수분해 효소에 의한 식물 DNA의 분해(Smalla and Gebhard, 1999; Widmer *et al.*, 1997), 토양 내 DNase의 존재



**Fig. 2. PCR fragments for Actin(A), Protox(B) from GM and non-GM rice cultivation soils. Lanes: M, 100bp DNA marker; P, positive control; 4~10, April~October; N, negative control.**

(Lorenz *et al.*, 1997) 등에 의하여 비 생물학적 또는 생물학적인 영향을 받는다.

본 실험 결과 근권 토양에서 도입 유전자가 일정 기간이후 잔존하지 않고 식물로부터 토양 미생물의 유전자 전달 빈도는 매우 낮거나 제한적이기 때문에, 현재의 과학기술로 검출할 수 있는 한계 이하로 존재할 것으로 예상되어 Germida와 Dunfield(2004)의 연구 결과와 같이 제초제내성 벼로부터 주변 생물체로의 수평적 유전자 이동 가능성은 매우 희박할 것으로 추정되었다. 그러나 연작 등으로 유전자변형 벼의 재배가 지속적으로 이루어질 경우 유전자변형 작물로부터 근권 토양 미생물의 유전자 이동 가능성은 높아질 것으로 예상되기 때문에 추후 장기적인 모니터링을 포함해 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 예상되었다.

## 요 약

본 연구는 Protox 제초제내성 벼 재배가 토양 미생물에 미치는 영향과 수평적 유전자 이동성을 알아보기 위해 수행되었다. 생육단계별 토양 미생물 군집밀도의 경우 제초제내성 벼를 재배한 근권 토양 미생물 군집밀도가 비 형질전환 벼의 근권 토양과 유사하여 제초제저항성 벼 재배가 근권 토양 미생물에 미치는 영향은 비슷할 것으로 추정되었다. 근권 토양의 우점 미생물 분포 양상을 분석한 결과, Proteobacteria, Firmicutes와 Actinobacteria 순으로 나타났으며 우점종과 점유율은 거의 유사하였다. 근권 토양 DNA에 대한 DGGE 분석 결과, 제초제내성 벼와 비 형질전환 벼의 근권 토양 미생물 군집의 profile 변화는 나타나지 않았다. 제초제내성 벼 재배에 따른 토양 화학성을 분석한 결과, 비 형질전환 벼의 근권 토양간 화학성은 차이가 없는 것으로 나타났다. 제초제내성 벼에 도입된 유전자군을 대상으로 근권 토양 DNA에 대한 PCR 분석 결과, 도입 유전자의 잔존성이 길지 않아 수평적 유전자 이동성은 희박할 것으로 추정되었다.

## Acknowledgement

This study was carried out with the support of "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ009609022013)", National Academy of Agricultural Science and the Next-Generation BioGreen 21 Program (No. PJ008008052012), Rural Development Administration, Republic of Korea. We are grateful thanks to Seung-Uk Ji for technical assistance.

## References

Bray, R.H., Kurtz, L.T., 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils, *Soil Sci.* 59, 39-46.  
Brookes, G., Barfoot, P., 2006. Global impact of biotech crops: Socio-economic and environmental effects in the

first ten years of commercial use, *AgBioForum* 9, 139-151.  
Conner, A.J., Glare, T.R., Nap, J.P., 2003. The release of genetically modified crops into the environment; Part II. Overview of ecological risk assessment, *Plant J.* 33, 19-46.  
de Vries, J. Wackernagel, W., 2005. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants, *Plant and Soil* 266, 91-104.  
Ellstrand, N.C., 1992. Gene flow by pollen: Implications for plant conservation genetics, *Oikos* 63, 77-86.  
Filion, M., 2008. Do transgenic plants affect rhizobacteria populations?, *Microb. Biotechnol.* 1, 463-475.  
Germida, J.J., Dunfield, K.E., 2004. Impact of genetically modified crops on soil-and plant-associated microbial communities, *J. Environ. Qual.* 33, 806-815.  
James, C., 2011. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011, *ISAAA Brief* No. 43. ISAAA: Ithaca, NY.  
Jonas, D.A., Elmadfa, I., Engel, K.H., Heller, K.J., Kozianowski, G., Konig, A., Muller, D., Narbonne, J.F., Wackernagel, W., Kleiner, J., 2001. Safety considerations of DNA in food, *Annu. Nut. Metab.* 45, 235-254.  
Jung, S., Lee, Y., YANG, K., Lee, S.B., Jang, S.M., Ha, S.B., BACK, K., 2004. Dual targeting of *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase into chloroplasts and mitochondria and high level oxyfluorfen resistance, *Plant Cell Environ.* 27, 1436-1446.  
Jung, B.G., Choi, J.W., Yoon, J.H., Kim, Y.H., Yun, E.S., 2001. Monitoring on chemical properties of bench marked upland soils in Korea, *Korean J. Soil Sci. Fert.* 34, 326-332.  
Kardol, P., Bezemer, T.M., Van Der Putten, W.H., 2006. Temporal variation in plant-soil feedback controls succession. *Ecol. Lett.* 9, 1080-1088.  
Kim, M.C., Ahn, J.H., Shin, H.C., Kim, T., Ryu, T.H., Kim, D.H., Song, H.G., Lee, G.H., Kai, J.O., 2008. Molecular analysis of bacterial community structures in paddy soils for environmental risk assessment with two varieties of genetically modified rice, Iksan 483 and Milyang 204, *J Microbiol. Biotech.* 18, 207-218.  
Kim S.E., Moon, J.S., Kim, J.K., Choi, W.S., Lee, S.H., Kim, S.U., 2010. Investigation of possible horizontal gene transfer from transgenic rice to soil microorganisms in paddy rice field, *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 187-192.  
Lee, B.K., Kim, C.G., Park, J.Y., Park, K.W., Yi, H.B., Harn, C.H., Kim, H.M., 2007. Assessment of the persistence of DNA in decomposing leaves of CMVP0-CP transgenic chili pepper in the field conditions, *Korean*

- J. Environ. Agric.* 26, 319-324.
- Lee, K., Yi, B.-Y., Kim, K.-H., Kim, J.-B., Suh, S.-C., Woo, H.-J., Shin, K.-S., and Kweon, S.-J., 2011. Development of efficient transformation protocol for soybean (*Glycine max* L.) and characterization of transgene expression after *Agrobacterium*-mediated gene transfer, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54, 37-45.
- Lorenz, M.G., Blum, S.A.E., Wackernagel, W., 1997. Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils, *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 513-521.
- Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H., Tebbe, C.C., 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33, *Microbial. Ecol.* 40, 43-56.
- NIAST, 2000. Methods of analysis of soil and plant, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation, *Nature.* 405, 299-304.
- Owen, MDK, 2000. Current use of transgenic herbicide-resistant soybean and corn in the USA., *Crop Prot.* 19, 765-771.
- Sharma, S., Aneja, M.K., Mayer, J., Munch, J.C., Schloter, M., 2005. Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes, *Microbial. Ecol.* 49, 407-415.
- Smalla, K., Gebhard, F., 1999. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer, *Fems Microbiol. Ecol.* 28, 261-272.
- Sohn, S.I., Oh, Y.J., Oh, S.D., Kim, M.K., Ryu, T.H., Lee, K.J., Suh, S.C., Baek, H.J., Park, J.S., 2010. Molecular analysis of microbial community in soils cultivating *Bt* Chinese cabbage, *Korean J. Environ. Agric.* 29, 293-299.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method, *Soil Sci.* 37, 29-38.
- Widmer F., Seidler, R.J., Donegan, K.K., Reed, G.L., 1997. Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field, *Mol. Ecol.* 6, 1-7.