

基因轉殖植物對田間土壤微生物相之影響及毒性釋出之分析

羅致述^{*1} 簡宣裕² 張明暉² 廖慶樑² 陳淑娟¹

¹行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

²行政院農業委員會農業試驗所農業化學組

摘要

基因改造植物在田間種植後，由於作物的農事操作，或植物老化，腐化或花粉傳播，使轉殖的 DNA 與基改蛋白進入環境中，就有可能產生基因移轉，或影響土壤生態，或對人畜，與非目標生物造成毒害。因此本文僅就基改植物對土壤微生物相之影響及毒性作一綜合性報導，並對在藥試所與農試所進行之基改作物對土壤微生物之影響提出報告。

關鍵詞：基改作物、水稻、馬鈴薯、青花椰菜、玉米、基因水平移轉、微生物族群、及毒性。

前言

自 1983 年以來，利用生物技術來生產對農業與人類有用的生物，即成了一種新興的科技。藉由分子生物的方法，把重組的 DNA 轉殖至一特定的細胞中，改變細胞或分子的遺傳物質，再藉由組織培養技術使該轉型細胞發展成一個個體。例如含殺蟲蛋白的基改玉米，抗殺草劑的基改大豆，抗病毒的基改木瓜等。基因改造植物在田間種植後，其所攜帶的轉殖 DNA 就有可能因花粉的散佈，或因作物的農事操作收成而使轉殖的 DNA 進入與其相近的植物中，或隨部份植體進入土壤中，使得轉殖的基因在土壤中有機會影響土壤的生態，而基改植物本體的生長亦有可能對根圈生物造成影響（圖一）。消費大眾對這些經由生物技術得到的基因改造植物（Genetically modified plants, GMP）的食用安全性，及對環境與生態的安全性非常關切，因此本文僅就基改植物之基因移轉及對環境微生態影響提出報告與討論。

基因水平移轉是自然界中常見的現象，對於真核生物與原核生物上的演化，基因水平移轉是一個重要的機制。而在基改作物上所轉殖的抗藥性基因是

本論文部份資料登載於 2005 年 7 月刊行之農業藥物毒物試驗所技術專刊

*通訊作者(聯絡電話：04-23302101 轉 825；電子信箱：lcc@tactri.gov.tw；傳真：04-23323073)

否可能與土壤中微生物進行基因水平移轉，特別是對人，畜致病，且需使用抗生素來治療的病原性細菌間的基因移轉也是要注意的（表一）。

英國在 1996 年不同意 Ciba-Geigy 基改抗蟲玉米用於動物飼料的申請，因這基改玉米含有完整的 β -lactamase 基因及來自 pUC18 載體的啟動子與複製起點 (*ori*)，不同於在自然界中常見的載體（在一個細胞中可產生 4 至 18 個複本）。本品系使用之載體可在一個細胞中產生超過 600 個複本，因此英國農部 (MAFF) 認為這種基改玉米對人畜與環境的安全是有一定程度的風險。

世界衛生組織與聯合國農糧組織 (World Health Organization/Food and Agriculture Organization, WHO/FAO) 在 2000 年發表數篇報告對於基改作物中使用的抗生素基因有一個原則上的建議：對這些抗藥性基因的橫向移轉至環境中病原性微生物上，及可能在臨床上的意義是必須評估的。因 DNA 無論其來自基改植物或來自環境進入勝任細菌中的機會均相近，而基改植物上的其他物種 DNA 較一般基因更可能進入勝任細菌中 (Meier and Wackernagel, 2003)。

美國環保署 (USEPA) 在基改作物審查初期時並不主動要求廠商提供有關微生物間的基因移轉報告，因早期認為 DNA 在土中不殘留，容易為環境中所分解。但由於新的研究報告指出煙草 (*Nicotiana tabacum*) 及馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 的轉殖基因在土中可殘存至少 40 天以上 (Widmer *et al.*, 1996)。基因甜菜 (*Beta vulgaris*) 的轉殖基因可在土中殘存至 18 個月以上 (Gebhard and Smalla, 1999)。而這些殘留在土中的轉基因，仍具活性可進入原核生物的基因組中，造成基因水平移轉鏈。在美國如農藥殘留在土中的半生期 (Half-life) 超過 30 天以上，環境衝擊指數就進入有害的領域。所以美國環保署近年來開始要求廠商提供有關轉殖基因在環境中的宿命的報告，並建議對進入土壤中的轉殖基因進行環境監控與評估可能的衝擊。

基改植物標示基因

基改作物使用的標示基因中以具抗生素抗性的基因最常用，約有 84% 的基改作物使用可使抗生素卡那黴素 (Kanamycin)，新黴素 (Neomycin) 失效的 *npt II* 基因 (Neomycin phosphotransferase gene)。

標示基因的目的為供確認細胞是否成功轉入目標基因。使用的標示基因主要有兩種：選擇基因 (Selection gene, 或 Selectable marker gene) 及報告基因 (Reporter gene)。外來基因的移轉雖可藉由農桿菌轉型 (Agrobacterium-mediated transformation)，粒子槍 (Particle gun)，微量注射 (Microinjection)，或原生質轉型 (Protoplast transformation) 等技術進行基因移轉，但這些基因轉殖的成功率不是非常高。為了提高獲得已成功完成基因轉殖的細胞株的效率，通常在做基因轉殖的同時也植入了另一組特定的基因 (Co-introduced with the

gene-of-interest)，這一組特定基因就是標示基因。它的目的就是將經完成轉型的基改細胞 (Transgenic cell) 培養於含抗生素或抗殺草劑的選擇性培養基中培養，篩選存活的細胞，以簡便快速的自大量未完成基因移轉的細胞 (無抗性) 中挑選數量微少但已完成基因移轉事件的細胞 (具抗性)。因殖入的特定基因可使完成基因移轉事件的細胞或植物在此選擇性的環境中表現，存活及增殖，而未完成基因移轉事件的細胞在這一特定的環境中不能生存。例如抗固殺草 (Glufosinate) 的基改甜菜，其目標基因為 *bar* 基因，選擇基因為 *nptII* 基因。抗木瓜輪點病毒的基改木瓜，其目標基因為木瓜輪點病毒鞘蛋白基因 *PRSV CP*，選擇基因為 *nptII* (圖二)。

標示基因又因其作用可再細分成四種 (表二, Nap *et al.*, 1992)。第一種為具抗生素抗性的選擇基因，最常用的是使抗生素失效酵素基因，如可使卡那黴素 (Kanamycin)，新黴素 (Neomycin)，及 Geneticin (抗生素 G418) 失效的酵素 Aminoglycoside-3'-phosphotransferase II 【APH(3') II, 又稱 *NPTII*】 基因 *npt II*。使氨比西林 (Ampicillin) 失效的 *bla* 基因。第二種為對廣效性殺草劑具抗性的基因，例如可抗固殺草 (Glufosinate) 及畢拉草 (Bialaphos) 的 *bar* 基因與 *pat* 基因，及可抗嘉磷塞 (Glyphosate) 的 *epsps* 基因。抗殺草劑的基因有時也是基改作物設計時的目標基因。第三種為代謝性基因，殖入的基因與植物的代謝相關。第四種為報告基因。報告基因是為了監控基因是否成功地完成移轉至受體基因組上而設計的，報告基因通常會導致受體宿主內增加一種酵素活性，而這酵素活性原本是不存在於受體宿主內的。對於比較不容易轉移基因的植物而言，加入報告基因就有助於基因移轉的確認，目前較常用的報告基因是 *uidA* (*gus*) 及 *gfp*。

依經濟合作暨開發組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 的報告指出最常用的標示基因前三名為 *aphA2(nptII)*，次為 *bar*，其次為 *pat*。其中又以 *aphA2* 基因最常用於基改作物上，約有 84% 基因植物使用此選擇基因 (Flavell *et al.*, 1992)，WHO 的報告則指出基改植物中約有 70% 會是使用 *npt II* 基因作為選擇基因的 (de Vries and Wackernagel, 1998)。Hemmer (1997) 報告指出已核准的基改作物 28 種中使用 *nptII* 基因的有 17 種 (60.7%)，使用 35S 啟動子基因的有 22 種 (78.6%)，使用 *nos* 終結子基因有 16 種 (57.1%)。而 *nptII* 基因也被証實可有效篩檢轉入卡那黴素抗藥性基因的基改細胞 (Nielsen *et al.*, 1997)。

nptII 基因成為最常用的抗藥性選擇基因，最主要的條件是這個抗藥性基因在環境中有的背景值很低，在土壤本身原生的族群中不太可能發現 *nptII* 基因序列及 Tn5 DNA 序列。在 Smalla 等人的研究報告中 (1993) 亦指出，在不同棲息環境中，篩選出對卡那黴素具抗藥性 (Kan-R) 的革蘭氏陰性菌株共有

355 株，其中來自荷蘭與德國的農地土壤中的抗藥性細菌 150 株均不含 *nptII* 基因。此結果顯示 *nptII* 基因在土壤環境中的零背景值。

抗藥性基因水平移轉

在環境中基因水平移轉有下列四種：(1) 經由植物花粉轉入另一種植物，(2) 由微生物轉入不同種類微生物，(3) 微生物轉入植物，及(4) 由植物或動物轉入微生物。其中轉型的機制對植物 DNA 進入微生物，特別是細菌很重要。例如枯草桿菌及單棲氮固菌可吸收與其本身 DNA 序列無關的 DNA 碎片 (Lorenz and Wackernagel, 1994)。

對於基改作物使用的抗藥性基因 *bla*，*nptII* 及 *aacCI* 水平移轉至細菌的研究自 1995 年開始。雖然基因移轉頻率低 (Gebhard and Smalla, 1998; Nielsen *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2005)。然而在一般土中微生物的含量約為 10^7 /克土，如移轉頻率為 10^{-12} ，則在每克土中就可能有的 10^{-5} 轉型成功的微生物，如移轉頻率為 10^{-6} ，則在每克土中，就可能有的 10^1 轉型成功的微生物。再經過一個演化時間後，就可能對環境產生了影響，這也是與毒性表現不同的地方。在評估對環境安全性時，時間單位需要很長。而評估食用安全性時，可在一定時間內得到對特定生物是否具有毒性的資料，再依此推估對人類的毒性。

基改植物的管理目前可分成三個階段，第一個階段是基改植物本身的遺傳特性，表現與食用安全。第二個階段是基改植物對環境的安全性。第三個階段是產品上市後的安全追蹤 (食用安全與環境安全)。藥試所自 2002 年即開始進行抗藥性轉基因在環境中的安全性評估試驗 (圖三)，目前試驗仍在進行。

基改植物對土壤微生物的生態影響

自 1999 年以來，有一些報告指出基改植物可對土壤微生態造成一些影響，僅以數例來說明基改植物對土壤群落變化的影響。

1. 凝集素：例如 Griffiths 等人 (2000) 研究可生產凝集素 Lectins (Con A)，及 Agglutinin (GNA) 的基改馬鈴薯對土壤群落的影響調查，顯示基改馬鈴薯可以對根圈微生物群落的生理特性造成改變。但當基改馬鈴薯收穫後，此種影響就消失了。
2. 抗嘉磷塞的基改油菜：Siciliano 及 Germida 等人 (1998) 報告指出抗嘉磷塞的基改油菜其根圈微生物群落與非基改油菜的群落有不同。
3. 基改煙草：Donegan 等人 (1997) 報告指出基改煙草的葉子會影響土壤中線蟲的族群密度，此表示基改煙草與非基改煙草在碳含量組成上就可能有不同。因葉子成份不同，土壤微生物就發展了可利用該特殊組成的微生物群落，導致落葉影響了土壤微生物的變化，進而造成線蟲族群的變化。

4. 幾丁質基改植物：含幾丁質酵素之基改煙草對土壤病原真菌與共生真菌的影響(Vierheilig et al., 1993)：Vierheilig 等人研究發現基改煙草(*Nicotiana sylvestris*)轉入來自煙草(*Nicotiana tabacum*)的幾丁質酵素，可降低根系病菌 *Rhizoctonia solani* 對煙草的致病力，但根系共生菌 *Glomus mosseae* 仍正常形成菌落而無影響。
5. 生產 Opine 的基改植物 *Lotus corniculatus* (Oger, P. et al., 1997)：以 7 種選擇性培養基來調查比較生長在種植基改植物與非基改植物土壤細菌的變化，結果發現在基改植物根區附近有較多的 Opine 利用細菌，顯示 Opine 基改作物確可影響土中細菌族群。

但由於實驗觀察的時間也很短，因此對於連續大量長期種植所造成的影響就不清楚了。

加拿大對基改玉米之環境安全評估項目中則要求對土壤微生物中之病原微生物與有益微生物要進行風險評估，其中土壤病原菌則列出 11 種指標生物作為調查對象。例如 *Gibberella zeae*, *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Setosphaeria turcicum*, *Ustilago maydis*, *Colletotrichum graminicola*, *Puccinia sorghi*, *Sphacelotheca reiliana*, *Erwinia stewartii*, 及 *Pseudomonas syringae* 等。對土壤病原菌及有益菌的分析調查，可因基改植物的特性，生長溫度與農地的環境不同而有改變。不同國家可設定不同的指標微生物來進行環境生態的影響調查，這不能僅依基改植物生產國的條件來進行。如期望產品外銷，則要依產品輸入國家的標準來執行，美國雖很反對這項建議，並在 WTO 中指出是一種貿易障礙，但最後也必需配合尊重各國的主權與自主性。

基改植物對台灣農地微生物相影響之調查

種植抗輪點病毒(PRSV)之基改木瓜及同源性非基改木瓜之農試所土壤，分析溶磷細菌、蛋白分解菌、總細菌與真菌族群數目之結果顯示，隨種植時間(10-38 星期)而互有消長(林俊義等人, 2004)。在北溝試驗土壤之進行纖維分解細菌之影響，初步分析在種植同源性非基改木瓜之土壤中可多得到兩種細菌。

在種植轉乳鐵蛋白基改水稻之農試所試驗田土壤上亦出現相同的微生物消長現象(6-18 星期)。在種植轉殖植酸酵素基改馬鈴薯之農試所試驗田土壤中發現溶磷細菌、固氮細菌、總細菌與真菌族群數皆比種植非轉基改馬鈴薯者少(20 星期)。而基改青花椰菜不同品種之土壤中族群數目和種植非基改青花菜的土壤也有差異(16 星期)，但經統計後差異均為不顯著。

基改玉米由於進口時為具有生命力之完整顆粒，因此有可能因非故意性散佈或農友特意栽種而發育成株，經以選擇性培養基比較種植基改玉米及非基改

玉米三星期後對土壤中之氯化菌、硝化菌、及硫化菌菌落之影響，顯示在氯化菌、硝化菌，及硫化菌菌落外觀上無差異（表三）。

基改植物毒性釋出之分析

生物技術是一個新興的科技，且研發成果多樣化，使得政府管理的措施不易配合。美國環保署初期比照農藥管理的方式進行，但隨即面臨到一個問題，就是不易得到足量的有效成份進行各項安全測試。例如農藥是一個簡單明確的分子，可大量取得。而基改植物的有效成份則是一種蛋白質，以微量方式存在植物體內，例如 B.t.k.HD-1 蛋白在每克基改作物上的含量約為 11.4 μg (11.4 ppm, w/w)，Bt Cry1F 約在 22.4 μg 以下。因此不易得到足量純化的蛋白質進行與農藥般相同規格的毒性安全與環境安全測試（表四）。

一般基改蛋白在 1 克植株之含量約為 20 μg ，約佔所有蛋白的 0.01%。以農桿菌 *Agrobacterium* sp. Strain CP4 產生的 EPSPS 蛋白之胺基酸序列與其他生物產生的 EPSPSs 蛋白胺基酸序列與枯草桿菌最接近（100%，一般性+相似性），其次為酵母菌（84%），大腸桿菌（78%），大豆（77%），玉米（73%）。因此實質等同應用在基改蛋白質及其胺基酸也會引起一些爭議。有人認為平常就吃大豆，玉米，因此對人沒有傷害性（Hazard），如無傷害性風險也就不存在了。對老鼠進行口服急毒性測試，以最高劑量進行時（572mg/kg，自微生物純化之 CP4 EPSPS 蛋白），也不見效果，因此無效劑量 NOEL (No effect level) 定為 572mg/kg (Harrison 等人，1996)。

基改植物之毒性風險評估較農藥之毒性風險評估困難，因基改植物之蛋白以微量存在植物體，純化不易，而農藥則結構簡單，且主要為外來之化學合成物。對於農藥毒性風險評估一般是以下列方式估算

$$\text{風險} = \text{毒性} \times \text{曝露劑量} \text{ 或 } = \text{傷害} \times \text{可能性} \times \text{結果}$$

其中毒性數值可由動物實驗中得到無效劑量 NOEL 或 NOAEL (No observed adverse effect level)，再由此得到 RfD 值 (Reference dose)，與 PAD 值 (Population adjusted dose)。曝露劑量則可藉由在食物中的農藥殘留來計算消耗量 (Residue consumption)。但是由於目前的毒性測試方法得不到基改植物最低的有害劑量 (LOAEL, Lowest observed adverse effect level)，及無效或無害劑量 (NOEL 或 NOAEL)，以致經常以動物試驗之最大劑量作為無效或無害劑量 (NOEL 或 NOAEL) 之估算值。例如對 Btk HD-1 最大口服急毒急性測試劑量為 4000mg/kg，測試結果與對照組無差異，因此無效劑量 (NOEL 或 NOAEL) 定為 4000mg/kg。由此可知生物技術的食物安全性風險評估不易執行。再加上有時標準的測試動物也會在個體上出現差異，造成結果的不同，此種偽真的現象 (False positive) 造成在毒性 (Toxicity) 或傷害性 (Hazard) 上

判斷的困難，也常造成政府管理單位、學者專家與生技公司間的爭議。

如以微生物方法產製以得到大量的表現蛋白，又不一定為各方面接受。兩者蛋白是相同 (Identical)，相近 (實質等同, Substantially equivalent)，或不同？例如某公司生產的基改作物在進行昆蟲毒性測試時發現，以兩種不同來源之毒蛋白進行對昆蟲的急毒性測試時，出現二組結果。對昆蟲 A, B, C 而言，兩種來源之蛋白毒性相同，但對昆蟲 D, E 而言卻有相差近 3 倍的急毒性值(表五)。這結果顯示，對 A, B, C 三種昆蟲而言，來自微生物增量的毒蛋白與來自基改植物的毒蛋白是相同的，但對 DE 兩種昆蟲而言是不同的，為何昆蟲對這些毒蛋白的反應有不同？但如把急毒性由相對毒性來看，則昆蟲對兩種不同來源之急毒性反應比較又是相同的，致死性強度均為 $A > B \approx C > D > E$ 。因此以毒性反應比較來看是等同的，但是以毒性劑量來看，對 DE 而言就不等同了。因此引申了問題，即不同來源的毒蛋白對人類或其他哺乳類的毒性測試要如何知道結果之正確性？以免這些差異造成基改植物管理上的不確定性。

因此在基改植物管理上的有效成份 (基改蛋白) 的確認在國際上形成了很多的討論，也同時由於有不同的意見，導致對隨後的食用安全，環境安全的評估也有了不同的結論。有人接受，有人存疑。以對管理制度上有多多年經驗的農藥為例，有些農藥也是有相同的爭議。例如 DDT，有人認為對人類的貢獻很大，但更多的人認為 DDT 對為環境生態的污染性要更注意 (表六)，由此可知安全性評估不是件容易的事，角度不同看法就不同。有些農藥的禁用也是在使用了 51 年後才找到適當的指標項目 (Indicator) 予以禁用 (表六)。

結 語

基改植物的管理自第一個基改蕃茄在 1991 年 8 月 12 日向美國藥物食品檢驗所 (USFDA) 申請許可使用於食品後，迄今美國的基改作物的管理經驗進入第 14 年，與農藥登記審查的近 60 年經驗相比 (1947—2005, 59 年) 仍有許多需改善的。因此藉由一件一件的個案 (Case by case) 累積經驗，及邊作邊修改是必然的。

例如對食用安全性之評估項目中過敏原的鑑定，早期是以在人工消化液中穩定的時間長短作為過敏原的依據。但此原則對某些生技公司的產品不利，經再討論後，則改以更多的測試項目來評估過敏性。早期環境安全的評估著重在基改蛋白在環境中之宿命，現在則增加基改基因在環境的宿命調查。早期的食用安全，有些僅對成熟的果肉進行分析，現在則因一些國家會作為生食沙拉的材料，因此在這些國家就又增加了對於青果中一些毒性物質的分析，如此使得特定成份分析項目往往超過 86 個以上。

對環境安全性之評估項目，在評估環境風險與生態毒性時就又複雜一些，因不容易有廣為接受的指標生物。在美國選定的指標生物，往往到了第二個國家就會被要求增減或替換指標生物，而且會被要求需在當地重作環境安全評估，導致申請的時間延長，經費大幅增加（表七）。

台灣對於基改植物的管理才剛起步，在可預見的將來仍需投入更多人力，更高的經費（表七），及工作項目。但只要持續去做，終將會整理出比現在更好的指標項目群(Indicators)，及更適當的評估技術與更為國內外接受的結論。如此台灣所生產的基改產品才有機會外銷出去，否則以台灣有限的農地與市場，要完全承接自身快速發展的基因改造植物與產品會有實際上的困難。

基改生物的安全管理本身是一個技術應用，工作量大，學術價值不易突出的服務工作。國際上對基改作物進行的各種測試也會因時、因地、因植物、因基因而調整。指標項目調查的結論也經常是基改與非基改間無顯著差異；有改變，但為暫時性；或此改變無顯著差異。參與執行這項工作的人員要先有這種認知。但隨著指標項目群的增加，累積的經驗愈多，基改植物的安全性試驗與評估結論也就會愈完整。

參考文獻

- 林俊義、劉邦基、王清玲、簡宣裕、石信德、陳邦華。2004。抗輪點病毒 (PRSV) 基因轉殖木瓜對生態影響及環境安全之評估。中華農學會報 5(4) : 374-392。
- Cheng, Y.H., Yang, J.S. and Yeh, S.D. (1996) Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum. *Plant Cell Reports*. 16:127-132.
- Lo, Chi-Chu, Chen, Shu-Chuan, Wang, Chi-Shiou, Chen, Hui-Lien. (2005) Evaluation of the transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 by transgenic papaya DNA containing functional *nptII* gene in soil microcosms. *Annals of Microbiol* (Accepted).
- de Vries, J., and Weackernagel, W. (1998) Detection of *npt II* (kanamycin resistance) gene in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol. Gen. Genet.* 257:606-613.
- Donegan, K.K.; Seidler, R.J.; Fieland, V.J.; Schaller, D.L.; Palm, C.J.; Ganio, L.M.; Cardwell, D.M.; Steinberger, Y. (1997) Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: persistence of the proteinase

- inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations. *J. Appl. Ecol.* 34:767-777.
- Flavell, R.B., Dart, E., Fuchs, R.L. and Fraley, R.T. (1992) selectable marker genes: safe for plants? *BioTech.* 10:141-4.
- Gebhard, F. and Smalla, K. (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1550-1554.
- Gebhard, F., and Smalla, K. (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.
- Griffiths, B.S., Geoghegan, I.E.; Robertson, W.M. (2000) Testing genetically engineered potato, producing lectins GNA and Con A, on montaaget soil organisms and proasses. *J. Appl. Ecol.* 37:159-170.
- Harrison, L., Bailey, M., Naylor, M., Ream, J., Hammond. B., Nida, D., Burnette, B., Nickson, T., Mitsky, T., Taylor, M., Fuchs, R., and Padgette, S. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutr.* 126:728-740.
- Lorenz, M.G. and Wackernagel, W. (1994a) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58:563-602.
- Meier, P. and Wackernagel, W. (2003) Monitoring the spread of recombinant DNA from field plots with transgenic sugar beet plants by PCR and natural transformation of *Pseudomonas stutzeri*. *Transgenic Res.* 12:293-304.
- Myhr A.I. and Traavik T. (2003) Genetically modified (GM) crops: precautionary science and conflicts of interests. *J. of Agricultural and Environmental Ethics.* 16:227-247.
- Nap, J-P., Bijvoer, J., and Stiekema, W. J. (1992) Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgen. Res.* 1:239-249.
- Nielsen, K. M., Bones, A. M., and van Elsas, J. D. (1997) Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3972-3977.
- Oger, P., Petit, A., Dessaux, Y. (1997) Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature biotechnology.* 15:369-372.
- Siciliano, S.D., Theoret, C.M., De Freitas, J.R., Hucl, P.J., Germida, J.J. (1998) Differences in the microbial communities associated with the roots of different

- cultivars of canola and wheat. *Can. J. of Microbiol.* 44:844-851.
- Smalla, K., van Overbeek, L.S., Pukall, R., and van Elsas, J.D. (1993) Prevalence of *npt II* and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 13:47-58.
- Vierheilig, H., Alt, M., Neuhaus, J., Biller, T., Wiemken, A. (1993) Colonization of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants, expressing different forms of *Nicotiana tabacum* chitinase by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:261-264.
- 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.

表一、基改作物中使用的抗藥性標示基因及其作用的抗生素^a

Table 1. Antibiotic resistance marker genes used in genetically modified plants, and the related antibiotic used in human health.

抗藥性基因	抗生素	用途
<i>nptII</i>	Kanamycin	全身性發炎，為小兒科用藥，毒性較 Neomycin 低很多，作為 Gentamycin 替代藥。也使用於嚴重性的系統感染，且其他抗生素無效時。
	Neomycin	第一線用藥，作用與 Kanamycin 相同，但毒性較強，亦為畜牧用藥。
<i>bla</i>	Ampicillin	第一線用藥，廣泛用於呼吸道，胃腸道，尿道，敗血症，細菌性腦膜炎。亦為畜牧用藥。

^a：基改作物含抗藥性標示基因作可向美國申請許可，但向歐盟申請許可會有困難。

表二、用於基因轉殖植物的選擇基因及報告基因

Table 2. Selected marker genes and reporter genes used in transgenic plants

基因	酵素	選擇藥劑或物質
1. 選擇基因：抗生素抗性		
<i>-aphA1 (npt I)</i>	Aminoglycoside-3'-phosphotransferase,	Kanamycin 及其他胺基配醣體 (Aminoglycosides)。
<i>aphA2 (npt II)</i>	APH(3')I,II,及 III, NPTI, II,及 III	
<i>aphA3 (npt III)</i>		
<i>-aacC1</i>	Gentamicin-acetyltransferase, AAC(3')I, III 及 IV, AAC(6')	Gentamicin 及其他胺基配醣體
<i>aacC3</i>		
<i>aacA (6'gat)</i>		
<i>-hpt (aphIV)</i>	Hygromycin phosphotransferase, HPT	Hygromycin B (主要為動物用藥)
<i>-spt</i>	Streptomycin phosphotransferase, SPT	Streptomycin
<i>-aadA</i>	Aminoglycoside-3''-adenyltransferase, AAD(3'')	Streptomycin Spectinomycin
<i>-ble</i>	與藥物接合的蛋白質	Bleomycin, Phleomycin
<i>-dhfr</i>	Dihydrofolate reductase, DHFR	Methotrexate, 抗葉酸藥物
<i>-bla</i>	β -lactamase	Ampicillin (Bt11)
<i>-bsr</i>	Blasticidin S deaminase, BSR	Blasticidin S
<i>-sulf</i>	Dihydropteroate synthase, DHPS	Sulfonamides
2. 選擇基因：除草劑抗性		
<i>-bar</i>	Phosphinothricin-N-acetyltransferase,	Glufosinate (固殺草), bialaphos (畢拉草), phosphinothricin (Basta, Finale)
<i>pat</i>	PAT 來自 <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	

<i>-epsps</i> <i>epsps 5</i>	來自植物的 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS	Glyphosate (嘉磷塞)
<i>-aroA</i> , <i>aroA(sm1)</i> , and <i>aroA(cp4)</i>	來自微生物的 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS	Glyphosate (嘉磷塞)
<i>-gox</i> <i>bxn</i>	Glyphosate oxidoreductase, GOX Bromoxynil nitrilase, BXN	Glyphosate (嘉磷塞) Bromoxynil
<i>-tfdA</i>	2,4-Dichlorophenoxyacetate monooxygenase	2,4-D
<i>-als (ahas)</i> , <i>csr1-1,-2</i> , <i>suRB-S4-hra</i>	Acetolactate synthase, ALS Acetohydroxy acid synthase, AHAS	Sulfonylureas Imidazolines Triazolpyrimidines Pyrimidylbenzoates
3. 選擇基因：代謝		
<i>Tdc</i>	Tryptophan decarboxylase, TDC	4-Methyltryptophan
<i>dhps</i> , <i>dhps-r1</i>	Dihydrodopicolinate synthase, DHPS, DHDPS	S-Aminoethyl-L-cysteine(A EC)
<i>ak</i>	Aspartate kinase, AK	Threonin 及 Lysin
<i>badh</i>	Betaine aldehyde dehydrogenase, BADH	Betaine aldehyde
<i>manA</i>	6-Phosphomannose isomerase, PMI	Mannose
<i>aprt</i>	Adenine phosphoribosyltransferase, APRT	Azaserine, alanosine, 及 Adenine
4. 報告基因		
<i>uidA (gus)</i>	β -Glucuronidase, GUS	β -Glucuronides
<i>luc</i>	Firefly luciferase, LUC	Luciferin, ATP 及 氧
<i>luxA</i> and <i>luxB</i>	細菌性的 Luciferase, LUC	Decanal, FMNH ₂ 及 氧
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase, β -GAL	Galactosides
<i>cat</i>	Chloramphenicol acetyltransferase, CAT	Chloramphenicol
<i>gfp</i>	綠色螢光蛋白質 (Green fluorescent protein, GFP)	需氧

表三、藥試所與農試所對基改作物於土壤微生物的生態影響調查

Table 3. Investigation the influences of transgenic crops in soil microorganisms by TACTRI and TARI

基改植物	對土壤微生物的影響	執行單位
木瓜	<p>種植基改木瓜及非基改木瓜土壤之溶磷細菌，固氮細菌，及蛋白分解細菌族群數於試驗期間變動不大，均無顯著差異。而種植基改木瓜土壤的總真菌數，總細菌數比種植非基改木瓜之土壤總菌數低。</p> <p>以 <i>Acinetobacter</i> sp. BD413(pFG4ΔnptII) 測試基改木瓜抗藥性基因之水平移轉，結果顯示在土壤微生態試驗中無抗藥性基因移轉現象。</p>	農試所
水稻	<p>種植含乳鐵蛋白基因之基改水稻土壤於試驗第 6 週時，溶磷細菌、固氮細菌族群數較種植非基改水稻者少。於第 12 週時，固氮細菌族群數則較非基改水稻者多；在第 18 週時固氮細菌、溶磷細菌及蛋白分解細菌族群數較非基改水稻者少。</p>	農試所
青花椰菜	<p>基改青花椰菜及非基改青花椰菜對土壤之溶磷酸鈣菌、蛋白質分解菌、游離固氮細菌、總真菌與細菌族群數之影響並不顯著。</p>	農試所
馬鈴薯	<p>種植非基改馬鈴薯之土壤之溶磷細菌、游離固氮細菌及真菌族群數皆高於含植酸酵素基因之基改馬鈴薯者。種植基改馬鈴薯土壤之蛋白質分解菌族群數與總細菌族群數多於種植非基改馬鈴薯土壤者，但差異均不顯著。</p>	農試所
玉米	<p>種植非基改玉米土壤及基改玉米土壤，經數種不同培養基培養比較，發現主要菌落均為乳白色不透明及黃色不透明細菌。而亞硝酸菌，氨化菌，硫化菌，及纖維素分解菌等菌相在兩種土壤中無明顯差異。其中種植基改玉米之土壤可得到細菌 <i>Leifsonia poae</i>, <i>Chryseobacterium gleam</i> 及 <i>Paenibacillus</i> sp. (新菌種)，而種植非基改玉米之土壤，可得到 <i>Chryseobacterium</i> sp. (新品種)。</p>	藥試所

表四、化學農藥與基改蛋白在生物安全測試的比較

Table 4. Comparisons between pesticides and transgenic proteins used in biosafety test

項 目	化 學 農 藥	基 改 植 物 表 現 蛋 白
1. 組成	物質簡單，明確，可大量取得	基改蛋白微量存在植物體內，不易取得
2. 高劑量	高劑量可造成效應	最大劑量不易明確，且未必與效應相關
3. 吸收量	容易估算	不易估算
4. 急毒性	容易判斷毒性程度	不易產生或判斷
5. 營養	與營養無關	與營養相關
6. 代謝途徑	途徑特殊容易了解	複雜
7. 殘留	可以，如化學農藥為非自然物	不易，因表現蛋白與自然蛋白理化性接近。
8. 因果關係	相當明確	複雜

表五、微生物產製的蛋白與基改植物表現的基改蛋白對昆蟲之急毒性(ng/cm^2)

Table 5. Acute toxicity of insects treated with microbial derived protein and punified transgenic plant expressed protein

昆 蟲	來 源	
	微生物產製蛋白	基改植物表現蛋白
A	0.5	0.5
B	2.0	2.0
C	2.5	2.5
D	50	15 (最大劑量)
E	70	25

(本表數據經修改)

表六、部份農藥的使用與販售在台灣禁用之時間(農委會)

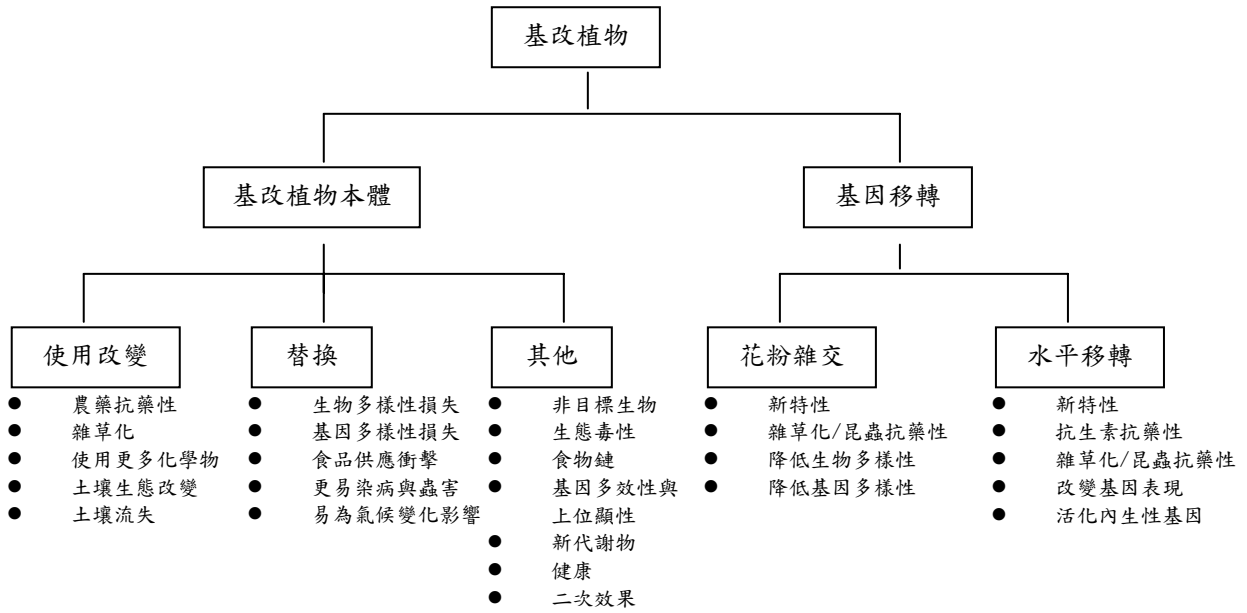
Table 6. List of some selected pesticides whose consumption and sale have been banned in Taiwan (Council of Agriculture)

農 藥	使用-禁用 合計	禁用指 標 項 目
滴滴涕 (DDT)	1944-1972 28	長效性環境污染
克氯苯 (Chlorobenzilate)	1952-1983 31	致癌性
亞拉生長素 (Daminozide)	1962-1990 28	致腫瘤性
巴拉松 (Parathion)	1946-1997 51	極劇毒，致癌性 C 級
一品松 (EPN)	1949-1998 49	極劇毒，遲發性神經毒

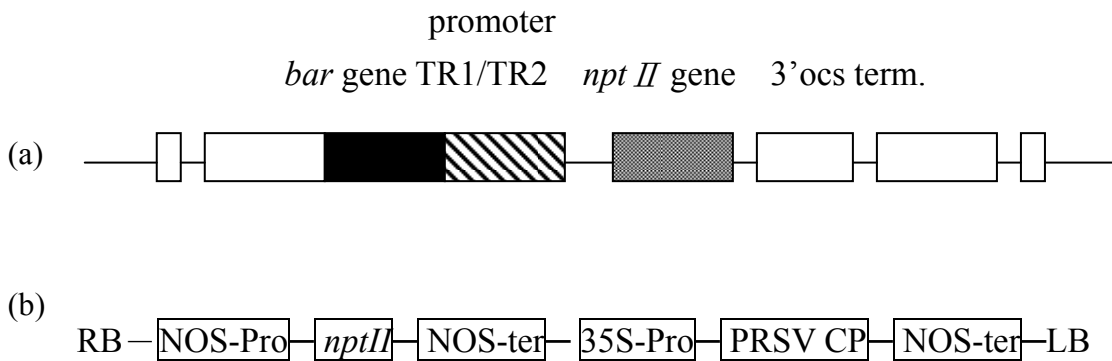
表七、美國 EPA 對基改植物的登記之費用估算

Table 7. Cost for transgenic plant registration estimated by USEPA

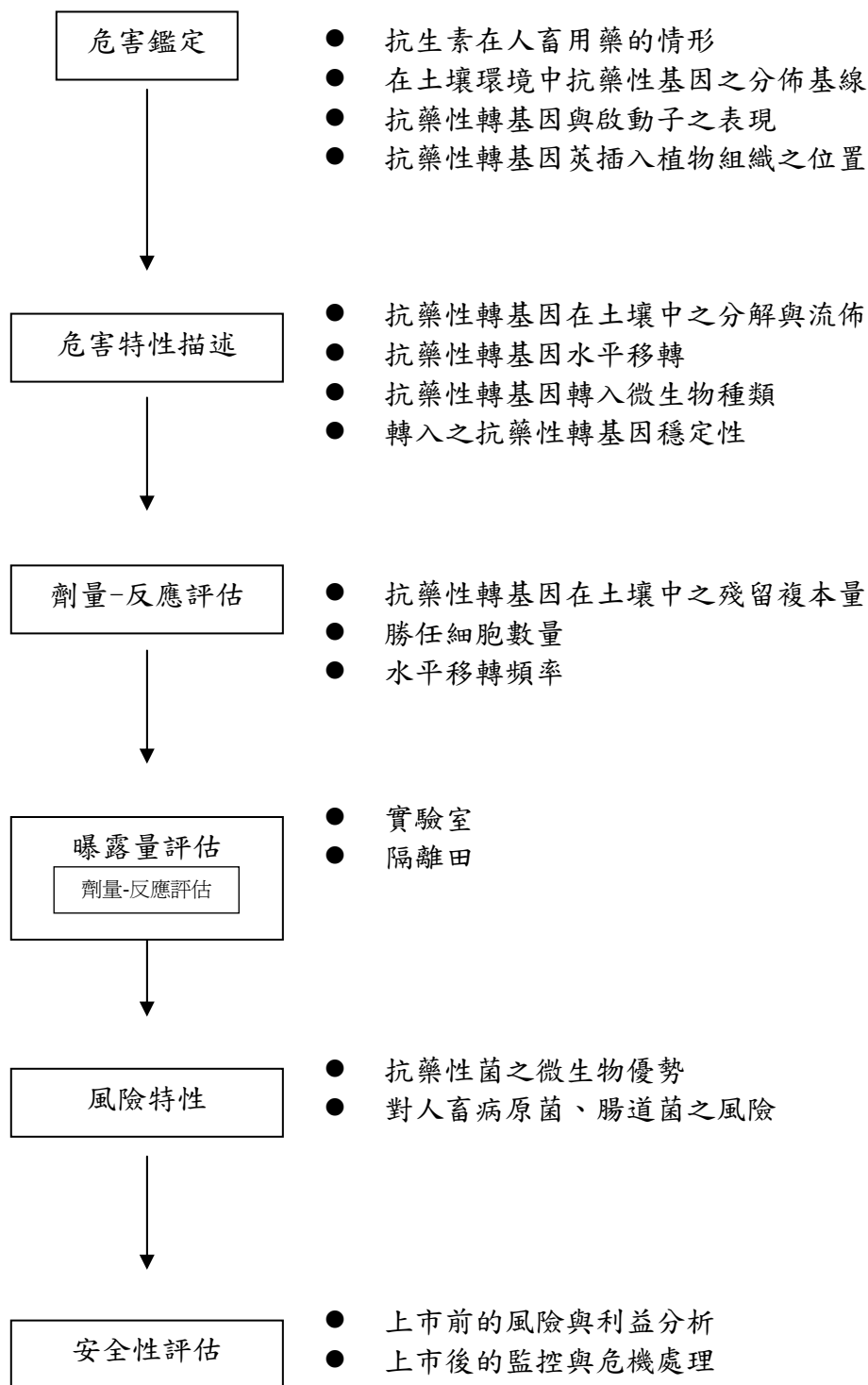
項 目	估算美金	台幣 (1 : 32)
基本資料 (殘留，宿命，急毒性，消化等)	20,000	640,000
環境宿命	735,000	23,520,000
人類安全與哺乳類急毒性	1,667,000	53,344,000
非目標生物	411,000	13,152,000
合 計	2,833,000	90,656,000



圖一、基改植物的使用與釋放對生態的可能影響 (Myhr and Traavik, 2003)
 Fig. 1. Potential ecological effects from transgenic plants use and release (Myhr and Traavik, 2003)



圖二、基改甜菜 (a) 及基改木瓜 (b) 基因構築簡圖。
 Fig. 2. Gene constructs of transgenic sugar beet (a) and papaya (b).



圖三、藥試所對抗藥性基因在環境之安全性評估流程

Fig. 3. Environmental safety assessment of antibiotic resistance genes by TACTRI.

Influence in Soil Microorganisms and Toxic Effects from Transgenic Plants

Chi-Chu Lo^{*1}, Chiuan-Yuh Chien², Ming-Huei Jhang², Ching-Liang Liao²,
Shu-Chuan Chen¹

Abstract

Transgenic plant materials and transgenic DNA can be released into the environment from agricultural practices, from senescent or rotting plant material, or from pollens. The persistence of transgenic DNA and transgenic proteins in soil have raised many concerns on potential gene transfer, influence on soil ecology, toxicity to animal and human health, and to non-target organisms. Therefore, this report is focused on the possible influence of transgenic plants on soil microorganisms, and toxicity (human, and insects), some data from Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute (TACTRI) and Taiwan Agricultural Research Institute (TARI) were reported.

Key words: transgenic crops, rice, potato, cauliflower, corn, horizontal gene transfer, microorganism community, toxicity

* (Corresponding author; Phone : +886-4-23302101 ext. 825 ; Fax : +886-4-23323073 ;
E-mail : lcc@tactri.gov.tw)

¹Division of Biopesticide, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute.

² Division of Agricultural Chemistry, Agricultural Research Institute.