

台灣市售飼料玉米抗固殺草基因特性及檢測利用之探討

袁秋英、謝玉貞、蔣慕琰

行政院農業委員會 農業藥物毒物試驗所

摘要

收集一般雜糧店販售之飼料玉米，測定其種子發芽及幼株對固殺草之反應，並由抗性植株葉片中分離核酸，探討抗藥基因之特性。本研究以市售玉米於溫室內播種，於植株幼苗期噴施固殺草 0.9 kg/ha，施藥後 3 - 4 日，多數玉米植株呈現傷害徵狀，並於 2 週內枯死，12 組測定樣品中均有抗藥性之植株，其所佔比率介於 1 - 14.7% 之間，應為抗固殺草之轉基因玉米。再以固殺草次致死劑量 0.4 kg/ha 處理植株，區別感抗植株後，進一步抽取玉米幼葉之 genomic DNA，由 CaMV 35S promoter、terminator 及 NOS terminator DNA 序列設計引子，進行聚合酵素鏈鎖反應，結果具抗藥之疑似轉基因玉米可分別擴增約 1.0、1.2 及 1.35 kb 的 DNA 片段，非抗藥植株則無此等 DNA 片段。PCR 產物經接合、轉型反應及定序，比對核酸及胺基酸序列，顯示此 3 組 PCR 產物由 35S promoter、IVS2、*pat* 基因、*bar* 基因、35S terminator 或 NOS terminator DNA 等片段組成，顯示此 3 種玉米為似抗固殺草之 T25、Event176 及 Bt11 品系。經由專一性引子之設計及 multiplex PCR 分析結果，可分別檢出 6、5 及 14 株抗固殺草玉米為似 T25、Event 176 及 Bt11 品系。市售之玉米粒、玉米仁、玉米片及玉米餅乾等食品以 multiplex PCR 分析，可檢出含抗固殺草基因之玉米物料。

(關鍵詞：基因改造生物體、玉米、固殺草抗藥性、*bar* 基因、*pat* 基因、複合-聚合酵素鏈鎖反應)

緒言

2002 年全球基因改造生物體 (Genetically Modified Organism, GMO) 之栽種面積已達五千八百萬公頃，大豆、玉米、棉花及油菜為基因改造之主要作物。此等栽種中之基因產品以抗殺草劑者佔 75%，其餘者為殖入 Bt 基因之抗蟲作物^(9,10)。目前主要上市之抗固殺草玉米有 9 種品系⁽¹¹⁾，其中 Bt11、Event 176、T25、TC1507、DBT418 及 DLL25 等 6 種品系，皆已於台灣衛生署申請食品安全審查，前三者已核准，後三者仍於資料審查中⁽⁵⁾。固殺草 (glufosinate-ammonium) 為臺灣重要之非選擇性萌後除草劑，於 1994 年開始登記使用於甘藍田、西瓜田、柑桔園、香蕉園、葡萄園及非耕地，可防除多種雜草⁽⁴⁾。固殺草之主要作用機制為其 phosphinothricin (PPT) 成份可抑制植體內 glutamine synthetase (GS ; EC 6.3.1.2) 酵素活性，使得 glutamate 無法與 ammonia 結合形成 glutamine，造成 ammonia 大量累積，毒害植物細胞^(8,15)，達成防除雜草之目的。抗固殺草轉基因玉米為 Syngenta、Bayer、DuPont 及 Monsanto 等

公司研發之基因工程產品，分別轉殖 *Streptomyces viridochromogenes* 之 *pat* 或 *S. hygroscopicus* 之 *bar* 基因於玉米植株，此二基因皆可編碼為分解固殺草 PPT 成份之 phosphinothricin N-acetyl transferase (PAT) 酵素，使得轉基因玉米植株，噴施固殺草後仍可正常生長，無任何傷害徵狀⁽¹¹⁾。

臺灣市售飼料及雜糧用玉米多為進口，2002 年進口之玉米約為 500 萬公噸，其中 94% 來自美國⁽¹⁾，有多少進口玉米為基因改造產品，尚無資料可查。此等基因改造產品對於人畜健康及生態環境所可能造成之影響及風險，是目前備受關切的問題。基因改造作物之栽種，對單一作物栽培體系直接衝擊之測定及評估較易執行。間接性之衝擊如生態環境方面，可能由於基因外流，近親種雜交，造成優勢品系野草化、生物物種單一化、非目標生物之毒害及食物鏈破壞等問題；食品、飼料用基因改造產品之安全問題方面，可能存在表現蛋白質、抗生素抗性基因之毒性及過敏性等問題，不易於短期內測定及預估^(13,23)。因此，基因改造作物轉基因特性之研究，及其相關產品標準鑑定方法及標示制度之建立，為當前進口農產品檢測之重要課題。由於目前之轉基因大豆及玉米等作物大部份利用 35S 啟動子、NOS 終結子及標的基因構築者，文獻所見之 DNA 定性分析，均以 35S 啟動子及 NOS 終結子設計引子，先進行篩選式 PCR 檢測，再以標的基因設計引子，進一步以 PCR 技術確認之^(12,16,18,21)，行政院衛生署藥檢局已由文獻之轉基因片段為引子，進行 PCR 測定之研究^(6,17)。台灣進口大豆抗嘉磷塞除草劑基因特性之研究，本所亦已建立 PCR 檢測與鑑定方法^(2,3)。由於抗固殺草玉米各品系構築之轉基因組成皆不相同，易造成檢測結果之誤判，因此本研究針對抗固殺草轉基因玉米進行抗藥特性、*bar* 及 *pat* 等轉基因定序、multiplex PCR 鑑定方法之建立及進而專一性檢測玉米及其相關之加工產品。

材料與方法

藥品及儀器

一般試劑藥品購自德國 Merck 公司及美國 Sigma 公司，固殺草[glufosinate, ammonium-DL-homoalanin-4-yl- (methyl) phosphinate, 18.02% SL]購自台灣巴斯夫公司。基因組 DNA 抽取套組 DNeasy Plant Maxi kit 及 multiplex PCR kit 購自德國 Qiagen 公司，plasmid DNA 抽取套組 miniprep system kit、DNA 純化回收套組 gel extraction kit 及 PCR 試劑購自台灣 Viogene 公司，DNA marker(1 kb plus DNA Ladder) 購自台灣吉恩馬克公司，引子由臺灣明欣公司合成，DNA 載體(pGEM-T Easy Vector kit) 購自美國 Promega 公司。DNA 定序試藥 (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit) 購自美國 PE Applied Biosystems 公司。PCR 儀器 Gene Amp PCR system 2400 及 DNA 定序儀 ABI PRISM 377-96 DNA Sequencer 為美國 Perkin-Elmer 公司產品。

玉米植株施用固殺草之藥劑反應

2003 年 1 月間於臺灣中部地區雜糧零售店及超市，收集玉米種子 12 組樣品，以

甜玉米(華珍品系)為對照植株,各樣品取 150 粒種子,播種於含培養土之育苗盤,放置於溫室培養,澆水保持濕潤,待植株發育至 3 - 4 葉,噴施固殺草 0.9 kg/ha,水量為 600 l/ha。施藥後 3 - 7 日,記錄植株萌芽率、外觀傷害徵狀及正常生長植株之株數。活體幼株在溫室測定後即銷毀。

抗固殺草玉米材料之製備與篩選

取用前述收集之玉米種子。培育至 3 - 4 葉,噴施低劑量固殺草(0.4 kg/ha),施藥後 3 - 7 日,分別種植幼葉外觀傷害及正常生長植株,收集非抗藥性及抗藥性植株之葉片,進行轉基因特性之研究。

聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

播種玉米種子,育苗步驟同前述方法,於 6 葉齡植株之下位成熟葉,滴施 5 μ l 固殺草(0.4 kg/ha)藥液,施藥後三日,分別剪下具傷害徵狀(非抗藥性者)及無傷害徵狀(具抗藥性者)植株之 0.1 g 幼葉,抽取基因組 DNA。依據抗固殺草玉米之轉基因序列^(11,14),設計二對引子,分別為花椰菜嵌紋病毒之啟動子(35S promoter): 5'-AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCC-3'/nopaline synthase gene 之 3'nontranslated region (NOS 3'): 5'-TCCTAGTTTGC GCGCTA-3' 及 (35S promoter): 5'-AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCC- 3'/35S terminator: 5'-GCTCAACACATGAGCGAAACCCT-3' (表一)。取 50 ng/ μ l 抗性植株及非抗性植株玉米之 DNA,分別加 1 μ l 10 μ M primer,利用 Viogen PCR kit (1 μ l 50 X Polymerase, 5 μ l 10 X PCR Buffer, 1 μ l 50 X dNTP Mix 10 mM, 40 μ l PCR grade H₂O),總體積為 50 μ l,進行 PCR 測試⁽²²⁾,負對照者以 PCR 等級去離子水取代 DNA。反應步驟為:起始變性溫度為 94 5 分鐘;變性溫度 94 30 秒,煉合溫度 55 30 秒,延展溫度 72 30 秒,循環 30 週期;最後延展溫度 72 7 分鐘。取 5 μ l PCR 產物,加入樣品 0.1 倍體積之 bromophenol blue 染劑,注入於含 1.2% (w/v) agarose gel 之 0.5 X TBE 膠體,以 100 伏特電壓進行電泳分析,時間約 25 分鐘,取出膠體於紫外燈下觀察結果,所得 DNA 片段與 DNA Marker 比較,利用內差法估計長度。

殺草劑抗性基因 (*bar* 或 *pat*) 之定序

由 PCR 產物之電泳分析結果,割取約 1.0、1.2 及 1.35 kb 之 DNA,利用 gel extraction kit 將 DNA 從膠體中溶洗出,進行 ligation 及 transformation 步驟。取 3 μ l 此 DNA,添加於 pGEM-T Easy Vector kit (5 μ l 2 X Rapid Ligation buffer, 1 μ l 50 ng pGEM-T Easy vector, 1 μ l T4 DNA ligase),於 16 反應 14 - 16 小時。將單一菌落之大腸桿菌 JM109 strain,加 3 ml LB 培養液,於 37 振盪培養 14 小時,取 200 μ l 菌液加入接合反應之 10 μ l DNA,放置於冰上 30 分鐘,再加入 200 μ l LB 培養液,於 37 振盪培養 1 小時,將菌液塗抹於 LB plate (含 IPTG、X-gal 及 ampicillin),培養 14 - 16 小時,選取含有 DNA insert 之白色菌落,移入 3 ml LB 培養液中,再於 37 培養 14 - 16 小時,取出 300 μ l,保存於 4 ,其餘之菌液於室溫下以 3000 g 離心 5

分鐘，倒出上層液，抽取 plasmid DNA，用 50 μ l 去離子水洗出 plasmid DNA，取 20 μ l plasmid DNA 加 1 μ l *Eco*RI 限制酵素，於 37 反應 2 小時，取出 6 μ l 加入樣品 0.1 倍體積之 bromophenol blue 染劑，注入於含 1.2% agarose 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 伏特電壓進行電泳分析⁽⁷⁾。選取具 1.0、1.2 及 1.35 kb insert DNA 之菌株，塗抹於含 ampicillin 之 LB 固體培養基上，於 37 培養 14 - 16 小時，抽取菌體之 plasmid DNA 定序。抽取大腸桿菌菌體之 plasmid DNA，利用 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit，以 DNA 定序儀定序。將 DNA 序列以 DNASTAR 軟體轉換成胺基酸序列，以 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 基因庫中 Blast 功能比對 35S promoter、35S terminator、nos terminator、*bar* 及 *pat* 基因序列。

Multiplex PCR 檢測

針對 35S promoter、35S terminator、nos terminator、*bar*、*pat*、*cryIAb* 及玉米 *zein* 基因，設計 5 對專一性引子，分別為 P35S-5B/ P35S-3、*bar*/T35S、*pat*/T35S、*pat*/NOS、*cryIab*-5/*cryIab*-3 及玉米基因 *ze*-5/*ze*-3 (表一)，取玉米轉殖株及非轉殖株之基因組 DNA 50 ng，利用 PCR kit 進行如前述方法之 PCR (煉合溫度為 55) 及電泳分析 (2.0% agarose)。

市售玉米相關加工產品之檢測

利用 multiplex PCR 方法之專一性引子對，採購玉米粒、玉米仁、玉米條、玉米片、冷凍混合蔬菜之玉米粒及玉米濃湯之玉米粒等檢體共 28 件樣品。分別取 0.1 g 檢體抽取 DNA，進行 multiplex PCR 檢測，步驟如前述 multiplex PCR 方法及電泳分析 (2.0% agarose)，*ze*-5/*ze*-3 引子之反應濃度為 0.1 mM，其餘引子濃度為 0.2 mM。

結果

玉米植株施用固殺草之藥劑反應

十二組不同來源之玉米樣品，經播種育苗，發芽率為 27 - 88% (表二)。玉米幼苗於施藥後 3 - 4 日，部份植株開始呈現藥害徵狀，施藥後 7 日，可明顯區分為正常生長植株及受傷害植株，受傷害植株之徵狀為葉片黃化及褐化 (圖一)，施藥後 14 日全株乾枯死亡，正常生長之植株可能為具抗固殺草之轉基因玉米，受傷害植株則為無抗藥性傳統培育之玉米品系，台灣之雙雜交超甜玉米華珍品系為對照植株，施藥後 7 日皆死亡。萌芽玉米植株中疑似轉殖株之抗固殺草玉米佔 1 - 14.7% (表二)。

以聚合酵素鏈鎖反應 (PCR) 檢測玉米抗固殺草基因

玉米植株幼葉以 DNeasy Plant Maxi kit 抽取 genomic DNA，此 kit 利用 DNA-binding resine 及 CTAB 方法⁽²²⁾之原理，可由 0.1 g 植體抽取約 15 μ g 之 DNA，以 DNeasyTM kit 抽取之 DNA 純度高⁽²²⁾，且加入 RNase 可去除 RNA 造成之干擾。

由 35S promoter、terminator 及 NOS terminator DNA 序列設計之 primer (表一)，經聚合酵素連鎖反應測定之結果顯示，煉合反應之溫度於 55℃，可於抗固殺草植株樣品，分別擴增約 1.0、1.2 (P35S-5A/T35S 引子) 或 1.35 kb (P35S-5A/nos 引子) 之單一 DNA 片段，非抗固殺草植株則無此等擴增之 DNA 片段，以無菌之去離子水取代 DNA 樣品之負對照組亦無此 DNA 片段，表示 PCR 測試中無污染現象發生(圖二)。

殺草劑抗性基因 (*bar* 或 *pat*) 之定序

將 PCR 之 DNA 產物由膠體溶洗出，經接合、轉型反應、抽取 plasmic DNA 及確認單一菌株之 insert DNA 約為 1.0、1.2 及 1.35 kb 者，再抽取此菌株之 plasmid DNA 定序⁽⁸⁾。將 PCR 之 DNA 產物序列以 NCBI 之 Blast 分析比對基因庫序列，結果 1.0 kb PCR 產物由 35S promoter DNA 片段 (295 bp)、*pat* 基因 (559 bp) 及 T35S terminator DNA 片段 (124 bp) 組成 (圖三)；長度約 1.2 kb PCR 產物由 35S promoter DNA 片段 (453 bp)、*bar* 基因 (600 bp) 及 35S terminator DNA 片段 (128 bp) 組成。另一長度約 1.35 kb PCR 產物由 5S promoter DNA 片段 (395 bp)、IVS2 DNA 片段 (178 bp)、*pat* 基因片段 (558 bp) 及 NOS terminator DNA 片段 (201 bp) 組成。

multiplex PCR 檢測

設計 5 對專一性引子，分別為 P35S-5B/P35S-3、*bar*/T35S、*pat*/T35S、*pat*/NOS、*cry1Ab*-5/*cry1Ab*-3 及玉米基因 *ze*-5/*ze*-3 (表一)，利用 multiplex PCR 方法檢測抗固殺草玉米葉片 DNA，結果可分別檢出 6 株似 T25 品系玉米，呈現 *pat*/T35S、P35S-5B/P35S-3 及 *ze*-5/*ze*-3 引子對擴增之 3 個條帶 (159、285 及 329 bp)，14 株似 Bt11 品系玉米，呈現 *cry1Ab*-5/*cry1Ab*-3、*pat*/NOS、P35S-5B/P35S-3 及 *ze*-5/*ze*-3 引子對擴增之 4 個條帶 (211、253、285 及 329 bp)，5 株似 Event 176 品系玉米，呈現 *bar*/T35S、P35S-5B/P35S-3 及 *ze*-5/*ze*-3 引子對擴增之 3 個條帶 (225、285 及 329 bp) (圖五)。

市售玉米相關加工產品之測定

利用前述之 5 對專一性引子：P35S-5B/P35S-3、*bar*/T35S、*pat*/T35S、*pat*/NOS、*cry1Ab*-5/*cry1Ab*-3 及玉米基因 *ze*-5/*ze*-3，檢測 28 件玉米加工產品。由於玉米 *zein* 基因大量存在於玉米植體內，而轉基因之相對含量較少，因此於 multiplex PCR 檢測時，將 *ze*-5/*ze*-3 引子之反應濃度減少為 0.1 mM，可避免 dNTP mix 的競爭而限制轉基因之擴增。玉米條及玉米片為高度加工之產品，非玉米之添加物較多，因此進行 PCR 的 template DNA 增為 100 - 150 ng。結果可檢出 7 件玉米粒樣品皆含有 35S promoter、35S terminator、nos terminator、*pat*、*cry1Ab* 及玉米 *zein* 基因 (圖六)；5 件玉米仁檢出 35S promoter、nos terminator、*pat*、*cry1Ab* 及玉米 *zein* 基因；4 件玉米條及 5 件玉米片可檢出 35S promoter、35S terminator、*pat* 及玉米 *zein* 基因；2 件冷凍混合蔬菜之玉米粒及 3 件玉米濃湯之玉米粒樣品則只檢出玉米 *zein* 基因 (圖六)。

討論

經由玉米植株噴施固殺草之藥劑反應，測定 12 組不同來源之樣品，植株幼苗於施藥後 7 日，可明顯區分為正常生長植株及受傷害植株，此傷害現象為固殺草作用之典型徵狀^(8,15)，受傷害植株為無抗藥性傳統培育之玉米品系，正常生長之植株則可能為抗固殺草之轉基因玉米，因此進口玉米種子樣品中，抗固殺草之疑似轉基因玉米佔 1 - 14.7%。按美國轉基因玉米之栽種面積約佔 32%⁽¹⁰⁾，主要涉及抗蟲之 Bt 基因、抗嘉磷塞之 CP4 EPSPS 基因及抗固殺草之 *pat* 或 *bar* 基因。本測試結果顯示，可能玉米之生產國未對轉基因玉米進行標示，且作物於採收穀物至貯藏運送過程中未分別處理，因此各批次種子樣品可能混有不同之抗固殺草轉基因玉米。此現象亦存在於台灣市售之大豆種子，但大豆抗除草劑轉基因種子之比例(35 - 47%)遠較玉米者為高⁽³⁾。

利用 35S promoter、terminator 及 NOS terminator DNA 序列之引子對，經聚合酶鏈鎖反應測定之結果，可於抗固殺草植株樣品分別擴增約 1.0、1.2 或 1.35 kb 之單一 DNA 片段，非抗固殺草植株則無此等擴增之 DNA 片段。經由 PCR 產物之定序，結果 1.0、1.2 及 1.35 kb PCR 產物分別與玉米 T25、Event 176 及 Bt11 品系⁽¹¹⁾呈現轉基因之構築相同，玉米 T25 品系為抗固殺草品系，其轉基因之主要組成為 35S 啟動子、*pat* 基因及 35S 終結子；Event176 品系為抗蟲及抗固殺草品系，其抗藥性轉基因之主要組成為 35S 啟動子、*bar* 基因及 35S 終結子，抗蟲基因為 *cry1Ab*；玉米 Bt11 品系為抗固殺草品系，其轉基因之主要組成為 35S 啟動子、IVS2 (玉米 alcohol dehydrogenase 基因的 intron)、*pat* 基因及 nos 終結子⁽¹¹⁾。經由 multiplex PCR 檢測，抗固殺草玉米分別有 6、5 及 14 株疑似為 T25、Event176 及 Bt11 品系，其中樣品二之 14 株抗固殺草葉片中，即可分別檢出此 3 品系之轉基因片段，顯示進口玉米抗固殺草樣品中擬混有 T25、Event176 及 Bt11 三種品系(圖三)。此三種玉米品系業已通過衛生署藥檢局之審查，核准進口及上市⁽⁵⁾。

由於利用 *Streptomyces viridochromogenes* 的 *pat* 基因及 *S. hygroscopicus* 的 *bar* 基因皆可編碼為抗固殺草的 PAT 酵素，而且 Syngenta、DuPont 及 Monsanto 等各研發公司設計之轉基因構築組成亦不相同，因此欲正確檢測抗固殺草玉米及其相關農產品，必須先得知各品系轉基因核酸序列之異同處，以降低偽陰性之誤解。本研究經 PCR 產物定序與基因庫資料比對，其中似 T25 及 Bt11 品系之玉米樣品，構築的 *pat* 基因分別為 559 及 558 bp，僅相差一鹼基，其餘 DNA 序列完全相同，此二品系之 *pat* 基因與 NCBI GenBank 中 *S. viridochromogenes* 之 *pat* 基因 (acc. No. M22827) 僅有 71% 相似度(圖四 A)，此不同之鹼基皆為編碼後相同胺基酸之第 3 鹼基，因此 T25、Bt11 及 acc. No. M22827 三者之 PAT-a 酵素胺基酸序列皆相同(圖四 B)。Event176 品系之 *bar* 基因與 T25 及 Bt11 品系之 *pat* 基因亦只有 71% 相似度(圖四 A)，Event176 品系 PAT 酵素之胺基酸序列 (PAT-b) 與 T25 及 Bt11 品系者 (PAT-a) 仍有 84.7% 相似度(圖四 B)，顯示此相似序列區段與抗固殺草之特性具相關性。

利用 5 對專一性引子：P35S-5B/P35S-3、*bar*/T35S、*pat*/T35S、*pat*/NOS、*cry1Ab*-5/*cry1Ab*-3 及玉米基因 *ze-5/ze-3*，檢測 28 件玉米加工產品。玉米粒樣品顯示

混有 Bt11 及 T25 兩種玉米品系物料；5 件玉米仁含有 Bt11 品系物料；4 件玉米條及 5 件玉米片皆含有 T25 品系玉米物料；2 件冷凍混合蔬菜之玉米粒及 3 件玉米濃湯之玉米粒則只檢出玉米 *zein* 基因。衛生署藥檢局利用 PCR 方法及 Matsuoka 氏等人^(19, 20) 發表之引子，亦檢出玉米粒含 T25 品系、玉米餅含 Bt11 品系物料⁽⁶⁾。根據 Ehlers 氏等人⁽²⁰⁾ 之報告指出，美國種植之基因改造玉米種子，採收後即與傳統品系玉米種子混合，90% 以上皆為硬粒玉米 (dent-corn) 類別，再以飼料或食品外銷。由本研究檢測結果顯示，台灣進口之玉米種子可能同時含有 Bt11、T25 及 Event 176 三種抗固殺草玉米品系，玉米粒食品中含有 Bt11 及 T25 品系，亦呈現品系混合之現象，其他 TC1507、DBT418 及 DLL25 三種抗固殺草玉米品系則尚未於玉米加工品中檢出。

引用文獻

1. 中華民國農產貿易統計要覽。2002。行政院農業委員會。台北。194 頁。
2. 袁秋英、蔣慕琰。2002。基因改造作物及食品之檢測方法 - 抗嘉磷塞大豆之基因特性及 PCR 檢測。藥毒所專題報導。第 65 期。15 頁。
3. 袁秋英、蔣慕琰。2002。進口大豆抗嘉磷塞除草劑之測定及其基因特性之探討。台灣農化與食品科學。40 (2) : 119-128。
4. 費雯綺、王玉美。2002。植物保護手冊。行政院農委會農業藥物毒物試驗所編印。台中。713-754 頁。
5. 衛生署基因改造食品網站 2003 (<http://food.doh.gov.tw/life/default-genefood.htm>)
6. 闕麗卿、陳彥伶、施養志。2001。檢測六種品系基因改造玉米及其加工製品方法之探討。基因改造食品之檢驗與管理研討會。117-133。
7. Birnboim, H. C., and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Res.* 7: 1513-1523.
8. Devine, M., Duke, S. O., and Fedtke, C. 1993. *Physiology of herbicide action.* pp. 251-294. PTR PrenticeHall, New York, USA.
9. Francis, M. G. 2003. *Transgenic Crops (GM): Developing Nations Join The Research Race.* (KISANWATCH: http://www.kisanwatch.org/eng/analysis/may%2003/an_Transgenic_Crops.htm).
10. *Genetically Modified Crops in the United States. From Pew Initiation on Food and Biotechnology.* 2003. (<http://pewagbiotech.Org/resources/factsheets/display.php3?FactsheetID=2>) .
11. GM Database from AGBIOS. 2003. (<http://64.26.159.139/about.php>) .
12. Hübner, P., Studer, E., Häfliger, D., Stadler, M., Stadler, M., Wolf, C., and Looser, M. 1999. Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. *Accred. Qual. Assur.* 4: 292-298.
13. *Issues of Genetically Modified Crops.* 2000. (http://www.urel.berkeley.edu/berkeleyan/1999/0915/crop_report.html)
14. Kay, R. A., Daly, C. M., and McPherson, J. 1987. Duplication of the CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhance for plant genes. *Science*, 236: 1299-1302.
15. Kishore, G. M., and Shah, D. M. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 627-663.
16. Kuiper, H. A. 1999. Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control*, 10: 339-349.
17. Lin, H. Y., Chiueh, L. C., and Shih, D. Y. C. 2000. Detection of genetically modified corns and corn by the polymerase chain reaction method. *J. Food and Drug Analysis*, 8: 200-207.

18. Lipp, M., Anklam, E., Brodmann, P., Pietsch, K., and Pauwels, J. 1999. Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and corn. *Food Control*, 10: 379-383.
19. Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., and Hino, A. 2000. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified corn. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 41: 137-143.
20. Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., and Hino, A. 2001. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified corn. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 42: 24-32.
21. Meyer, R. 1999. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, 10: 391-399.
22. Mullis, G. T., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
23. Peterson, G., Cunningham, S., Deutsch, L., Erickson, J., Quinlan, A., Raez-Luna, E., Tinch, R., Troell, M., Woodbury, P., and Zens, S. 2000. The risks and benefits of genetically modified crops: A multidisciplinary perspective. (<http://life.csu.edu.au/consecol/vol14/iss1/art13/>) .

ABSTRACT

Yuan, C. I.*, Hsieh, Y. C., and Chiang, M. Y. 2003. Characterization and detection of the glufosinate-resistant gene in corn products in Taiwan. Plant Prot. Bull. Xx: xx-xx. (Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan, ROC)

Five million tons of corn are imported annually into Taiwan. Most seeds sampled from local shops were found to be viable. We established seedlings in a greenhouse and applied 0.9 kg/ha of glufosinate to the foliage of these plants. Sensitive seedlings showed symptoms of injury in 3~4 days and died within 2 weeks. Glufosinate-resistant seedlings accounted for 1%~14.7% of the original seed samples. We used plants that survived glufosinate treatment for PCR detection and genomic characterization. PCR assay of genomic DNA extracted from corn leaves, using the CaMV 35S promoter, terminator, and NOS terminator as primers, produced a 1.0-, 1.2- and 1.35-kb fragments. DNA sequencing using PCR products showed that the fragments consisted of the 35S promoter, IVS2, *bar*, *pat*, the 35S terminator and/or the NOS terminator. We designed specific primer sets for the DNA sequence of glufosinate-resistant corn; PCR products of 159, 211, 225, 253, 285, and 329 bp, respectively, were produced using these specific primers. A primer producing low molecular DNA fragments were suitable for detecting of implanted genes from processed products, such as field corn, corn kernels, corn fries, and flakes.

(Key words: GMO, corn, glufosinate resistance, *bar* gene, *pat* gene, multiplex-PCR)

* Corresponding author. E-mail: yci@tactri.gov.tw

表一、試驗中使用之引子序列

Table 1. Primers used in this study

Primers	DNA sequence (5' → 3')	Gene	Amplified DNA
P35S-5A	AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCC	35 S promoter (Acc. No. E05206)	1.35 kb (Bt11)
NOS-3	TCCTAGTTTGCGCGCTA	NOS terminator (Acc. No. AJ007624)	
P35S-5A	AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCC	35 S promoter	1.0 kb (T25)
T35S	GCTCAACACATGAGCGAAACCCT	35S terminator (Acc. No. AF458479)	1.2 kb (Event 176)
P35S-5B	TCCGGAAACCTCCTCGGATTCC	35 S promoter	285 bp
P35S-3	GGAAGGGTCTTGCGAAGGATA	35 S promoter (Acc. No. E05206)	
bar	AGCTGGACTTCAGCCTGCCGGTA	<i>bar</i>	225 bp
T35S	GCTCAACACATGAGCGAAACCCT	35S terminator	
pat	GCCAGTTAGGCCAGTTACCCA	<i>pat</i>	159 bp
T35S	GCTCAACACATGAGCGAAACCCT	35S terminator	
pat	GCCAGTTAGGCCAGTTACCCA	<i>pat</i>	253 bp
NOS	TCCTAGTTTGCGCGCTA	NOS terminator	
cry1Ab-5	CTCTCGCCGTTTCATGTCCGT	<i>cry1Ab</i>	211 bp
cry1Ab-3	GGTCAGGCTCAGGCTGATGT	<i>cry1Ab</i> (Acc. No. AF254640)	(ref. 19)
ze-5	TGCTTGCATTGTTTCGCTCTCCTAG	<i>Zein</i>	329 bp
ze-3	GTCGCAGTGACATTGTGGCAT	<i>Zein</i> (Acc. No. AB086264)	(ref. 19)

表二、飼料用玉米之發芽及幼株對固殺草之反應

Table 2. Seed germination and seedling response of feed corn* to glufosinate application.

Sample No.	Established seedlings	Injured plant		Normal plant	
		No. of plants	(%)	No. of plants	(%)
1	123	121	98.4	2	1.6
2	95	81	85.3	14	14.7
3	81	77	95.1	4	4.9
4	95	87	91.6	8	8.4
5	114	113	99.1	1	0.9
6	113	110	97.3	3	2.7
7	132	131	99.2	1	0.8
8	78	76	97.4	2	2.6
9	113	109	96.5	4	3.5
10	44	43	97.7	1	2.3
11	48	47	97.9	1	2.1
12	41	40	97.6	1	2.4
Control**	150	150	100.0	0	0.0

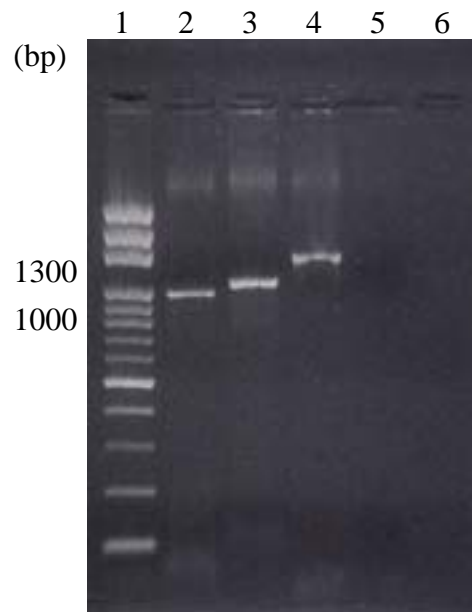
* Corn seeds were collected from local retail shops. Seedlings, at 3~4 leaf stage, raised from 150- seeds were evaluated for injury after foliar application of 0.9 kg/ha glufosinate.

** Control plant: sweet corn (hua chen hybrid).



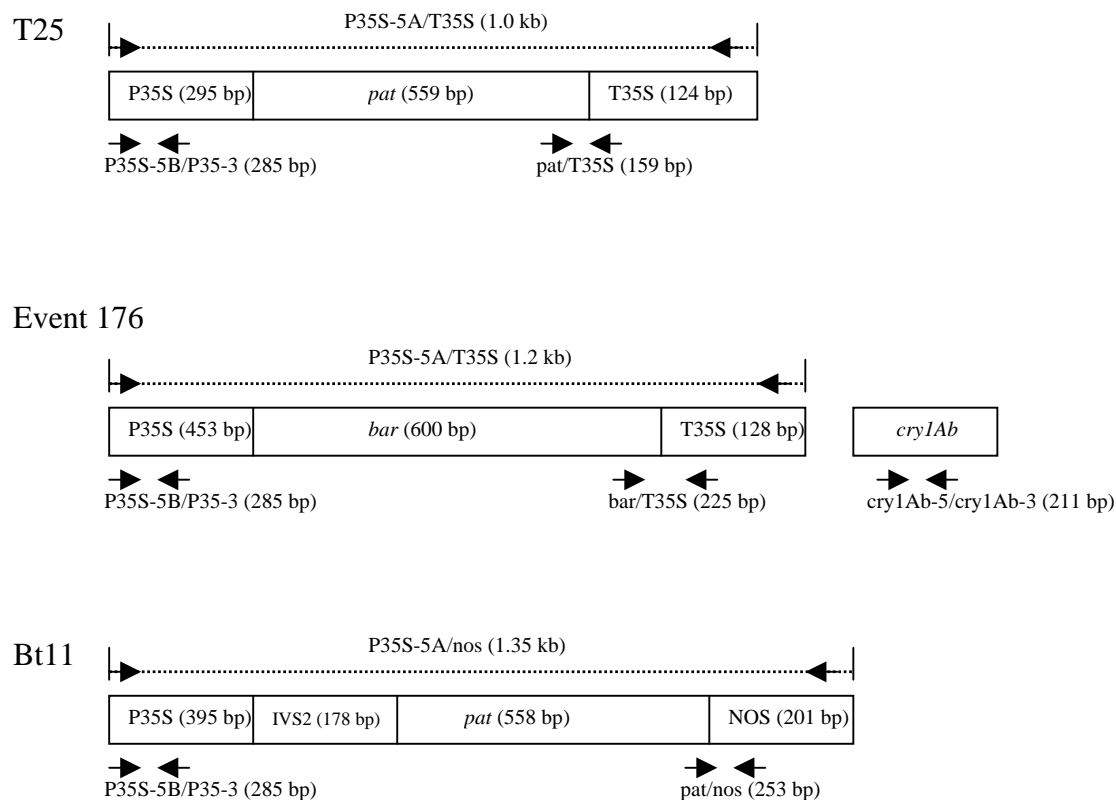
圖一、玉米植株噴施固殺草溶液（18.02%，0.9 kg/ha），施藥後 7 日，抗固殺草植株正常生長（箭頭所示），非抗固殺草植株褐化死亡。

Fig. 1. Glufosinate-resistant corn which survived the foliar application of 0.9 kg/ha glufosinate (18.02% SL). Susceptible corn plants died within 7 days spraying glufosinate.



圖二、利用 PCR 檢測抗固殺草玉米植株。第 1 欄為 DNA marker，第 2 及 3 欄以 P35S-5A/T35S 為引子，第 4 欄為以 P35S-5A/NOS 為引子，第 5 欄為非抗固殺草玉米，第 6 欄為去離子水。

Genomic DNA of glufosinate-resistant corn amplified by PCR using different primer pairs. Lane 1, DNA marker; lanes 2 and 3, P35S-5A/T35S primers; lane 4, P35S-5A/NOS primers; lane 5, non-glufosinate-resistant corn and lane 6, deionized water.



圖三、抗固殺草玉米三品系之 PCR 產物組成及專一性引子設計位置。引子位置如箭頭所示，P35S 為花椰菜嵌紋病毒之啟動子、T35S 為花椰菜嵌紋病毒之終結子、NOS 為 nopaline synthase 基因之終結子、*bar* 為 phosphinothricin N-acetyl transferase 基因(由 *Streptomyces hygroscopicus* 選殖者)，*pat* 為 phosphinothricin N-acetyl transferase 基因(由 *S. viridochromogenes* 選殖者)，IVS2 為玉米 alcohol dehydrogenase 基因之 intron，*Cry1Ab* 為 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 內毒素之抗虫基因。

Fig. 3. Elements of PCR products and positions of primers in the different glufosinate-resistant corn constructs. Approximate positions of primers are shown as arrows. P35S, sequences derived from cauliflower mosaic virus promoter; T35S, sequences from cauliflower mosaic virus terminator; NOS sequences from the nopaline synthase terminator; *bar*, phosphinothricin N-acetyl transferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*; *pat*, phosphinothricin N-acetyl transferase gene from *S. viridochromogenes*; IVS2, intron from maize alcohol dehydrogenase; and *Cry1Ab*, synthetic delta endotoxin gene derived from *Bacillus thuringiensis*.

A. Sequence of *pat* and *bar*

```

pat-1  atggccgcggtttgtgatatcgttaaccattacattgagacgtctacagtgaactttaggacagagccacaa
pat-2  -----g-----c--c-----c--t--c-----c-----agc--g--c-----cc-t--g-----g--g
bar    ---c-g-----c--cacc-----c-----c-----aagc--g--c-----ca-t--c-----g--g

pat-1  acaccacaagagtggattgatgatctagagaggttgcaagatagatacccttggttggttgctgaggttgag
pat-2  --t--g--g-----c--c--c--g---c--cc-c--g--cc-c-----c---c-c--c--c-----g---
bar    ga---g--g-----cg--c--c--c--tcc-tc---gg--gc-c-----c---c-c--c--c-----g--c

pat-1  ggtgttgtggctggatttgcttacgctgggccctggaaggctaggaacgcttacgatggacagttgagagt
pat-2  --c--c--c--c--c--c--c-----c--c-----cc-c-----c-----c-----c---tcg
bar    ----ag--c--c--c--c--c-----g--c-----ac-c-----c-----c-----g--cc---tcg

pat-1  actgtttacgtgtcacataggcaccaaaggttgggcctaggatccacattgtacacacatctgcttaagtct
pat-2  --g--g-----c--c--cc-----gc--c--c--a--g--c-----cc-c-----c--c-----g-----c
bar    --c--g-----c--c--ccc-c-----gc--ac---a--g--c-----gc-c-----c--c-----g-----c

pat-1  atggaggcgaaggttttaagtctgtggttgctgttataggccttccaacgatccaactgttaggttgcat
pat-2  -----c--g--c--c---agc-----c--c--c--c--a--a--c-----c--gagc--gc--cc---c
bar    c-----a--g--c--c---agc-----c--ct-c--c--ag-t--c-----c--gagc--gc--cca---c

pat-1  gaggctttgggatacacagcccgggtacatgctgcgcagctggatacaagcatggtggatggcatgatgtt
pat-2  -----gc-c-----c--g--c--g--gc---g-----c--c-----c--g--c-----c--c--g
bar    -----gc-c-----tg--cc---c--c--tgc---g--g--c--c--t-----c--gaac-----c--g

pat-1  ggtttttggcaaagggattttgagttgccagctcctccaaggccagttaggccagttaccagatctgag
pat-2  --g--c-----gc-c--c--c---c---g--c--g--cc-c--c--cc-----c--c--a-----
bar    -----c-----gct--gac--cagcc---g--ta--g--cc--t--g--cct---c--t---g-----

```

(B) Aligment of PAT

```

PAT-a  MSPERRPVEIRPATAADMAAVCDIVNHYIETSTVNFRTPEQTPQEWIDDLERLQDRYPWLVAEVEGVVAG
PAT-b  -----AD--R--E---P---T-----E-----T---V--RE-----D-E---

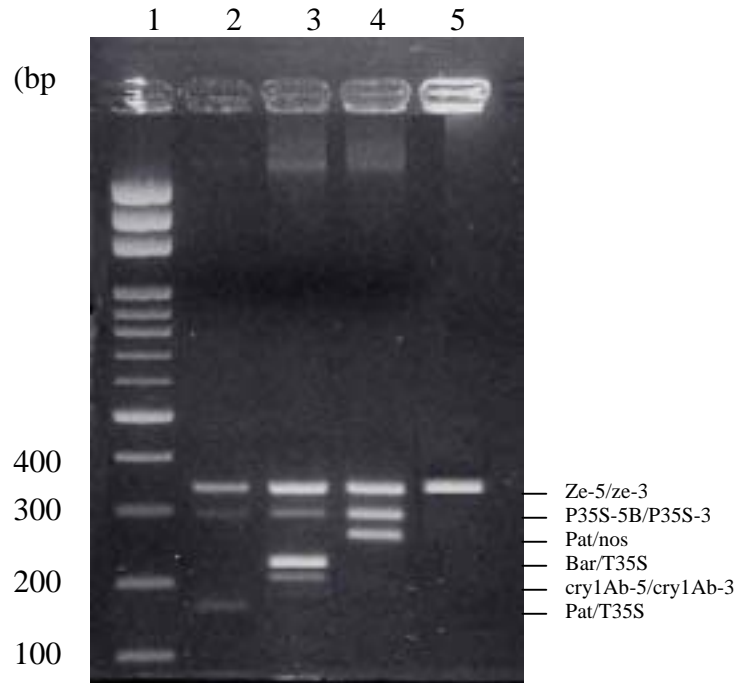
PAT-a  IAYAGPWKARNAYDWTVESTVYVSHRHQRLGLGSTLYTHLLKSMEAQGFKSVVAVIGLPNDPSVRLHEAL
PAT-b  -----A-----P---T-----L-----M-----

PAT-a  GYTARGTLRAAGYKHGGWHDVGFWRDFELPAPPRPVRPVTVQI
PAT-b  --AP--M-----F---N-----L--S--V-----L---E-

```

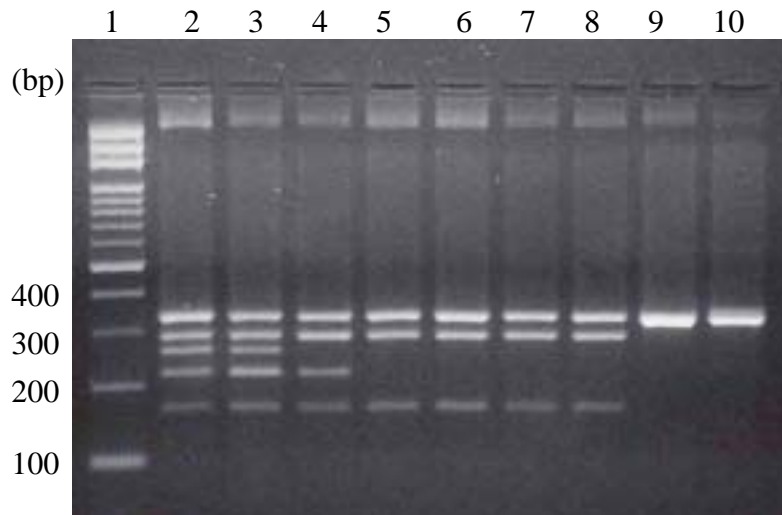
圖四、PCR 產物解序為抗固殺草玉米之轉基因 *pat* 及 *bar* 序列比較。(A) T25 及 Bt11 品系植株之 *pat* 基因(*pat-1*), *S. viridochromogenes* 之 *pat* 基因(*pat-2*, acc. No. M22827) 與 Event 176 之 *bar* 基因。(B) T25 及 Bt11 的 *pat* 基因編碼之 PAT-a 與 Event 176 的 *bar* 基因編碼之 PAT-b 胺基酸序列比較。

Fig. 4. Sequence comparison of *pat* and *bar* from glufosinate-resistant corn. (A) DNA sequence of *pat* from maize T25 and/or Bt11 (*pat-1*), *S. viridochromogenes* (*pat-2*, accession. no. M22827), and DNA sequence of *bar* from maize Event 176. (B) Alignment of the PAT-a (from maize T25 and/or Bt11) with the PAT-b sequence (from maize Event 176).



圖五、利用 multiplex PCR 檢測抗固殺草玉米植株。引子對為 P35S-5B/P35S-3、pat/T35S、pat/NOS、bar/T35S、cry1Ab-5/cry1Ab-3 及 ze-5/ze-3。第 1 欄為 DNA marker，第 2 欄為含 T25 品系轉基因之植株，第 3 欄為含 Event 176 品系轉基因之植株，第 4 欄為含 Bt11 品系轉基因之植株，第 5 欄為非抗固殺草玉米，第 6 欄為去離子水。

Fig. 5. PCR products of genomic DNA of glufosinate-resistant corn amplified by multiplex PCR. Primers were P35S-5B/P35S-3, pat/T35S, pat/NOS, bar/T35S, cry1Ab-5/cry1Ab-3, and/or ze-5/ze-3, respectively. Lane 1, DNA marker; lane 2, T25-like plant; lane 3, Event 176-like plant; lane 4, Bt11-like plant.



圖六、以 multiplex PCR 方法及推測之轉基因引子檢測玉米及相關農產加工品。純化之 DNA 以引子對 P35S-5B/P35S-3, pat/T35S, pat/NOS, bar/T35S, cry1Ab-5/cry1Ab-3 及 ze-5/ze-3 擴增。第 1 欄為 DNA marker, 第 2、3 欄為玉米粒, 第 4 欄為玉米仁, 第 5、6 欄為玉米條, 第 7、8 欄為玉米片, 第 9 欄為冷凍混合蔬菜之玉米粒, 第 10 欄為玉米濃湯之玉米粒。

Fig. 6. Multiplex PCR analysis of the glufosinate-resistant gene in corn and processed products. Purified samples of DNA were amplified with primer pairs, P35S-5B/P35S-3, pat/T35S, pat/NOS, bar/T35S, cry1Ab-5/cry1Ab-3 and/or ze-5/ze-3. Lane 1, DNA marker; lanes 2 and 3, field corn; lane 4, corn kernels; lanes 5 and 6, corn fries; lanes 7 and 8, corn flakes; lane 9, mixed vegetables; lane 10, corn soup.

(袁秋英、謝玉貞、蔣慕琰。2003。台灣市售飼料玉米抗固殺草基因特性及檢測利用之探討。植保會刊。45(4) 已接受。)