

초초제저항성 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.) 이벤트 Jeju Green21의 환경위해성평가

배태웅 · 강홍규 · 송인자 · 선현진 · 고석민 · 송필순 · 이효연

Environmental risk assessment of genetically modified Herbicide-Tolerant zoysiagrass (Event: Jeju Green21)

Tae-Woong Bae · Hong-Gyu Kang · In-Ja Song · Hyeon-Jin Sun · Suk-Min Ko · Pill-Soon Song · Hyo-Yeon Lee

Received: 10 May 2011 / Accepted: 25 May 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Transgenic zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) expressing the bar gene inserted in the plant genome has been generated previously through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The GM zoysiagrass (event: JG21) permits efficient management of weed control of widely cultivated zoysiagrass fields, reducing the frequency and cost of using various herbicides for weed control. Now we have carried out the environmental risk assessment of JG21 prior to applying to the governmental regulatory agency for the commercial release of the GM turf grass outside of test plots. The morphological phenotypes, molecular analysis, weediness and gene flow from each test plot of JG21 and wild-type zoysiagrasses have been evaluated by selectively analyzing environmental effects. There were no marked differences in morphological phenotypes between JG21 and wild-type grasses. The JG21 retained its stable integration in the host plant in T₁ generation, exhibiting a 3:1 segregation ratio according to the Mendelian genetics. We confirmed the copy number (1) of JG21 by using Southern blot analysis, as the transgenic plants were tolerant to ammonium glufosinate throughout the culture period. From cross-fertilization and

gene flow studies, we found a 9% cross-pollination rate at the center of JG21 field and 0% at distances over 3 m from the field. The JG21 and wild-type zoysiagrass plants are not considered “weed” because zoysiagrasses generally are not dominant and do not spread into weedy areas easily. We assessed the horizontal gene transfer (HGT) of the transgene DNA to soil microorganisms from JG21 and wild-type plants. The bar gene was not detected from the total genomic DNA extracted from each rhizosphere soil of GM and non-GM *Zoysia* grass fields. Through the monitoring of JG21 transgene’s unintentional release into the environment, we found no evidence for either pollen mediated gene flow of zoysiagrass or seed dispersal from the test field within a 3 km radius of the natural habitat.

서론

최근 급격한 기후변화로 인한 작물의 생리장해는 농작물의 재배·관리문제로 인해 농작물 가격 폭등을 초래하고 있으며, 인구증가에 따른 식량문제를 야기하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 기존의 전통적 육종에 의한 작물개량과 재배기술의 개선이 필요하게 되었고, 기후변화에 대한 적응성을 갖는 기능성 GM (Genetically Modified) 작물의 개발 및 실용화 추진이 요구된다. 전세계적으로 GM작물의 실용화를 위한 재배는 1996년 상업적 재배가 시작된지 15년이 지난 2010년 현재 GM 작물의 재배면적이 1억4800만 ha에 이르고 있으며 (ISAAA 2011), GM 토마토 (Flavr Savr)가 상업적으로 재배 승인된 이후 2010년 현재까지 22작물의 124개 품목에 대해서 상업적 재배가

T.-W. Bae · H.-G. Kang · I.-J. Song · H.-J. Sun · S.-M. Ko · H.-Y. Lee (✉)
제주대학교 아열대원예산업연구소
(Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea)
e-mail: hyoyeon@jejunu.ac.kr

P.-S. Song · H.-Y. Lee
제주대학교 생명공학부
(Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea)

승인되었다 (ISAAA 2011). 국내의 경우 GM작물의 상업적 재배승인은 단 한건도 없는 실정이나, 사료용 및 가공용 LMO 작물의 수입은 위해성심사를 통해서 118개 품목이 승인되었다. 국내에서 GM작물의 실용화를 위한 환경위해성평가 시험은 2010년 현재 약 76건이 보고되었고, 제초제저항성 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)를 비롯한 벼, 고추, 콩 등을 중심으로 활성화 되고 있다 (Lee SW 2010). 최근 제초제저항성 들잔디는 국내 최초로 상업적 재배를 시도하고자 약 7년간 환경위해성평가를 수행하였고, 2010년 11월에 위해성심사를 농촌진흥청에 신청하였다. 일반적으로 들잔디는 한국을 비롯한 아시아가 원산지이나 전 세계적으로 분포되었고, 국내 자생 들잔디의 경우 일본 및 중국과 차이가 있어 한국잔디 (*Zoysia koreana*)로 명명되기도 한다. 들잔디의 이용은 공원, 골프장, 축구장 등과 같은 스포츠산업과 도로 비탈면, 댐, 간척지 등의 토양침식방지를 위한 녹화산업에 매년 급격히 증가되고 있으며, 이로 인하여 잔디관련 사업규모도 크게 확대되고 있다. 또한 골프장 및 잔디재배 지역의 증가는 재배관리 시에 잡초방제 및 병해충방제를 위한 농약 사용량을 크게 증가시키고 있으며, 농약의 과다사용으로 인한 환경오염 문제가 발생시키고 있다 (Choi et al. 1990; Schleicher et al. 1995). 이러한 문제를 해결하기 위한 고품질 한국잔디의 개발 및 보급은 우리의 중요한 당면과제이며, 기존의 교배육종, 돌연변이 육종과 생명공학학을 이용한 기능성 들잔디 품종개발에 대한 연구가 절실히 필요하다. 최근 유전자변형기술을 이용한 제초제저항성 (Toyama et al. 2003; Ge et al. 2006), 해충저항성 (Zhang et al. 2007) 들잔디가 개발되었고, 개발된 고품질 기능성 잔디는 잔디재배 및 관리 시에 발생하는 문제점 해결할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 개발된 GM 들잔디를 실용화하기 위해서는 반드시 생물학적 안전성평가를 거쳐 상업적 재배 승인을 얻어야 한다. 따라서 본 연구에서는 제초제저항성 들잔디의 위해성심사 승인을 위한 환경위해성평가 내용을 소개하고자 한다. 따라서 본 논문에서는 제초제저항성 들잔디의 환경위해성평가 내용인 도입 유전자의 특성 및 주변염기서열 검정, 농업적 특성 검정, 유전자이동성 검정, 잡초화 가능성 검정, 비표적생물체에 대한 위해성 검정, 인체 및 동물에 대한 안전성평가와 위해요소 억제 방안 등에 대해서 기술하고자 한다.

제초제저항성 들잔디의 개발

들잔디는 다른 한지형 잔디에 비해 형질전환 식물체의 개발이 다소 어려운 것으로 알려져 왔으나, 잔디의 종자에서 유도된 캘러스로부터 고효율의 식물체 재분화 기술이 확립되었다. 또는 들잔디의 포복경으로부터 식물체

유도 및 형질전환 기술이 보고되어 들잔디의 형질전환이 활발하게 진행되고 있다. 들잔디의 형질전환기술은 protoplast electroporation 방법이 처음 소개되었고 (Inokuma et al. 1998), 유전자총을 이용한 형질전환 (Lim et al. 2004) 기술 등이 보고되었으며, *Agrobacterium* 법에 의한 형질전환 (Choi et al. 2000; Toyama et al. 2003; Ge et al. 2006; Li et al. 2006; Lei et al. 2007) 기술이 보편화 되었다. 본 연구의 제초제저항성 들잔디는 완숙종자로부터 재분화 가능한 캘러스의 선발 기술 확보, *Agrobacterium* 균 감염 조건 확립, 유전자가 도입된 캘러스의 재분화 및 형질전환체 선발, 형질전환 식물체의 순화와 도입 유전자발현 확인의 과정을 거쳐서 최종적으로 선발되었다 (Toyama et al. 2003). 최종 선발된 제초제저항성 들잔디를 실용화하기 위한 환경위해성평가 재료는 도입 유전자의 복제수가 1 copy 수를 갖는 식물체이다. 다음은 최종 선발된 제초제저항성 들잔디 (이벤트명: Jeju Green21, 이하 JG21)의 분자생물학적 검정을 통해서 확인된 정보들에 대해서 기술하고자 한다.

도입유전자의 분자생물학적 특성 검정

LMO법률이 정한 유전자변형생물체의 위해성평가 자료에는 유전자변형생물체의 분자생물학적 특성에 관한 평가범위가 명시되어 있다. 이 자료에 기초하여 제초제저항성 들잔디 JG21에 도입된 바이너리벡터의 T-DNA 유전자 구성 및 염기서열 정보를 제시하였고, 도입된 제초제저항성 유전자 *bar*의 도입 및 발현 특성을 분석하여 제시하였다. PCR에 의해 *Ubiquitin promoter::bar*로 재조합된 목적유전자가 도입되었음을 확인하였고, Figure 1과 같이 Southern blot분석에 의해 JG21계통 내에 1개의 삽입 복제수가 포함되어 있음을 확인하였다 (Sun et al. 2010). 삽입 복제수는 다음 세대의 제초제저항성의 분리비 (제초제저항성:야생형=3:1)와 PCR을 이용한 도입유전자의 분리비 (동형접합형:이형접합형:야생형=1:2:1)를 통해서도 재검증되었다 (Sun et al. 2010). 이러한 결과는 도입유전자가 염색체 혹은 미토콘드리아가 아니라 핵의 염색체 내에 삽입되었음을 증명하고 있다. 전사단계의 유전자발현은 RT-PCR 방법으로 검증되었고, 번역단계의 유전자발현은 PAT 항체를 이용한 strip kit와 Western blot 분석 방법으로 검증되었다 (Sun et al. 2010). 계능 상에서 도입 유전자의 삽입 위치를 확인하기 위한 방법으로는 Inverse PCR 방법과 TAIL-PCR 방법이 있으나 본 실험에서는 TAIL-PCR 방법을 이용하였다 (Liu et al. 1995). 또한 삽입된 위치의 T-DNA 양쪽 말단 주변 DNA의 염기서열을 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 제공하는 유전자 데이터베이스와 분석프로그램으로 분석한 결과, 지금까지 알려진 어떤 염

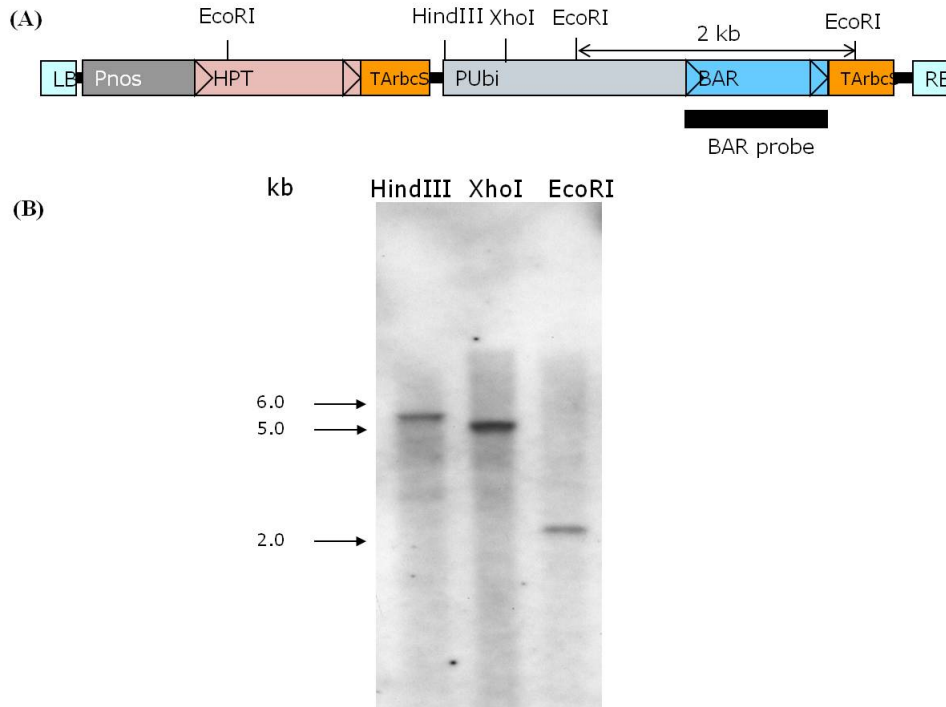


Fig. 1 Gel blot analysis of bar gene from genomic DNA of GM zoysiagrass. (A) The simplified T-DNA of pGPTVHB; (B) The 600-bp bar DNA amplified by PCR was used as probe. JG21 zoysiagrass genomic DNA (10 µg) was digested with *HindIII*, *XhoI*, or *EcoRI* and resolved on 1.0% agarose gel. DNA sizes are indicated by arrows (from Sun et al. 2010).

기서열과도 의미 있는 유전자 또는 단백질 상동성을 보여 주지 않았다. 이 결과는 들잔디의 유전체 정보가 아직 데이터베이스 내에 별로 없기 때문인 것으로 판단된다. 또한 T-DNA 주변염기서열의 단백질 암호화 가능성을 분석한 결과 어떠한 의미 있는 open reading frame (ORF)을 구성하지 않으므로 JG21 계놈에서 T-DNA는 단백질을 암호화 하지 않는 비유전자 영역으로 삽입되었을 것으로 추정된다 (Sun et al. 2010). 현재는 지금까지 소개한 제초제저항성들잔디 JG21의 도입유전자의 분자생물학적 특성이 복수세대 동안 안정성을 유지하는지를 평가하는 실험 등을 보충하고 있다.

환경위해성평가를 위한 시험포장 조성

제초제저항성 들잔디 이벤트 JG21의 환경위해성평가 시험을 위한 환경방출시험은 격리온실 및 격리포장에서 수행되어졌고, 각각의 시험포장은 유전자변형 농산물의 환경위해성평가 지침 (농림부고시 2002)과 유전자변형생물체의 국가간이동등에 관한 법률 (2008년 시행)에 따라서 격리포장 구비조건에 맞게 시설되었다. 주요 시험포장은 도입 유전자 특성 검정 및 농업적 특성 조사를 위한 시험포장, 유전자이동성 검정을 위한 시험모형, 화분비산밀도 검정을 위한 시험포장 등이 있다. 도입 유전자 특성

검정 및 농업적 특성 조사를 위한 시험포장은 각각 0.25 m², 1 m², 4 m²과 240 m² 크기로 조성하였고, JG21과 일반 들잔디의 제초제 살포시험 및 생육 특성을 단계적으로 조사하였다. 유전자이동성 검정을 위한 시험포장은 임의 배치법, 난괴법, 중심부배치법, 방사형배치법과 단방향 배치법등의 시험모형을 조성하였고, 각각의 시험모형들은 JG21과 일반 들잔디의 간격을 0, 0.5, 1, 3 m으로 설정하였으며, JG21의 크기에 따라서 3~9 m 및 3~42 m 범위를 갖는 시험모형을 구성하였다 (Bae et al. 2008). 또한 화분비산밀도 검정을 위한 시험포장은 12 × 10 m² 크기의 재배포장을 조성하여 JG21을 증식시켰고, JG21로부터 거리에 따른 화분방출 밀도와 화분생존 능력을 조사하였다. 자연환경에 미치는 영향을 검정하기위한 표적 및 비표적 생물체에 대한 영향평가는 상기의 조성된 240 m² 크기의 재배포장에서 잡초와의 교잡을 통한 제초제저항성 잡초발생 여부를 조사하였고, 재배포장의 토양 및 곤충장내 미생물의 분포와 JG21로부터 수평적 유전자전이 등을 평가하였다.

농업적 특성 검정

JG21의 농업적 특성 검정은 도입 유전자 발현에 의해 생성된 신규성과 지금까지 이용되고 있는 일반 들잔디와 생육특성을 비교 분석하고, JG21의 실용적 가치와 문제

Table 1 Seed characteristics of genetically modified (GM) and wild-type (WT) *Zoysia* grass using eight morphological traits; length of flowering culms, length of spike without rachis; length/width ratio; germination, and weight (from Bea et al. 2008)

Plants	Number of seeds per spike	Length of rachis (cm)	Length of flowering culms (cm)	Seed length (SL) (mm)	Seed width (SW) (mm)	Frequency of Germination (%)	Weight of 1,000 seeds (g)
JG21	49.4±7.6 [†]	4.8±0.6 [‡]	12.1±2.4 [‡]	3.2±0.3 [‡]	1.5±0.2 [‡]	3.7±1.2	0.6±0.3 [§]
WT	49.1±7.3	4.9±0.6	11.7±2.7	3.1±0.3	1.4±0.2	4.0±1.0	0.6±0.2
t-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

[†]Mean ± standard error of forty-five replicates.

[‡]mean ± standard error of fifteen replicates.

[§]mean ± standard error of five replicates.

^{*}NS, considered statistically insignificant at 0.05 level by t-test.

점을 평가하는 중요한 항목이다. 재배포장의 토양성분 분석은 식물체의 재배환경을 알 수 있는 지표로서 두 시험포장에서 산도, 전기전도도, 유기물함량, 가용성 인산과 칼륨, 칼슘, 마그네슘과 미량원소 등의 함량을 비교하였고, 그 결과 두 시험포장에서 토양성분 함량에 유의차가 없었다. 농업적 특성 조사를 위한 재배시험은 격리온실 및 개방형 포장 수준에서 이루어졌고, 일반 들잔디와 JG21의 단계별 생육을 통한 표현형 검정, 피복율, 증식밀도 및 도입 유전자의 특성 등을 조사하였다. 각각의 들잔디에 대한 생육 특성비교는 지상부와 종자부로 나누어 생육조사를 실시하였고, 선행연구 방법 (Honda and Kono 1963; Yu et al. 1974; Hong and Yeom 1985; Kim et al. 1996; Chio and Yang 2004)에서 보고된 시험방법에 따라 수행하였다. JG21 들잔디 지상부의 생육특성을 살펴보면 초고 (약 20 cm), 엽장 (17~19 cm), 엽폭 (약 0.5 cm), 최하위 엽의 높이 (약 4 cm) 등의 형태적 특성은 일반 들잔디와 큰 차이가 없었고, 잔디의 생육 및 색도를 좌우하는 엽록소 함량 (1 g/kg)도 유의차가 없었다. JG21 종자부의 특성을 살펴보면 들잔디에서 생산된 종자의 수량성 (약 49 개)과 1000립중 (약 0.6 g), 종자의 크기, 종자의 자연발아율 (3.7~4%), 화간 및 화서의 길이 (14.8~15.4 cm) 등에서도 일반 들잔디와 유사하였다 (Table 1). 들잔디의 생장량 비교는 들잔디가 생육되는 동안 시기별 피복율, 증식밀도, 포복경의 수와 길이 등을 조사하였다. 그 결과 JG21은 일반 들잔디와 생장에 큰 차이가 없이 식재 후 5개월에 포복경의 수가 약 5개 이었고, 평균 길이는 30~33 cm 이었다. 각각의 들잔디 피복율은 5개월에 약 6배 증식되었고, 증식밀도는 반경 10 cm 당 평균 44개로 관찰되었다. 이러한 결과는 도입 유전자의 특성인 제초제저항성을 제외하고, JG21의 생육특성이 야생형 잔디의 생육특성과 거의 차이가 없다는 것을 보여준다(Bae et al. 2008).

유전자이동성 검정

GM 작물의 유전자이동성은 바람 또는 곤충을 매개로한

화분비산에 의해서 일어나고, GM작물의 재배면적에 따라 유전자이동 빈도는 매우 큰 차이를 나타낸다. JG21의 경우 곤충에 의한 화분비산 보다는 바람에 의한 화분비산이 대부분을 차지하고 있으며, 유전자 이동성 빈도는 개화시기의 기후와 화분의 생리적 특성에 따라서 다르게 나타날 수 있다. 따라서 유전자이동 빈도를 예측하기 위해서는 JG21 화분의 생존능력과 방출패턴을 조사할 필요가 있다. 화분의 생존능력 조사는 기존에 보고된 요오드 염색법과 TTC 염색법 보다는 들잔디 화분으로부터 발아된 화분관 수를 조사하는 방법이 효과적 이었다. 화분관 발아배지 조건 확립은 설탕과 붕산이 조합된 고체배지에 JG21 들잔디와 일반들잔디 화분을 도말한 후 화분관이 발아되는 빈도를 조사하였다. 최적의 발아배지 조성을 이용한 화분생존능력 검정 결과 일광조건 약 30분 이내에 생존능력이 상실되었고, 실온조건의 음지에서는 약 180분 후에 생존능력이 상실되는 것으로 나타났다 (Kang et al. 2009). 또한 화분의 방출패턴 조사는 바세린이 도말된 슬라이드 글라스를 사용하였고, 일정한 시간대에서 화분밀도를 측정하였다. 그 결과 JG21 및 일반 들잔디는 일출 이후에 화분방출이 시작되었고, 10~12시에 최고점에 도달하여 1시 이후에 급격히 감소하였다. 화분의 생존능력 검정을 위한 화분 수집 시간은 화분의 생존율이 높은 시간대인 09~11시에 이루어졌다.

일반적으로 들잔디는 암술이 성숙한 후 4~5일 후 수술이 생성되었고, 이러한 이유로 들잔디는 자가수분 보다 타가수분 빈도가 높게 나타낸다. 동종 들잔디와의 교잡성을 이용한 JG21의 유전자이동성 빈도는 각각의 시험배치법에서 JG21의 면적이 증가함에 따라서 교잡빈도가 높게 나타났다. JG21의 식재면적이 약 4 m²인 경우에 반경 1 m에 위치한 일반 들잔디에서 0.8-1.3%, 반경 2 m에서 0.6%, 반경 3 m에서 0.12%의 교잡빈도가 관찰되었다 (Table 2). JG21의 식재면적이 8 m²인 경우에 JG21의 중심부에 배치된 일반 들잔디에서 약 9%의 교잡빈도가 나타났고, 중심부로부터 멀어질수록 교잡빈도가 앞서 기술한 교잡율 보다 높게 나타났다. 최근 자유방임 수분에 자연 교잡

Table 2 Number of the germinated seeds tested and the hybrids identified at distances from genetically modified (GM) *Zoysia* grass in each plot design

Distance (m)	EPC5	CRD	RCBD	CPC3	CPC9	UPC42
m > 0	14.3%	6.03%	-	-	-	-
0.5		1.22%	1.24%	-	-	-
1		-	1.63%	1.39%	0.82%	-
2		-	-	0.30%	0.69%	-
3		-	-	0.12%	0	0
6		-	-	-	0	0
9		-	-	-	0	0
18		-	-	-	-	0
24		-	-	-	-	0
30		-	-	-	-	0
36		-	-	-	-	0
42		-	-	-	-	0

CRD: Completely Random Design.

EPC: Encircled Population Combination.

CPC: Central Population Combination.

UPC: Unidirectional Population Combination.

RCBD: Randomized Complete Block Design.

CPC9: WT *Zoysia japonica* within 9-m radius from GM *Zoysia japonica* (2-m diameter).

율은 37~42%로 보고되었으나 (Kitamura 1964), 본 JG21의 경우에는 낮은 빈도로 관찰되었다. 이러한 교잡율의 차이는 JG21이 heterozygote이기 때문에 교잡에 의한 유전자이동 빈도가 낮게 나타난 것으로 판단되지만 재배면적이 증가할수록 유전자이동성은 높게 나타날 것으로 생각된다. 최근 GM 벤투그라스의 유전자이동성을 살펴보면 재배포장으로부터 약 3.8 km 떨어진 자연서식지에서 근연종 및 타종 식물체로 유전자 이동성이 확인되었고 (Reichman et al. 2006), 4,453 ha의 재배면적에서는 약 21 km 외부 까지 화분비산에 의한 유전자 이동 가능성이 확인되었다 (Watrud et al. 2004).

따라서 JG21 들잔디의 유전자이동성 검정은 재배포장 단위에서 검토할 필요가 있으며, 재배면적에 따른 격리거리 설정과 격리포장 외부에 대한 환경모니터링 방법이 요구되고 있다. 일반적으로 GM작물의 환경방출 시험포장은 시험작물에 따라 다양한 면적의 시험포장이 조성되었고, 국내의 경우 시험포장 면적은 1 ha 내외이나 국외의 경우 최근 보고된 GM 벤투그라스 재배포장은 4,453 ha에 이른다. 특히 GM 작물의 재배면적에 따른 동종 및 근연종과의 격리거리 설정은 GM 작물의 환경방출시험을 수행하고 있는 국내의 경우 매우 중요한 문제이다.

JG21 들잔디의 환경모니터링 기술

최근 GM 작물의 재배면적은 2009년과 2010년 사이에 1,400

만 ha가 증가하였고 (약 10%증가), 2015년 까지 재배면적이 약 2억 ha에 이를 것으로 전망하고 있다 (ISAAA 2011). 이러한 GM 작물의 재배면적 증가는 재배포장 외부로 비의도적 방출 가능성을 높이고 있기 때문에 환경위해성평가에서는 유전자변형 작물의 비의도적 방출에 대한 주기적인 환경모니터링과 위해요소에 대한 효과적인 대처방안을 제시해야 한다. 본 연구에서는 JG21의 비의도적 방출가능성을 탐지하기 위하여 점진적 확산방법 이용하여 격리포장 외부의 자연환경에 대한 환경모니터링을 수행하였다. JG21의 환경모니터링은 재배시험 포장으로부터 반경 3 km 이내 자연환경의 일반 들잔디에 대해서 유전자 이동 가능성을 검정하였다 (Fig. 2). 환경모니터링을 수행한 시료채취는 시험포장 외부의 수로주변, 노견, 제방, 묘지, 목초지, 정원, 해안가 등에서 수행되었고, 들잔디, 금잔디, 갯잔디 등의 *Zoysia* 속 잔디류를 대상으로 하였다. 시험방법은 비선택성 제초제인 바스타를 살포하여 제초제 저항성 여부를 조사하였고, 수집된 시료의 DNA를 추출하여 PCR 검정을 통해서 bar 유전자의 발현을 검정하였다 (Fig. 3).

JG21 들잔디의 환경모니터링에서 점진적 확산 방법은 년차에 따라서 수집반경을 0.5 km에서 5 km까지 단계적으로 변경하는 것이다. JG21 들잔디가 환경방출된 1년차에 반경 500 m 이내의 동종 및 근연종에 대해서 유전자 이동가능성을 조사한다. 조사대상 지역 내에서 대상식물체가 없는 경우에는 인위적으로 식물체를 이식하여 보충하고, 종자수집 및 발아된 식물체에 제초제살포 시험을

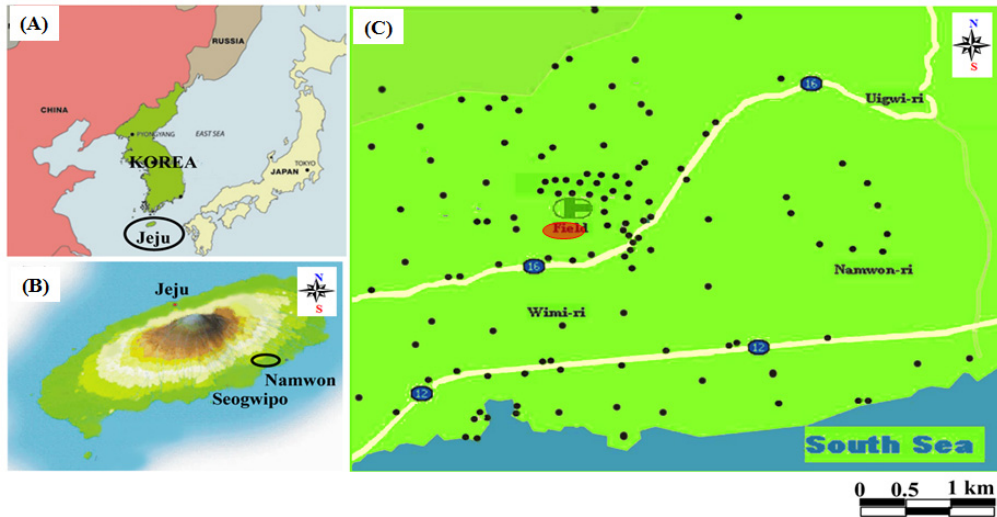


Fig. 2 Test for the potential gene flow from genetically modified (GM) grass to wild-type (WT) grasses within a 3-km radius during a 2-yr period from 2003 to 2005.

The GM grass field is centrally located in the Wimi-Ri test field in Nam Jeju County. The sampling sites shown were randomly chosen where *Zoysia* grasses grew. The sampling site distribution is biased in the north easterly direction from the GM grass site, whereas other directions are less favorable for grass growth due to geo-topographic factors (from Bae et al 2008).

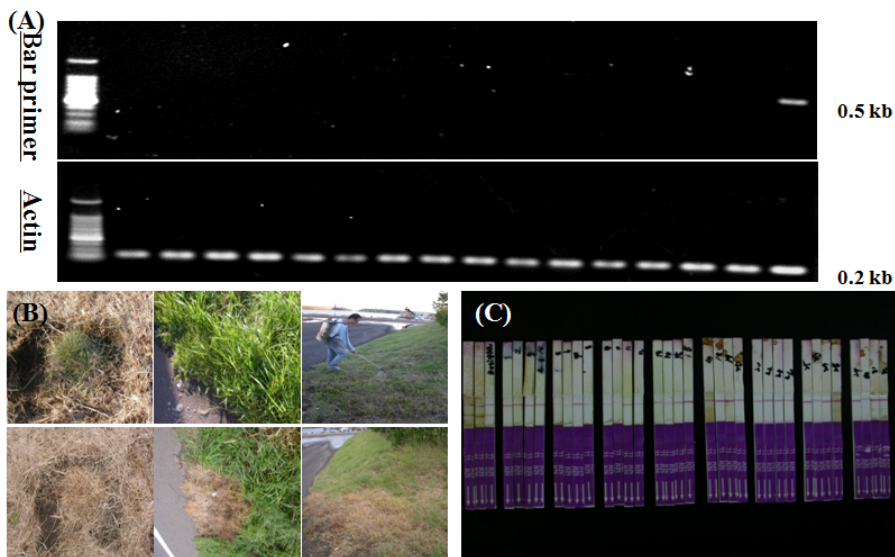


Fig. 3 Analysis of the potential gene flow from genetically modified (GM) grass to wild-type (WT) grasses in the natural habitat. (A) PCR analysis; (B) herbicide trial; (C) EnviroLogix QuickStix Kit for detection of herbicide-tolerant gene express PAT/*bar* protein.

통해서 유전자이동성 여부를 확인하였다. 2년차에서는 반경 1 km 이내 자연환경의 동종 및 근연종 식물체에 대해서 제초제살포 시험과 PCR 방법을 통해서 비의도적 방출 가능성을 검정해야한다. 3차년도에서는 반경 3 km 이내에서 대상 식물체를 수집하였고, 수집지점 당 4개의 시료를 수집반경 5 m 이내에서 채집하였다. 유전자이동성 여부는 Trait LL test strips kit (Strategic Diagnostics Inc., USA)를 이용하여 PAT 단백질의 검출 여부 확인을 통해서 비의도적 방출 가능성을 모니터링 하였다 (Fig. 2). 이러한 점진적 확산방식의 환경모니터링은 개체수의 증식

및 종자 비산에 의한 확산반경이 증가할 것으로 예상하여 수행되었고, 현재까지 자연 생태계에서 비의도적 방출로 인한 JG21의 유출 및 확산은 없는 것으로 판단된다.

최근 GM 작물의 환경모니터링은 옥수수, 콩 면화, 유채 등의 GM 작물이 수입되고 있는 향만, 도로주변, 사료용 목초지, 곡물창고 등에서 낙곡으로 인하여 발생된 비의도적 방출을 검정하였다 (Lee et al. 2009; Park et al. 2010). 수입산 GM콩의 경우에는 인천항 주변 및 이동경로의 도로주변, 일반콩 재배지에서 비의도적 방출이 확인되지 않았으나, 사료용 GM 옥수수의 경우 (NK603, Mon810,

and TC1507)에는 군산항 주변을 시작으로 사료용 저장고, 사료용 목초지 등에서 비의도적 방출이 발생되었다고 보고되었다 (Park et al. 2010). 이러한 GM 작물들의 비의도적 방출을 검정하기 위한 주기적인 환경모니터링은 확산경로 추적과 확산 방지를 위한 예방대책을 설정하기 위하여 매우 필요한 항목이다.

JG21 들잔디의 잡초화 가능성 검정

GM 작물의 잡초화 가능성 검정은 자연생태계에서 GM 작물의 우점성 및 확산에 의한 생태계 교란 가능성을 검정하는 것에 있다. 따라서 JG21의 잡초화 가능성 검정은 먼저 잡초성을 갖는 식물체와의 교잡 가능성 검정하였고, 자연환경에서 타종 식물체와의 경쟁적 우점성을 비교하였다. 또한 종자의 자연발아율은 잡초성을 나타내는 지표로서 종자과종 후 년차별로 종자의 발아율을 조사하였다. JG21과 잡초의 교잡성을 조사하기 위해 JG21 재배 포장 내에서 2년간 발생한 잡초를 대상으로 제초제 살포 시험을 수행하였다. 그 결과 재배포장에서 자연 발생한 국화과 3종, 콩과 1종, 석죽과 3종, 지치과 1종, 현삼과 2종의 잡초에서 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자가 전혀 관찰되지 않았다. 또한 벼과 잡초인 독새풀 (*Alopecurus aequalis*), 포아풀 (*Poa annua*), 겨이삭 (*Agrostis clavata*)에서도 제초제에 저항성을 갖는 개체가 관찰되지 않았다 (Bae et al. 2008). 이러한 결과는 JG21과 개화시기가 유사한 잡초종과 교잡성이 없으며, 제초제에 저항성을 갖는 슈퍼잡초는 발생되지 않을 것으로 생각된다.

자연환경에서 JG21이 잡초화 되기 위해서는 잡초적 특성의 하나인 경쟁적 우점성을 포함해야한다. 이러한 특성 조사는 JG21과 일반 들잔디를 자연상태에서 다년간 방치하여 시기별 잡초의 발생 빈도와 각각의 들잔디의 생육밀도를 조사하였다. 들잔디 구역에서 자연 발생한 우점잡초는 쌍자엽 18종, 단자엽 7종 이었고, 잡초의 발생빈도는 봄철 잡초가 56%, 여름철 잡초가 28%, 가을철 잡초가 8%이었으며, 겨울철 잡초가 8%로 계절별로 약 20-39% 정도의 피복율이 관찰되었다. 반면에 우점잡초와의 경쟁성을 살펴보면 자연상태에서 1년간 방치한 JG21과 일반 들잔디는 피복율의 변화가 거의 없었고, 3년간 방치한 경우 계절에 따라 우점잡초에 의해서 잔디의 포복경 및 신초의 발육이 억제되었다. 자연환경에서 들잔디에 비해서 우점성을 갖는 잡초는 들잔디의 생육초기인 봄철에 광합성 부족을 초래하여 들잔디의 직립경, 포복경 및 뿌리의 생장이 감소시켰다. 또한 들잔디의 감소 및 소멸은 왕성한 생육패턴을 갖는 여름철에 바랭이와 같은 우점잡초의 피복에 의한 광합성 부족 및 열적 스트레스를 동시에 받아 고사하기 때문이다. 이러한 결과는 들잔

디가 관리되지 않을 경우에 우점잡초와의 경쟁에 의해 생육이 억제되면서 잔디의 서식지가 서서히 소멸된다는 보고 (戶刈, 1960; Lee, 1988; Oh et al. 2000)와도 일치한다. JG21 들잔디와 일반 들잔디 종자의 자연발아율은 약 4%로 매우 낮은 발아율이 관찰되었고, 이러한 낮은 발아율은 자연환경에서 JG21 들잔디가 자연생태계를 교란시킬 만큼 확산 될 수 없음을 의미한다. 따라서 JG21 들잔디는 잡초와의 교잡가능성이 없고, 자연환경에서 제초제의 이득이 없을 경우 우점잡초에 의해서 생육이 억제될 뿐만 아니라 종자발아율 및 확산 가능성이 낮기 때문에 잡초화 가능성이 없다.

비표적 생물체에 미치는 영향 검정

GM 작물의 재배와 함께 자연생태계에 미치는 영향 평가는 표적 및 비표적 생물체에 대한 영향평가로 구분되고 있다. 본 연구의 JG21의 표적 생물체는 재배지에서 발생한 대상 잡초이며, 비표적 생물체는 곤충과 미생물이다. 비표적 생물체에 미치는 영향평가는 JG21과 일반 들잔디 재배포장에서 서식하고 있는 곤충 및 미생물의 분포와 변이종의 출현 등을 조사하였고, JG21에 도입된 유전자가 토양 및 곤충장내 미생물로의 수평적 유전자 전이 (Horizontal Gene Transfer) 가능성을 평가하는 것이다. 토양 및 곤충 장내미생물의 분포 조사는 JG21과 일반 들잔디 포장에서 서식하는 토양 미생물과 들잔디 잎을 먹고 사는 대표적 곤충인 풀무치 (*Locusta migratoria*)를 대상으로 장내 미생물 분포를 조사하였다. 토양 및 곤충장내 미생물의 염기서열 수집방법은 16S rDNA 유전자의 염기서열을 primer로 이용하여 PCR 분석을 수행하여 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물에서 얻어진 염기서열은 NCBI 사이트에 등록된 염기서열과 상동성을 비교하여 각 포장의 토양 미생물과 풀무치 장내 미생물을 동정하였고, 동정된 미생물의 분포를 비교하였다.

JG21과 일반 들잔디의 토양미생물 분포 비교를 위하여 각각의 집단에서 분리한 PCR 산물 50개에 대한 Phylogenetic 분석한 결과 두 집단간 유의차가 나타났으나, 분석개체의 규모를 100개 이상으로 할 경우에는 유의차가 적을 것으로 생각 된다 (Lee et al. 2011). 일반적으로 glutosinate 성분에 저항성을 갖는 옥수수, 유채의 경우 토양미생물의 집단에서 큰 차이가 없음이 보고되었고 (Dunfield and Germida 2001; Gyamfi et al. 2002), 바스타 제초제는 토양 미생물에 분해가 일어나기 때문에 제초제살포에 의한 미생물의 변화도 큰 차이가 없는 것으로 보고되었다 (Schmalenberger and Tebbe 2002).

두 들잔디 구역의 곤충장내 미생물상을 살펴보면 *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*의 4개 그룹에서 미생물의 개체 수는 큰 차

이가 없었으나 미생물의 개체에는 약간의 차이가 있었다. 또한 *Actinobacteria* 그룹의 1개체가 JG21 들잔디 구역에서만 관찰되었다. 앞서 조사된 각각의 들잔디 구역에서 미생물 발생빈도의 차이는 자연 상태에서 자란 곤충의 서식지와 곤충의 생존 기간(나이)에 의해서 개체마다 나타날 수 있는 차이로 생각된다. 이러한 결과는 GM 유채와 일반유채 재배지에서 서식하고 있는 꿀벌들의 장내 미생물 분포가 6개의 미생물 그룹에서 7~23%의 빈도로 관찰되었고, GM 유채가 꿀벌의 장내미생물상에 큰 변화를 주지 못 한다는 결과 (Mohr and Tebbe 2006)와 유사하다.

최근 자연환경에서 형질전환에 의한 유전자전달은 생물학적, 물리적 장벽에 의해서 매우 일어나기 어렵지만 예상하지 않게 주변 생물체로의 유전자 전이가 보고되고 있다 (Richardson and Palmer 2007). 식물체로부터 미생물로의 수평적 유전자전이를 평가하기 위하여 각각의 들잔디 재배포장의 토양 미생물, 근권미생물, 풀무치의 장내 미생물을 대상으로 bialaphos 및 hygromycin 저항성 유전자 (*bar*와 *hpt*)의 전이 여부를 분자생물학적 방법을 이용하여 조사하였다. 그 결과 토양미생물, 근권미생물, 풀무치의 장내미생물로부터 분리된 각각의 DNA에서 형질전환 시 들잔디에 도입된 *bar* 또는 *hpt* 유전자가 존재하지 않는 것을 확인하였고 (Bae et al. 2007; Lee et al. 2011), 자연 상태에서 JG21 들잔디에 도입된 유전자가 주변 비표적 생물체로의 수평적 유전자전이는 거의 일어나지 않는 것 생각된다. 이러한 연구결과는 GM 유채 (Hoffmann et al. 1994), GM 감자 (Schluter et al. 1995)와 GM 콩 (Kim et al. 2004) 등에서 미생물로의 수평적 유전자 전이 여부를 조사한 결과와 같다.

동물 및 인체에 미치는 영향 검정

GM작물에 대한 동물 및 인체에 대한 위해성평가는 GM작물의 안전성 확보에 있어서 매우 중요한 항목이며, GM 작물로부터 알레르기 유발 가능성, 독성 물질분비 가능성, 주요영양 성분의 변화 등이 평가되고 있다. GM작물의 인체 위해성평가는 국제적으로 공인된 프로토콜 (FDA 1992; FAO/WHO 1996; OECD 2001)에 따라서 독성 및 알레르기 반응성에 대한 조사가 수행 되고 있다. JG21의 인체 및 동물 위해성평가에서는 들잔디의 일반성분 분석 및 영양성분 분석을 일반 들잔디와 비교하였고, 아플라톡신과 같은 독성물질의 검출여부를 확인하였다. 그 결과 들잔디의 성분함량에는 큰 차이가 없었고, 아플라톡신은 검출한계 0.05 ng/g (식품공전 기준 10 ng/g) 범위에서 발견되지 않았다.

JG21에서 발현되는 새로운 단백질의 알레르기 반응성

검정은 공인된 프로토콜 (FDA 1992; FAO/WHO 1996; OECD 2001)과 Kim 등 (1987)이 보고한 들잔디 화분의 알레르기 반응성 시험을 토대로 하였다. 들잔디의 알레르기 반응성 검정은 제주대학교 알레르기 내과의 내원환자와 지원자 128명을 대상으로 공통항원과 각각의 들잔디 단백질항원을 이용하여 피부반응검사를 시행하였다. 그 결과 피시험자로부터 20가지 공통 알레르기 항원에 대해서 80% 이상 알레르기 반응성을 보였고, JG21과 일반 들잔디에서 각각 4.7%의 알레르기 반응성이 나타났다 (Bae et al. 2008). 일반적으로 들잔디 화분 단백질에서 알레르기 반응성은 약 5% (Kim et al. 1987)가 보고되었고, JG21로부터 새롭게 생성된 단백질이 알레르기 반응성을 유발한다는 증거는 없다. 따라서 JG21 들잔디에서 발현되는 PAT 단백질의 알레르기 유발가능성 대해서 일반적으로 알려진 FDA, FAO/WHO의 프로토콜을 토대로 PAT 단백질 염기서열의 알레르겐 상동성에 대해서 검토하였다. 그 결과, PAT 단백질의 염기서열은 알려진 알레르겐의 염기서열과 35% 이하의 낮은 상동성을 보였고, 연속된 8개의 아미노산 서열에서도 일치하지 않았다. 이러한 결과는 JG21에서 발현되는 PAT 단백질에 의해 새로운 알레르겐을 유발하지 않는 것으로 판단되고, Codex Alimentarius (2003), FAO/WHO (1996)의 보고서와 Herouet 등 (2005)의 연구결과와 일치한다.

또한 PAT 단백질의 동물 및 인체 장내에서 분해능을 조사한 결과, Figure 4에서와 같이 인공위장액에서 약 30 초 후에 완전히 분해되었음을 확인하였다 (Sun et al. 2010). 이러한 결과는 동물모델을 이용한 급성독성 실험 (Sjoblad et al. 1992; Schmidt 1994; Mossinger and Dietrich 1998) 인공위장액을 이용한 불활성 시험 (Herouet et al. 2005; Thomas et al. 2004)에서 PAT 단백질이 인체 및 동물에 악영향을 미치지 않을 것으로 보고되었다.

JG21 들잔디의 위해요소 억제방안

GM 작물의 환경위해성평가는 사전예방의 원칙을 기본으로 하고 있으며, 새롭게 발생한 위해요소에 대한 억제방안을 제시해야한다. JG21의 환경위해성평가 수행을 통해서 화분, 종자, 영양체 등이 비의도적으로 방출될 경우 바스타 이외의 비선택성 제초제인 근사미 (glufosate 계)와 그라목손 (paraquat 계) 등의 제초제에 의해서 쉽게 고사됨을 확인하였다. 또한 들잔디는 5~6월 개화시기부터 주기적으로 예초작업을 실시하기 때문에 화분비산에 의한 유전자 이동가능성을 억제할 수 있는 장점을 갖고 있다. 이러한 위해요소 관리 기술은 들잔디 화분비산으로부터 발생하는 유전자이동성을 완전하게 억제할 수 없다.



Fig. 4 Morphology comparison between wild-type (WT) and male-sterile genetically modified *Zoysia japonica*. (A) WT *Zoysia* anther stained by KI-I₂ solution; (B) the mutant of male-sterile GM *Zoysia* anther. (C) pollen of non-irradiated GM Zoysiagrass; (D) The pollen of male-sterile GM zoysiagrass were empty and crush. The bar size is about 60 μm (from Bae et al. 2009).

최근 보고된 JG21의 화분비산을 억제하는 방안으로써 감마선 조사를 통한 불임성 JG21을 유도하였고, 방사선을 이용한 돌연변이 유도 기술이 유전자이동성을 억제할 수 있음이 보고되었다 (Bae et al. 2009). 감마선을 이용한 불임성 JG21의 유도는 2004년부터 최근까지 약 6년간 포장시험을 통해서 검토되었고, 화기형성을 억제하는 불임성 및 웅성불임 등의 돌연변이체가 선발되었다 (Fig. 4). 특히 종자를 확보할 필요가 없는 들잔디와 같은 영양번식체의 경우에 매우 효과적이며, 후대 종자를 이용하는 작물의 경우에는 큰 효과를 얻지 못할 것으로 생각된다. 최근 웅성불임 GM 작물의 개발은 유전자이동성을 억제하는 획기적인 방안으로 제시되고 있으며, 웅성불임 유전자 도입보다는 방사선을 이용한 불임성 돌연변이 GM 작물은 안전성 확보를 위한 획기적인 방법으로 제시되고 있다.

결론

최근 국내에 수입이 승인된 GM 작물은 118 종으로써 가공용 및 사료용으로 수입되고 있으며, 재배용 GM 작물 수입승인은 단 1건도 없는 실정이다. 국내에서 개발된 GM 작물의 환경위해성평가를 통한 상업적 재배승인은

없는 실정이나 최근 제초제저항성 벼, 해충저항성 벼, 제초제저항성 고추, 배추, 감자 및 잔디 등에 대한 환경위해성평가를 빠르게 수행하고 있다. 이러한 이유는 국내 GM 작물의 개발 기술은 세계적으로 동등한 수준에 이르고 있으나, GM 작물에 대한 환경위해성평가 기술 및 정보가 부족한 실정이기 때문이다. 본 연구의 JG21에 대한 환경위해성 평가는 국내 GM 작물의 환경위해성평가 기술 확보를 위한 기초적 토대를 마련하고자 하였다. 세계적인 추세에 있는 GM 작물의 개발과 환경위해성 평가는 21세기 신품종 육성 및 상품화에 있어서는 반드시 거쳐야 할 관문이다. 이미 실용화되고 있는 GM 작물의 환경위해성평가 항목은 크기 7가지로 구분되었고, 그 내용을 살펴보면 도입 유전자의 특성 규명 및 분자생물학적 검정, 농업적 특성 검정, 유전자이동성 검정, 잡초화 가능성 검정, 비표적 생물체에 대한 영향 검정, 인체 및 동물에 대한 위해성평가, 위해요소 억제방안 마련 등의 필수 요소가 포함되어 있다. 특히 식용작물의 경우에는 인간이 오랜기간 동안 이용되어온 작물과의 실질적 동등성 비교를 통해서 경험적 안전성을 기본으로 하고 있다.

JG21의 환경위해성평가에서 가장 중요한 것은 개발된 들잔디가 인간을 포함한 자연환경의 생물체에 대해서 악영향이 없이 안전하게 이용될 수 있는지에 대한 해답을 얻는 것이다. 따라서 모든 GM 작물에서와 같이 사전에

방원칙에 따라 다양한 시험설계와 포장시험, 각각의 항목별을 시험평가를 통해서 안전성과 위해성 대한 정보가 검토되어야 한다. 먼저 GM 작물을 비의도적 방출 없이 시험평가 및 재배하기 위해서는 주변 동종식물체와의 격리거리를 설정해야한다. 격리거리 설정은 유전자이동성을 사전에 방지하기위한 것으로써 유전자이동성 시험을 통해서 재배면적에 따라서 새롭게 설정되고 있는 실정이다. 또한 비의도적 방출을 검정하기 위한 주변 식물체에 대한 환경영향평가는 동종 및 타종식물체와의 교잡가능성, 잡초화 가능성을 단계적으로 검토되어야 한다.

본 연구의 JG21은 자연상태로 방치될 경우 서식지 내의 우점잡초에 의해서 들잔디 영역이 서서히 감소되어 자연생태계에 악영향을 미치지 못하는 것이 확인되었다. 주변 비표적 생물체에 대한 안전성에 대한 평가는 JG21이 자연 생태계의 미생물 및 곤충의 분포변화와 새로운 종을 생성하여 교란을 시키는지 분석하였고, 유전자 전이여부를 확인하여 생태계의 기본적 안전성을 확보하고자 하였다. 본 연구를 통해서 아직까지 주변 미생물로의 유전자 전이와 미생물의 상변화에는 영향을 미치지 않았음을 확인하였고, 생태계의 가장 하위계층에 대한 안전성평가를 통해서 인체의 안전성을 확보하고자 주기별로 환경모니터링을 수행하고 있다.

인체 및 동물에 대한 위해성평가에서는 보편적인 과학 지식과 표준화된 프로토콜을 토대로 안전성이 입증되어야 한다. JG21에서 발생할 수 있는 새로운 알레르기 유발 가능성 물질 검정은 비식용이지만 들잔디 화분 흡입 및 표면 접촉성 측면에서 과학적 방법에 따라 검토하였고, 생성단백질인 PAT이 동물 및 인체에 악영향을 주지 않는 것으로 조사되었다. GM 작물의 환경위해성평가에서는 예측될 수 있는 위해 요소를 사전에 예방하기 위하여 발생 가능한 위해요소를 신속히 대처하는 방안을 제시해야 한다.

상기에서 기술한 보고를 종합해보면 JG21에서 발생할 수 있는 위해요소는 화분비산에 의한 유전자 이동가능성 및 종자 유출에 의한 확산에 있다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로서 감마선을 이용한 불임성 돌연변이체를 개발하였고, 불임성 들잔디는 화분 및 종자가 자연환경에 확산되는 것을 방지할 수 있기 때문에 안전성을 유지할 수 있다.

마지막으로 GM 작물의 환경위해성평가는 통합학문 분야(식물의 재배학, 생리학, 생태학, 분류학, 화학, 생물학, 독성학, 알레르기 및 면역학, 미생물 및 곤충의 분류, 분자생물학 등)로서의 다양한 전문가 도움이 절대적으로 요구되는 연구이다. 따라서 이러한 분야의 전문가 집단이 활성화될 필요가 있기 때문에 환경위해성 프로토콜 개발 및 실용성을 위한 전문가 양성 및 전문가 네트워크 활성이 절실히 요구된다.

사 사

본 연구는 2010년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업 (2010-0029630)과 2011년도 산림과학기술개발 사업으로 수행된 연구임.

참고문헌

- Bae TW, Lee HY, Ryu KH, Lee TH, Lim PO, Yoon PY, Park SY, Riu KZ, Song PS, Lee YE (2007) Evaluation of horizontal gene transfer from genetically modified zoysiagrass to the indigenous microorganisms in isolated GMO field. *Korean Journal of Plant Biotechnology* 34:75-80
- Bae TW, Vanjildorj E, Song SY, Nishiguchi S, Yang SS, Song IJ, Chandrasekhar T, Kang TW, Kim JI, Koh YJ, Park SY, Lee J, Lee YE, Ryu KH, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2008) Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *J Environ Qual* 37(1):207-18
- Bae TW, Kim J, Song IJ, Song SY, Lim PO, Song PS, Lee HY (2009) Production of unbolting lines through gamma-ray irradiation mutagenesis in genetically modified herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *Breeding Science* 59:103-105
- Choi ML, Kim DH (2000) Agrobacterium-mediated transformation of Korean lawngrass (*Zoysia japonica*). *J Kor Soc Hort Sci* 41: 455-458
- Choi JS, Fermanian TW, Wehner DJ, Spomer LA (1990) Effect of temperature, moisture and soil texture on DCPA degradation. *Agron J* 80(1):108-113
- Choi JS, GM Yang (2004) Development of new hybrid cultivar 'Senock' in *Zoysia* grass. *Kor Turfgrass Sci* 18:1-12
- Codex Alimentarius Commission (2003) Report on the 4th session of the Codex ad hoc intergovernmental task force on foods derived from biotechnology (ALINORM 03/34A). In Codex principles and guidelines on foods derived from biotechnology. 26th session, Rome, Italy. June-7 July, 2003. Joint FAO/WHO Food standards programme, food and agriculture organization
- Dunfield KE, Germida JJ (2001) Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. *FEMS Microbiol. Ecol* 38:1-9
- FAO/WHO (1996) Biotechnology and food safety. Report of a joint FAO/WHO consultation. Food and Agricultural Organization, Food and Nutrition Paper. Rome, Italy
- FDA (1992) Statement of policy: foods derived from new plant varieties. Federal Register 57:22984-23005
- Ge Y, Norton T, Wang ZY (2006) Transgenic *Zoysia* (*Zoysia japonica*) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 25:792-98
- Gyamfi S, Pfeifer U, Stierschneider M, Sessitsch A (2002) Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. *FEMS Micro-*

- biol Ecol 41:181-190
- Herouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, Van der Klis R, Rouan D (2005) Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul Toxicol Pharmacol* 41:134-149
- Hoffmann T, Golz C, Schieder O. (1994) Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Current Genetics* 27: 70-76
- Honda M, Kono M (1963) 芝の形態並びに解剖學的研究. 特に日本芝 *Zoysia japonica* Steud. について. 千葉大園藝學部學術報告 (11):1-22
- Hong KH, Yeam DY (1985) Studies in interspecific hybridization in Korean lawngrasses (*Zoysia* spp.). *J Kor Soc Hort Sci* 26:169-178
- Inokuma C, Sugiura K, Cho C, Okawara R, Kaneko S (1996) Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawngrass. *Plant Cell Rep* 15:737-7741
- International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications from website. Available from: (<http://www.isaaa.org> and <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase>)
- Kang HG, Bae TW, Jeong OC, Sun HJ, Lim PO, Lee HY (2009) Evaluation of Viability, Shedding Pattern, and Longevity of Pollen from Genetically Modified (GM) Herbicide-tolerant and Wild-type Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *J plant Biol* 52:630-634
- Kim HK, Kim KS, Joo YK, Hong KH, Kim KN, Lee JP, SY Mo, Kim DH (1996) Variation of the morphological characteristics in the accessions of *Zoysia* species and their hybrid lines. *Kor Turfgrass Sci* 10:1-11
- Kim YL, Lee SK, Oh SH (1987) A study of allergy skin tests with Korean pollen extracts. *Yonsei Medical Journal* 28:112-118.
- Kim YT, Park BK, Hwang EI, Yim NH, Lee SH, Kim SU (2004) Detection of recombinant marker DNA in genetically modified glyphosate-tolerant soybean and use in environmental risk assessment. *J Microbiol Biotechnol* 14:390-394
- Kitamura F (1967) 芝生と芝生用植物, 加島喜代志, 東京, pp 45-65
- Lee BK, Monitoring the occurrence of genetically modified soybean and maize in cultivated fields and along the transportation routes of the Incheon Port in South Korea
- Lee MS (1988) 잔디 발 잡초의 분류학적 특성에 관한 연구. *Kor Turfgrass Sci* 2:59-64
- Lee YE, Yang SH, Bae TW, Kang HG, Lim PO, Lee HY (2011) Effects of field-grown genetically modified zoysia grass on bacterial community structure. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(4):333-340
- Lee SW (2010) 국내 외 GM 식물의 개발 및 산업화 현황. *Kor J Plant BioTech* 37(3):305-312
- Lei Z, Xing WD, Rong HF, Qiu WH, Ma CX (2004) Optimization of major factors for tissue culture and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Japanese lawngrass (*Zoysia japonica*). *Acta Prataculturae Sinica* 13:100-105
- Li RF, Wei JH, Wang HG, He J, Sun ZY (2006) Development of highly regenerable callus lines and *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese lawngrass (*Zoysia sinica* Hance) with a cold inducible transcription factor, CBF1. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 85:297-05
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995) Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8:457-463
- Lim SH, Kang BC, Shin HK (2004) Herbicide Resistant Turfgrass (*Zoysia japonica* cv. 'Zenith') Plants by Particle bombardment-mediated Transformation. *Kor Turf Sci* 34(5):221-229
- Mohr KI, Tebbe CC (2006) Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (*Apoidea*) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology* 8:258-272
- Oh KS, Oh BY, Lee YK, Lee BM, Lee JG (2000) 제초제 Dicamba 의 토양미생물 및 잔디 효소에 의한 분해. *한국농약과학회지* 4: 26-30
- OECD (2001) Test No. 420: Acute oral toxicity. Fixed dose procedure. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 17 December 2001, pp 1-14
- Park KW, Lee BK, Kim CK, Kim DY, Park JY, Ko EM, Jeong SC, Chio KH, Woon KW, Kim HM (2010) Monitoring the occurrence of genetically modified maize at a grain receiving port and along transportation routes in the Republic of Korea. *Food Control* (21)4:456-461
- Richardson AO, Palmer JD (January 2007). "Horizontal Gene Transfer in Plants". *Journal of Experimental Botany*58(1): 1-9
- Richman JR, Watrud LS, Lee EH, Burdick CA, Bollman MA, Storm MJ, King GA and Mallory-Smith C (2006) Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in onoagronomic habitats. *Molecular Ecology* (in press)
- Schleicher LC, Shea PJ, Stougaard RN, Tupy DR (1995) Efficacy of dissipation of dithopyr and pendimethalin in perennial ryegrass turf. *Weed Science* 43(1):140-148
- Schmalenberger, A, Tebbe CC (2002) Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiol Ecol* 40:29-37
- Schmidt JO (1994) Toxinology of venoms from the honeybee genus *apis*. *Toxicon* 33:917-927
- Sjogblad R, McClintock JT, Engler R (1992) Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regul Toxicol Pharmacol* 15:3-9
- Sun HJ, Kang HG, Bae TW, Cho TG, Kim J, Lim PO, Riu KZ, Lee HY (2010) Digestibility assessment of the phosphinothricin acetyltransferase (PAT) protein in the leaf tissue powder of transgenic zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) in simulated gastric fluid (SGF) *J Plant Biol* 53:113-120
- Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, Fu TJ, Latt CM, HadWeld N, Hatzos C, HeXe SL, Heylings JR, Goodman RE, Henry B, Herouet C, Holsapple M, Ladics GS, Landry TD, MacIntosh SC, Rice EA, Privalle

- LS, Teiner HY, Teshima R, Thomas K, Van R Ree M Woolhiser, Zawodny J (2004) A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol* 39:87-98
- Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2003) Production of herbicide-tolerant zoysia-grass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Cells* 16(1):19-27
- Watrud LS, Henry Lee E, Fairbrother A, Burdick C, Reichman JR, Bollman M, Storm M, King G, Van de Water PK (2004) Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with *CP4 EPSPS* as a marker. *PNAS* 101: 14533-14538
- 戸刈義次 (1960) 雑草防除の新技术, 日本富民協會, pp 13-18
- Yu TY, Yeom DY, Kim YJ, and Kim SJ (1974) Morphological studies on Korean lawn grasses (*Zoysia* spp.). *J Kor Soc Hort Sci* 15:79-91
- Zhang L, Wu D, Zhang L, Yang C (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) containing a synthetic cryIA(b) gene from *Bacillus thuringiensis*. *plant Breeding* 126 (4):428-432