

Research Article

Open Access

바이러스저항성 삼각주 재배가 토양 미생물상에 미치는 영향

오성덕, 김종범, 이정진,¹ 김민경, 안병옥, 손수인, 박종석, 류태훈, 조현석, 이기종*

농촌진흥청 국립농업과학원, ¹경기도 농업기술원 선인장연구소

Impact of Virus-resistant Trigonal Cactus Cultivation on Soil Microbial Community

Sung-Dug Oh, Jong-Bum Kim, Jung-Jin Lee,¹ Min-Kyeong Kim, Byung-Ohg Ahn, Soo-In Sohn, Jong-Sug Park, Tae-Hun Ryu, Hyun-Suk Cho and Kijong Lee (National Academy of Agricultural Science, Suwon, 441-707, Korea, ¹Gyeonggido Agricultural Research & Extension Services, Goyang, 411-809, Korea)

Received: 21 March 2013 / Revised: 9 May 2013 / Accepted: 12 May 2013

© 2013 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

BACKGROUND: Genetically modified(GM) trigonal cactus(*Hylocereus trigonus* Saff.) contained a coat protein gene of cactus virus X (CVX), which conferred resistance to the virus, phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) gene, which conferred herbicide resistance, and a cauliflower mosaic virus 35S promoter (CaMV 35S). This study was conducted to evaluate the possible impact of GM trigonal cactus cultivation on the soil microbial community.

METHODS AND RESULTS: Microorganisms were isolated from the rhizosphere of GM and non-GM trigonal cactus cultivation soils. The total numbers of bacteria, and actinomycete in the rhizosphere soils cultivated GM and non-GM trigonal cactus were similar to each other, and there was no significant difference. Dominant bacterial phyla in the rhizosphere soils cultivated with GM and non-GM trigonal cactus were Proteobacteria, Uncultured archaeon, and Uncultured bacterium. The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles show a similar patterns, significant difference was not observed in each other. DNA was isolated from soil cultivated GM and

non-GM trigonal cactus, we analyzed the persistence of the inserted gene by PCR. Amplification of the inserted genes was not observed in the soil DNA, which was collected after harvest.

CONCLUSION(S): This result suggests that the GM trigonal cactus cultivation does not change significantly the microbial community.

Key Words: CVX, Soil microbial community, Trigonal cactus

서론

유전자변형(Genetically modified) 대두가 상업적으로 재배된 1996년 이후 제초제내성, 해충저항성 등 유전자변형 작물들의 재배면적은 해마다 증가하고 있다. 2012년 전 세계 유전자변형 작물의 재배면적은 1억 7,000만 ha(James, 2012)로, 대한민국 국토면적(1,002만 ha)의 약 17배에 해당된다. 유전자변형 작물은 작물 생산에 필요한 노동력과 농기계 사용 절감에 따른 경제적인 이익뿐만 아니라(Owen, 2000), 기후 변화 등의 농업환경 변화에 지속가능한 식량 생산을 가능케 한다(Brookes and Barfoot, 2006). 그러나 외래 유전자 도입에 의한 독성 및 알레르기 물질 생산 가능성(Konig *et al.*, 2004)과 도입 유전자 이동(gene flow)에 의한 생태계 교란(Conner *et al.*, 2003) 등의 우려로 유전자변형 작물 이용

*교신저자(Corresponding author)

Tel: +82-31-299-1142, FAX: +82-31-299-1122;

Email: leekjong@korea.kr

에 대한 논란은 전 세계적으로 지속되고 있다. 2011년 대국민 LMO인식조사에 따르면 우리나라 국민 53.5%는 유전자변형 기술이 인류에 도움을 준다고 인식하고 있지만 유전자변형 농산물의 구입·이용 의향은 제품에 따라 13~44%로 수용 의사가 거의 없는 것으로 나타났다(Jung, 2011). 국내에서는 아직까지 유전자변형 작물은 재배되고 있지 않지만 생명공학에 대한 투자 확대와 집중적인 연구개발을 통해 다수의 유전자변형 작물들을 개발하고 있다. 환경 및 식품위해성 평가를 거쳐 안전성이 증명된 유전자변형 작물만을 재배할 수 있음에도 벼, 배추 등 식용작물 위주로 개발되고 있어 소비자의 수용의사를 높이기 위한 방안이 우선적으로 고려될 필요가 있다. 일례로 화훼식물의 화색변경, 절화수명 연장 등 관상 가치를 향상시킨 비식용 유전자변형 식물체 보급을 통해 유전자변형 작물에 대한 소비자의 우려를 낮출 수 있을 것으로 예상된다. 또한 영양변식이 가능한 비식용 유전자변형 작물은 농업환경에 대한 위해성평가를 다소 완화할 수 있는 장점이 있어 이에 대한 집중적인 연구가 선행될 필요가 있다. 바이러스에 의한 피해를 최소화하기 위해 전 세계적으로 개발된 바이러스저항성 유전자변형 작물은 파파야, 호박, 자두, 감자 등 4작물 7종이 있으며, 이들은 각각 윤문병(ringspot virus), 모자이크병(mosaic virus), 곰보병(pox virus), 잎말이병(leafroll virus)에 저항성을 나타낸다. 현재 상업 재배중인 유전자변형 파파야 이외의 작물들은 환경 및 식품위해성 심사 승인을 거쳐 조만간 상업 재배될 것으로 예상되고 있다.

접목선인장은 국내 고유의 신품종과 재배기술로 해외시장에서 선호도가 높아 세계시장의 70~80%를 점유하는 고부가가치 작목이다. 접목선인장은 관상가치를 높이고 빠른 생육을 위해 대목인 삼각주(*Hylocereus trigonus* Saff.)에 비모란을 접목시켜 재배한다. 반복적인 영양변식으로 재배된 삼각주는 바이러스 이병률 증가로 비모란 구색 퇴화, 접목활착을 저하, 생산성 감소, 검역 등의 문제가 발생하므로 이를 해결하기 위해서는 바이러스저항성 삼각주의 조속한 개발과 보급이 필요하다. 국내에서는 선인장 바이러스 X(*Cactus virus X*, CVX)의 피막 단백질을 암호화하는 유전자를 전신발현 프로모터 유전자와 함께 삽입하여 CVX에 저항성을 나타내는 바이러스저항성 형질전환 삼각주를 개발하였다. 포장에서 재배된 유전자변형 작물로부터 근권 주변 생물체로의 유전자 이동에 대한 명확한 증거는 보고된 바 없으나(Badosa *et al.*, 2004), 유전자변형 작물을 재배하기 위해서는 환경에 미칠 수 있는 요인들의 면밀한 분석이 필요하다. 본 연구에서는 기 개발된 바이러스저항성 삼각주 재배에 의한 토양 미생물의 생태 영향을 토양 미생물 군집밀도, 근권 토양 화학성 등으로 분석하였다. 또한 분자생물학적 기술을 이용한 토양 미생물의 군집변화와 도입유전자의 잔존성을 분석하여 비식용 유전자변형 작물의 환경위해성 평가 가이드라인을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

식물체 재배 및 토양 시료

선인장 바이러스 X(CVX)의 피막 단백질을 암호화하는 유전자가 삽입된 바이러스저항성 형질전환 삼각주와 선인장원 구조로부터 분양받은 비형질전환 삼각주 모본을 590(W)×385(D)×150(H)크기의 사각포트에 원예용 상토를 채우고 12주씩 3반복으로 이식하여 재배하였다. 영양변식을 통해 증식하는 선인장의 특성에 맞춰 모체에서 3~4개의 자구가 생겨날 때까지 일반재배법에 따라 재배하면서 시기별로 포트에 있는 상토를 채취하였다. 상토는 식물체를 뿌리째 뽑아 Kim 등(2008)의 방법에 따라 비균권 토양을 제거하여 균집 분석에 이용하였으며, 화학성 분석은 풍건 후 2 mm의 표준망체로 거른 시료를 이용하였다.

토양 미생물 균집 분석

삼각플라스크에 채취한 토양 10 g과 멸균한 0.85% NaCl 90 mL를 넣어 진탕 배양기에서 30분간 200 rpm으로 현탁하였다. 일련의 희석과정을 거친 현탁액을 각각의 배지에 도말하고 28°C에서 배양하였다. 세균은 cycloheximide(0.05 g/L)를 첨가한 R2A agar(NA, Difco, MI) 배지에서 2일간, 진균은 chloramphenicol(0.02%)을 첨가한 R2A agar 배지에서 4일간, 방선균은 Sodium caseinate agar 배지에서 5일간 배양한 후 계수하였다. 미생물 수는 배양된 페트리디쉬에 나타난 균체를 3반복 계수하여 평균값을 생균수(colony forming unit, CFU/g 건조토)로 산출하였다.

DGGE를 이용한 미생물 군집 분석

형질전환 삼각주와 비형질전환 삼각주를 재배한 토양 미생물 군집 변화는 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)로 분석하였다. FastDNA Spin Kit(Qbiogen, USA)로 토양 내 DNA를 추출하고, 진정세균의 미생물상 변이 분석을 위해 16S rRNA의 V9 부위를 증폭하는 1070f(5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3')와 여분의 G+C clamp (CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCCGCCCC)가 부가된 1392r(5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 반응액 조성은 5 µL 10 × PCR buffer, 10 ng 주형 DNA, 25 pmol 양방향 프라이머, 200 µM dNTP, 2.5 U f-Taq DNA polymerase(Solgent, Korea)를 첨가하여 최종 부피는 50 µL로 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 Detection System(Bio-Rad, USA)을 사용하여 변성제인 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.

우점세균 동정

토양에서 추출한 DNA로부터 세균의 16S rRNA 영역을 증폭하는 27mf(5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')와

1492r(5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer로 PCR을 수행하고 염기서열을 분석하여 동정하였다. PCR 반응액의 조성과 조건은 미생물 군집 분석 방법과 동일하게 수행하였으며, 1% agarose gel에서 확인된 DNA를 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 삽입하고 *E. coli* DH5a에 형질전환하였다. 형성된 콜로니로부터 무작위로 DNA를 추출하여 삽입 절편을 증폭한 후 DNA clean kit(Bioneer, Korea)로 정제하고 27mf와 519r(5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') primer를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

토양 화학성 분석

농촌진흥청의 토양 및 식물체 분석법(NIAST, 2000)에 준하여 형질전환 삼각주와 비형질전환 삼각주를 재배한 근권 토양을 음지에서 건조시켜 2 mm체를 통과한 것을 사용하였다. pH와 EC는 토양과 증류수를 1:5로 혼합하여 30분간 진탕한 후 현탁액을 측정하였으며, 유기물 함량은 Walkley와 Black법, 유효인산은 Bray No. 1법으로 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.

유전자 잔존성 조사

토양에서 추출된 DNA로부터 형질전환 삼각주에 도입된 CVX와 선발표지 유전자(*bar*)의 토양 내 잔존성을 PCR로 확인하고 형질전환 삼각주로부터 주변 생물체로의 수평적 유전자 이동성 여부를 판단하였다. 도입유전자(CVX)를 증폭하는 primer(CVX F, 5'-ATGCTACTACTGGAGTCCAGICT-3', R, 5'-TCACTCAGGGCCTGGAGAAATTGA-3')와 선발표지(*bar*)를 함께 증폭하는 primer(*bar* F, 5'-GATCTCGGTGACGGGCAGGACC-3', R, 5'-TCACTCAGGGCCTGGGAGAAATTGA-3')로 PCR을 실시하였으며, PCR 반응물의 조성과 조건은 미생물 군집 분석에 이용된 방법과 동일하게 하였다.

결과 및 고찰

토양 미생물상 분석

CVX 바이러스저항성 삼각주 재배에 의한 근권 토양의 미생물상 영향을 구명하고자 형질전환 삼각주와 비형질전환 삼각주 재배 토양의 생육시기별 세균, 방선균 및 진균 밀도를 조사하였다(Table 1). 형질전환 삼각주와 비형질전환 삼각주 재배 토양간의 생육시기별 세균, 방선균 밀도는 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). 토양 내 진균 밀도는 생육기간 동안 형질전환 삼각주를 재배한 토양에서 비형질전환 삼각주에 비해 다소 높게 유지되었다($P<0.05$). 그러나 수확이후의 형질전환 삼각주와 비형질전환 삼각주 토양에서는 유의성이 없어($P>0.05$) 안정적으로 유지되는 것으로 나타났다. 식물 뿌리에서 배출되는 삼출물은 미생물 군집과 활성의 변화를 초래할 수 있고 토양 미생물상의 변화는 유기물의 분해와 순환에 영

Table 1. Number of microbes in GM and non-GM trigonal cactus cultivated soil

Soil microbe	Samples	Early growth stage	Late growth stage	Post harvest
Bacteria ($\times 10^7$ CFU/g)	Non-GM	44.4 ^a	10.1 ^a	13.0 ^a
	GM	32.6 ^a	10.6 ^a	13.6 ^a
Actinomycete ($\times 10^6$ CFU/g)	Non-GM	24.4 ^a	32.7 ^a	49.7 ^a
	GM	20.4 ^a	31.7 ^a	44.6 ^a
Fungi ($\times 10^4$ CFU/g)	Non-GM	10.4 ^a	6.5 ^a	43.3 ^a
	GM	14.5 ^b	9.8 ^b	36.3 ^a

Colony forming unit(CFU)g⁻¹ fresh soil weight±standard deviation from three replications.

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

향을 주어 식물의 생육이나 병원균 성장 등에 직·간접으로 영향을 끼칠 수 있다(Miethling *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005). 그러나 삼각주 재배 토양간 생육시기별 세균과 방선균 밀도에 변화가 없고 수확이후 진균 밀도는 차이 없이 안정화됨으로써 형질전환 삼각주 재배에 의한 토양 미생물상 영향은 비형질전환 삼각주와 유사할 것으로 추정하였다. 식물체 생육상태와 토양 미생물과의 상호작용에 의해 미생물 군집이 변화될 수 있어(Kardol *et al.*, 2006) 진균 밀도에 대한 추가적인 분석이 필요할 것으로 사료되었으며 진균의 고밀도는 원예용 상토의 배합 불균형에 의한 일시적인 현상으로 추정되었다. 본 연구에서 사용된 평판배양법은 배양 가능한 미생물을 간단하게 분석할 수 있어 체초제내성 벼(Kim *et al.*, 2008) 등 유전자변형 작물 재배 토양의 미생물 밀도 비교에 사용되었으며, 다른 유전자변형 작물의 분석시 충분히 적용 가능할 것으로 예상되었다.

재배 토양 내 우점종 분석

토양 미생물의 우점종 변화는 CVX 바이러스저항성 삼각주 재배 토양에서 DNA를 분리하고 미생물의 16S rRNA 염기서열을 분석하여 확인하였다. 근권 토양에서 동정된 세균들을 phylum 수준에서 비교한 결과(Table 2), 형질전환 삼각주와 비형질전환 삼각주의 근권 토양에는 Proteobacteria, Uncultured archaeon, Uncultured bacterium이 우점하였으나 시료 채취시기에 따라 우점세균은 증감하였다. 형질전환 삼각주 재배 토양의 우점세균은 시료 채취시기에 따라 변동이 크지 않았으나 비형질전환 삼각주 재배 토양은 영양생장기의 비배양 고세균의 편중과 비배양 세균의 감소 등으로 인해 변화가 크게 나타났다. 일반적으로 토양 미생물의 에너지 급원인 잔존물과 뿌리 삼출물 등의 증가로 식물체 생육에 따른 근권 토양 미생물의 변동이 나타나기도 하지만(Wei *et al.*, 2006), 제한된 재배조건, 분석시료와 무작위적인 추출법에 의해 우점종의 변화가 나타난 것으로 추정되었다. 따라서, 시료의 채취 기간과 분석시료수를 늘림으로써 장기적인 분석이 필요할 것으로 예상되었다. 동일한 지역에서도 재배 품종

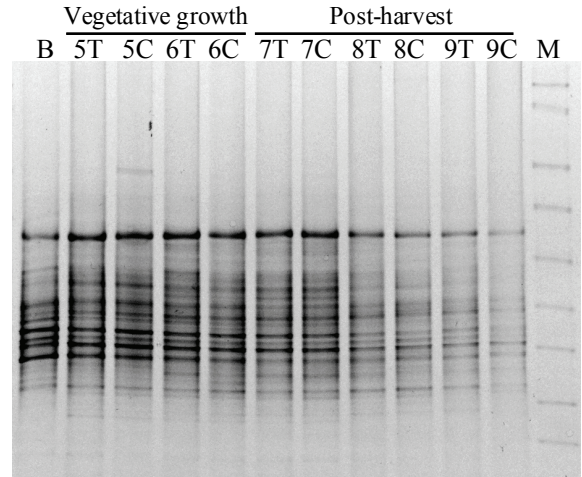
Table 2. Phylogenetic distribution of isolates obtained from GM and non-GM trigonal cactus cultivated soil

Phylum	Before experiment	Vegetative growth		Post harvest		Total
		GM	Non-GM	GM	Non-GM	
Ascomycota	5		1	1		7
Bacteroidetes		16	3		10	29
Firmicutes				1	1	2
Mortierellomycotina					4	4
Proteobacteria	12	26	10	23	45	116
Sediment bacterium		1				1
Spirochaetes				4	1	5
Verrucomicrobia				1	1	2
Uncultured microbes						
Archaeon	33	12	72	15	4	136
Bacillus		1				1
Bacterium	22	37	7	53	32	151
Compostbacterium		1				1
Euryarchaeote				1		1
Fungus	3	1	1			5
Gamma proteobacterium	1		1			2
Rhizobiales bacterium	2					2
Unclassified bacterium	2	1				3
Total	100	100	100	100	100	500

과 토양 미생물의 미세한 군집 차이로 근권 내에 다양한 미생물이 존재할 수 있기 때문에(Filion, 2008), 형질전환 삼각주 재배토양 내 우점종의 생태적 변화 양상을 장기적으로 분석하여 판단할 필요가 있다. 본 연구에 사용된 염기서열 분석법은 일반배양법으로는 배양이 어려운 미생물도 동정할 수 있고 염기서열 해독에 대한 비용절감으로 다량의 토양 미생물 분석이 가능하기 때문에 추후 축적된 데이터베이스를 활용하여 우점종 변이를 자세히 분석할 수 있을 것으로 예상된다.

DGGE 분석에 의한 토양 미생물 군집 비교

형질전환 삼각주와 비형질전환 삼각주를 재배한 토양으로부터 시기별 DNA를 추출하고 16S rRNA를 특이적으로 증폭하여 DGGE 분석법으로 근권 토양 미생물 군집을 비교하였다(Fig. 1). 형질전환 삼각주와 비형질전환 삼각주의 시기별 토양 DGGE profile은 모든 시기에서 거의 유사하였다. DGGE profile을 기반으로 밴드의 밀도와 수의 양상을 분석한 결과(Table 3), 삼각주 수확 이후 채취한 토양에서는 DNA의 분해 등으로 밴드의 증폭이 거의 일어나지 않았고 또한 삼각주 종류에 따른 차이도 거의 나타나지 않았다. 재배



Lanes: B, soil sampled before experiment; 5T~9T, soil from GM trigonal cactus in May~September; 5C~9C, soil from non-GM trigonal cactus in May~September; M, Marker

Fig. 1. DGGE of 16S rDNA fragments from GM and non-GM trigonal cactus.**Table 3. Comparison of similarity between GM and non-GM trigonal cactus based on UPGMA cluster analysis**

Lanes ^z	B	5T	5C	6T	6C	7T	7C	8T	8C	9T	9C
B	100 ^y										
5T	100	100									
5C	100	100	100								
6T	92.3	92.3	92.3	100							
6C	83.3	83.3	83.3	72.7	100						
7T	72.7	72.7	72.7	80	88.9	100					
7C	72.7	72.7	72.7	80	88.9	100	100				
8T	83.3	83.3	83.3	90.9	60	66.7	66.7	100			
8C	100	100	100	92.3	83.3	72.7	72.7	83.3	100		
9T	92.3	92.3	92.3	83.3	72.7	60	60	90.9	92.3	100	
9C	100	100	100	92.3	83.3	72.7	72.7	83.3	100	92.3	100

^zLanes replicated in the DGGE gels in Fig. 1

^y100 indicates complete similarity

시기에 따라 삼각주간의 밴드 유사성은 수확시 토양 내 뿌리 잔존물 증가로 7월 형질전환 삼각주 재배 토양의 밴드 유사성은 72.7%로 낮아졌으나 이후 92.3%로 회복되었다. 전체 밴드에 대한 분석 결과, 뿌리 잔존물이 많이 남아 있던 7월 토양과 수확이후 방치된 9월 토양과의 밴드 유사성은 60%로 가장 낮았으며 다른 밴드와의 유사성은 일정하게 유지되어 바이러스저항성 삼각주 재배에 따른 토양 미생물 군집의 변화는 생육기간에 일시적으로 나타나며 이후 수개월내에 회복되는 것으로 추정되었다. 파파야 Ringspot 바이러스저항성 형질전환 파파야를 재배한 토양의 DGGE 결과에서도 시료

Table 4. Chemical characteristics of rhizosphere soil of GM and non-GM trigonal cactus

Stage	Samples	pH (1:5)	OM (g/kg)	T-N (%)	Av. P ₂ O ₅ (mg/kg)	Exch. cation (cmol+/kg)			
						Ca	Mg	K	Na
Before experiment	Non-GM	5.8	542.4	0.04	179.5	6.9	0.7	2.3	0.8
	GM	5.7	533.5	0.04	178.9	7.0	0.8	2.4	0.8
Vegetative growth	Non-GM	5.7	545.9	0.04	128.1	8.2	0.9	2.9	1.2
	GM	5.8	543.8	0.04	153.8	8.2	0.8	2.7	1.1
Post harvest	Non-GM	5.3	557.7	0.04	181.0	10.1	0.9	2.9	1.6
	GM	5.4	566.8	0.04	152.4	8.8	0.8	2.6	1.4

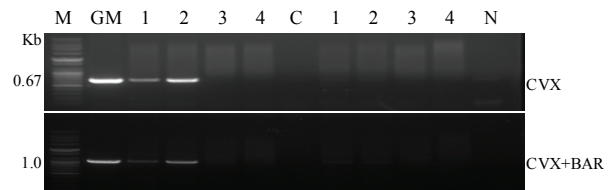
채취 지역의 토양 이질성에 의해 생육시기별 밴드 패턴의 차이가 나타났다(Hsieh and Pan, 2006). DGGE 분석은 토양 미생물 군집변이에 대한 재배 품종, 시료 채취 시기 및 지역의 토양 이질성 등에 쉽게 영향을 받을 수 있기 때문에(Kim *et al.*, 2008), 형질전환 작물의 토양 미생물 군집 비교 연구 시에는 충분히 고려하여 비교해야 한다.

삼각주 재배토양 화학성 분석

토양 화학성은 토양 미생물의 변화에 따라 상호 반응하므로 토양 pH, 유효인산, 유기물 함량 등의 화학성 분석을 통해 형질전환 삼각주와 비형질전환 삼각주 재배에 의한 토양 미생물 변화를 비교하였다(Table 4). 토양 pH는 수확 이후 다소 낮아졌으나 생육 적정범위(pH 5.5-6.5)와 품질기준(pH 5.5-7.0)내에 존재하여(Lee *et al.*, 2006) 식물 생육에는 영향이 없을 것으로 예상되었다. 토양 내 유기물 함량은 물리성 개선과 토양 미생물의 활성을 높여 비옥도를 판정하는 지표로 활용된다. 형질전환 삼각주 재배에 이용된 원예용 상토의 주원료가 유기물질이기 때문에 일반 밭 토양(20-30g/kg)에 비해 유기물 함량이 높게 나타났지만 삼각주간의 유의성은 나타나지 않았다(P>0.05). 유효인산과 치환성양이온도 생육 기간과 수확이후에 일정하게 유지되었으며, 식물 생육에 적절한 범위 내에 존재하는 것으로 조사되었다. 본 연구에서는 형질전환 삼각주 재배에 따른 시기별 변화 없이 안정화되었으나 유전자변형 작물 재배에 의한 토양 화학성 변화를 판단하기 위해서는 작물 생육기간 동안 연속적인 분석을 통한 장기적인 영향 평가가 필요할 것으로 예상되었다.

수평적 유전자 이동성 조사

수평적 유전자 이동성(Horizontal gene transfer)은 번식에 의하지 않고 개체로부터 다른 개체로 유전물질이 안정적으로 전달되는 것을 의미한다. 1963년 병원균이 복수의 항생제에 저항성을 나타내는 전달성 유전에서 처음 밝혀진 이후 세균 진화의 주요한 요인으로 알려져 있다(OECD, 2010). 일반적으로 형질전환체 근권의 토양 미생물로 수평적 유전자 이동이 발생하기 위해서는 장기간 다량의 유전자가 근처에 존재해야만 한다. 도입 유전자의 잔존성은 형질전환 삼각주와 재배 토양으로부터 DNA를 분리하고 도입 유전자를 특이적



Lanes: M, marker; GM, GM trigonal cactus; 1~4; soil from June to September; C, non-GM trigonal cactus; N, negative control

Fig. 2. PCR fragments from GM and non-GM trigonal cactus cultivated soil.

으로 증폭하여 확인하였다(Fig. 2). 형질전환 삼각주 식물체에서는 도입 유전자와 선발표지로 사용된 제초제저항성 유전자가 증폭되었지만, 비형질전환 삼각주에서는 도입된 유전자가 증폭되지 않았다. 토양에서 추출한 DNA에서는 영양생장기에는 증폭된 밴드가 나타났지만 수확 이후 토양에서는 증폭된 밴드를 검출할 수 없었다. 이는 생육중기의 토양 DNA 추출시 식물체의 뿌리가 혼입된 것으로 추정되었으며, 수확 이후 토양 내 잔존성이 낮아 근권 토양 미생물의 수평적 유전자 이동 가능성은 없을 것으로 예상되었다. 추후 삼각주 유전체 정보가 밝혀지면 내재유전자의 염기서열을 이용하여 잔존성에 대한 보다 명확한 기준제시와 분석이 가능할 것으로 예상되었다. Widmer 등(1997)은 형질전환 담배와 감자의 항생제 저항성 *npfl* 유전자가 각각 77일, 137일간 토양 내에 잔존할 수 있다고 보고하였으며 본 연구에서도 토양 내 도입 유전자는 2개월 정도 잔존하였으나 이후 분해되어 PCR 분석으로는 검출할 수 없었다. 식물 DNA의 토양 내 잔존성은 핵산 가수분해 효소에 의한 DNA의 분해(Smalla and Gebhard, 1999; Widmer *et al.*, 1997), 토양 내 존재하는 DNase(Lorenz *et al.*, 1997) 등에 의해 비생물학적 또는 생물학적인 영향을 받는다. 본 연구에서는 토양에서 도입 유전자가 일정 기간이후 검출되지 않아 현재의 과학기술로 검출할 수 있는 한계 이하로 존재할 것으로 예상되고 식물로부터 토양 미생물로의 유전자 전달 빈도는 매우 낮거나 제한적이기 때문에, Germida와 Dunfield(2004)의 연구 결과와 같이 바이러스저항성 삼각주로부터 주변 생물체로의 수평적 유전

자 이동 가능성은 매우 희박할 것으로 추정되었다.

요약

본 연구는 CVX 바이러스저항성 삼각주 재배가 토양 미생물에 미치는 영향과 수평적 유전자 이동성을 확인하기 위해 수행되었다. 생육시기별 토양 세균과 방선균 군집밀도는 형질 전환 삼각주 재배 토양의 미생물 군집밀도와 비형질 전환 삼각주 군집밀도가 유사하여 토양 미생물에 미치는 영향은 유사할 것으로 추정되었다. 토양 미생물의 우점종은 Proteobacteria, Uncultured archaeon과 Uncultured bacterium으로 나타났다. 형질 전환 삼각주 재배 토양의 우점종과 비율은 거의 일정하게 유지되었다. 근권 토양 DNA의 DGGE 분석을 통해 형질 전환 삼각주와 비형질 전환 삼각주 토양 미생물 군집의 profile 변화는 나타나지 않았다. 형질 전환 삼각주와 비형질 전환 삼각주 재배 토양의 화학성은 차이가 없었다. 형질 전환 삼각주에 도입된 유전자로 토양 DNA에 대한 PCR 분석 결과, 도입 유전자의 잔존성이 길지 않아 수평적 유전자 이동 가능성은 희박할 것으로 추정되었다.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ009609022013)", National Academy of Agricultural Science and the Next-Generation BioGreen 21 Program (No. PJ008326032012), Rural Development Administration, Republic of Korea. We are grateful thanks to Seung-Uk Ji for technical assistance.

References

- 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 microbiology ecology* 48, 169-178.
- 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.
- 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.
- Hsieh, Y.T., Pan, T.M., 2006. Influence of planting papaya ringspot virus resistant transgenic papaya on soil microbial biodiversity, *J. Agric. Food Chem.* 54, 130-137.
- James, C., 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012, ISAAA Brief No. 44. ISAAA, Ithaca, NY.
- Jung, H., 2011. 2011 Biosafety white paper, p. 315-328, Korea research institute of bioscience and biotechnology, Daejeon, Korea.
- Kardol, P., Bezemer, T.M., Van Der Putten, W.H., 2006. Temporal variation in plant-soil feedback controls succession, *Ecol. Lett.* 9, 1080-1088.
- 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, H.H., Kim, K.H., Kang, J.Y., 2006. Comparison of the european standard methods and the rural development administration methods for determining chemical properties of horticultural substrates, *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 24, 425-430.
- 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.
- NIAST, 2000. Methods of analysis of soil and plant, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea.
- OECD, 2010. Safety assessment of transgenic organisms, Volume 4: OECD Consensus Documents, p. 171-174
- Owen, M.D.K., 2000. Current use of transgenic herbicide-resistant soybean and corn in the USA, *Crop Prot.* 19, 765-771.
- Sharma, S., Aneja, M.K., Mayer, J., Munch, J.C., Schloter, 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.
- Wei, X.D., Zou, H.L., Chu, L.M., Liao, B., Ye, C.M., Lan, C.Y., 2006. Field released transgenic papaya affects microbial communities and enzyme activities in soil, *Plant and soil* 285, 347-358.
- 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.
-