

## Bt 벼의 토양미생물상 영향 비교평가

손수인\* · 안병욱 · 지희연<sup>1</sup> · 조병관<sup>2</sup> · 조민석<sup>1</sup> · 신공식

농촌진흥청 국립농업과학원, <sup>1</sup>충남대학교, <sup>2</sup>㈜스마테움

### Assessment of Microbial Community in Paddy Soils Cultivated with *Bt* and Nakdong Rice

Soo-In Sohn\*, Byung-Ohg Ahn, Hee-Youn Chi<sup>1</sup>, Byung-Kwan Cho<sup>2</sup>, Min-Seok Cho<sup>1</sup>, and Kong Sik Shin

National Academy of Agricultural Science, Suwon, 441-707, Korea

<sup>1</sup>Smateome Co., Ltd., Suwon, 441-100, Korea

<sup>2</sup>Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

The cultivation of genetically modified (GM) crops has increased due to their economic and agronomic advantages. Before commercialization of GM crops, however, we must assess the potential risks of GM crops on human health and environment. The aim of this study was to investigate the possible impact of *Bt* rice on the soil microbial community. Microbial communities were isolated from the rhizosphere soil cultivated with *Bt* rice and Nakdong, parental cultivar and were subjected to be analyzed using both culture-dependent and molecular methods. The total counts of bacteria, fungi, and actinomycetes in the rhizosphere of transgenic and conventional rice were not significantly different. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes revealed that the bacterial community structures during cultural periods were very similar each other. Analysis of dominant isolates in the rhizosphere cultivated with *Bt* and Nakdong rice showed that the dominant isolates from the soil of *Bt* rice and Nakdong belonged to the *Proteobacteria*, *Cloroflexi*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Acidobacteria*. These results indicate that the *Bt* rice has no significant impact on the soil microbial communities during cultivation period. Further study remains to be investigated whether the residue of *Bt* rice effect on the soil environment.

**Key words:** *Bt* rice, Soil microbial community, 16S rDNA, pyrosequencing

## 서 언

유전자변형작물 (GMO, Genetically Modified Organism) 은 그 재배면적이 해마다 증가하고 있는 추세이다. 2011년에는 전 세계적으로 1억 6,000만 헥타의 유전자변형 작물이 재배되었으며, 이는 2010년도에 비해 8%가 증가한 것이다 (James, 2011). 2011년은 세계 인구가 70억 명에 달한 해로 이로 인한 식량안보의 문제가 현실로 다가왔으며, 세계적으로 기후변화에 대처하고 지속가능한 농업생산을 위한 생명공학의 중요성이 강조되고 있다. 그 중 GMO를 하나의 대안으로 주목하고 있으나 GMO가 환경에 미치는 잠재적 위험성, 즉, 도입유전자가 표적 및 비표적 생물체로 전이될 가능성 (Nap et al., 1992; de Vries and Wackernagel, 2004), 잡초화, 생태계 교란 등에 대한 안전성 시비는 끊임없이 대두되고 있는 실정이다 (Stewart et al., 2003; Sohn et al.,

2010). 따라서 개발된 GMO가 환경에 방출되어 재배되기 전에 환경에 미칠 수 있는 요인들의 면밀한 분석이 이루어져야 한다.

*Bt* (*Bacillus thuringiensis*)는 토양 유래 세균으로서, *Bt*에서 유래한 단백질은 특정한 곤충에 대해 저항성을 가진다. *Bt*형질전환 작물들은 경제적, 환경적 이익뿐만 아니라 인간 건강에도 이로움을 주는데, 이는 살충제를 기존 작물재배시보다 적게 처리할 수 있기 때문이다 (Raney, 2006; Carpenter, 2010). *Bt* 단백질 중 한 부류에 속하는 Cry (crystal) 단백질은 *Bacteria*의 sporulation phase에서 주로 생성되는 것으로 알려졌다, 역시 *Bt* 단백질에 속하는, *Bacillus thuringiensis* AD88에서 최초로 분리된 Vip (vegetative insecticidal protein) 단백질은 *Bacteria*의 vegetative stage와 stationary stage에서 생성되는 것으로 보고되고 있다 (Estruch et al., 1996). Vip 단백질은 *Agrotis ipsilon* (black cutworm), *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm), *Heliothis virescens* (tobacco budworm), *Helicoverpa zea* (corn earworm or cotton bollworm), *Ostrinia nubilalis* (European corn borer),

접수 : 2012. 9. 26 수리 : 2012. 10. 12

\*연락처 : Phone: +82312991144

E-mail: sisohn@korea.kr



**Table 1. Chemical characteristics of rhizosphere soil of Bt and Nakdong rice.**

Treatment	pH	Avail. P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sup>†</sup>	EC <sub>c</sub>	T-N	OM <sup>†</sup>	Exch.Cation			
						K	Ca	Mg	Na <sup>†</sup>
	1:5	mg kg <sup>-1</sup>	ds m <sup>-1</sup>	%	g kg <sup>-1</sup>	----- cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> -----			
Bt	6.39±0.02	81.98±0.38*	0.62±0.00	0.18±0.01	20.38±0.20**	0.62±0.00	7.36±0.05	1.92±0.03	0.21±0.00**
Nakdong	6.35±0.02	63.37±0.33*	0.58±0.01	0.19±0.01	19.46±0.34**	0.60±0.00	7.21±0.09	1.89±0.02	0.27±0.01**

<sup>†</sup>Asterisks denote a significant difference(\*\*P<0.05, \*P<0.1)

ME, USA)과 EtBr로 염색하여 Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용, UV transilluminator 하에서 관찰하였다.

**Pyrosequencing을 이용한 16S rRNA gene 염기서열 분석 및 종다양성 분석** 토양으로부터 추출한 DNA를 주형으로 사용하여, 16S rRNA gene의 증폭을 위하여 fusion primer인 B16S-F (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'와 B16-8-62 (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TAGATGCG-AC-WTTACCGCGCTGCTGG-3')를 사용하였다. PCR 반응은 10x buffer+MgCl<sub>2</sub> 5 µL, 10 mM dNTPs 1 µL, 20 pmol µL<sup>-1</sup> primers (forward/reverse) 2 µL, 5U µL<sup>-1</sup> Taq Polymerase (Roche, Brandord, USA), 0.25µL, DNA template (100 ng) 1 µL를 넣고 총 부피가 50 µL가 되도록 증류수를 넣어 PCR 증폭을 하였다. PCR 반응은 Touch-down program을 사용하여 denaturation (94°C, 5분), denaturation (94°C, 30초), annealing (60°C, 45초), extension (72°C, 90초) 단계를 10회 반복하면서 각 단계마다 annealing 온도를 0.5°C씩 낮추면서 실시한 후, denaturation (94°C, 30초), annealing (55°C, 45초), extension (72°C, 90초) 단계를 20회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물을 주형으로 하여 한 개의 bead 당 한 개의 DNA fragment가 부착되도록 하여, PCR을 하고 필요한 기질 및 효소와 함께 PicoTiterPlate의 well에 첨가한 뒤 GS FLX Titanium system (Roche, Brandord, USA) 염기 서열 분석기를 이용하여 pyrosequencing반응을 진행시켰다. 얻어진 염기서열은 EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>)의 16S rDNA sequence와 비교하여 동정하였다. 벼 근권토양 세균의 종다양성 분석은 Shannon-Wiener'index를 통해 분석하였다 (Odum, 1998).

## 결과 및 고찰

**토양 화학 성분 분석** Bt벼와 형질전환 모품종인 낙동벼 근권 토양의 화학성분을 조사하였다. 토양 화학성분의 차이는 토양미생물 군집에 영향을 미칠 수 있기 때문에, Bt벼와 낙동벼 근권토양의 화학성분에 차이가 있는지 조사하

**Table 2. Number of microbes in rhizosphere soil of Bt and Nakdong rice**

Period	Microbe	Bt	Nakdong
May	<sup>†</sup> Bacteria(x10 <sup>6</sup> )	4.9±1.5	5.4±1.3
	Actinomycetes(x10 <sup>5</sup> )	1.8±0.6	1.7±0.5
	Fungi(x10 <sup>3</sup> )	9.6±0.5	9.3±0.1
June	Bacteria(x10 <sup>6</sup> )	5.2±1.2	8.6±1.5
	Actinomycetes(x10 <sup>5</sup> )	1.3±0.5	9.6± 4.0
	Fungi(x10 <sup>3</sup> )	8.5±1.5	11.6±2.1
July	Bacteria(x10 <sup>6</sup> )	83.4±12.6	113.3±23.0
	Actinomycetes(x10 <sup>5</sup> )	1.5±0.5	2.0±0.0
	Fungi(x10 <sup>3</sup> )	4.0±1.1	12.0±3.0

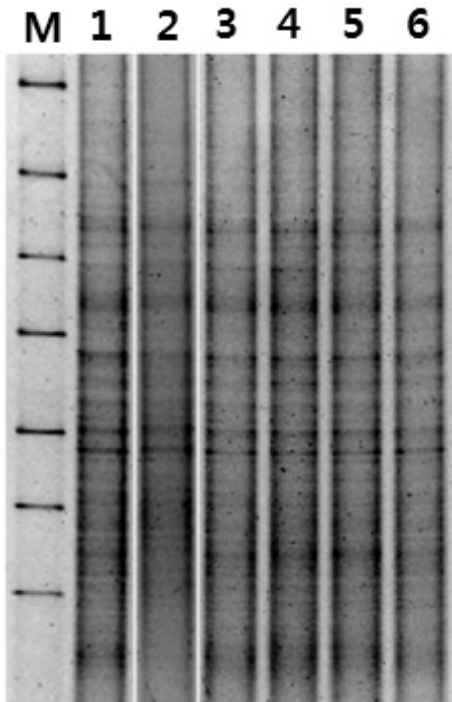
<sup>†</sup>colony forming unit (CFU) g<sup>-1</sup> fresh weight ± standard deviation from three replications.

기 위해 토양 pH, 유효인산, 전기전도도, 양이온, 전질소, 유기물 함량 등을 분석하였다 (Table 1). 토양 pH는 Bt벼와 낙동벼 모두 6.4로 조사되었고 이는 우리나라 논 토양의 평균값인 5.6에 비해 약간 높은 수준을 보였다 (Jung et al., 1998). 토양의 pH는 토양에 존재하는 양분의 유효도에 영향을 미치는데, 일반적으로 강산성 (pH4.5)에서는 유효도가 낮아지고 약산성 (약 pH6.5)에서는 높아지는 경향이 있다. 유효인산은 낙동벼는 65 mg kg<sup>-1</sup>, Bt벼는 74 mg kg<sup>-1</sup>로 나타나 큰 차이는 없는 것으로 조사되었다. 두 토양 모두 우리나라 논 토양의 평균 유효인산 값인 95 mg kg<sup>-1</sup>에 비해서는 다소 낮은 것으로 조사되었다. 토양 전기 전도도는 Bt벼와 낙동벼에서 0.5 dS m<sup>-1</sup>로 같은 수준인 것으로 나타났으며, 전질소량도 두 토양에서 0.2%로 조사되었다. K, Ca, Mg, Na 등의 양이온 함량에 있어서도 Bt벼와 낙동벼가 비슷한 수준인 것으로 조사되었다. 양이온 함량은 유기물 함량과 연관성이 있는 것으로 알려져 있고 (Clark et al., 1998) 분화분석에서는 Bt벼와 낙동벼간 유기물 함량은 거의 같은 수치를 나타내는 것으로 조사되었다.

**토양미생물 군집밀도 분석** Bt벼 재배에 따른 토양미생물상 영향을 조사하기 위해 이앙전 (5월), 재배초기 (6월), 최대분얼기 (7월) 토양의 세균, 방선균, 진균의 미생물 군집밀도를 조사하였다 (Table 2). 벼를 이앙하기 전 토양의

세균, 방선균, 진균 군집밀도는 매우 유사한 것으로 조사되었으며, 6월 재배초기 *Bt*벼 낙동벼 토양과 최고분얼기 7월 *Bt*벼와 낙동벼 근권 토양의 세균, 방선균, 진균의 군집밀도는 7월 낙동벼 세균 군집밀도가 *Bt*벼에 비해 약간 높은 수준을 나타낸 것을 제외하고 시기별 두 토양간 유의성 있는 차이는 없는 것으로 조사되었다. 이와 같은 결과는 최근 *Bt*벼의 토양 효소 활성, 미생물 군집 조성 및 기능적 다양성에 대한 분석에서 *Bt*벼의 재배가 이들에 대해 명확을 영향을 준다는 증거가 없음을 보고한 내용과 일치하는 것으로 사료된다 (Liu et al., 2008; Lu et al., 2010; Wei et al., 2012).

**DGGE 분석에 의한 토양미생물 군집변이 비교** *Bt*벼와 낙동벼 근권토양의 시기별 근권 토양미생물 군집변이 양상을 비교하기 위해 DGGE 분석을 수행하였다. PCR을 이용, 16S rRNA 유전자의 V9부위를 증폭하였으며 증폭산물은 아가로오스 젤에 전기영동하여 예상 증폭 산물 크기인 323 bp 임을 확인하였다 (data not shown). *Bt*벼와 낙동벼의 시기별 토양미생물 변화를 분석하기 위해 16S rRNA 유전자의 V9부위 증폭산물을 같은 DGGE gel에 전개하였고, 그 결과, *Bt*벼와 낙동벼의 근권 토양간 DGGE profile은 시기별 밴드의 차이는 있어도 *Bt*벼와 낙동벼 근권토양간 밴드의 차이는 거의 없는 것으로 관찰되었다 (Fig. 1). 일부 동일 위치에 있는 밴드의 강도에 차이가 있는 것은 토양이 가

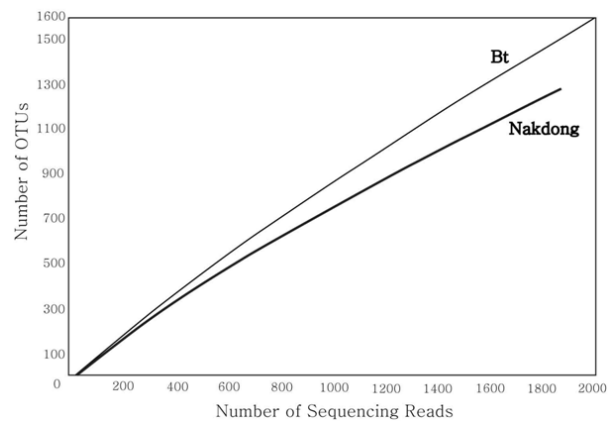


**Fig. 1.** DGGE analysis of 16S rRNA gene V9 region obtained after PCR amplification with eubacterial primers 1070f and 1392r. DGGE profile for May (1 & 2), June (3 & 4), July (5 & 6) field soils of Nakdong (1, 3 & 5) and *Bt* rice soils (2, 4, & 6) rice soils. M, DGGE molecular weight marker

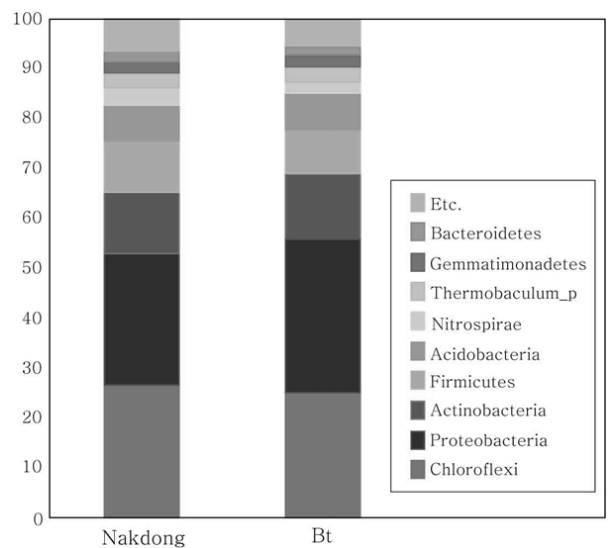
진 이질성에 기인하는 것으로 사료되었다. 이는 *CryIAb*로 형질전환된 *Bt*벼와 모품종의 DGGE profile의 차이가 없었던 분석결과와 일치하였다 (Liu et al., 2008).

**16S rDNA 염기서열 분석 및 세균 종다양성 분석**

Pyrosequencing 방법으로 *Bt*벼와 낙동벼 토양미생물 군집을 분석한 결과, *Bt*벼는 2,100개, 낙동벼는 1,872개의 16S rRNA gene sequence를 획득하였다. 두 개 토양시료의 미생물 군집의 종 다양성 (species richness)을 비교하기 위해 rarefaction curve를 분석한 결과 (Fig. 2), 분석된 염기서열 갯수에 대한 Operational taxonomic unit (OTU)의 기울기는



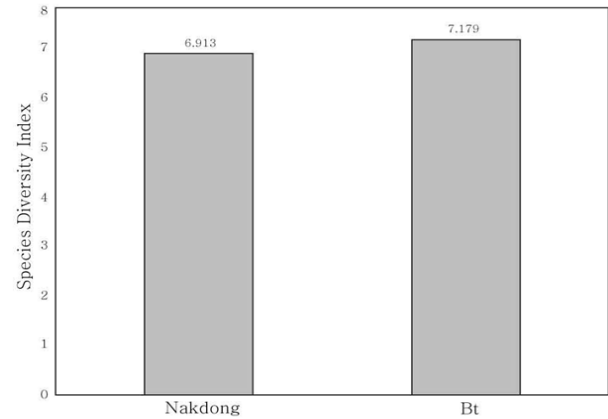
**Fig. 2.** Rarefaction curves of OTUs (operational taxonomic units) defined by sequence variations in *Bt* and Nakdong rice soils. The X-axis shows the number of sequences in each sample, while the Y-axis shows the numbers of OTUs encountered.



**Fig. 3.** Bacterial composition in the rhizosphere soil of Nakdong and *Bt* rice. Relative abundance of operational taxonomic units classified to each taxon was determined with partial sequences of bacterial 16S rRNA genes from soils by EzTaxon.

**Table 3. Phylogenetic distribution of the dominant isolates obtained from Bt and Nakdong rice soils.**

Bacteria	Nakdong		Bt	
	No. of isolate	Distribution rate %	No. of isolate	Distribution rate %
Proteobacteria	496	26.5	640	30.5
Chloroflexi	501	26.8	534	25.4
Actinobacteria	234	12.5	276	13.1
Firmicutes	185	9.9	186	8.9
Acidobacteria	132	7.1	156	7.4
Thermobaculum_p	58	3.1	67	3.2
Nitrospirae	68	3.6	50	2.4
Gemmatimonadetes	41	2.2	44	2.1
Bacteroidetes	47	2.5	37	1.8
Chlorobi	18	1.0	15	0.7
Cyanobacteria	10	0.5	16	0.8
Chlorophyta	13	0.7	8	0.4
Planctomycetes	7	0.4	14	0.7
Bacillariophyta	13	0.7	6	0.3
Armatimonadetes	6	0.3	8	0.4
OP8	9	0.5	1	0
WS3	2	0.1	8	0.4
Fibrobacteres	5	0.3	4	0.2
Elusimicrobia	4	0.2	5	0.2
Verrucomicrobia	4	0.2	4	0.2
Spirochaetes	2	0.1	3	0.1
TM7	0	0	4	0.2
WS5	2	0.1	1	0
Streptophyta	1	0.1	2	0.1
OD1	0	0	2	0.1
NKB19	0	0	2	0.1
Tenericutes	1	0.1	1	0
EU266861_p	2	0.1	0	0
Ochrophyta	0	0	2	0.1
TM6	2	0.1	0	0
OP11	1	0.1	1	0
SM2F11	2	0.1	0	0
Rhodophyta	2	0.1	0	0
Bacteria_uc	1	0.1	0	0
OP3	1	0.1	0	0
BRC1	1	0.1	0	0
CS	1	0.1	0	0
Ciliophora	0	0	1	0
AD3	0	0	1	0
GN04	0	0	1	0
Total	1872	100	2100	100

**Fig. 4. Bacterial species diversity index in the rhizosphere soil of Bt and Nakdong rice.**

두 개 토양시료에서 유사한 것으로 나타났다. Phylum 수준에서 미생물의 분포비율을 비교한 결과, Bt벼 토양미생물은 *Proteobacteria* (30.5%), *Chloroflexi* (25.4%), *Actinobacteria* (13.1%), *Firmicutes* (8.9%), *Acidobacteria* (7.4%) 낙동벼 토양미생물은 *Chloroflexi* (26.8%), *Proteobacteria* (26.5%), *Actinobacteria* (12.5%), *Firmicutes* (9.9%), *Acidobacteria* (7.1%) 순으로 분포하였다 (Fig. 3, Table 3). 분자생물학적 기법을 통해서 배양하기 힘든 균의 분석도 가능한데, Bt 벼 근권토양과 낙동벼 근권토양에서 모두 나타나는 *Acidobacteria*는 배양이 어려운 것으로 알려져 있다 (Kim and Whang, 2007). 두 토양간 종 다양성 지수를 Shannon-Weiner's index에 근거하여 분석한 결과 두 근권토양 세균 종 다양성 정도는 낙동벼가 6.9, Bt벼가 7.2로 유사한 수준인 것으로 조사되었다 (Fig. 4). Phylum수준에서의 우점미생물 분포비율은 Bt벼와 낙동벼에서 매우 유사한 것으로 나타났다으며, 이로 미루어보아 Bt벼 재배가 토양미생물 군집구조에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

Pyrosequencing 방법은 PCR 증폭 후 염기서열 분석을 하게 되는데, DGGE와 달리 denaturing gradient gel을 이용하지 않고 DNA fragment로부터 직접적인 염기서열 분석을 함으로써 DGGE 분석에 비해 더 많은 미생물의 확인이 가능하다 (Kim et al., 2011). 따라서 GM 작물의 토양미생물상에 대한 영향을 분석하는데 있어서도 현재 pyrosequencing 방법이 도입되고 있으며 (Lee et al., 2011), 향후 차세대 염기서열 분석기법 (NGS: next generation sequencing) 기법의 발달에 따른 비용 절감이 이루어진다면 GM 작물의 토양미생물상 영향 조사를 위한 다른 분석법들을 대체할 수 있는 방법으로도 이용 가능할 것으로 사료된다.

## 요 약

경제적 및 농업적 장점은 유전자 변형 작물 재배면적의

증가를 가져왔다. 그러나 유전자 변형 작물의 상업적 재배 전에 유전자 변형 작물의 인간건강 및 환경에 미칠 잠재적 위해성에 대한 면밀한 검토가 필수적이다. 본 연구에서는 *Bt*벼의 토양미생물 군집에 미치는 영향을 조사하였다. 토양 화학성분을 분석한 결과, *Bt*벼와 낙동벼 근권토양 간 화학성분의 유의성 있는 차이는 없는 것으로 조사되었다. 재배 전, 재배초기, 최고분얼기의 토양미생물 군집밀도를 조사했을 때 *Bt*벼 근권토양의 세균, 방선균, 진균 군집밀도는 낙동벼와 유사한 수준으로 나타났다. 시기별 DGGE 분석결과 *Bt*벼 근권토양 전체미생물상은 낙동벼와 차이가 없는 것으로 조사되었다. Pyrosequencing을 통한 *Bt*벼와 낙동벼의 미생물 군집조성을 조사한 결과 주요 미생물상 분포에 있어서도 매우 유사한 양상을 나타내었다. 위의 결과들을 종합해볼 때 *Bt* 재배에 따른 토양미생물상에 미치는 영향은 미미한 것으로 사료된다. 수확 후 벼 잔존물이 토양환경에 미치는 영향에 대해서는 좀 더 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원의 지원 (과제번호: PJ008055)에 의해 수행되었음.

## 인 용 문 헌

- Bashir, K., T. Husnain, T. Fatima, Z. Latif, S.A. Mehdi, and S. Riazuddin. 2004. Field evaluation and risk assessment of transgenic indica basmati rice. *Mol. Breed.* 13:301-312.
- Betz, F. S., B.G. Hammond, and R. L. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32: 156-173.
- Carpenter, J. E. 2010. Peer-reviewed surveys indicate positive impact of commercialized GM crops. *Nat. Biotechnol.* 28: 319-321.
- Clark, M. S., M. S. Smith, and J. W. Doran. 1998. Changes in soil chemical properties resulting from organic and low-input farming practices. *Agron. J.* 90: 662-671.
- de Vries, J. and W. Wackernagel. 2004. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant Soil.* 266: 91-104.
- Dufourmantel, N., G. Tissot, F. Goutorbe, F. Garçon, C. Muhr, S. Jansens, B. Pelissier, G. Peltier, and M. Dubald. 2005. Generation and analysis of soybean plastid transformants expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protoxin. *Plant Mol. Biol.* 58: 659-668.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig, and M. G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a spectrum of activities against lepidopteran insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5389-5394.
- He, K., Z. Wang, S. Bai, L. Zheng, Y. Wang, and H. Cui. 2006. Efficacy of transgenic *Bt* cotton resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Crop Prot.* 25: 167-173.
- Icoz, I., D. Saxena, D.A. Andow, C. Zwahlen, and G. Stotzky. 2008. Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn expressing cry proteins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Environ. Qual.* 37(2), 647-662.
- Icoz, I. and G. Stotzky. 2008. Fate and effects of insect-resistant *Bt* crops in soil ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 40:559-586.
- James, C. 2011. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2011. ISAAA Briefs No. 43, Ithaka, NY.
- Jung, B. G., G. H. Jo, E. S. Yun, J. H. Yoon, and Y. H. Kim. 1998. Monitoring on chemical properties of bench marked paddy soils in Korea. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 31(3) 246-252.
- Kim, E. S., S. W. Hong, and K. S. Chung. 2011. Comparative analysis of bacterial diversity in the intestinal tract of earthworm (*Eisenia fetida*) using DGGE and pyrosequencing. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39(4): 374-381
- Kim E. H., S. C. Suh, B. S. Park, K. S. Shin, S. J. Kweon, E. J. Han, S. H. Park, Y. S. Kim, and J. K. Kim. 2009. Chloroplast-targeted expression of synthetic *cry1Ac* in transgenic rice as an alternative strategy for increased pest protection. *Planta.* 230: 397-405.
- Kim, Y.J. and K.S. Whang. 2007. Phylogenetic characteristics of viable but nonculturable bacterial populations in a pine mushroom (*Tricholoma matcutake*) forest soil. *The Korean J. Microbiol.* 43: 201-209.
- Koziel, M. G., G. L. Beland, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Lauris, K. Lewis, D. Maddox, K. McPherson, M. R. Meghji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright, and S. V. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio. Technol.* 11: 194-200.
- Kumar, H. and V. Kumar. 2004. Tomato expressing Cry1A(b) insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected against tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) damage in the laboratory, greenhouse and field. *Crop Protect.* 23:135-139.
- Lee, S. H., C. G. Kim, and H. J. Kang. 2011. Temporal dynamics of bacterial and fungal communities in a genetically modified(GM) rice ecosystem. *Microb. Ecol.* 61: 646-659.
- Liu, W., H. H. Lu, W. Wu, Q. K. Wei, Y. X. Chen, and J. E. Thies. 2008. Transgenic *Bt* rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development. *Soil Biol. Biochem.* 40: 475-486.

- Lu, H., W. Wu, Y. Chen, H. Wang, M. Devare, and J. E. Thies. 2010. Soil microbial community responses to *Bt* transgenic rice residue decomposition in a paddy field. *J. Soils Sediments*. 10:1598-1605.
- Maqbool, S. B., S. Riazuddin, N. T. Loc, A. M. R. Gatehouse, J. A. Gatehouse, and P. Christou. 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Mol. Breed.* 7: 85-93.
- Meissle, M., E. Vojtech, and G. M. Poppy. 2005. Effects of *Bt* maize-fed prey on the generalist predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Transgenic Res.* 14:123-132.
- Mendelsohn, M., J. Kough, Z. Vaituzis, and K. Matthews. 2003. Are *Bt* crops safe? *Nature Biotech.* 21: 1003-1009.
- Nap, J.P., J. Bijvoet, and W. J. Stiekema. 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Res.* 1: 239-249.
- NAAS (National Academy of Agricultural Science). 2000. Analysis method of soil and plant: Physics, chemistry and microorganism. RDA, Korea.
- Odum. 1998. Fundamental of ecology. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 800p.
- Perlak, F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, and D. A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio. Technol.* 8: 939-943.
- Raney, T. 2006. Economic impact of transgenic crops in developing countries. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17: 1-5.
- Raybould, A. and D. Vlachos. 2011. Non-target organism effects rests on Vip3A and their application to the ecological risk assessment for cultivation of MIR162 maize. *Transgenic Res.* 20: 599-611.
- Shu, Q., G. Ye, H. Cui, X. Cheng, Y. Xiang, D. Wu, M. Gao, Y. Xia, C. Hu, R. Sardana, and I. Altosaar. 2000. Transgenic rice plants with a synthetic *cry1Ab* gene *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Mol. Breed.* 6: 433-439.
- Sohn, S. I., Y. J. Oh, S. D. Oh, M. K. Kim, T. H. Ryu, K. J. Lee, S. C. Suh, H. J. Baek, and J. S. Park. 2010. Molecular analysis of microbial community in soils cultivating Bt Chinese cabbage. *Korean J. Environ. Agric.* 29(3): 293-299.
- Stewart, C. N., M. D. Jr., Halfhill, and S. I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nat. Rev. Gen.* 4: 806-817.
- Tu, J., G. Zhang, K. Datta, C. Xu, Y. He, Q. Zhang, G. S. Khush, and S. K. Datta. 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *Nat. Biotechnol.* 18:1101-1104.
- Wei, M., F. Tan, H. Zhu, K. Cheng, X. Wu, J. Wang, K. Zhao, and X. Tang. 2012. Impact of *Bt*-transgenic rice (SHK601) on soil ecosystems in the rhizosphere during crop development. *Plant Soil Environ.* 58(5): 217-223.
- Ye, G. Y., Q. Y. Shu, H. W. Yao, H. R. Cui, X. Y. Cheng, C. Hu, Y. W. Xia, M. W. Gao, and I. Altosaar. 2001. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *J. Econ. Entomol.* 94: 271-276.
- Ye, G. Y., H. W. Yao, Q. Y. Shu, X. Cheng, C. Hu, Y. W. Xia, M. W. Gao, and I. Altosaar. 2003. High levels of stable resistance in transgenic rice with a *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leafhopper, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) under field conditions. *Crop Protect.* 22: 171-178.