

如何降低及監控基因轉殖作物外源基因流佈*

陳烈夫**、魏夢麗***、呂椿棠***、呂秀英***

*行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2197 號

**行政院農業委員會農業試驗所農場管理組助理研究員

***行政院農業委員會農業試驗所農藝組助理研究員、助理研究員及研究員

Decreasing and Monitoring the Gene Flow in Transgenic Crops

Chan Lit-Fu, Meng-Li Wei , Chun-Tang Lu and Hsiu-Ying Lu

關鍵詞：基因轉殖作物；基因流佈；遺傳隔離；不受精生殖；閉花受精；基因轉殖緩和；數學模式

Key words: Transgenic crops; Gene flow; Genetic isolation; Apomixis; Cleistogamy; Transgenic mitigation; Mathematical model

通訊地址：台中縣霧峰鄉中正路 189 號 農業試驗所

聯絡電話：04-23302301#125

Email: iying@wufeng.tari.gov.tw (呂秀英)

一、前言

目前相當多基因轉殖作物風險評估之研究是集中在基因逃逸 (gene escape) 所造成的基因轉殖作物與其野生近緣種間之基因流佈 (gene flow) 問題上 (樊等, 2001; 張等, 2002; 盧等, 2003; Conner 等, 2003; Nap 等, 2003)。基因逃逸是指藉由遺傳工程之方法, 將遺傳物質 (目標基因) 轉移至某一生物有機體上, 而在該生物個體、種群甚至物種間發生自發性移動之過程, 其中包括目標基因在基因轉殖作物不同品種之間、或在該作物與野生物種或其野生近緣種之間的移動, 這導致一系列潛在性之生態環境安全問題 (閻, 2002)。

在植物中基因流佈可透過兩種方式來表現, 第一種方式是透過種子傳播 (seed dispersal), 即基因轉殖作物之種子透過傳播在另一個品種或其野生近緣種之種群內, 能建立自我繁殖的個體來藉以表現, 通常透過種子傳播導致基因逃逸的距離較近; 第二種方式是透過花粉流佈 (pollen flow), 即基因轉殖作物透過花粉傳播與其他非基因轉殖作物品種或其野生近緣種進行雜交或回交, 而在非基因轉殖品種、野生近緣種的種群中建立可育之雜交或回交後代來藉以表現, 通常花粉傳播而導致基因流佈可以是遠距離的, 特別是蟲媒授粉植物的花粉傳播距離可以在數公里以上; 一般認為, 花粉傳播是基因轉殖作物在空間上逃逸之主要管道, 也是基因轉殖作物與其野生近緣種間基因流佈之主要原因 (魏等, 1999; 魏及馬, 2002; Gepts and Papa, 2003)。從目前的研究來看, 轉殖基因在時間及空間上之逃逸無法避免, 這就需要利用某種技術或方法來加以控制與管理基因流佈。本文將就基因轉殖作物本身的一些生物技術手段及其原理作一整理及論述, 期望從技術之源頭來降低外源基因的流佈。

二、降低基因轉殖作物外源基因流佈的傳統方法

降低基因流佈之方法應著重於阻斷基因交流的過程, 現在主要是利用隔離之方法, 尤其是利用距離來進行隔離。植物育種學家在半個世紀前已經進行了如何

保護作物不受外來花粉污染之研究，主要的農作物大都進行了授粉隔離距離之研究（表 1）。現今在考量基因轉殖作物之安全隔離時，均借鏡於這些為保證種子基因純度而進行有關隔離距離之研究結果（閻，2002；Lavigne 等, 2002）。隔離距離之確定一般是根據授粉距離而定，然而授粉距離受到很多因素之影響，例如風力、風向、氣溫、濕度、昆蟲地域性、栽種面積等，因此引作他用時其安全及實用性尚需進一步進行檢證（Remund 等, 2001）。

目前除設定安全隔離距離之外，尚其他的隔離方法，如摘心或套袋基因轉殖作物的花器官、移除與基因轉殖作物有性親和之種類植物、調整開花時間、提早收穫、在其周圍種植同種之非基因轉殖作物做為緩衝區等，但僅以這類物理性隔離方式來進行控制，似乎並不能達到預期的效果，或許考量採用遺傳隔離的方法，其達成效率可能比較理想或更徹底（Levin, 1978；李及孟, 2003；趙等, 2003）。

Dale 等(1994)認為利用距離或緩衝作物區來隔離已商業化的基因轉殖作物的辦法一般是不切實際和不可能的，小規模基因轉殖植物栽種獲得的安全距離資料，對大規模商業化栽種的參考價值可能意義不大；但小規模栽種可提供有關基因轉殖植物特性的訊息，例如小規模栽種基因轉殖試驗中有關有性親和之數據資料，提供了大規模栽種基因轉殖作物時最有效的阻斷基因流佈的手段（魏等, 1999）。

三、降低基因轉殖作物外源基因流佈的分子策略

現行已有一些降低基因轉殖作物與其野生近緣種間之基因流佈的遺傳隔離方法，主要包括葉綠體轉殖（chloroplast transgenic）、花粉（雄性）不育（male sterility）、種子不育（seed sterility）、染色體組不親和性（chromosome genome incompatibility）、閉花授精（cleistogamy）、無融合生殖或不受精生殖（apomixis）、暫時性控制外源基因之表現（temporal and tissue-specific control）、基因轉殖緩和或弱化技術（transgenic mitigation），如表 2 所示。茲分述如下：

1. 葉綠體轉殖：

通常在進行細胞核的轉殖時，因無法避免外源基因隨花粉四處飄散，其安全性令人擔憂。有鑑於此，改良基因轉殖的作用方式就成了重要的課題，其中較可行的改進方式就是透過葉綠體表現目標基因(Gray 等,1998；Daniell, 2002)。由於大多數植物的花粉中都不含細胞質成分，也就沒有葉綠體 DNA 的存在，因而在受精過程中只有花粉之細胞核穿過胚珠，花粉之細胞質一般不向後代遺傳，將外源基因轉入葉綠體（細胞質）基因組後，只能進行細胞質遺傳，故經由基因轉殖至葉綠體染色體其子代結合子只具有來自母本質體(maternal plastids)，而父本質體(paternal plastids)則被分離至伴細胞(synergid cell)中，這造成了外源基因的生物封鎖性(bio-containment)，使得被導入的基因不會經由花粉而與其他植物雜交(out-cross)，因而花粉不會帶有外來導入的基因。因此透過葉綠體轉殖所獲得的基因轉殖植物，不能像核基因那樣可以隨花粉擴散，故可避免外源基因的流佈，從而保證基因工程的安全性。況且由於外源基因的細胞質遺傳特性，一旦得到同質化的葉綠體轉殖體，其後代將永遠保持純系而不會分離，亦即不能透過花粉向其他植物流佈（McCauley, 1995）。

2.花粉（雄性）不育：

此係利用基因工程阻斷花粉之發育。例如利用絨氈層(tapetum)細胞特異基因 Ta29-RNase T1 與 Ta29-barnase 誘導雄性不育，絨氈層是花粉發育過程中一種獨特的分泌細胞，其代謝與花粉之發育有密切關係，其原理是將花粉和花藥特異啟動子(Ta29)與細胞毒素基因(RNase T1 與 barnase)建構成嵌合基因(chimera gene)後，導入受體植株中，細胞毒素基因的特異表現可選擇性破壞花粉、花藥的結構，從而阻斷花粉之發育過程，導致雄性不育，故可降低基因的流佈；另一種方法可透過反義 RNA 技術阻斷與花粉發育有關基因之表現而獲得雄性不育之植株，因類黃酮(flavonoid compounds)是花粉發育過程中的重要物質，而苯基苯乙烯酮合成酶(chalcone synthase, CHS)是其生物合成之關鍵酶，其原理是將 CHS 基因的反義 RNA 基因與花椰菜嵌紋病毒 35S 啟動子(cauliflower mosaic virus 35s promoter, CaMV35S 啟動子)及花藥特異序列建構成嵌合基因，而獲得雄性不育株系，故可

降低基因的流佈；第三種方法則透過提早降解孢粉質外壁細胞層（sporopollenin）而獲得雄性不育株，其原理是在花粉發育過程中，花藥絨氈層細胞分泌孢粉質酶（callose synthase）能夠降解堅硬的孢粉質外壁細胞層，使小孢子彼此分離，進而形成正常花粉粒，這一過程有嚴格的時間性，如果提前分泌孢粉質酶，使孢粉質外壁細胞層過早降解，小孢子發育就會停止，導致花粉畸形與雄性不育，故亦可降低基因的流佈（李及孟，2003）。除上述三種主要基因轉殖培育雄性不育植株的方法外，另如干擾粒線體與細胞核之訊息流動，也可導致雄性不育，從而降低外源基因之流佈，但此仍處於試驗階段（Kuvshinov 等, 2001）。

3. 種子不育：

透過控制胚及胚乳的發育造成種子不育，可以降低外源基因之擴散。如終結子技術（terminator technology）之應用，其原理是在基因轉殖作物中加入了一個由四部份組成的順序表現序列：抑制子基因 I（編碼抑制 Cre-lox 基因的蛋白質）、重組酶基因 Cre（編碼的蛋白質可特異地切除另一抑制序列 II）、抑制序列 II、核糖體抑制蛋白（ribosome-inhibitor protein, RIP）基因與 *Lea* 啟動子基因（在 *Lea* 啟動子的控制下，RIP 可以特異地使胚致死而對種子的其他部分的發育沒有影響）組成之終結子基因，得到的基因轉殖作物之種子由種子公司加上一種誘導劑，經誘導劑的作用與終結子基因間之相互作用，在種子胚胎發育的後期產生一種毒素，這種毒素殺死發育後期的胚胎，最後得到成熟但不育之種子（錢等，1999）。雖然基因轉殖作物產生不育種子可能在解決基因逃逸帶來的生態風險上有益處，但這項技術或有可能帶來另一種生物安全危機（魏及馬，2002）。

4. 染色體組不親和性：

利用染色體組不親和的原理，將外源基因導入植物的某個染色體組上，這樣基因轉殖作物與不含該染色體組的近緣種間產生基因轉殖交流就可能降低，若造成花粉（雄性）不育或種子不育，也可以降低外源基因擴散（Gray 等, 1998）。許多植物是異源多倍體（allopolyploid），僅有一套染色體組與野生物種具有親和性，從而可以進行種間雜交，例如芥菜（*Brassica juncea*, AABB=2n=36）之 B 染

色體組可以和蕓苔屬的大多數野生物種配對，因為蕓苔屬的大多數野生物種具有 B 染色體組，故利用甘藍型油菜 (*B. napus*, AACCC=2n=38) 來進行基因轉殖就可降低與蕓苔屬野生物種的親和性，因此推廣那些具不親和染色體組的基因轉殖植物，可以降低基因轉殖性狀向野生物種流佈之風險 (Daniell, 2002)。

5. 閉花授精：

某些植物在開花之前就發生了自花授粉與授精作用，這過程被稱為閉花授精。因此透過基因工程產生閉花授精植物，可降低基因流佈之風險 (Kuvshinov 等, 2001)。

6. 無融合生殖或不受精生殖：

植物無融合生殖是指胚之發育並不經過雌雄配子融合而產生種子的一種特殊生殖方式，屬無性生殖之一種，亦即由珠心之一未進行減數分裂的細胞 (2n) 所發育而成胚，可產生種子。發生此種生殖有多種方式進行，一是由珠皮或珠心之一細胞發育而成胚，若單元胚囊存在，稱之為不定胚或偶發胚 (adventitious embryony)；二是由珠皮或珠心之一細胞行體細胞分裂，直接形成二元性之胚囊，並無單元胚囊之存在，則稱為無孢子生殖 (apospory)；或大孢子母細胞直接或間接發育而成一胚囊，或不經減數分裂或經改變之減數分裂阻止染色體數之減半，此方法稱為不減數孢子生殖 (diplospory)。在無融合生殖過程中，種子實際上來源於營養組織而不是透過有性雜交作用而產生的，由於大多數無融合生殖植物產生沒有活性或不親和之花粉，因此可以減少外源基因之流佈 (Koltunow 等, 1995；Daniell, 2002)。

7. 暫時性控制外源基因之表現：

此係利用誘導性啟動子來控制時間與組織特異性之表現，其原理是將化學誘導啟動子和外源基因 (如抗除草劑基因) 導入植物，這樣獲得基因轉殖植株只有用化學試劑誘導後，外源基因才能表現。如噴灑除草劑之前，先用化學試劑誘導抗除草劑基因的暫時表現，植物就獲得了抗除草劑之特性，外源基因即使流佈到野生物種和其他植物，不經化學試劑誘導也不表現，從而降低了基因流佈的潛在

危險性(Gray 等,1998 ; Daniell, 2002)。另一種方法是在開花時阻止基因轉殖的表現，利用化學物質誘導之位置特異性，其原理是利用化學物質誘導啟動子或花粉發育特異的啟動子來激活基因座特異之重組酶系統 Cre-lox 之表現，在植物開花前將外源基因去除，使其只在沒有開花前表現。這系統對那些只需要在特定時間段內表現的性狀非常有用 (Kuvshinov 等, 2001 ; Daniell, 2002)。

8.基因轉殖緩和或弱化技術：

在自然界中野生種之間、野生種與作物之間都存在著激烈的競爭，即使是溫和的不利性狀也會使植物的野化受到極大的限制，所以野生種透過天然回交 (introgression) 獲得對作物來說是有益的性狀之後，使獲得該基因轉殖的野生種的適應性相對降低並最終消亡，這個方法被稱為基因轉殖緩和或弱化技術。其原理是將那些不利野生種生存之性狀如防止種子散落、種子同步成熟、植株矮化、降低種子二次休眠等的轉殖緩和基因與目標基因建構，這樣基因轉殖作物就失去了有利於野生種形成的競爭優勢，即使發生了基因逃逸，也會因轉殖緩和基因伴隨漂移而使得超級野生物種的形成受到限制。當然這類轉殖緩和基因不僅要與目標基因緊密連鎖，而且對於基因轉殖作物應該是有利或中性的 (Kuvshinov 等, 2001 ; Daniell, 2002)。

四、監控基因轉殖作物外源基因流佈的方法

由於目前在非農業生態系統中有關基因轉殖作物外源基因流佈與潛在的生態影響之研究尚處於開發階段，故急需一些新技術加以協助調查，例如綠色螢光蛋白標誌基因 (green fluorescent protein, GFP) 及監測數學模式的開發應用等，將有助於監控基因轉殖作物外源基因流佈，進而應用至野外之監測上。

1.綠色螢光蛋白標誌基因的應用：

利用從海洋生物水母中分離得到的可在紫外光或藍光下發出綠色螢光的單聚體蛋白，用以替代抗生素基因作為標誌基因，可對外源基因進行即時監控之可視性標誌 (Kuvshinov 等, 2001 ; Daniell, 2002)。如將花粉特異性啟動子引導下之

GFP 基因導入菸草中，表現出對花粉的 GFP 標誌，從而可區分基因轉殖作物與非基因轉殖作物之花粉，追蹤基因轉殖作物花粉移動情況、空間傳播方式及授粉機制，並估計漂流到一定距離外之基因轉殖作物花粉數量。因此，GFP 可應用在追蹤或監測基因流佈方面，這一具有非破壞性、即時、動態、可視性的監控技術，將可推動生態安全性之研究（Hudson 等, 2001；Stewart, 2001）。

2. 監測數學模式的開發應用：

模式在生態風險評估及監測的重要性是顯而易見的，因為風險評估是根據有限的已知資料來預測未知後果的過程，這就需要應用大量的數學模式才能完成。Bateman 於 1947 年最早提出了距離對風媒和蟲媒傳播花粉污染影響的三個方程式，並將其近似地合併成一個為 $F=ye^{-KD}/D$ ，F 為花粉污染之比率，D 為距離，y 為零隔離距離時之污染。進而 Manasse (1992)以此為基礎，提出了評價基因漂流的指數模式，以評價基因轉殖作物與其野生親緣種間的基因流佈，但此模式是假設污染花粉以固定的機率傳播。因此 Kareiva (1994)隨後提出一個類似於 Manasse 之指數模式的可靠性函數(reliability function)，以描述污染花粉傳播的機率會隨著隔離距離而異。對於風險評估而言，需要的不是在某一距離上的傳播花粉頻度，因而 Gliddon 等(1997)進一步使用累積密度函數所建立的模型，來描述一個轉殖基因在一個或幾個方向上流佈到某一特定距離以外的可能。為管理及監測法國農作環境下之除草劑耐性油菜品種，從而將一個農作區之耕作制度對基因轉殖油菜品種基因流佈之影響予以量化，Colbach 等(2001a,b)建立了 GeneSys 模式：這個模型輸入之變量影響著基因轉殖除草劑耐性品種與常規之除草劑敏感品種的生長與發育，在整個生活史中，可依據開花時間、試區形狀及間距、試區間可以交換花粉及種子之數量，以模擬植株之年生活史(種子庫-幼苗-成株-開花-結實)等；而輸出變量則以模擬開始後 50 年試區之種子庫、成株與種子產量，每階段均需統計試區每平方公尺之植株個體數及植株之基因型組成成份，藉此提供對策以追蹤及監測基因轉殖作物之基因流佈。隨著風險評估越來越複雜，準確性要求越來越高，發展和改善各種數學模式始終是風險評估研究領域的重要課題(呂等，

2002)。

五、結論

安全，是一個相對性的概念。由基因轉殖作物技術帶來並引起廣泛關注之生物安全問題，可以透過科學的方法來解決並控制在可接受的範圍以內。上述的方法有幾項還處於探索階段，需要經過田間試驗的進一步驗證，故目前尚沒有一種方法對所有植物都適合。為了有效地降低外源基因流佈，各種方法的組合使用是非常必要的，而比較成熟的方法為葉綠體轉殖及花粉（雄性）不育，而綠色螢光蛋白標誌基因只是具有協助基因轉殖作物基因流佈之指標作用，至於數學監測模式的開發應用之預測對未來生態環境的影響尚需進一步的田間試驗。但隨著科學數據與經驗之累積，現全世界都正積極研發一系列安全的基因轉殖策略，力求最大限度地避免基因轉殖作物可能帶來的潛在風險。

六、引用文獻

1. 李永春、孟凡榮。2003。中國生物工程雜誌 23:30-33。(中國)
2. 呂秀英、陳烈夫、呂椿棠、魏夢麗。2002。科學農業 50(11,12):399-409。
3. 張永軍、吳孔明、彭于發、郭予元。2002。生態學報 22:1951-1959。(中國)
4. 閻新甫主編。2002。轉基因植物。科學出版社。北京。(中國)
5. 趙艷、王慧中、于彥春、黃大年。2003。遺傳 25:119-122。(中國)
6. 樊龍江、周雪平、胡秉民、石春海、吳建國。2001。應用生態學報 12:630-632。
(中國)
7. 錢迎倩、馬克平、衛國、魏偉。1999。生物多樣性 7:151-155。(中國)
8. 盧寶榮、張文駒、李博。2003。應用生態學報 14:989-994。(中國)
9. 魏偉、馬克平。2002。中國農業科技導報 4:10-15。(中國)
10. 魏偉、錢迎倩、馬克平。1999。植物學報 41:343-348。(中國)

11. Bateman, A. J. 1947. *Heredity* 1:303-336.
12. Colbach, N. *et al.* 2001a. *Agric. Ecosyst. Environ.* 83:235-253.
13. Colbach, N. *et al.* 2001b. *Agric. Ecosyst. Environ.* 83:255-270.
14. Conner, A. J. *et al.* 2003. *Plant J.* 33:19-46.
15. Dale, P. J. *et al.* 1994. In: Jones, D. D. (eds.) "Proceedings of the 3rd international symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms", Oakland, California, USA:Uni. of California , Division of Agric. Nature Resources, 57-67.
16. Daniell, H. 2002. *Nature Biotech.* 20:581-586.
17. Gepts, P. and R. Papa. 2003. *Environ. Biosafety Res.* 2:89-103.
18. Gliddon, C. *et al.* 1997. *Gene Flow – A Review of Millennium: Risks and Benefits.* Italy, Dec. 1-5.
19. Gray, A.J. *et al.* 1998. *Nature* 392:653-654.
20. Hudson, L.C. *et al.* 2001. *Mol. Ecol. Notes* 1:321-324.
21. Kareiva, P. *et al.* 1994. *Mol. Ecol.* 3:15-21.
22. Koltunow, A.M. *et al.* 1995. *Plant Physiol.* 108:1345-1352.
23. Kuvshinov, V. *et al.* 2001. *Plant Sci.* 160:517-522.
24. Lavigne, C. *et al.* 2002. *Theor. Appl. Genet.* 104:139-145.
25. Levin, D.A. 1978. *Evol. Biol.* 11:185-317.
26. Manasse, R. 1992. *Ecol. Appl.* 431-438.
27. McCauley, D.E. 1995. *Tree* 10:198-202.
28. Nap, J.P. *et al.* 2003. *Plant J.* 33:1-18.
29. Remund, K.M. *et al.* 2001. *Seed Sci. Res.* 11:101-109.
30. Stewart, C.N. Jr. 2001. *Plant Cell Rep.* 20:376-382.

表 1. 主要農作物於田間的授粉隔離距離

作物種類	隔離距離 (公尺)	備註
水稻 <i>Oryza sativa</i> L.	100	
大豆 <i>Glycine max</i> (L.)Merrill	100	
蕃茄 <i>Lycopersicum esculentum</i> Mill	100	
小麥 <i>Triticum aestivum</i>	100	或花期隔離 25 天以上
大麥 <i>Hordeum vulgare</i>	100	或花期隔離 20 天以上
馬鈴薯 <i>Solanum tuberosum</i> L.	100	
辣椒 <i>Capsicum annum</i>	100	
棉花 <i>Gossypium</i> L.	150	或花期隔離 20 天以上
玉米 <i>Zea mays</i> L.	300	或花期隔離 25 天以上
苜蓿 <i>Trifolium repens</i>	300	
黑麥草 <i>Lolium perenne</i>	300	
菸草 <i>Nicotiana tabacum</i>	400	
高粱 <i>Sorghum vulgare</i> Pers.	500	
南瓜 (西葫蘆) <i>Cucurbita pepo</i>	700	
芸苔屬 (油菜) <i>Brassica</i> L.	1000	

摘自閻 (2002) .

表 2. 控制基因漂流之分子策略及其應用現況

技術策略	應用現況
1.葉綠體轉殖(細胞質遺傳)	已應用在菸草、水稻、擬南芥、馬鈴薯、油菜、蕃茄
2.花粉(雄性)不育	已應用在菸草、油菜
3.種子不育	已應用在菸草
4.染色體組不親和性	試驗階段
5.閉花授精	試驗階段
6.無融合生殖(不受精生殖)	試驗階段
7.暫時性控制外源基因之表現 (利用化學誘導性啟動子去除外源基因)	試驗階段
8.基因轉殖緩和或弱化技術 (降低雜交後代之適應性)	試驗階段

摘自 Daniell (2002) .