

포장 조건에서 *CMVPO-CP* 형질전환 고추 도입유전자의 지속성 조사

이범규 · 김창기 · 박지영 · 박기웅 · 이훈복 · 한지학¹⁾ · 김환목*

한국생명공학연구원 바이오평가센터, ¹⁾(주)농우바이오 생명공학연구소

(2007년 11월 16일 접수, 2007년 12월 24일 수리)

Assessment of the Persistence of DNA in Decomposing Leaves of *CMVPO-CP* Transgenic Chili Pepper in the Field Conditions

Bumkyu Lee, Chang-Gi Kim, Ji-Young Park, Kee Woong Park, Hoonbok Yi, Chee Hark Harn¹⁾, and Hwan Mook Kim* (Bio-Evaluation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Cheongwon 363-883, Korea, ¹⁾Biotechnology Institute, Nongwoo Bio Co. Ltd., Yeosu 469-885, Korea)

ABSTRACT: This study was conducted to evaluate the persistence of DNA in the transgenic chili pepper resistant to cucumber mosaic virus (CMV) in the field condition. We analyzed the persistence of genes in the leaf samples obtained from two field conditions, below and above soil. Transgenic and non-transgenic leaf tissues were buried in the soil at a depth of 10 cm or placed on the soil surface. Qualitative and quantitative PCR analysis showed that the amount of transferred genes from the transgenic peppers below and above soil was dropped to 28.3-42.7% one month after buried and it was rapidly reduced to 0.9-3.3% after two months. The transgenes were not detected three to four month after buried. In addition, DNA of the leaves placed below soil decomposed about 8% more than those on soil surface. The gene transfer from decomposing leaves of the transgenic pepper to soil was investigated by PCR analysis with the soil attached to the samples. The PCR result indicated that the gene transfer from the transgenic pepper to soil was not occurred.

Key Words: DNA persistence, chili pepper, gene transfer, soil, transgenic plant

서 론

식량증산을 목적으로 개발된 형질전환작물은 2006년 현재 22개국에서 총 1억 200만 헥타르에 걸쳐 재배되고 있으며, 그 재배 및 이용이 매년 급속하게 증가되고 있다¹⁾. 이러한 형질전환작물은 관리의 편의성, 수확량 증가, 관리비용 절감 등의 많은 경제적 이점을 가지고 있으나, 인체 및 환경에 대한 잠재적 위해성에 대한 문제 또한 대두되고 있다^{2,3)}. 환경에 대한 위해 요인에는 형질전환작물의 잡초화 및 야생화 가능성, 근연 야생식물로의 도입유전자 확산, 비표적 곤충 또는 미생물에 대한 영향 등이 있다.

또 다른 환경적 우려 중 하나는 형질전환작물의 재배 중 잎이나 뿌리가 토양에서 분해되는 과정에서 작물에 도입된 유전자가 유출되어 주변의 토양미생물로 이동 될 가능성이다.

형질전환작물의 재배에 있어 이러한 유전자 전달(gene transfer)이 문제가 되는 이유는 많은 수의 형질전환작물이 유전자도 입세포를 선발하기 위해 kanamycin, hygromycin 등의 항생물질에 대한 내성 유전자를 선발표지로 사용하기 때문이다. 토양 세균으로의 항생물질 내성 유전자의 전이는 주변 환경에 대한 유리한 새로운 형질을 취득하게 하여 미생물군집에 변화를 일으킬 수 있으며 장기적으로 생태계 교란 등의 문제를 야기 시킬 수 있고, 항생제 저항성 병원균의 출현을 통해 인류의 건강을 위협할 수도 있다^{4,6)}.

토양에서 형질전환 식물체의 도입유전자로부터 미생물로의 자연형질전환(natural transformation)이 발생하기 위해서는 미생물에 도입될 DNA가 토양에서 충분한 시간동안 적절한 양으로 생물학적 활성을 잃지 않고 안정적으로 존재하여야 하며, 주변에 이를 받아들일 수 있는 토양미생물이 존재하여야 한다⁷⁾. 토양에서의 DNA 지속성에 관한 연구에서 정제된 DNA 및 plasmid DNA는 자연토양에서 여러 주 동안 지속된다고 보고되었으며^{8,9)}, 형질전환 식물체를 이용한 실험에

*연락처:
Tel: +82-43-240-6520 Fax: +82-43-240-6519
E-mail: hwanmook@kribb.re.kr

서는 식물체에 도입된 유전자가 토양에서 2-3개월 까지 지속된다고 알려져 있다^{7,10}. 토양 중의 미생물 또는 식물체의 분해에 의해 유출되는 DNA의 지속성은 비생물적(abiotic) 그리고 생물적(biotic) 요인에 의해 영향을 받는다. 비생물적 요인으로 토양 내의 광물질(mineral)은 DNA의 분해를 막아준다고 알려져 있으며¹¹⁻¹³, 그 밖에 토양 산도, 2가 이온(bivalent ions)등도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다¹⁴. 생물적 요인으로는 토양내의 미생물 활성이 DNA의 지속성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 이러한 미생물 활성이 토양 내 DNase 활성을 변화시키는 것으로 알려져 있다¹⁵. 또한 토양내의 높은 습도와 온도가 DNA의 분해를 촉진시키는 것으로 알려져 있으며, 이는 토양 미생물의 활성을 증가시키기 때문인 것으로 추측되고 있다⁹.

토양에 존재하는 DNA로부터 토양미생물로의 형질전환에 대해서는 많은 연구가 수행되어 왔다. Lorenz와 Wackernagel¹⁶과 Nielsen 등¹⁷은 다양한 환경에서 분리한 40여 종의 세균에서 자연형질전환이 일어나는 것을 실험실 조건에서 관찰하였으며, 최적화된 조건에서 세균과 진균으로의 수평유전자동이 보고되었다¹⁸⁻²⁰. 하지만 실험실 조건이 아닌 토양, 퇴비, 하수 등과 같은 환경에서의 자연형질전환에 대해서는 거의 보고 되어있지 않아 아직까지 그 가능성에 대해 논란이 되고 있다.

본 연구는 자연형질전환의 가능성 여부를 알아보기 위하여 PCR 및 실시간(real-time) PCR법을 이용하여 오이모자이크바이러스(cucumber mosaic virus, CMV) 저항성 형질전환 고추(CMVPO-CP 고추) 도입유전자의 지속성과 주변 토양으로의 전이에 대해 포장(field)조건에서 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 실험구 설치

본 실험은 (주)농우바이오에서 개발한 오이모자이크바이러스 저항성 형질전환 고추(CMVPO-CP 고추)를 사용하여 수행되었다. CMVPO-CP 고추는 모계통인 P915 고추를 야그로박테리움을 이용해 형질전환 한 것으로 35S promoter의 조절을 받는 CMVPO-CP (cucumber mosaic virus pathotype 0 - coat protein) 유전자 및 nos terminator와 선발표지인 kanamycin 저항성 유전자 NPT II가 도입되었다(Fig. 1). 약 45일간 유리온실에서 재배된 CMVPO-CP 고추(T3, line 7)와 모계통의 유묘를 격리포장에 정식하고 두 달간 재배한 뒤 잎을 채취하여 60°C에서 5일 동안 건조시켰다. 유전자의 지속성은 2006년 8월부터 12월까지 4개월간 토양 속 및 토양 표면의 조건에서 조사되었다. 실험구 토양은 pH 7.4, 수분함량 1.1%, 전질소

0.1%, 가용성 인 19.5 mg/kg, 가용성 칼륨 10.0 mg/kg, 유기물 함량은 3.0%이었으며, 사질토 70.2%, 점토 10.1%, 미사토 19.7%로 구성되어있었다. 토양 내에서의 지속성 측정을 위해 건조된 모계통 및 CMVPO-CP 고추의 잎 5 g을 낙엽주머니(litter bag, mesh size: 1 mm)에 넣어 각각 12개를 격리포장 내의 토양 10 cm 깊이에 1 m 간격으로 묻었다. 토양 표면에서의 유전자 지속성 측정을 위해서는 건조된 잎 20 g씩을 직경 30 cm×높이 25 cm의 PVC 주름관 3개에 넣고 바람에 날아가지 않도록 망으로 덮어 놓았다.

시료의 채취

모계통 및 형질전환 고추의 잎이 담겨 있는 낙엽주머니를 1개월 간격으로 각각 3개씩 토양으로부터 꺼내 DNA를 추출하였으며, 토양표면에 올려놓은 잎도 3개의 주름관에서 각각 5 g씩 취해 실험실로 운반한 뒤 DNA를 추출하였다. 또한 묻혀있던 낙엽주머니 주위의 토양을 채취하여 체(mesh size: 2 mm)로 치고 15 ml 튜브에 담았다. 시료는 드라이아이스가 담긴 상자에 넣어 실험실로 운반한 뒤 DNA를 추출하였다.

식물 및 토양에서의 DNA 추출

토양 내 및 토양 표면에서 수집된 고추 잎 시료의 genomic DNA는 DNeasy[®] Plant Maxi Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 설명서에 준하여 추출하였고, 얻어진 crude DNA는 humic acid를 제거하기 위해 DNA PrepMate[™] II kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 순수 정제하였다.

토양 DNA의 추출은 Fast DNA SPIN[®] for Soil Kit (Q-Bio gene, USA)을 사용하였으며, 토양에서 추출한 crude DNA는 식물 DNA 추출에서와 같이 humic acid를 제거하기 위해 PrepMate[™] II kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 순수 정제 한 뒤 PCR 분석을 수행하였다.

PCR 분석

시간 경과에 따른 토양 내 및 토양 표면에서의 고추 유전자의 지속성은 PCR법을 이용하여 정성 분석하였다. 분석을 위해 CMVPO-CP 고추의 도입 유전자인 35S promoter부위와 nos terminator부위를 증폭시켰으며, 모계통과의 비교를 위해 식물내재유전자인 actin 부위를 증폭시켰다. PCR에 이용된 각 primer의 염기서열은 Table 1에 표기하였다. PCR 반응의 조성은 DNA template (200 ng)와 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 μM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 각 1.25 μM primer, 250 μM dNTP 및 1 unit의 Taq polymerase (Bioneer, Korea)를 포함하여 총량은 20 μL이었다. PCR 반

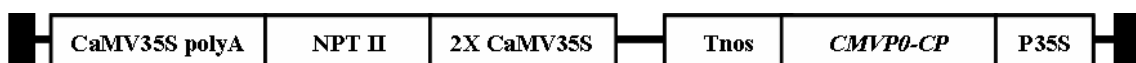


Fig. 1. A schematic diagram of the introduced gene to CMVPO-CP transgenic chili pepper.

Table 1. Oligonucleotide primers.

Gene	Orientation	Sequence (5'→3')	Amplicon
<i>actin</i>	Upstream primer	TGG ACT CTG GTG ATG GTG TC	560 bp
	Downstream primer	CCT CCA ATC CAA ACA CTG TA	
35S	Upstream primer	GCT CCT ACA AAT GCC ATC A	195 bp
	Downstream primer	GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA	
<i>nos</i>	Upstream primer	GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG	180 bp
	Downstream primer	TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA	

응은 MJ research의 PTC-225를 이용하여 94°C에서 first denaturation 5분 후 94°C 30초, 50°C(*actin*) 또는 58°C(35S 및 *nos*) 30초, 72°C 1분으로 하여 35 cycle을 수행하였으며, terminal elongation은 72°C에서 5분 간 하여 전 증폭 과정을 종료하였다. 토양 DNA의 PCR 분석은 *actin*, 35S promoter, *nos terminator* 영역을 증폭하였으며 사용된 primer 및 PCR 반응 조건은 식물에서 사용된 PCR법과 동일하게 사용하였다. 증폭된 PCR산물(10 µL)은 1.8% TAE buffer agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

실시간 PCR

토양 내에서 CMVP0-CP 고추 DNA의 시간경과에 따른 분해 정도는 실시간 PCR 방법을 이용하여 정량 분석하였다. 분석을 위해 35S promoter, *nos terminator* 그리고 *actin* 유전자를 증폭하는 primer를 사용하였으며(Table 1), 반응의 조성은 1 well 당 template DNA 100 ng, 300 nM primer, 2X HS Prime Taq Premix (Genet Bio, Korea) 10 µL를 포함하여 총량은 20 µL이었고 시료 1개당 3회 반복하여 분석하였다. 표준시료는 위의 반응 조건에 3×10² ng에서 3×10⁵ ng까지 10배씩 희석한 CMVP0-CP 고추의 genomic DNA를 template로 사용하여 제조하였다. PCR은 Bio-Rad사의 iCycler를 사용하였으며 95°C 10분 반응 후, 95°C에서 30초, 50°C(*actin*) 또는 58°C(35S 및 *nos*)에서 30초, 72°C에서 30초의 40 cycle로 수행하면서 cycle마다 신장기에 형광 값을 읽었으며, 55°C부터 95°C까지 0.5°C씩 올리면서 용해 곡선(melting curve)을 그렸다. PCR 반응이 끝나면 분석 프로그램으로 분석한 후 토양에 묻기 전의 시료(0개월)에 대한 상대치를 계산하여 값을 구하였다.

결과 및 고찰

PCR 분석을 통한 CMVP0-CP 및 모계통 고추의 DNA 지속성 조사

자연형질전환은 토양 중의 미생물 또는 식물체의 분해에 의해 방출되는 DNA의 지속성이 중요한 요인으로 작용하기 때문에 먼저 지중과 지표에서의 CMVP0-CP 고추와 모계통의 DNA 지속성을 조사하였다. PCR은 아주 적은 양의 DNA로도 특정 유전자의 증폭이 가능하므로 유전자이동을

연구하는데 적합하여 본 실험에 사용되었다. DNA 지속성 조사를 위해 1개월 간격으로 4개월 간 시료를 채취하여 *actin*, 35S promoter, *nos terminator* 부위를 PCR법으로 증폭시켜 분석한 결과 *actin* 유전자는 CMVP0-CP 고추와 모계통에서 모두 증폭되었고, 도입 유전자인 35S promoter와 *nos terminator* 부위는 CMVP0-CP 고추에서만 검출되었다(Fig. 2). CMVP0-CP 고추와 모계통의 공통 내재 유전자인 *actin* 유전자는 두 식물 모두 0, 1, 2개월째의 시료에서 검출되었으나, 2개월째의 시료에서는 PCR 산물의 양이 앞의 다른 두 시기에 비해 줄어든 것이 관찰되었고 3개월 이후의 시료에서는 PCR 검출이 되지 않았다. CMVP0-CP 고추의 도입 유전자인 35S promoter 부위와 *nos terminator* 부위 역시 *actin* 유전자와 유사하게 2개월째의 시료에서 PCR 산물의 양이 줄어들었으며 3개월 이후의 시료에서는 PCR을 통한 검출이 되지 않았다(Fig. 2). 이러한 유전자의 분해 정도는 *actin*과 *nos terminator* 부위의 경우 지중 및 지표에서 큰 차이를 보이지 않았으나, 35S 부위의 경우 토양 표면의 샘플에서 3개월째까지 검출되는 것이 확인되었다(Fig. 2). 이상의 결과로부터 고추의 유전자는 토양 속 및 토양 표면에서 3개월을 전후로 도입유전자가 거의 분해되었음을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 형질전환 담배 및 포플러를 이용한 다른 연구그룹의 실험 결과와 유사하였다^{9,10}.

실시간 PCR 분석을 통한 DNA 분해도의 정량분석

PCR분석을 통해 토양 내 및 토양 표면에서 CMVP0-CP 고추 및 모계통의 DNA가 시간이 경과함에 따라 분해됨을 알 수 있었다. 이러한 분해되는 정도를 정량적으로 확인하기 위하여 실시간 PCR법을 이용하여 분석을 수행하였다. 분석 결과 CMVP0-CP 및 모계통에서 조사된 *actin*, 35S promoter, *nos terminator* 부위의 유전자는 지중 및 지표에서 1개월 경과 후 토양 속에 묻거나 토양 표면에 방치하기 전(0개월)에 비해 28.3-42.7%로 감소하였으며, 2개월 경과 후에는 그 양이 급속하게 감소하여 0달째의 0.9-3.3%의 양을 나타냈다(Table 2). 처리 3개월 이후에는 유전자의 증폭이 관찰되지 않았으나 앞선 PCR 분석 결과에서 나타난 것과 같이 CMVP0-CP 고추의 토양 표면 샘플에서 35S의 유전자가 3개월째에 0.3%의 양을 보였다. 또한 정량분석 결과 토양 속의 샘플보다 토양 표면에 처리한 샘플이 약 8% 정도 덜 분해되었으며(Table 2),

이러한 결과를 통해 *CMVP0-CP* 고추 잎의 유전자는 지중보다는 지표에서 더 오래 지속됨을 알 수 있었다. 하지만 토양에서의 DNA 지속성은 토양 내의 다양한 생물학적, 비생물학적 요인에 영향을 받으므로 다양한 토양조건에서의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

토양 내에서 분해된 *CMVP0-CP* 고추 도입유전자의 주변 토양으로의 전이 조사

형질전환 식물체가 분해되는 과정에서 유출된 DNA와 토양미생물이 가까이 접촉된다면 형질전환에 의한 유전자전달이 일어날 가능성이 있다²¹⁾. 이러한 유출된 DNA가 토양으로 전이될 경우 토양수 등에 의해 확산되어 토양미생물과 접촉될 가능성이 높아질 수 있다. *CMVP0-CP* 고추가 토양 내에서 분해되는 과정에서 유출된 DNA가 주변 토양으로 전이되었는지를 조사하기 위해 토양에 묻은 낙엽주머니 주변의 토양에서 DNA를 추출하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR 분

석 결과 양성대조구로 사용된 *actin* 유전자의 경우 낙엽주머니를 묻은 지 1, 2, 3, 4개월 후 채취한 모든 토양에서 유전자의 증폭이 확인되었지만, *CMVP0-CP* 고추의 도입 유전자인 35S promoter와 *nos* terminator 유전자의 증폭은 확인되지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과를 통해 본 실험에서 *CMVP0-CP* 고추 도입유전자의 토양으로의 이동은 발생하지 않은 것으로 사료되었다. 실험 결과에서 모든 기간에 걸쳐 검출된 양성대조구로 사용된 *actin* 유전자는 실험구에 존재하는 다른 식물 뿌리의 잔해가 토양에 혼입되어 증폭되었을 것으로 사료되며 (Fig. 3), 이를 방지하기 위해 실험 재료 작물의 특이적인 내재유전자를 양성대조구로 사용할 필요가 있다고 판단되었다.

야외환경에서 형질전환작물 도입유전자로부터 토양미생물의 유전자이동은 실제 일어난다고 하여도 그 빈도는 매우 낮은 것으로 알려져 있으며²⁰⁾, 본 실험의 결과 *CMVP0-CP* 고추의 도입유전자는 포장 환경에서 3개월 이내에 급속하게 분해

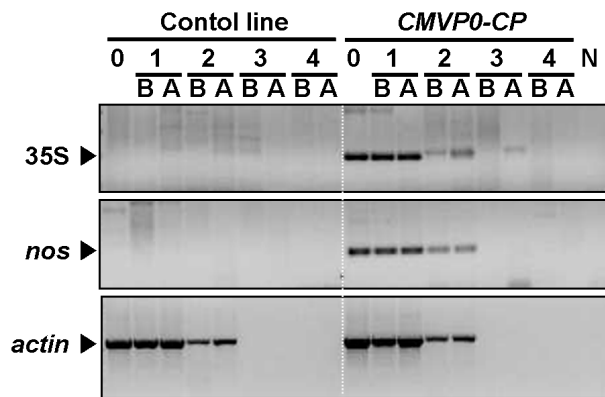


Fig. 2. PCR products of *actin*, 35S and *nos* primer amplified from chili pepper samples after one to four months of incubation; Lanes 1 to 4, the incubation times (month); B, below soil; A, above soil; N, negative (no DNA) control.

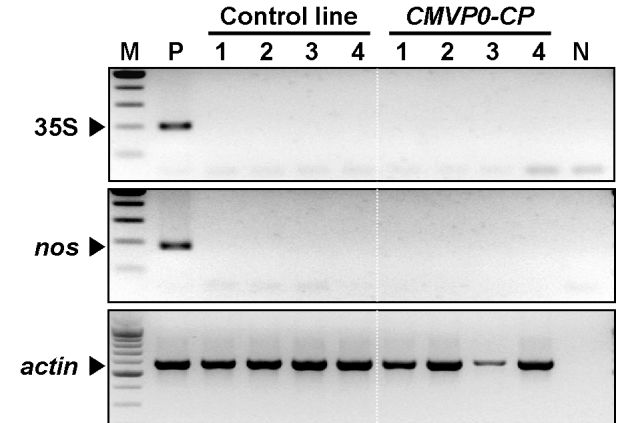


Fig. 3. PCR products of *actin* (A), 35S promoter (B), and *nos* terminator (C) primer amplified from soil samples after one to four months incubation; Lanes 1 to 4, the incubation times (month); M, 100bp DNA ladder; P, positive control; N, negative (no DNA) control.

Table 2. Relative amount of persistent *actin*, 35S and *nos* genes in one to four months of incubation. Data are means±standard deviations (n=3).

Lines	Gene	Sample conditions	% of controls (0 month)			
			1 month	2 months	3 months	4 months
Control	<i>actin</i>	Below soil	39.7±3.7	2.6±0.4	nd ^a	nd
		Above soil	42.3±4.4	3.3±0.6	nd	nd
<i>CMVP0-CP</i>	<i>actin</i>	Below soil	38.5±6.1	1.6±0.3	nd	nd
		Above soil	36.1±3.2	2.9±0.4	nd	nd
	35S	Below soil	30.1±4.5	1.3±0.1	nd	nd
		Above soil	37.7±3.9	2.1±0.3	0.3±0.1	nd
	<i>nos</i>	Below soil	28.3±5.6	0.9±0.2	nd	nd
		Above soil	31.8±7.4	2.0±0.2	nd	nd

^and = not detected.

되었고 주변 토양으로도 전이되지 않아 토양미생물로의 유전자 전달의 가능성은 극히 적을 것으로 사료되었다.

요 약

오이모자이크바이러스(cucumber mosaic virus, CMV)에 저항성을 가지도록 개발된 형질전환 CMVP0-CP 고추를 이용하여 포장 조건에서 CMVP0-CP 고추 도입유전자의 지속성을 조사하였다. CMVP0-CP 고추의 잎을 토양 표면에 올려놓거나 토양 내에 묻은 뒤 일정 시간 간격으로 PCR 및 실시간 PCR법을 이용하여 도입유전자를 정성, 정량 분석하였다. CMVP0-CP 고추에 도입된 유전자의 양은 10 cm 깊이의 토양 속 및 토양 표면에서 1개월 후 28.3-42.7%, 2개월 후 0.9-3.3%로 감소하였으며, 3-4개월 후에는 검출되지 않았다. 또한 이러한 유전자는 지중보다 지표에서 약 8% 더 오래 지속되었다. CMVP0-CP 고추의 잎이 토양 내에서 분해되는 과정에서 유출된 DNA가 주변 토양으로 전이되었는지를 조사하기 위해 낙엽주머니에 부착된 토양으로부터 DNA를 추출하여 PCR분석을 수행하였다. PCR 분석 결과 CMVP0-CP 고추에 도입된 유전자가 검출되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 시행 생명공학안전성평가기술개발사업과 KRIBB 기관고유사업 및 작물유전체기능연구사업단 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- James, C. (2007) Global status of commercialized biotech/GM crops, 2006, ISAAA Briefs, No. 35, ISAAA, New York.
- Nap, J. P., Metz, P. L., Escaler, M., and Conner, A. J. (2003) The release of genetically modified crops into the environment. Part I. Overview of current status and regulations, *Plant J.* 33, 1-18.
- Snow, A. A and Morán-Palma, P. (1997) Commercial cultivation of transgenic plants: Potential ecological risks, *BioScience* 47, 86-97.
- Badosa, E., Moreno, C., and 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.
- Motavalli, P. P., Kremer, R. J., Fang, M., and Means, N. E. (2004) Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations, *J. Environ. Qual.* 33, 816-824.
- Nielsen, K. M., van Elsas, J. D., and Smalla, K. (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413(pFG4nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1237-1242.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Donegan, K. K., and Reed, G. L. (1997) Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field, *Mol. Ecol.* 6, 1-7.
- Romanowski, G., Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1993) Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3438-3446.
- Widmer, F., Seidler, R. J., and Watrud, L. S. (1996) Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms, *Mol. Ecol.* 5, 603-613.
- Hay, I., Morency, M., and Séguin, A. (2002) Assessing the persistence of DNA in decomposing leaves of genetically modified poplar trees, *Can. J. For. Res.* 32, 977-982.
- Gallori, E., Bazzicalupo, M., Dal Canto, L., Fani, R., Nannipieri, P., Vettori, C., and Stotzky, G. (1994) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil, *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 119-126.
- Paget, E. and Simonet, P. (1994) On the track of natural transformation in soil, *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 109-118.
- Romanowski, G., Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1991) Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1057-1061.
- Smalla, K., Borin, S., Heuer, H., Gebbard, F., Van Elsas, J. D., and Nielsen, K. M. (2000) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria - are there new data to fuel the debate? Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, Sakatoon, Canada, pp. 146-154.
- Blum, S. A. E., Lorenz, M. G., and Wackernagel, W.

- (1997) Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils, *System. Appl. Microbiol.* 20, 513-521.
16. Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment, *Microbiol. Rev.* 58, 563-602.
17. Nielson, K. M., Bones, A. M., Smalla, K., and Van Elsas, J. D. (1998) Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - a rare event? *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 79-103.
18. de Vries, J. and Wackernagel, W. (1998) Detection of *npt II* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation, *Mol. Gen. Genet.* 257, 606-613.
19. Gebhard, F. and Smalla, K. (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1550-1554.
20. Hoffmann, T., Golz, C., and Schieder, O. (1994) Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants, *Curr. Genet.* 27, 70-76.
21. Williamson, M. (1992) Environmental risks from the release of genetically modified microorganisms (GMOs) - the need for molecular ecology, *Mol. Ecol.* 1, 3-8.
-