

분자생물학적 분석을 통한 Bt 배추의 토양미생물상 영향 비교평가

손수인 · 오영주 · 오성덕 · 김민경 · 류태훈 · 이기종 · 서석철 · 백형진 · 박종석*

농촌진흥청 국립농업과학원
(2010년 9월 14일 접수, 2010년 9월 24일 수리)

Molecular Analysis of Microbial Community in Soils Cultivating Bt Chinese Cabbage

Soo-In Sohn, Young-Ju Oh, Sung-Dug Oh, Min-Kyung Kim, Tae-Hoon Ryu, Ki-Jong Lee, Seok-Choel Suh, Hyeong-Jin Baek, Jong-Sug Park^{*}(National Academy of Agricultural Science, Suwon, 441-707, Korea)

The aim of this study was to investigate the possible impact of Bt Chinese cabbage on the soil microbial community. Microbial communities were isolated from the rhizosphere of one Bt Chinese cabbage variety and four varieties of conventional ones 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 Chinese cabbages were observed to have an insignificant difference. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes revealed that the bacterial community structures were very similar to each other and this genetic stability of microbial communities was maintained throughout the culture periods. Analysis of dominant isolates in the rhizosphere of transgenic and conventional Chinese cabbages showed that the dominant isolates from the soil of transgenic Chinese cabbage belonged to the *Bacilli* and *Alphaproteobacteria*, while the dominant isolates from the soil of conventional cabbage belonged to the *Holophagae* and *Planctomycetacia*, respectively. These results indicate that the Bt transgenic cabbage has no significant impact on the soil microbial communities.

Key Words: Bt Chinese cabbage, Soil microbial community, 16S rDNA

서 론

GMO(Genetically modified organism)는 그 재배면적이 해마다 증가하고 있는 추세이다. 2009년에는 전 세계적으로 1억 3,400만 헥타의 형질전환 작물이 재배되었으며, 이는 전세계 작물재배 면적의 9%에 해당하고, 2008년도에 비해 7%가 증가한 것이다(James, 2009). GMO의 긍정적 측면, 즉, 생산량 증가, 농약사용 절감, 온실가스 감축과 같은 여러 가지 이로움으로 인해 앞으로 GMO의 개발과 재배는 기하급수적으로 늘어날 것이다. 그러나 GMO가 환경에 미치는 잠재적 위험성, 즉, 도입유전자가 표적 및 비표적 생물체로 전이될 가능성(Nap *et al.*, 1992; de Vries and Wacker-nagel, 2004), 잡초화, 생태계 교란 등에 대한 안전성 시비는

끊임없이 대두되고 있는 실정이다(Stewart *et al.*, 2003). 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. 예를 들어, *Cry1Ab*와 *Cry1F*이 발현된 옥수수는 European corn borer, corn earworm, 그리고 Southwestern corn borer에 대해서 저항성을 보이며, *Cry1Ac*가 발현된 목화는 tobacco budworm, cotton bollworm, 그리고 pink bollworm에 대해서 저항성을 나타내는 것으로 알려졌다(Mendelsohn *et al.*, 2003). *Bt* 면화는 그 재배면적이 2009년 현재 1,610만 헥타아르에 이를 정도로 큰 규모로 경작되고 있음에도 불구하고 이들 *Bt* 작물이 토양환경에 미치는 영향을 과학적으로 분석한 예는 많지 않다. ECOGEN 프로젝트에 의하면 *Cry1Ab* 옥수수의 토양미생물 군집과 미소생물 군에 대한 영향은 비형질전환 옥수수 품종에 따른 이들에 대한 영향보다 적은 것으로 조사되었고(www.ecogen.dk), 토양에서 *Cry* 단백질이 미소생물군의 수와 종류 및 효소활성에 미

*연락처:
Tel: +82-31-299-1141 Fax: +82-31-299-1122
E-mail: jongsug@korea.kr

치는 영향도 미미한 것으로 나타났지만(Icoz *et al.*, 2008), *Cry1Ab* 단백질은 대부분의 토양에서 4년이나 지속되는 것으로 조사되어(Icoz *et al.*, 2008) 이들 단백질의 토양에 대한 영향은 단기 뿐만 아니라 장기적인 측면에서 고려되어야 할 것이다.

본 연구에서는 변형 *cry1Ac1* 유전자가 형질전환된 배추즙 나방에 저항성인 *Bt* 배추(Cho *et al.*, 2001)의 실용화에 앞서, *Bt* 배추가 포장수준에서 환경에 방출되었을 때 토양미생물 생태계에 미칠 수 있는 영향을 비형질전환 배추와 비교하여 분석하였다. *Bt* 배추와 형질전환 모품종인 노원 배추, 그리고 일반배추 품종으로서 삼진, 장미, 가을맛, 황성배추의 근권토양 화학성분을 분석하였으며, 이들 *Bt* 배추와 일반배추 품종들의 재배포장의 토양으로부터 배양법에 의해 토양미생물 군집밀도를 조사하였다. DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)를 이용, 월별 전체미생물 군집변화를 분석하였으며, 근권토양으로부터 전체 미생물 DNA를 추출하여 16S rDNA PCR 증폭산물의 클로닝을 통해 이들을 동정하여 형질전환 배추 근권토양과 비형질전환 배추 근권토양의 미생물 군집구조를 비교 분석하였다. 형질전환에 사용된 식물형질전환 벡터의 구성요소 유전자의 PCR을 통해 이들 유전자의 토양미생물로의 전이 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

토양시료

토양시료를 채취하기 위한 시험구는 경기도 수원시의 GMO 격리포장에 설치되었고, *Bt* 배추 시험구와 형질전환 모품종인 노원, 일반 배추 품종으로서 삼진, 장미, 가을맛, 황성 배추의 시험구를 각각 3반복으로 재배하였다. 일반 배추 품종의 종자는 종묘회사에서 구입하였다. 각 시험구의 크기는 2.5 m × 2.5 m로 하였다. 배추 종자는 육묘상자에 파종 후 2주 경과한 식물체를 8월 중순에 포장에 이식하였고, 이로부터 토양시료 채취는 9월, 10월, 11월 중순에 수행하였다. 근권토양은 배추를 뿌리째 뽑은 후 토양이 붙은 채로 뿌리를 흔들어 비근권 토양을 제거한 후, 뿌리에 붙은 수 mm의 토양을 비닐봉지 내에서 천천히 흔들어 떨어뜨린 것을 근권토양으로 하였다.

근권토양 화학분석

GM 배추와 non-GM 배추들의 근권 토양시료를 채취하여 그늘에서 건조시킨 후 2 mm 체를 통과한 토양시료를 분석에 이용하였다. 토양 화학분석은 농업과학기술원 토양 및 식물체 분석법(농업과학기술원, 2000)에 준하여 pH는 토양과 증류수의 비율을 1:5로 하여 pH meter로 측정하였고, 토양 총질소 및 총탄소 함량은 Elemental analyzer (Vario Max CN, Elementar, Germany), 유효인산은 Lancaster 법을 이용하여 비색정량하였으며, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 나트

륨 등 치환성양이온은 1N Ammonium acetate로 침출하여 유도결합플라즈마 발광광도계(ICP, Intergra, GBC, Australia)로 분석하였다.

미생물 군집밀도 조사

채취한 토양 10 g을 90 ml의 멸균된 0.85% NaCl 용액에 넣어 진탕배양기 (Vision Co., Bucheon, Korea)에서 200 rpm으로 30분간 현탁하였다. 현탁액은 일련의 희석계열을 만든 후, 세균은 cycloheximide (0.05 g/l)를 첨가한 R2A agar (NA, Difco, Detroit MI)배지에, 사상균은 chloramphenicol (0.02%)을 첨가한 R2A agar(Difco, Detroit MI) 배지에, 방선균은 sodium caseinate agar 배지에 도말하여 배양하였다. 도말된 평판은 세균의 경우 28°C에서 2일간, 방선균은 4일간, 사상균은 5일간 배양한 후 출현한 colony를 계수하였다. 각 시료당 미생물 수는 3개의 petridish에 나타난 colony를 각각 계수한 후 평균한 값을 생균수 (colony forming unit : CFUg⁻¹ 건조)로 산출하였다.

DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 분석

형질전환 배추와 비형질전환 배추가 재배된 토양에서 토양미생물 군집의 변화가 있는지 조사하기 위해 DGGE 분석을 수행하였다. 토양미생물로부터 DNA는 FastDNA Spin Kit (Qbiogen, Carlsbad, U.S.A.)를 사용하여 추출하였으며, 16S rRNA 유전자를 PCR 증폭하였다. PCR을 위한 프라이머는 *Eubacteria*의 V3와 V9 부위를 포함하도록, F352T-519r 그리고 1070f-1392r을 사용하였다(Table 1). PCR 반응물은 총량을 50 µl로 하여, 5 µl의 10x PCR buffer, 10 ng의 주형 DNA, 각 25 pmol의 양방향 프라이머, 200 µM의 각각의 dNTP, 2.5 U의 *f-Taq* DNA polymerase (Solgent, Daejeon, Korea)를 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성과정을 거친 후, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 30 cycle을 수행하였으며, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.)을 사용하여 변성제인 formamide가 40-70%로 농도 구배된 8% 아크릴아미드젤에서 전기영동하였다. 전개된 DNA를 SYBR Green I (Cambrex BioScience, Rockland, ME, USA)과 EtBr로 염색하여 Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용, UV transilluminator하에서 관찰하였다.

16S rDNA 염기서열 분석

토양 DNA는 FastDNA Spin Kit (Qbiogen, Carlsbad, U.S.A.)를 사용하여 추출하였으며, 세균의 16S rRNA부위를 증폭하기 위해 27mf와 1491r 프라이머 (Table 1)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응물의 조성은 위의 실험과 동일하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성과정을 거친

Table 1. Primers used in this study

Gene	Primer	Sequence
16S rRNA V3 region	F352T	5'-ACTCCTACGGGTGGC-3'
	519r	5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3'
16S rRNA V9 region	1070f	5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3'
	1392r	5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'
16S rDNA	27mf	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
	1492r	5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'
35S <i>cry1Ac1</i>	35SCr-1	5'-AAGGGATGACGCACAATCCCCTA-3'
	35SCr-2	5'-ACTCGCTGAGCAGAACTGTGTCA-3'
<i>cry1Ac1</i>	TaCry2-1	5'-TGCTGCAACCATCAATAGCC-3'
	TaCry2-2	5'-AGACACGCTCCAAGCCAGT-3'
bar	barFOR	5'-TCTGCACCATCGTCAACCACTACAT-3'
	barREV	5'-CTGAAGTCCAGCTGCCAGAAACCCA-3'

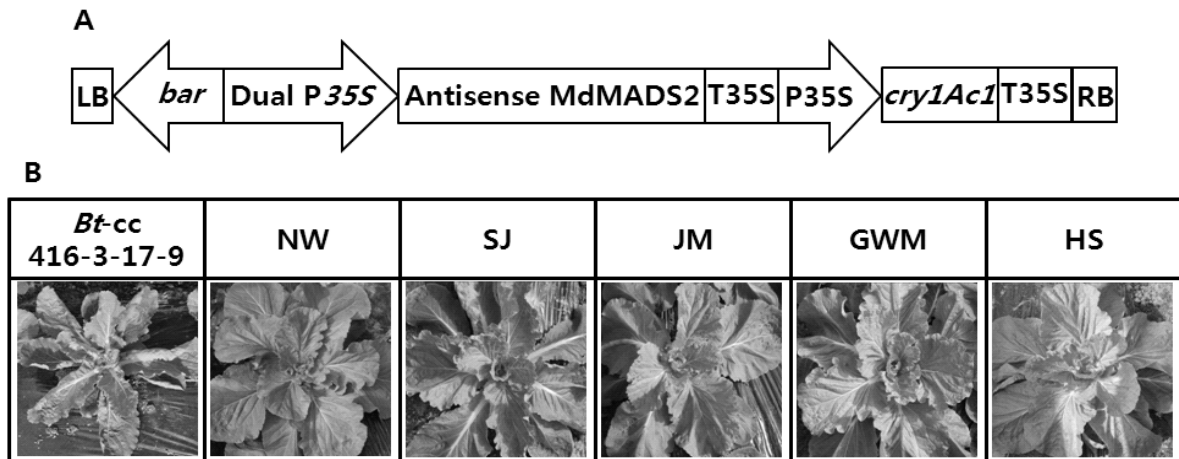


Fig.1. The binary vector 416 used for transformation of Chinese cabbage and *Bt*, and conventional Chinese cabbages. A, A schematic diagram of T-DNA region of plant expression vector. LB: Left border, Dual P35S: *Cauliflower mosaic virus* promoter 35S, T35S: *Cauliflower mosaic virus* terminator, *bar*: phosphinothricin acetyltransferase gene, *cry1Ac1*: synthetic insect-resistance gene, *MdMADS2*: *Malus domestica* MADS box gene, RB: right border. B, *Bt* and conventional Chinese cabbages after 4 weeks of culture in the field. *Bt-cc*: *Bt*-Chinese cabbage, NW: Nowon, SJ: Samjin, JM: Jangmi, GWM: Gawulmat, HS: Hwangseong

후, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 30 cycle을 수행하였으며, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 후 반응산물 중 5 µl를 1% 아가로스젤에서 확인한 후, 제조회사의 지침대로 pGEM-T easy vector(Promega, Madison, MI, U.S.A.)에 삽입하고, *E.coli* DH5a에 형질전환하였다. 형성된 콜로니는 무작위로 선발하여 클로닝된 삽입절편을 증폭하고, DNA clean kit(Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 정제한 후, 27mf와 519r 프라이머를 이용, 염기서열 분석을 수행하였다.

유전자 수평이동성 조사

*Bt*배추로부터 토양미생물로의 유전자 수평이동성을 조사

하기 위해, CAMV 35S 프로모터 및 *cry1Ac1* 유전자의 5'말단부위의 프라이머, *cry1Ac1*의 일부, 그리고 *bar* 유전자 일부를 증폭하기 위한 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다 (Table 1). PCR 반응물의 조성은 위의 실험과 동일하였다. PCR은 95°C에서 4분간 변성과정을 거친 후, 95°C에서 15초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분의 조건으로 40 cycle을 수행하였으며, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 기기는 Bio-Rad PCR C1000을 사용하였다. PCR 후 반응산물 중 5 µl를 3% 아가로스젤에서 확인한 후, Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용, UV transilluminator하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

토양분석

Bt 배추와 형질전환 모품종인 노원배추, 그리고 비형질전환 배추인 장미, 가을맛, 황성배추 근권 토양의 화학성분을 조사하였다. 토양 화학성분의 차이는 토양미생물 군집에 영향을 미칠 수 있기 때문에, *Bt* 배추와 비형질전환 배추 근권 토양의 화학성분에 차이가 있는지 조사하기 위해 토양 pH, 유효인산, 전기전도도, 양이온, 전질소, 유기물 함량 등을 분석하였다(Table 2). 토양 pH는 6.9~7.4 범위로서 전형적인 밭토양 pH를 나타내었다. 토양의 pH는 토양에 존재하는 양분의 유효도에 영향을 미치는데, 일반적으로 강산성(pH4.5)에서는 유효도가 낮아지고 약산성(약 pH6.5)에서는 높아지는 경향이 있다(조 등, 2002). 유효인산은 587.6~1138.6 mg/kg 범위로서 *Bt* 배추 토양의 유효인산 수준(1011.3 mg/kg)은 일반배추 토양의 유효인산 함량 범위 내에 속하는 것으로 조사되었다. 토양 전기 전도도는 1.01~2.23 ds/m, 전질소량은 0.26~0.39%, 유기물 함량은 5.17~7.47% 범위로서, 각각에 대한 *Bt* 배추 토양의 분석치는 일반배추 토양 분석 범위내에 있는 것으로 조사되었다. 토양 내에서 질소는 거의 부식층과 A1층에 존재한다. 토양의 전질소 함량은 토양의 유기물 함량과 밀접한 상관관계를 보인다. K, Ca, Mg, Na 등의 양이온 함량에 있어서도 *Bt* 배추 토양의 분석결과는 일반배추 토양 분석 범위내에 있는 것으로 조사되었다.

토양미생물 군집밀도 분석

생육 최성기인 9월 배추근권 토양의 전체 세균, 방선균, 진균의 군집밀도를 조사하였다. *Bt* 배추 근권토양 세균의 군집밀도는 $6.8 \pm 0.9 \times 10^5$ 이었으며, 방선균은 $4.3 \pm 0.3 \times 10^5$, 진균은 $4.8 \pm 0.9 \times 10^5$ 으로 분석되었다. *Bt* 배추 근권토양과 일반 배추 근권토양간 월별 미생물 군집밀도의 유의성있는 차이는 없었으며, *Bt* 배추 근권 토양의 미생물 군집밀도 범위는 일반 배추 근권 토양의 미생물 군집밀도 범위 내에 속하는 것으로 조사되었다.

DGGE 분석에 의한 토양미생물 군집변이 비교

Bt 배추와 형질전환 모품종인 노원배추, 그리고 비형질전환 배추인 장미, 가을맛, 황성배추의 월별 근권 토양미생물 군집변이 양상을 비교하기 위해 DGGE 분석을 수행하였다. PCR을 이용, 16S rRNA 유전자의 V3와 V9부위를 증폭하였으며 증폭산물은 아가로오스 젤에 전기영동하여 각각 168 bp와 323 bp 임을 확인하였다(data not shown). *Bt* 배추와 일반 배추토양의 월별 토양미생물 변화를 분석하기 위해 16S rRNA 유전자의 V3와 V9부위 증폭산물을 같은 DGGE gel에 전개하였고, 그 결과, *Bt* 배추와 비형질전환 배추의 근권 토양간 DGGE profile은 V3와 V9 부위 모두 월별 밴드의 차이는 있어도 *Bt* 배추와 비형질전환 배추 근권토양간 밴드의 차이는 거의 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). DGGE 밴드가 월별 차이를 보이는 것은 토양미생물의 성장과 대사

Table 2. Chemical analysis of rhizosphere soil of *Bt* and non-transgenic Chinese cabbages

RS ^a	pH	P ^b (mg/kg)	EC ^c (ds/m)	Cation(cmol/kg)				N ^d (%)	O ^e (%)
				K	Ca	Mg	Na		
^f Bt	6.9±0.12	1011.3±200.2	1.46±0.02	1.96±0.02	16.83±0.17	3.4±0.02	0.54±0.02	0.35	5.74±0.04
^g NW	7.2±0.03	915.2±43.1	1.1±0.06	2.07±0.07	17.40±0.05	3.74±0.25	0.58±0.07	0.39	7.30±0.13
^h SJ	7.2	587.6±7.4	1.13±0.06	1.38±0.01	16.83±0.11	3.53±0.04	0.51	0.26	5.46±0.09
ⁱ JM	7.0	599.3±109.5	1.47±0.05	1.52±0.01	16.40±0.2	3.82±0.06	0.54±0.07	0.3±0.01	5.17±0.04
^j GWM	7.0±0.12	600.4±57.9	2.23±0.07	1.54±0.01	17.44	4.3±0.52	0.65±0.04	0.33±0.01	5.21±0.03
^k HS	7.4	1038.6±59.5	1.01±0.06	2.58±0.03	17.44±0.01	3.52±0.21	0.53±0.01	0.38	7.47±0.08

^a, Rhizosphere soil; ^b, Available phosphorus; ^c, Electrical conductivity; ^d, Total Nitrogen; ^e, Soil organic matter; ^f, *Bt*-Chinese cabbage; ^g, Nowon ; ^h, Samjin; ⁱ, Jangmi; ^j, Gawulmat; ^k, Hwangseong

Table 3. Number of microbes in rhizosphere soil of *Bt* Chinese cabbage and non-transgenic Chinese cabbage

Microbes	<i>Bt</i> -Chinese cabbage	Non-transgenic Chinese cabbage				
		NW	SJ	JM	GWM	HS
Bacteria	^a $6.8 \pm 0.9 \times 10^5$	$4.2 \pm 2.2 \times 10^5$	$3.6 \pm 1.0 \times 10^5$	$2.2 \pm 1.5 \times 10^5$	$3.3 \pm 0.7 \times 10^5$	$4.1 \pm 1.7 \times 10^5$
Actinomycetes	$4.3 \pm 0.3 \times 10^5$	$5 \pm 0.3 \times 10^5$	$5.0 \pm 0.4 \times 10^5$	$5.5 \pm 1.0 \times 10^5$	$5.7 \pm 1.3 \times 10^5$	$4.0 \pm 0.7 \times 10^5$
Fungi	$4.8 \pm 1.5 \times 10^4$	$4.8 \pm 1.5 \times 10^4$	$3.2 \pm 2.9 \times 10^4$	$1.4 \pm 0.6 \times 10^4$	$1.7 \pm 1.5 \times 10^4$	$5.5 \pm 3.4 \times 10^4$

^a, colony forming unit(CFU)/g fresh weight ± standard deviation from three replications.

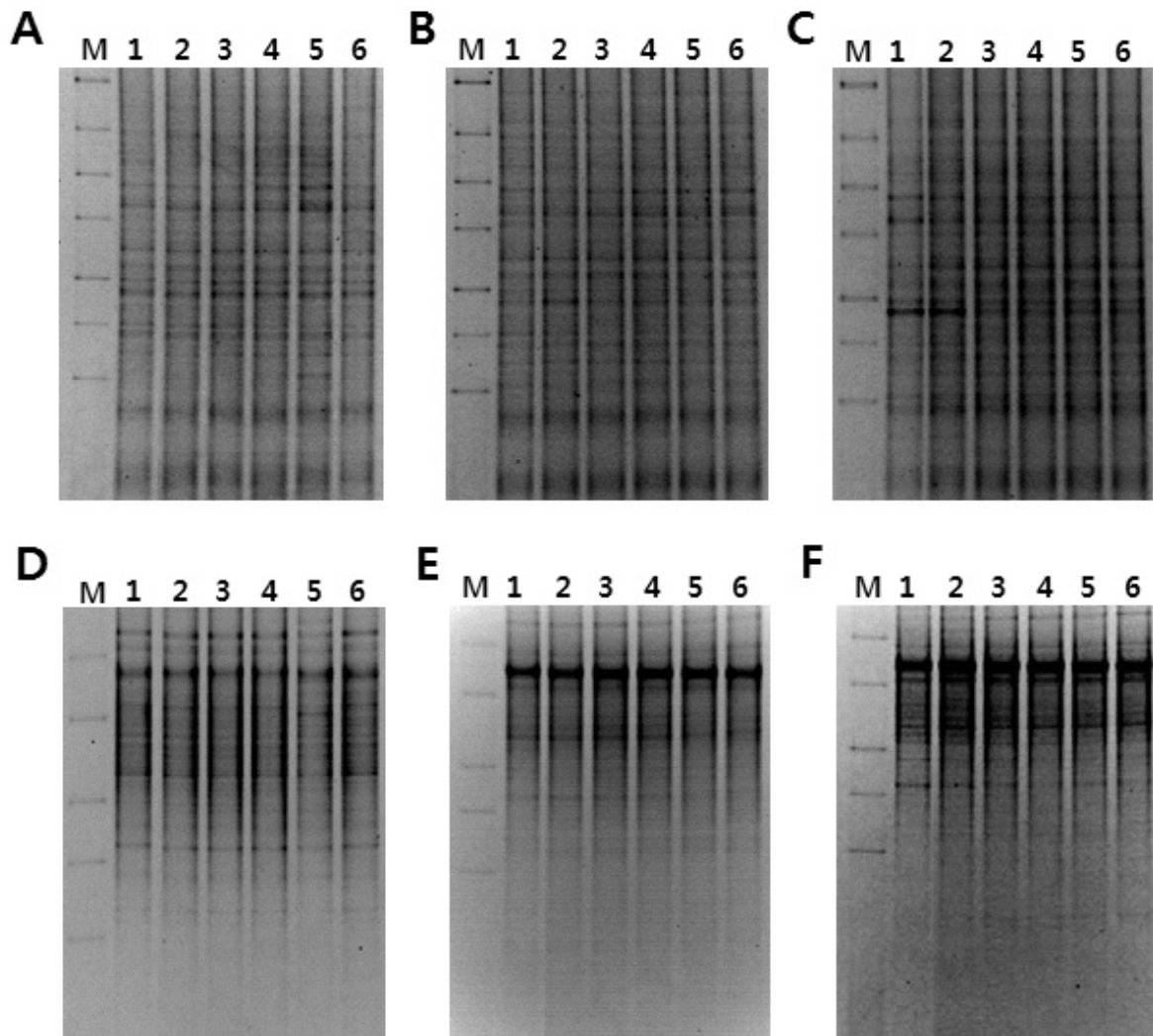


Fig. 2. DGGE analysis of 16S rDNA V3 region obtained after PCR amplification with eubacterial primers 352T and 519r (A, B & C) and V9 region with primers 1070f and 1392r (D, E & F). DGGE profile for September (A & D), October (B & E), November (C & F) field soils of *Bt* Chinese cabbage (1 lanes) Nowon (2 lanes), Samjin (3 lanes), Jangmi (4 lanes), Gawulmat(5 lanes) and Hwangseong (6 lanes). M, DGGE molecular weight marker.

활동이 토양 온도, 축적된 토양 유기물의 이동 또는 뿌리의 성장속도에 따라 영향을 받을 수 있기 때문인 것으로 생각된다(Grayston *et al.*, 2001). 일부 동일 위치에 있는 밴드의 강도에 차이가 있는 것은 토양이 가진 이질성에 기인하는 것으로 사료되었다. 이는 제초제저항성 형질전환 벼와 일반 벼 토양의 월별 토양미생물 군집변이를 비교하기 위한 DDGE 분석결과와도 일치하였다(Kim *et al.*, 2008).

16S rDNA 염기서열 분석

Bt 배추와 일반배추 품종 근권토양의 우점 미생물상을 비교하기 위해 토양 DNA를 이용한 분자생물학적 기법에 의해 조사하였다. 토양 DNA에서 우점미생물의 16S rDNA를 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과, *Bt* 배추 근권토양에서는

*Bacilli*와 *Alphaproteobacteria* 일반배추 근권토양에서는 *Holophagae*와 *Planctomycetacia*가 우점을 이루었다 (Table 4). 분자생물학적 기법을 통해서 배양하기 힘든 균의 분석도 가능한데, *Bt* 배추 근권토양과 일반배추 근권토양에서 모두 나타나는 *Acidobacteria*는 배양이 어려운 것으로 알려져 있다(Kim and Whang, 2007). *Bt* 배추와 일반배추 품종간 토양미생물의 분포율에는 다소 차이가 있었으나, 무작위 선택에도 불구하고 이들이 *Bt* 배추와 일반배추 품종 토양에 모두 분포하는 것으로 보아 토양간 미생물 군집의 변이는 적은 것으로 생각되었다.

유전자 수평이동성 조사

형질전환에 사용된 유전자 중 CAMV 35S 프로모터 및

Table 4. Phylogenic distribution of the dominant isolates obtained from Chinese cabbage soils

Bacteria	Bt-Chinese cabbage		Nowon	
	No. of isolate	Distribution rate(%)	No. of isolate	Distribution rate(%)
<i>Acidobacteria Gpl</i>	3	3.1	1	1
<i>Actinobacteria</i>	13	13.5	1	1
<i>Alphaproteobacteria</i>	14	14.6	10	10.4
<i>Bacilli</i>	14	14.6	2	2.1
<i>Betaproteobacteria</i>	11	11.5	8	8.3
<i>Clostridia</i>	9	9.4	10	10.4
<i>Deltaproteobacteria</i>	7	7.3	1	1
<i>Deinococci</i>	1	1	3	3.1
<i>Erysipelotrichi</i>	1	1	2	2.1
<i>Gammaproteobacteria</i>	6	6.3	7	7.3
<i>Gemmatimonadetes</i>	2	2.1	5	5.2
<i>Holophagae</i>	2	2.1	24	25
<i>Mollicutes</i>	1	1	1	1
<i>Planctomycetacia</i>	2	2.1	11	11.5
<i>Sphingobacteria</i>	4	4.2	7	7.3
<i>Thermolithobacteria</i>	5	5.2	2	2.1
<i>Thermotogae</i>	1	1	1	1
Total	96	100	96	100

*cryIac1*의 일부를 포함하는 유전자, *cryIac1* 유전자, 그리고 *bar* 유전자의 근권 토양미생물로의 전이 여부를 조사하기 위해 근권 토양으로부터 토양미생물의 DNA를 추출, 이들 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다 (Table 1). Positive control로서 Bt 배추 잎으로부터 DNA를 추출하고, negative control로서 노원, 장미, 가을 맛, 황성배추의 잎으로부터 추출한 DNA를 이용하여 PCR을 수행하였을 때, Bt 배추 잎에서 유래한 DNA에서만 각각의 프라이머에 대한 증폭산물을 얻을 수 있었으며, 비형질전환 배추로부터 유래한 DNA에서는 밴드가 검출되지 않았다 (Fig. 4). 최대 성숙기인 9월 Bt 배추와 비형질전환 배추 근권 토양에서 추출한 DNA를 대상으로 PCR을 수행하였을 때, 각각의 프라이머에 대한 증폭산물이 검출되지 않았다 (Fig. 4). 몇몇 박테리아는 최적조건하에서 식물 유래 형질전환 유전자의 일부를 도입하는 것으로 조사되었으나, 포장 수준 조사에서 식물로부터 토양미생물로의 유전자의 수평이동성에 대해서는 보고된 바가 없다 (Nielsen and Townsend, 2004). 토양시료로부터 추출한 DNA를 이용하여 PCR 수행 시 목적유전자가 성공적으로 증폭되기 위해서는 반응산물 중 50 copy 이상의 DNA를 포함하고 있을 경우에만 PCR 증폭이 가능하였다는 것을 감안할 때, 이들 시료에서는 유전자의 수평이동이 일어나지 않았거나, 일어났다 하더라도 토양 환경과 같은 조건에서는 유전자가 도입된 박테리아의 복제율이 매우 낮아 PCR을 통해서 검출될 수 없음을 의미한다고 볼 수 있다 (Nielsen and Townsend, 2004).

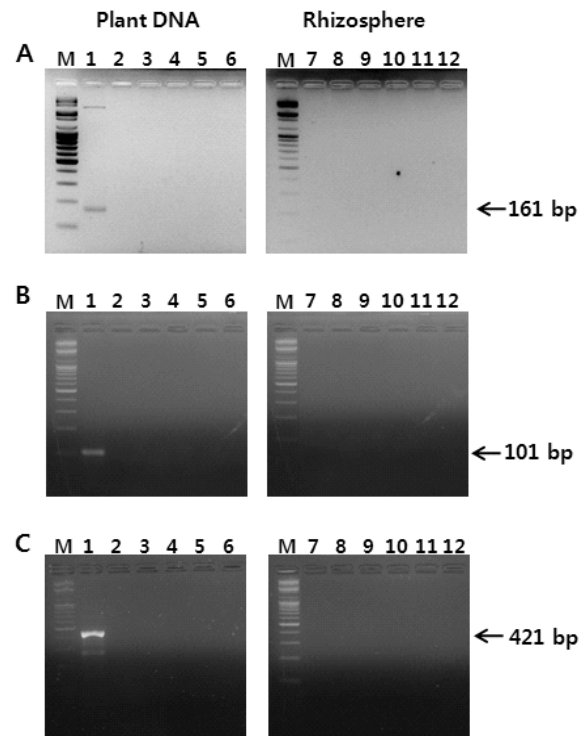


Fig. 4. Analysis of horizontal gene transfer in soil. Construct-specific 35ScriIac1(A), *cryIac1*(B), and *bar*(C) genes were PCR-amplified from the genomic DNA of transformed & non-transformed cabbages and soil DNA. M, 100 bp DNA ladder; 1-6, PCR product from the genomic DNA of Bt Chinese cabbage, Nowon, Samjin, Jangmi, Gawulmat, and Hwangseong in order; 7-12, PCR product from the rhizosphere soil of Bt Chinese cabbage, Nowon, Samjin, Jangmi, Gawulmat, and Hwangseong in order.

요 약

본 연구의 목적은 Bt 배추의 토양미생물 군집에 미치는 영향을 조사하기 위한 것이다. 토양미생물 조사에 앞서 토양 화학성분을 분석한 결과, Bt 배추와 일반품종 배추 근권토양 간 화학성분의 유의성 있는 차이는 없는 것으로 조사되었다. 생육 최대 성숙기의 토양미생물 군집밀도를 조사했을 때 Bt 배추 근권토양의 미생물 군집밀도 범위가 일반 배추 근권토양의 미생물 군집밀도 범위내에 속하는 것으로 나타났다. 월별 DGGE 분석결과 일반품종 배추 근권토양 미생물 군집에 비해 Bt 배추 근권토양 미생물 군집의 변이는 없었다. 형질전환 벡터 유래 유전자부위를 이용하여 유전자의 수평이동성을 조사했을 때 Bt 근권토양 유래 DNA에서는 벡터 유래 유전자가 검출되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원의 지원(과제번호: PJ006865)에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Cho, B.H., Cho, S.J., Park, C.S., Um, D.S., 2002, Soil science. Hyangmoonsa Press.
- Cho, H.S., Cao J., Ren, J.P., Earle, E.D., 2001, Control of Lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1C gene. *Plant Cell Rep.* 20, 1-7.
- Grayston, S. J., Griffith, G. S., Mawdsley, J. L., Campbell, C. D., Bardgett, R. D., 2001, Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biol Biochem* 33, 679-682.
- Icoz, I., Saxena, D., Andow, D.A., Zwahlen, C., Stotzky, G., 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.
- James, C., 2008, The global status of commercialized biotech/GM crops: 2009. ISAAA Briefs No. 41, Ithaca, NY.
- Kim, M.C., Ahn, J.H., Shin, H.C., Kim, T., Ryu, T.H., Kim, D.H., Song, H.G., Lee, G.H., Ka, 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 Biotechnol.* 18(2), 207-218.
- Kim, Y.J., Whang, K.S., 2007 Phylogenetic characteristics of viable but nonculturable bacterial populations in a pine mushroom (*Tricholloma matcutake*) forest soil. *The Korean J. of Microbiol.* 43, 201-209.
- Mendelsohn, M., Kough, J., Vaituzis, Z., Matthews, K., 2003, Are Bt safe? *Nat. Biotechnol.* 21(9), 1003-1009.
- Nap, J.P., Bijvoet, J., Stiekema, W.J., 1992, Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Res.* 1, 239-249.
- Nielsen, K.M., Townsend, J.P., 2004, Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nat. Biotechnol.* 22(9), 1110-1114.
- Stewart, C.N., Jr., Halfhill, M.D., Warwick, S.I., 2003, Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nat. Rev. Gen.* 4, 806-817.
- de Vries, J., Wackernagel, W., 2004, Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant and Soil* 266, 91-104.