Research Article

Open Access

형질전환 콩 재배가 근권 토양 미생물상에 미치는 영향

이기종,^{1†} 손수인,^{1†} 이장용,¹ 이부영,² 오성덕,¹ 권순종,¹ 서석철,¹ 류태훈,¹ 김경환,¹ 박종석^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, ²서울시립대학교 환경원예학과

Effects of Transgenic Soybean Cultivation on Soil Microbial Community in the Rhizosphere

Kijong Lee,^{1†} Soo-In Sohn,^{1†} Jang-Yong Lee,¹ Bu-Young Yi,² Sung-Dug Oh,¹ Soon-Jong Kweon,¹ Seok-Chael Suh,¹ Tae-Hun Ryu,¹ Kyung-Hwan Kim¹ and Jong-Sug Park^{1*} (¹National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-707, Korea, ²University of Seoul, Department of Environmental Horticulture, Seoul 130-743, Korea)

Received: 25 October 2011 / Accepted: 7 November 2011
© 2011 The Korean Society of Environmental Agriculture

Abstract

BACKGROUND: Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is a legume and an important oil crop worldwide. This study was conducted to evaluate the possible impact of transgenic soybean cultivation on the soil microbial community.

METHODS AND RESULTS: Microorganisms were isolated from the rhizosphere 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 transgenic and non-transgenic soybeans were similar to each other, and there was no significant difference between transgenic and non-transgenic soybeans. Dominant bacterial phyla in the rhizosphere soils cultivated with transgenic or non-transgenic soybeans were *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria*. The microbial communities in transgenic and non-transgenic soybean soils were characterized using the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The DGGE profiles showed the different patterns, but didn't show significant difference to each other at 0.05 significance level. DNAs were isolated from soils cultivating transgenic or non-transgenic soybeans and analyzed for persistence of

transgenes in the soil by using PCR. PCR analysis revealed that there were no amplified γ -*tmt* and *bar* gene in soil DNA.

CONCLUSION(S): The results of this study suggested that microbial community of soybean field were not significantly affected by cultivation of the transgenic soybeans.

Key Words: Gene transfer, Soil microbial community, Transgenic soybean

서론

제초제 저항성 콩을 상업적으로 재배한 1996년 이후 유전자변형(Genetically modified, GM) 작물의 재배면적은 해마다 증가하고 있다. 2010년 전체 유전자변형 작물의 재배면적은 1억 4,800만 ha(James, 2010)로, 대한민국 국토(221,336km²)의 약 6.7배에 해당되는 면적이다. 유전자변형 작물 중 제초제 저항성 콩은 전 세계 7,330만 ha에서 재배되고 있으며, 전 세계 콩 재배면적(9,000만 ha)의 81%에 해당된다. 국내에서는 유전자변형 작물이 재배되고 있지 않지만 유전자변형 작물에 대한 논란은 계속되고 있다. 유전자변형 작물은 생산비 절감에 따른 생산성 증가(Owen, 2000), 농약 사용 절감에 의한 환경 보존 및 온실가스 배출 절감에 따른 기후 변화 대응 효과(Brookes and Barfoot, 2006) 등의 장점이 있지만 유전자 전달(gene transfer)에 의한 도입 유전자 확산(gene flow)과 잡초화 가능성(Elstrand, 1992), 생태계 교란(Conner *et al.*, 2003) 및 독성 및 알레르기 물질 생산(Konig *et al.*, 2004) 등의 우려도 있다. 2008년 시행된

*교신저자(Corresponding author),
Phone: +82-31-299-1141; Fax: +82-31-299-1122;
E-mail: jongsug@korea.kr

† These authors contributed equally to this work

유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법(LMO법)은 안전성 확보를 위한 사전 위해(危害) 방식을 규정하고 있어 상용화를 위해서는 유전자변형 작물이 환경과 인체에 미칠 수 있는 요인들의 면밀한 분석이 필요하다.

유전자 전달은 생존 양식의 일부분으로 접합(conjugation), 형질도입(transduction), 형질전환(transformation) 등을 통해 원핵생물의 종간 또는 종내에서 일어난다(Ochman *et al.*, 2000). 지금까지 수생 및 육생 환경뿐만 아니라 위장에서 배양 가능한 원핵생물 중 약 90종에서 유전자 전달이 일어나는 것으로 확인되었다(de Vries and Wackernagel, 2005). 최근 항생제 내성 유전자나 제초제 저항성 유전자를 보유한 유전자변형 작물이 대규모로 재배될 경우 토양 세균 및 주변 식물체로 이들 유전자가 전달되어 항생제 저항성 병원균 출현 및 슈퍼잡초 발생에 따른 생태계 교란 가능성 문제가 제기되기도 하였으나(de Vries and Wackernagel, 2005), 현재까지 포장에서 재배된 유전자변형 작물로부터 세균으로 유전자가 전달되었다는 명확한 증거는 보고된바 없으며, 다만 인위적으로 제한된 기내 실험 조건에서는 β -lactamase 유전자가 도입된 감자로부터 *Erwinia chrysanthemi*로 세포 당 2×10^{-17} 빈도로 유전자가 전달되었으며(Jonas *et al.*, 2001), 또한 유전자 전달은 상동 재조합(homologous recombination)이 가능한 경우에만 나타나는 것으로 알려져 있다(Badosa *et al.*, 2004). 국내에서는 일부 형질전환 작물에 대한 근권 토양 및 미생물상 영향을 분석한 연구가 수행되었으며, 제초제 저항성 들깨(Sohn *et al.*, 2009) 및 고추(Lee *et al.*, 2007)와 해충저항성 *Bt* 배추(Sohn *et al.*, 2010) 등의 재배에 의해 주변 근권 토양 및 미생물상에 영향을 미치거나 토양 미생물로 유전자가 전달되었다는 증거는 없는 것으로 보고되었다.

형질전환 작물의 상용화를 위해서는 환경위해성 분석을 통한 안전성 검정이 필수적이며, 특히 콩의 경우 우리나라가 지리적 원산지로서 예전부터 재배하여 왔으므로 토양 미생물상을 비롯한 환경에 미치는 영향에 대한 자세한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 국내에서 개발된 vicilin 유래 종자특이 프로모터에 의해 종자 내 풍부한 γ -tocopherol을 α -tocopherol로 전환하는 γ -tocopherol methyltransferase(γ -tmt) 유전자를 도입한 형질전환 콩(Lee *et al.*, 2011)의 포장 재배가 토양 및 토양 미생물에 미치는 영향을 분석하기 위하여 근권 토양의 화학분석, 토양 미생물 군집밀도 등에 대하여 비 형질전환 콩과 비교 조사하였다. 또한 분자생물학적 기술을 이용하여 토양 미생물의 전체 군집변화와 도입 유전자의 토양 미생물로의 전이 여부 등을 분석함으로써 환경위해성 연구 및 형질전환 콩 재배를 위한 가이드라인을 구축하고자 한다.

재료 및 방법

토양시료

국내에서 개발된 γ -tocopherol methyltransferase(γ -tmt) 유전자를 도입한 형질전환 콩(1025-3-17, 1208-3-30)과 각각의 모품종(Jack, Williams82) 종자를 육묘상자에 파종 후, 형

질전환 콩은 3-4엽기에 제초제(바스타) 0.3%를 처리하여 선발하였다. 국립농업과학원 GMO 격리포장(수원)에서 재배하면서(이식간격 : 50 x 100 cm) 성숙기에 근권 주변 토양 시료를 채취하였다. 토양 시료는 Kim 등(2008)의 방법에 따라 콩을 뿌리째 뽑은 후 비 근권 토양을 제거하고, 2 mm 체로 거른 토양을 근권 토양으로 분석에 이용하였다.

미생물 군집밀도 조사

채취한 토양 10 g에 멸균한 0.85% NaCl 90 mL를 첨가하고 진탕 배양기에서 30분간 현탁하였다(200 rpm). 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 건토)로 산출하였다.

DGGE를 이용한 미생물 군집 분석

형질전환 콩 및 비 형질전환 콩을 재배한 토양 미생물 간의 군집 변화를 알아보기 위해 Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) 분석을 하였다. FastDNA Spin Kit(Qbiogen, USA)로 토양 미생물 DNA를 추출한 후, 진정세균의 미생물상 변이 여부를 분석하기 위하여 16S rRNA의 V9 부위를 증폭할 수 있는 1070f-1392r primer(Table 1)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 각각 5 μ L 10 x PCR buffer, 10 ng 주형 DNA, 25 pmol 양방향 프라이머, 200 μ M dNTP, 2.5 U *f-Taq* DNA polymerase(Solgent, Daejeon, Korea)를 첨가한 후 최종 부피를 50 μ 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

Table 1. PCR primers used for microbes and soybean characterization

Gene	Primer	Sequence
16S rRNA V9 region	1070f	5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3'
	1392r	5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'
16S rDNA	27mf	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
	1492r	5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'
γ -tmt	tmt-f	5'-GAATCGGAGGGACTCCTCA-3'
	tmt-r	5'-TTGCTGGTTGGCTGCAC -3'
bar	bar-f	5'-TCTGCACCATCGTCAACCACTACAT-3'
	bar-r	5'-CTGAAGTCCAGCTGCCAGAAACCCA-3'
actin	act-f	5'-TTATGCCCTCCCATGCAA-3'
	act-r	5'-TGCTGGAAGGTGCTTAGAGA-3'

Detection System(Bio-Rad, Hercules, USA)을 사용하여 변성

제인 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. InfoQuest FP software Ver. 4.50(Bio-Rad)으로 DGGE profile의 유사성을 분석하였고 Jaccard coefficient를 이용하여 표현하였다.

우점세균의 동정

근권에서 분리한 세균을 동정하기 위하여 16S rRNA 염기서열 분석을 실시하였다. FastDNA Spin Kit로 토양으로부터 DNA를 추출하고, 27mf와 1492r primer(Table 1)를 사용하여 세균의 16S rDNA 부위를 증폭하였다. PCR 반응물의 조성과 조건은 미생물 군집 분석에 이용된 방법과 동일하였으며, 1% agarose gel에서 확인한 후, pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 삽입하고 *E. coli* DH5α에 형질전환하여 배양하였다. 형성된 콜로니를 무작위로 선발하고 삽입 절편을 증폭한 후 DNA clean kit(Bioneer, Daejeon, Korea)로 정제하고 27mf와 519r(5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') primer를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

근권 토양 화학분석

형질전환 콩과 비 형질전환 콩의 근권 토양을 각각 채취하여 음지에서 건조시킨 후, 2 mm체를 통과한 토양을 분석하였다. 토양 화학분석은 농촌진흥청의 토양 및 식물체 분석법(NIAST, 2000)에 준하여 실시하였다. pH와 EC는 토양과 증류수를 1:5로 혼합하여 30분간 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.

수평적 유전자 이동성 조사

형질전환 콩으로부터 근권 주변의 미생물로의 수평적 유전자 이동성 여부를 확인하기 위하여 근권 토양에서 DNA를 분리한 후 *γ-tmt* 유전자와 *bar* 유전자 일부를 증폭할 수 있는 primer(Table 1)를 사용하여 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응물의 조성과 조건은 미생물 군집 분석에 이용된 방법과 동일하게 하였다.

결과 및 고찰

근권 토양 미생물상 분석

유전자변형 작물 재배가 근권 토양의 미생물상에 미치는 영향을 규명하기 위하여 성숙기의 형질전환 콩(1025-3-17, 1208-3-30) 및 비 형질전환 콩(Jack, Williams82)의 근권 토양에 대한 세균, 방선균 및 진균의 군집밀도를 비교 분석하였다(Table 2). 1025-3-17과 Jack, 1208-3-30과 Williams82간

Table 2. Number of microbial population in the rhizosphere soils cultivated with transgenic and non-transgenic soybeans

	Microbial population [†]		
	Bacteria (× 10 ⁶)	Actinomycetes (× 10 ⁶)	Fungi (× 10 ⁴)
1025-3-17	2.5±0.23	1.6±0.39	1.5±0.44
Jack	2.0±0.99	1.5±0.46	1.8±0.42
1208-3-30	2.1±0.55	2.2±0.23	1.4±0.21
Williams82	2.0±0.93	1.7±0.46	1.4±0.46

[†]colony forming unit(CFU)/g fresh soil weight±standard deviation from three replications.

의 군집밀도 분석 결과, 근권 토양 유래 세균, 방선균 및 진균의 군집밀도 간에는 유의성이 보이지 않아(P>0.05), 형질전환 콩 재배가 근권 토양의 미생물상에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

식물 침출물에 의해 식물의 뿌리가 직접 영향을 미치는 근권 토양의 미생물상 변화는 양분의 재순환, 유기물 분해 등 토양 생태계에 영향을 미치거나, 식물 생육 촉진 근권 세균 방출, 병원체 생장 등 식물과 미생물간의 상호작용에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Miethling *et al.*, 2000). 따라서 식물 뿌리에서 분비되는 침출물에 의해 미생물 군집 및 활성의 변화가 발생되면, 근권 토양 미생물은 식물 생육에 직·간접적으로 영향을 미치게 된다(Sharma *et al.*, 2005). 본 실험에서 토양 미생물상 변화를 동정하는데 이용한 희석평판법은 해충저항성 *Bt* 면화(Donegan *et al.*, 1995), *Bt* 옥수수(Saxena and Stotzky, 2001), 체초체 저항성 벼(Kim *et al.*, 2008)의 배양 가능한 미생물 군집에 미치는 영향 연구와 동일한 방법이며, 이들 연구들도 형질전환 식물과 비 형질전환 식물을 재배한 토양 미생물의 군집 간에는 차이가 없었다고 보고하였다.

콩 재배 토양의 우점종 동정

형질전환 콩 재배에 의한 토양 내 우점종의 변화를 확인하기 위하여 근권 토양으로부터 DNA를 분리한 후 우점미생물의 16S rDNA에 대한 염기서열을 분석하였다. 근권 토양에서 동정된 세균들의 분포를 phylum 수준에서 비교한 결과(Table 3), 1025-3-17의 근권 토양에는 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*이 각각 45.6%, 28.9%, 16.7% 분포하였으며, Jack의 근권 토양에는 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*이 각각 32.6%, 29.2%, 27.0% 비율을 보여 유사한 우점종 분포 양상을 보였다. 또한 1208-3-30과 Williams82간의 동정 세균에 대한 분포양상을 비교 분석한 결과, 1208-3-30의 근권 토양에는 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*이 각각 48.9%, 21.1%, 22.2%로 분포하였고, Williams82 근권 토양에서는 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*이 각각 30.0%, 31.1%, 10.0%의 비율로 분포하였다. 비록 형질전환 콩과 비 형질전환 콩을 재배한 근권 토양 미생물의 우점종과 점유율이 정확히 일치하지는 않았지만 토양 미생물

Table 3. Bacteria isolated from the rhizosphere soils cultivated with transgenic and non-transgenic soybeans in the field sites

Isolate	1025-3-17		Jack		1208-3-30		Williams82	
	No. of isolates	Ratio (%)	No. of isolates	Ratio (%)	No. of isolates	Ratio (%)	No. of isolates	Ratio (%)
<i>Acidobacteria</i>	2	2.2	3	3.4	1	1.1	9	10.0
<i>Actinobacteria</i>	15	16.7	24	27.0	20	22.2	9	10.0
<i>Chlorobi</i>	nd [†]	-	2	2.2	1	1.1	6	6.7
<i>Chloroflexi</i>	1	1.1	1	1.1	nd	-	nd	-
<i>Firmicutes</i>	26	28.9	26	29.2	19	21.1	28	31.1
<i>Fusobacteria</i>	nd	-	nd	-	1	1.1	nd	-
<i>Gemmatimonadetes</i>	1	1.1	nd	-	1	1.1	5	5.6
<i>Nitrospira</i>	nd	-	2	2.2	3	3.3	3	3.3
<i>Planctomycetes</i>	3	3.3	2	2.2	nd	-	2	2.2
<i>Proteobacteria</i>	41	45.6	29	32.6	44	48.9	27	30.0
<i>Verrucomicrobia</i>	1	1.1	nd	-	nd	-	1	1.1
Total	90	100.0	89	100.0	90	100.0	90	100.0

[†]nd, not detected

의 생태적 변화를 명확하게 판단할 수 있을 정도의 뚜렷한 차이를 보이지 않아 형질전환 콩 재배가 근권 토양 미생물의 우점종 분포에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 비록 대단히 낮은 분포비율이지만 *Chloroflexi*는 1025-3-17과 Jack의 근권 토양에 특이적으로, *Fusobacteria*는 1208-3-30의 근권 토양에 특이적으로 동정되었는데, 이러한 차이는 동일한 지역에서도 재배되는 품종에 따라 토양 서식 미생물의 미세한 군집 차이에 의해 나타난 것으로 추정되었다(Filion, 2008; Sohn *et al.*, 2010).

DGGE 분석에 의한 토양 미생물 군집 비교

근권의 토양 미생물 군집을 비교하기 위하여, 형질전환 콩과 비 형질전환 콩을 재배한 토양에서 각각 분리한 DNA로부터 16S rRNA의 V9 부분을 증폭한 후 DGGE 분석을 실

시하였다(Fig. 1). DGGE profile에 대한 분석 결과, Jack과 1025-3-17 근권 토양 간에, Williams82와 1208-3-30의 근권 토양 간에는 각각 차이를 보이지 않아($P>0.05$), 형질전환 콩 재배가 근권 토양 미생물 군집에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 각 시료간의 DGGE 밴드 위치를 기초로 유사성을 나타내는 Jaccard 유형을 비교 분석한 결과(Table 4), Jack과 1025-3-17간에는 최소 66.8% 유사도를 보였으며, Williams82와 1208-3-30간에는 최소 65.5%의 유사도를 보여 미생물 군집에는 거의 변화가 없는 것으로 추정하였다. 토양 미생물 군집변이에 대한 DGGE 분석은 재배 품종, 시료 채취 시기 및 지역의 토양 이질성 등에 영향을 받을 수 있기 때문에(Kim *et al.*, 2008) 형질전환 식물에 의한 토양 미생물 군집 비교 연구 시에는 동일한 지역에서 형질전환에 사용된 모본을 대조구로 사용하여야 한다.

Table 4. Comparison of similarity between non-transgenic and transgenic soybean based on Jaccard coefficient

Lanes [†]	Jack			1025-3-17			Lanes	Williams82			1208-3-30		
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
1	100 [‡]						1	100					
2	82.2	100					2	98.2	100				
3	70.1	83.9	100				3	92.2	91.7	100			
4	66.9	80.1	80.8	100			4	91.4	90	88.9	100		
5	68.1	77.8	72.3	76.7	100		5	66.5	65.5	66.1	68	100	
6	70.7	72.4	66.8	67.2	73.9	100	6	78.8	78.1	79.1	74.7	70.3	100

[†]Lanes replicated in the DGGE gels in Fig. 1[‡]100 indicates complete similarity

Fig. 1. DGGE analysis of 16S rDNA V9 region with primers 1070f and 1392r. A: DGGE profile for Jack(1, 2, 3) and transgenic soybean 1025-3-17(4, 5, 6); B: Williams82(1, 2, 3) and transgenic soybean 1208-3-30(4, 5, 6) M: DGGE molecular weight marker.

Table 5. Soil chemical properties in the rhizosphere soils cultivated with transgenic and non-transgenic soybeans

	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (%)	T-N (%)	Av. P ₂ O ₅ (mg/Kg)	Exchangeable cation (cmol ⁺ /kg)			
						K	Ca	Mg	Na
1025-3-17	7.4±0.06	0.8±0.07	5.4±1.33	0.34±0.009 ^a	371.8±17.12 ^a	0.8±0.02 ^a	13.0±0.11 ^a	1.6±0.04 ^a	0.4±0.03 ^a
Jack	7.2±0.13	0.8±0.02	6.0±1.08	0.28±0.008 ^b	302.4±1.35 ^b	0.7±0.04 ^b	10.1±0.60 ^b	1.2±0.06 ^b	0.3±0.02 ^b
1208-3-30	7.4±0.06	0.9±0.06	6.3±0.70 ^a	0.29±0.013	336.0±11.47 ^a	0.8±0.11	11.7±0.38	1.4±0.03	0.3±0.03
Williams82	7.4±0.02	0.9±0.04	4.7±0.32 ^b	0.27±0.001	297.6±7.99 ^b	0.7±0.03	11.0±0.52	1.5±0.04	0.3±0.01

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

포장의 토양 화학성 분석

토양의 화학성 차이는 토양 미생물 군집에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 형질전환 콩과 비 형질전환 콩의 근권 토양 화학성(토양 pH, 유효인산, 전기전도도, 양이온, 전질소, 유기물 함량 등)을 비교 분석하였다(Table 5). 토양 pH는 7.2-7.4 수준으로서 우리나라 밭 토양의 평균 pH인 5.6(Jung *et al.*, 2001)과 적정범위인 6.0-6.5보다는 다소 높았지만 뿌리혹박테리아의 활성에 적절한 토양산도로 알려진 pH 6.45-7.41 범위 내에 속하여 토양 미생물 생육에 영향을 미치지 않을 것으로 예상되었다. 토양 유기물 함량은 토양 비옥도를 판정하는 중요한 지표로 토양 물리성을 개선하고 토양 미생물의 활동을 왕성하게 하는데 본 시험포장의 경우 적정범위인 20-30 g/Kg 보다 높게 나타났다. 유효인산은 발작물 생육의 적정범위인 300-500 mg/kg과 유사하였으며, 치환성양이온 함량은 적정범위의 칼륨(0.5-0.6 cmol⁺/kg), 칼슘(5.0-6.0 cmol⁺/kg), 마그네슘(1.5-2.0 cmol⁺/kg)등과 비교하였을 때 다소 높은 수치를 보였다. 1025-3-17과 Jack의 근권 토양 간의 전질소, 유효인산, 치환성양이온, 1208-3-30과 Williams82간의 유기물

함량, 유효인산에서 나타난 통계적으로 유의한 차이(*P*<0.05)가 소수의 토양 미생물상 변화를 초래한 원인으로 추정되었다. 따라서 토양 환경의 미세한 차이에 의한 화학성의 변화를 정확하게 구명하고 실제적인 환경위해성 여부를 확인하기 위해서는 특정 시기의 토양 화학성의 변화만으로 판단하기 보다는 전체 생육시기에 걸친 연속적인 분석을 통해서 평가해야 할 것이다.

수평적 유전자 이동성 조사

형질전환 시 도입된 유전자가 수평적 유전자 이동에 의해 근권 토양 미생물로 전이되었는지 여부를 확인하기 위하여 식물체 및 주변 근권 토양으로부터 분리한 DNA에 대하여 도입 유전자 증폭용 primer로 PCR을 수행하였다(Fig. 2). 식물체에 대한 PCR 분석 결과, 형질전환 콩과 형질전환용 운반체 DNA에서만 특이적으로 도입 유전자(*γ-tmt*, *bar*)가 증폭되었고, 비 형질전환 콩에서는 도입 유전자 밴드가 검출되지 않았다. 근권 토양 DNA에 대한 PCR 분석 결과, 1025-3-17, 1208-3-30 모두 밴드가 검출되지 않아 근권 토양

Fig. 2. PCR products of transgene in the transgenic plant and rhizosphere soil samples. Lanes J, soybean DNA of Jack; 1025, soybean DNA of 1025-3-17; S, soil DNA replication; P, positive control; M, molecular marker; W82, soybean DNA of Williams82; 1208, soybean DNA of 1208-3-30.

미생물로의 수평적 유전자 이동이 이루어지지 않았음을 확인하였다. Widmer 등(1997)은 형질전환체 선발에 이용된 항생제 저항성 *nptII* 유전자가 담배와 감자의 경우 각각 77일, 137일간 토양 내에 잔존할 수 있다고 보고하였으나, PCR 분석을 통해 토양 내 잔존하지 않음을 확인하였다.

작물이 재배되는 포장에서 식물 DNA의 토양 내 잔존성은 핵산 가수분해 효소에 의한 식물 DNA의 분해(Smalla and Gebhard, 1999; Widmer *et al.*, 1997), 토양 내 DNase의 존재(Lorenz *et al.*, 1997; Smalla and Gebhard, 1999) 등에 의하여 비 생물학적 또는 생물학적으로 영향을 받게 된다. 또한 유전자의 수평적 이동은 자연계에 존재하는 미생물이 주변 환경변화에 효과적으로 적응하기 위한 자연적인 수단으로 연구되어져 왔으나, 일반인들에게는 병원성 유전자 및 항생제 저항성 유전자 도입 가능성에 대한 우려만이 강조되고 형질전환 작물들의 실용화에 부정적인 영향을 미치고 있는 실정이다. 현재까지, 인위적인 최적조건에서 형질전환 작물 유래 유전자 단편이 일부 박테리아로 도입되고 재조합이 일어난 것으로 예는 알려졌으나, 포장시험과 인간의 섭식 실험 결과 형질전환 작물로부터 토양 미생물로의 수평적 유전자 이동성이 일어난다는 결정적인 증거는 아직까지 보고된 바 없다(Nielsen and Townsend, 2004).

본 실험 결과 근권 토양에서 도입 유전자가 잔존하지 않고 식물로부터 토양 미생물로의 유전자 전달 빈도는 매우 낮거나 제한적이기 때문에, Germida와 Dunfield(2004)의 연구 결과와 같이 형질전환 작물로부터의 수평적 유전자 이동성은 일어나지 않은 것으로 예상되었다. 또한 근권 토양 DNA에 대한 PCR 분석 시 목적유전자가 성공적으로 증폭되기 위해서는 50 copy 이상의 DNA가 있을 경우에만 PCR 증폭이 가능하기 때문에(Nielsen and Townsend, 2004; Sohn *et al.*, 2010) PCR로 검출할 수 있는 한계 이하로 존재하거나, 분해되어 버리는 것으로 추정되었다.

요 약

본 연구는 국내에서 개발된 형질전환 콩 재배 시 토양 미생물 군집에 미치는 영향과 수평적 유전자 이동 여부를 알아보기 위해 수행되었다. 성숙기 토양의 미생물 군집밀도의 경우 형질전환 콩 근권 토양 미생물 군집밀도가 비 형질전환 콩 근권 토양과 유사하여 형질전환 콩 재배가 근권 토양 미생물에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 근권 토양의 우점 미생물 분포 양상 분석 결과, *Proteobacteria*, *Firmicutes*와 *Actinobacteria* 순으로 나타났으며 점유율은 다소 차이를 보였으나 우점종은 거의 유사하였다. 근권 토양 DNA에 대한 DGGE 분석 결과, 형질전환 콩과 비 형질전환 콩의 근권 토양 미생물 군집의 변화는 보이지 않았다. 형질전환 콩 재배에 따른 토양의 화학성을 분석한 결과, 형질전환 콩과 비 형질전환 콩의 근권 미생물상의 명확한 차이가 나타날 정도로 토양 간 화학성의 차이는 크지 않았다. 형질전환 작물에 도입된 유전자군을 대상으로 식물체와 근권 토양 DNA에 대한 PCR 분석을 수행한 결과 수평적 유전자 이동성은 일어나지 않은 것으로 추정되었다.

감사의 글

This study was supported by Rural Development Administration, Republic of Korea (Project No. PJ006754022011).

참고문헌

- Badosa, E., Moreno, C., Montesinos, E., 2004. Lack of detection of ampicillin resistance gene transfer from Bt176 transgenic corn to culturable bacteria under field conditions, *Fems Microbiol. Ecol.* 48, 169-178.
- 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.
- Donegan, K.K., Palm, C.J., Fieland, V.J., Porteous, L.A., Ganio, L.M., Schaller, D.L., Bucuo, L.Q., Seidler,

- R.J., 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil-microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* Var. Kurstaki endotoxin, *Appl. Soil Ecol.* 2, 111-124.
- 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., 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010, *ISAAA Brief* No. 42. 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, 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.
- 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.
- Konig, A., Cockburn, A., Crevel, R.W.R., Debruyne, E., Grafstroem, R., Hammerling, U., Kimber, I., Knudsen, I., Kuiper, H.A., Peijnenburg, A.A.C., Penninks, A.H., Poulsen, M., Schauzu, M., Wal, J.M., 2004. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1047-1088.
- 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.
- NIAS, 2000. Methods of analysis of soil and plant, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea.
- Nielsen, K.M., Townsend, J.P., 2004. Monitoring and modeling horizontal gene transfer, *Nat. Biotechnol.* 22, 1110-1114.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation, *Nature*. 405, 299-304.
- Owen, M.D.K., 2000. Current use of transgenic herbicide-resistant soybean and corn in the USA., *Crop Prot.* 19, 765-771.
- Saxena, D., Stotzky, G., 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil, *Soil Biol. Biochem.* 33, 1225-1230.
- Sharma, S., Aneja, M.K., Mayer, J., Munch, J.C., Schlöter, 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., Kwon, J.S., Woen, H.Y., Noh, H.J., Kim, K.H., Baek, H.J., Kim, Y.H., 2009. Assessment of microbial community in the rhizoplane and rhizosphere soil of herbicide-resistant transgenic perilla. *Korean J. Intl. Agri.* 21, 120-124.
- 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.