

基改香蕉生物安全評估：對根圈土壤微生物相之影響

陳涵葳¹ 陳敬文² 曾清山¹ 吳明哲³ 杜元凱^{1,*}

摘要

陳涵葳、陳敬文、曾清山、吳明哲、杜元凱。2017。基改香蕉生物安全評估：對根圈土壤微生物相之影響。台灣農業研究 66(2):134–145。

基因改造作物可能對環境造成未知的風險，本研究利用平板計數法、微生物群落層級生理譜 (community-level physiological profiles; CLPP) 等方法評估 pflp (plant ferredoxin like protein) 香蕉轉殖系對根圈土壤微生物相之影響。試驗結果顯示，部分 pflp 轉殖系定植 1 mo 後，根圈土壤樣品之游離固氮菌及硝化細菌族群數目分別降低至 5.84–6.44 (\log_{10} CFU g^{-1}) 及 5.38–5.96 (\log_{10} CFU g^{-1})，顯著低於未轉殖對照品系 Gros Michel 之 6.59 及 6.52 (\log_{10} CFU g^{-1})，但定植 3 yr 轉殖系與未轉殖對照品系之根圈土壤樣品中，纖維分解菌、尿素分解菌、游離固氮菌、硝化系菌和氨氧化菌族群數目均無顯著差異。本試驗共檢測 2,052 個菌落，皆未檢測出有外源基因 *nptII* 的水平轉移情形。將 CLPP 參數進行主成分分析、群集分析以及生物多樣性分析，結果顯示轉殖系與未轉殖對照品系間根圈土壤微生物相無顯著差異，亦不會影響根圈土壤微生物群落多樣性及均勻度。

關鍵詞：基改作物、生物安全評估、根圈、微生物群落。

前言

香蕉為芭蕉科 (*Musaceae*) 芭蕉屬 (*Musa*)，根據聯合國世界糧食暨農業組織 (Food and Agriculture Organization; FAO) 統計資料顯示，香蕉年產量達 105 百萬噸，在熱帶、亞熱帶地區超過 150 個國家栽培香蕉，目前栽培最多的國家為印度、中國、菲律賓、巴西及烏干達 (FAOSTAT 2016)。由於經濟栽培用途的香蕉多為三倍體，具有雌配子不孕、雄不稔及無種子的特性，雜交育種工作常因染色體倍體數或親本基因組來源不同而窒礙難行 (Swennen & Vuylsteke 1993)。在香蕉品種改良的策略上，雜交育種費時較長，而體細胞變異 (somaclonal variation) 株的選拔不確定性較高，以基因轉殖方式可以快速得到穩定表現目標性狀的香蕉轉殖系，且三倍體香蕉具無

花粉、無種子的特性，外源基因流佈風險低 (Heslop-Harrison 2011)。2000 年烏干達政府支持國際香蕉促進聯盟 (International Network for the Improvement of Banana and Plantain; INIBAP)，利用生物技術提升東非高原香蕉產量；2005 年美國農業生物技術計畫 (Agricultural Biotechnology Support Project II; ABSPII) 資助康乃爾大學與烏干達國家農業研究機構，發展抗病香蕉轉殖技術，以維護東非高原香蕉生產；比爾蓋茲基金會亦在 2005 年提撥 5.1 億美元，支持澳洲昆士蘭科技大學研發富含維生素 A 與鐵離子等營養成分的香蕉，以解決非洲國家營養缺乏的問題。雖然，基因改造 (genetically modified) 技術是香蕉品種改良的捷徑，但隨著基改作物項增加、栽培面提升，大眾對於基改作物的生物安全議題也愈發重視。台灣基改作物安全評估項目包括下

投稿日期：2016 年 5 月 20 日；接受日期：2016 年 8 月 8 日。

* 通訊作者：yktu@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會台東區農業改良場作物改良課助理研究員。台灣 台東市。

³ 財團法人農業科技研究院植物科技研究所研究員兼所長。台灣 新竹市。

列 5 個方向：(1) 基改作物演變成雜草之可能性及其影響；(2) 基改作物對目標生物可能之直接或間接影響；(3) 基改作物對非目標生物可能之直接或間接影響；(4) 基改作物所含外源基因流入其他動植物、病原生物之可能性及其影響；(5) 基改作物發生基因外流時，對國內生態環境及原生種可能之影響 (Chan *et al.* 2004)。Angle (1994) 指出，基改作物及其產物通過根系分泌物或作物殘體進入土壤生態系統，可能與土壤微生物相互作用，造成土壤生物多樣性改變。因此，基改作物對土壤生態系統的影響受到眾多學者重視。

據估計，每克土壤中有上千種不同的微生物，大約 100 億個微生物，但由於培養基和培養條件的限制，目前可由傳統平板培養方法分離的微生物種類和數量僅占估計數量的 1–5%，而其餘 95–99% 微生物種群仍然未被分離 (Amann *et al.* 2000)，使得微生物族群難以定性描述。美國 Biolog 公司生產的微孔盤 (microplate) 是目前微生物群落層級多樣性 (community-level diversity) 研究的主流方法，可快速分析微生物群落功能性歧異度 (functional diversity)，得到微生物群落層級生理描述或稱群落層級生理譜 (community-level physiological profiles; CLPP) 的訊息。基改作物的外源基因和基因表達產物可通過根系分泌物或殘體進入土壤生態系統，根系釋放碳水化合物數量的不同，將導致微生物群落對根釋放物質的利用及使用效率不同 (Fang *et al.* 2005)。長期種植會改變微生物的代謝途徑，這些微生物關係到植物殘體的分解作用、氨化作用、硝化作用、反硝化作用、酶的合成和活性，進而對土壤微生物多樣性造成影響 (Trevors *et al.* 1994)。而基改作物攜帶的抗生素篩選基因只有在特定的試驗條件下才能發生向土壤微生物轉移，且轉化成功率很低 (de Vries *et al.* 2001; Pontiroli *et al.* 2010)。

本試驗以平板計數法及 CLPP 法分析轉殖系根圈土壤微生物群落數量及多樣性，並利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 檢測外源基因發生水平轉移之可能性，以期能作為評估基改作物生物安全之參考。

材料與方法

香蕉根圈土壤採樣

本試驗所使用之基改香蕉材料共有 MVES-3、MVES-4、MVCS-6、MVCS-20 及 MCPER-3 等 5 個轉殖系，由中央研究院馮騰永研究員所提供；轉殖載體構築方式如 Dayakar *et al.* (2003) 所述，轉殖系均能穩定表現 *pflp* (plant ferredoxin-like protein) 外源基因，並對黃葉病原 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 具有抗性 (Yip *et al.* 2011)。本試驗另以 Gros Michel 及 Pei Chiao 為未轉殖 (WT) 之對照品系。試驗於 2011–2014 年在行政院農業委員會農業試驗所隔離田進行，田間配置採完全隨機設計，取樣位置包含 5 個轉殖系與 2 個未轉殖 (WT) 品系之根圈，以及沒有植物根系穿越的總體土壤 (bulk soil) 做為試驗控制組 (CK)；取樣時間為定植後第 1 mo 及宿根栽培第 3 年。每個取樣位置分別選定 3 個採土點，各採集土面下 15 cm 深度之根圈土壤 100 g，混合成為 1 個土壤樣品，以粗篩網過濾去除植物殘體與碎石後於室溫下陰乾備用，以進行後續微生物群落之檢測。

外源基因水平轉移檢測

取生長於含卡納黴素 (Kanamycin; Kan) 培養基上的菌落，以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 檢測 *nptII* 外源基因。檢測之引子對為 sNPT-F (5'-CGCAT-GATTGAACAAGATGGATTGC-3') 與 sNPT-R (5'-ATGTTTCGCTTGTTGGTTCGAATGG-3')。反應液中含有 10× PCR buffer、10 mM dNTPs、10 mM 引子及 Pro Taq™ DNA polymerase (PROTECH)；PCR 反應條件為 94℃ 持續 7 min 打開雙股，接著 94℃ 持續 30 s、56℃ 持續 30 s、72℃ 持續 30 s，共 27 個循環，最後於 72℃ 反應 10 min。PCR 增幅片段以 2.5% 之洋菜膠體電泳分離後記錄。

pflp 香蕉轉殖系根毛數量測定

5 個 *pflp* 轉殖系與未轉殖對照之 Gros Michel 及 Pei Chiao 品系香蕉苗，經無菌處理與組織培養繼代繁殖後，挑選大小一致且未發

根之瓶苗進行試驗，無根瓶苗培養於 B3 固態培養基 (1/2 MS salts, 340 mg L⁻¹ NaH₂PO₄ · H₂O, 160 mg L⁻¹ adenine sulfate, 3% sucrose, pH 5.5, 0.7% agar)，於 25°C ± 2°C、12 h 光照環境下培養 1 mo 之後出瓶，小植株出瓶後定植於 3 吋盆，盆中介質分別為滅菌之泥炭土及田間土壤，每處理共 10 盆，於溫室生長 1 mo 後於解剖顯微鏡下記錄蕉苗單位長度根毛數量。

土壤微生物群落分析—平板計數法

秤取 0.5 g 乾燥之土壤樣品，加入 49.5 mL 之 0.2% water agar，室溫下震盪 30 min 進行土壤微生物萃取，待土壤顆粒自然沉降後，取上層液並以 0.85% NaCl 進行序列稀釋。以選擇性培養基平板計數法偵測下列指標性微生物：總細菌 (total bacteria; TB) 及總真菌 (total fungi; TF) 選擇性培養基配方如 Mislivec *et al.* (1992) 所述；格蘭氏陰性菌 (Gram-negative bacteria; GNB)、蛋白質分解菌 (proteolytic bacteria; PB) 及尿素分解菌 (ureolytic bacteria; UB) 參照 Ting *et al.* (2008) 方法配製；纖維分解菌 (cellulose decomposing bacteria; CDB) 參考 Teather & Wood (1982)；溶磷菌 (inorganic phosphate solubilizing bacteria; iPSB) 是依據 Nautiyal (1999) 方法操作。游離固氮菌 (*Azotobacteria*; AZ)、硝化細菌 (nitrite oxidizing bacteria; NOB) 及氨氧化菌 (ammonia oxidizing bacteria; AOB) 仿效 Wang *et al.* (2012)。上述不同之選擇性培養基中分別加入 100 μL 之 10³ 稀釋液，以 L 型玻璃棒將菌液塗佈均勻，每種選擇性培養基試驗進行 3 重複。所有培養基皆以滅菌釜 121°C、1.2 kg cm⁻²、15 min 條件滅菌。另依上述培養基配方及方法配置一批額外添加 50 mg L⁻¹ Kan 之培養基，塗佈 100 μL 之 10³ 土壤微生物萃取稀釋液，用以檢測抗生素水平轉移。總真菌置於室溫培養 3 d；溶磷菌、尿素分解菌、游離固氮菌、硝化細菌及氨氧化菌於 28°C 培養 7 d；總細菌、格蘭氏陰性菌、蛋白質分解菌及纖維分解菌置於 37°C 烘箱培養 3 d。逐天觀察紀錄上述微生物族群菌落數。

土壤微生物群落分析—微生物群落層級生理分析

以 Biolog EcoPlate™ (Biolog Inc.) 進行環境微生物 CLPP 多樣性分析，EcoPlate™ 微孔盤底部塗佈不同的碳源與 tetrazolium 呈色劑，每重複包含 1 個空白對照與 31 種碳源，試驗共計 3 重複，EcoPlate™ 於 37°C 下預熱後，在樣品槽中注入 10³ 稀釋樣品 150 μL，置於 37°C 培養 48 h，呈色結束後以全波長酵素免疫分析儀 (microplate manager benchmark plus reader, Rio-Red Laboratories Inc.) 偵測 590 nm 吸光值。樣品吸光值需經下列背景校正、誤差訊號排除、樣品槽平均發色 (average well color development; AWCD) 校正步驟，再進行統計分析。

Step 1：扣除背景值 $A_i' = A_i - A_0$

Step 2：排除誤差訊號 exclude $A_i' \leq 0$ or $A_i' \geq 2$

Step 3：計算樣品槽平均發色

$$AWCD(j,t) = \frac{1}{31} \sum_{i=1}^{31} OD(i,j,t)$$

Step 4：呈色校正 $OD_{adj}(i,j,t) = \frac{OD(i,j,t)}{AWCD(j,t)}$

A_0 ：未加碳源的空白對照組吸光值

A_i ：i 碳源樣品槽吸光值

A_i' ：扣除背景值之 i 碳源樣品槽吸光值

$AWCD(j,t)$ ：在 t 時間時，第 j 樣品盤 (重複) 的樣品槽平均發色

$OD_{adj}(i,j,t)$ ：在 t 時間時，第 j 樣品盤 (重複) 的 i 碳源樣品槽吸光校正值

訊息統計指數 (information statistic index) 依 Shannon & Wiener (1963) 所列公式進行計算：

$$\text{Shannon index } (H') = -\sum P_i \ln P_i \quad (1)$$

$$\text{Shannon evenness } (E) = \frac{H'}{\ln S} \quad (2)$$

P_i ：第 i 個呈色樣品槽占全部樣品槽中有呈色樣品槽之比例

S ：已呈色樣品槽的數量

統計分析

本試驗數據以 SAS 套裝軟體 (SAS version 7.1, SAS institute, Cary, NC, USA) 進行變方分析 (one-way ANOVA)、主成分分析 (principal components analysis; PCA) 及最小顯著差異性測驗 (Fisher's protected least significant difference test; LSD test) 比較各處理平均值間之差異性。

結果與討論

pflp 香蕉轉殖系對根圈土壤微生物數量之影響

植物根部分泌物 (root exudate) 組成包含醣類、胺基酸、有機酸、固醇類、酵素，以及植物荷爾蒙，能促進或抑制之微生物生長，影響根圈土壤微生物群落分布，進而改變根圈土壤的理化特性 (Nardi *et al.* 2000)。本試驗分析不同採樣時間之香蕉根圈土壤樣品，評估 pflp 香蕉轉殖系對土壤微生物造成之短期及長期影響。試驗結果顯示，轉殖系在定植後第 1 mo，對 TF、TB、ACT 與 GNB 等非特定微生物族群 (common microorganisms) 數量影響小，轉殖系 MVES-4、MVES-6 與未轉殖對照組在 TF、TB 與 GNB 間無顯著差異，而 MVCS-20 與 MCPER-3 轉殖系每克根圈土壤中 ACT 菌落形成單位 (colony forming unit; CFU) 之對數值分別為 5.22 與 5.19，顯著低於 Gros Michel 與 Pei Chiao 之 5.38 (\log_{10} CFU g^{-1})，MVES-3 根圈土壤之 TF、ACT 與 GNB 族群數量則比未轉殖對照品系高 (表 1)。pflp 香蕉轉殖系對功能性微生物族群 (functional microorganisms) 數量的影響方面，定植 1 mo 後 PB 與 iPSB 的族群數量在轉殖品系與未轉殖對照組間無顯著差異，但 UB 族群在轉殖系 MVES-4、MVES-6 及 MVCS-20 之根圈土壤中分布不均勻，3 次取樣計數結果差異很大，較難判斷這些轉殖系是否對 UB 族群生長發生抑制作用。而轉殖系 MVES-3、MVES-4、MVCS-6、MVCS-20 及 MCPER-3 在定植 1 mo 後，根圈土壤中 CDB、AZ 及 NOB 族群數量顯著少於未轉殖對照品系 (表 1)。檢測宿根

栽培第 3 年之根圈土壤樣品結果顯示，TB、CDB、UB、AZ、NOB、AOB 族群數目在轉殖系與未轉殖對照品系間無顯著差異，而轉殖系 MVES-3、MVES-4 宿根栽培根圈土壤中 PB 與 iPSB 族群數量顯著高於未轉殖對照品系 (表 1)。由上述結果推論，pflp 香蕉轉殖系對栽培初期根圈土壤微生物族群分布影響較大，尤其是 AZ、NOB 的族群數量，但是對宿根栽培第 3 年的根圈土壤則無此現象，除 PB 與 iPSB 族群外，轉殖系與未轉殖對照品系間皆無顯著差異。平板計數法之生物多樣性分析指標也顯示，pflp 香蕉轉殖系宿根栽培第 3 年之根圈，土壤微生物群落多樣性與均勻度與未轉殖對照品系間無顯著差異 (表 2)。pflp 香蕉轉殖系對根圈土壤微生物之影響，可能來自根部 ROS 表現量提升，以及根毛結構之改變。目前已知穩定表現 pflp 基因之阿拉伯芥轉殖系，除了提升抗病能力外，其根部活性氧化物 (reactive oxygen species; ROS) 含量較高。由於根毛發育與 ROS 之表現關係密切，所以 pflp 阿拉伯芥轉殖系與未轉殖對照組相比，其根毛發育顯著較多且長 (Shin *et al.* 2011)；而本試驗為瞭解 pflp 基因表現是否也能影響香蕉轉殖系根毛發育，將各品系香蕉組培苗移植至含有田間土壤及無菌泥炭土的盆中種植 1 mo，試驗結果顯示 pflp 單位根長度的根毛數量與未轉殖對照品種間並無顯著差異 (圖 1)。可能是因為 pflp 基因選殖自雙子葉甜椒中，雙子葉植物基因於單子葉植物中表現時，常會發生密碼子偏移 (codon bias) 現象 (Kawabe & Miyashita 2003)，使轉殖基因功能性與原來不盡相同，或是 CaMV 35S 啟動子在單子葉植物中表現量較低、組織細胞特異性表現所致 (Benfey & Chua 1989; Battraw & Hall 1990)。但 pflp 香蕉轉殖系根部 ROS 含量是否提升，仍待進一步試驗釐清。Lu *et al.* (2008) 為探討基因轉殖香蕉植株對根圈土壤微生物的影響，將穩定表現 Gus-nptII 外源基因之香蕉轉殖系定植於田間，在苗期、成苗期、花序抽出期採樣並檢測土壤微生物數量變化。結果顯示，香蕉轉殖系對各個時期的根圈土壤微生物數量沒有顯著影響。pflp 香蕉轉殖系 (轉殖親本為 'Sukari

表 1. pflp 香蕉轉殖系與非轉殖對照組對根圈土壤微生物族群數目之影響。
 Table 1. The quantity of culturable microflora in rhizosphere soils of pflp and non-transgenic banana lines, log₁₀ CFU g⁻¹ (dry soil)^z.

Transplanting period	Sampling site ^y	Common microorganism										Functional microorganism																																																																																																																																																																																				
		TF	TB	ACT	GNB	PB	CDB	iPSB	UB	AZ	NOB	AOB	TF	TB	ACT	GNB	PB	CDB	iPSB	UB	AZ	NOB	AOB																																																																																																																																																																									
1st month	Bulk soil (CK)	4.64 ± 0.09 bc ^x	5.57 ± 0.06 a	5.26 ± 0.06 c	5.77 ± 0.04 a	5.36 ± 0.33 a	5.70 ± 0.10 ab	5.68 ± 0.22 a	5.59 ± 0.12 a	6.69 ± 0.04 a	6.52 ± 0.10 a	6.48 ± 0.06 a	Gros Michel (WT)	4.01 ± 0.11 c	5.55 ± 0.17 a	5.38 ± 0.06 b	5.48 ± 0.06 a	5.10 ± 0.19 a	5.80 ± 0.14 a	5.54 ± 0.08 a	5.11 ± 0.37 a	6.59 ± 0.09 a	6.52 ± 0.06 a	6.04 ± 0.14 c	Pei Chiao (WT)	4.73 ± 0.07 bc	5.77 ± 0.07 a	5.38 ± 0.07 b	5.09 ± 0.14 a	5.16 ± 0.31 a	5.48 ± 0.06 bc	5.58 ± 0.07 a	5.09 ± 0.95 a	6.61 ± 0.04 a	6.60 ± 0.09 a	6.30 ± 0.04 b	MVES-3	5.00 ± 0.09 a	5.69 ± 0.02 a	5.78 ± 0.01 a	5.30 ± 0.29 a	5.60 ± 0.38 a	5.29 ± 0.06 c	5.68 ± 0.12 a	4.10 ± 0.17 ab	5.84 ± 0.03 e	5.38 ± 0.10 c	5.72 ± 0.11 d	MVES-4	3.82 ± 0.38 c	5.58 ± 0.14 a	5.47 ± 0.02 b	4.79 ± 0.30 a	5.76 ± 0.25 a	5.26 ± 0.16 c	5.70 ± 0.03 a	1.43 ± 2.48 b	5.88 ± 0.08 de	5.45 ± 0.11 c	5.67 ± 0.07 d	MVCS-6	4.70 ± 0.50 bc	5.71 ± 0.09 a	5.49 ± 0.04 b	5.27 ± 0.53 a	5.36 ± 0.05 a	5.44 ± 0.13 c	5.60 ± 0.12 a	2.97 ± 2.57 ab	6.16 ± 0.09 c	5.91 ± 0.07 b	6.01 ± 0.11 c	MVCS-20	4.75 ± 0.34 bc	5.63 ± 0.09 a	5.22 ± 0.14 c	5.07 ± 1.07 a	5.42 ± 0.08 a	5.46 ± 0.21 c	5.65 ± 0.13 a	2.93 ± 2.56 ab	6.44 ± 0.12 b	5.96 ± 0.22 b	6.02 ± 0.06 c	MCPER-3	4.29 ± 0.26 bc	5.52 ± 0.12 a	5.19 ± 0.08 c	5.06 ± 0.27 a	5.08 ± 0.44 a	5.43 ± 0.12 c	5.75 ± 0.11 a	5.31 ± 0.14 a	6.01 ± 0.11 d	5.95 ± 0.10 b	6.06 ± 0.08 c	Bulk soil (CK)	3.63 ± 0.31 d	5.28 ± 0.16 a	5.26 ± 0.19 a	4.48 ± 0.34 b	4.56 ± 0.08 b	5.16 ± 0.07 a	5.03 ± 0.03 b	4.05 ± 0.14 a	5.01 ± 0.08 a	4.50 ± 0.25 a	4.86 ± 0.17 a	Gros Michel (WT)	3.81 ± 0.27 cd	5.35 ± 0.13 a	5.06 ± 0.01 b	4.96 ± 0.07 ab	4.66 ± 0.14 b	5.01 ± 0.13 a	5.13 ± 0.03 b	3.84 ± 0.12 a	4.90 ± 0.17 a	4.76 ± 0.05 a	5.11 ± 0.13 a	Pei Chiao (WT)	4.36 ± 0.12 b	5.32 ± 0.16 a	5.25 ± 0.12 a	5.15 ± 0.06 a	4.65 ± 0.14 b	5.05 ± 0.02 a	5.04 ± 0.05 b	3.66 ± 0.22 a	4.84 ± 0.10 a	4.65 ± 0.22 a	5.11 ± 0.11 a	MVES-3	4.14 ± 0.13 bc	5.52 ± 0.34 a	5.28 ± 0.05 a	5.29 ± 0.07 a	5.06 ± 0.07 a	5.08 ± 0.50 a	5.34 ± 0.11 a	3.98 ± 0.07 a	4.90 ± 0.01 a	4.70 ± 0.04 a	4.98 ± 0.12 a	MVES-4	4.08 ± 0.17 bc	5.35 ± 0.05 a	4.86 ± 0.08 c	4.80 ± 0.26 ab	5.24 ± 0.10 a	5.24 ± 0.15 a	5.30 ± 0.04 a	3.76 ± 0.41 a	5.04 ± 0.04 a	4.63 ± 0.28 a	5.03 ± 0.04 a	MVCS-6	4.79 ± 0.30 a	5.32 ± 0.07 a	4.82 ± 0.08 c	5.18 ± 0.21 a	5.12 ± 0.18 a	5.37 ± 0.07 a	5.07 ± 0.10 b	3.74 ± 0.23 a	4.88 ± 0.08 a	4.87 ± 0.02 a	5.00 ± 0.11 a	MVCS-20	3.79 ± 0.33 cd	5.36 ± 0.17 a	5.13 ± 0.15 ab	4.55 ± 0.67 b	5.21 ± 0.06 a	5.20 ± 0.03 a	5.13 ± 0.11 b	3.72 ± 0.12 a	4.76 ± 0.18 a	4.60 ± 0.22 a	5.05 ± 0.22 a	MCPER-3	3.83 ± 0.16 cd	5.32 ± 0.09 a	5.15 ± 0.06 ab	4.82 ± 0.13 ab	4.64 ± 0.11 b	5.11 ± 0.12 a	5.07 ± 0.05 b	3.73 ± 0.05 a	4.94 ± 0.17 a	4.81 ± 0.11 a	5.09 ± 0.16 a

^z Microflora testing included total fungi (TF), total bacteria (TB), actinomycetes (ACT), gram-negative bacteria (GNB), proteolytic bacteria (PB), cellulose decomposing bacteria (CDB), inorganic phosphate solubilizing bacteria (iPSB), ureolytic bacteria (UB), *Azotobacteria* (AZ), nitrite oxidizing bacteria (NOB), and ammonia oxidizing bacteria (AOB).
^y Rhizosphere soils collected from 3 sampling points per site were mixed as a composite sample.
^x Means ± standard error ($n = 3$) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at $\alpha = 0.05$ by Fisher's protected LSD test.

表 2. pflp 香蕉轉殖系與非轉殖對照組對根圈土壤微生物歧異度指標之影響。

Table 2. Effects of the pflp and non-transgenic banana lines on the functional diversity index of microflora in rhizosphere soils.

Transplanting period	Sampling site	Plat counting method		CLPP method	
		Shannon's index	Shannon evenness	Shannon's index	Shannon evenness
1st month	Bulk soil	1.75 ± 0.04 cd ^z	0.52 ± 0.02 de	3.03 ± 0.06 a	0.96 ± 0.05 a
	Pei Chiao	1.66 ± 0.12 d	0.48 ± 0.06 e	2.95 ± 0.21 a	0.90 ± 0.01 a
	Gros Michel	1.65 ± 0.09 d	0.48 ± 0.04 e	2.92 ± 0.15 a	0.91 ± 0.01 a
	MVES-3	2.17 ± 0.02 a	0.79 ± 0.01 a	2.76 ± 0.06 a	0.89 ± 0.01 a
	MVES-4	2.05 ± 0.03 b	0.75 ± 0.02 ab	2.91 ± 0.03 a	0.88 ± 0.04 a
	MVCS-6	2.02 ± 0.06 b	0.71 ± 0.04 bc	2.81 ± 0.02 a	0.89 ± 0.01 a
	MVCS-20	1.80 ± 0.03 c	0.57 ± 0.03 d	3.01 ± 0.07 a	0.86 ± 0.03 a
	MCPER-3	2.01 ± 0.04 b	0.68 ± 0.02 c	2.62 ± 0.11 a	0.90 ± 0.02 a
	3rd year	Bulk soil	2.04 ± 0.12 a	0.70 ± 0.09 a	3.00 ± 0.04
Pei Chiao		2.13 ± 0.06 a	0.77 ± 0.04 a	2.99 ± 0.12 a	0.94 ± 0.11 a
Gros Michel		2.14 ± 0.03 a	0.77 ± 0.02 a	3.18 ± 0.09 a	0.93 ± 0.01 a
MVES-3		2.03 ± 0.20 a	0.70 ± 0.13 a	3.25 ± 0.03 a	0.96 ± 0.02 a
MVES-4		2.13 ± 0.08 a	0.76 ± 0.06 a	3.10 ± 0.02 a	0.93 ± 0.01 a
MVCS-6		2.20 ± 0.06 a	0.82 ± 0.05 a	3.19 ± 0.01 a	0.95 ± 0.02 a
MVCS-20		2.07 ± 0.17 a	0.73 ± 0.12 a	2.76 ± 0.04 a	0.88 ± 0.04 a
MCPER-3		2.14 ± 0.03 a	0.77 ± 0.02 a	3.05 ± 0.06 a	0.93 ± 0.01 a

^z Means ± standard error ($n = 3$) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

Ndizi', AAB 基因組) 的安全評估試驗已於烏干達康培拉 (Kampala) 完成，單股結構多形性 (single-strand conformation polymorphism; SSCP) 結果顯示，宿根栽培 3 yr 之轉殖系與未轉殖對照品系，其根圈土壤微生物並無顯著差異。配合次世代定序技術分析根圈土壤微生物多樣性，結果亦顯示轉殖系與未轉殖品種間無顯著差異 (Nimusiima *et al.* 2015)。

pflp 香蕉轉殖系外源基因水平轉移風險評估

植物中 25% 的碳同化物會從根部釋放至土壤環境中 (Philippot *et al.* 2013)，基改作物的外源基因產物也可經由此途徑進入生態系中。目前已知細菌基因轉移的形式可分成導入 (transduction)、接合 (conjugation) 與轉型 (transformation) 等 3 種，而轉型是指微生物攝入裸露的 DNA 片段，再整合入微生物基因組的過程，自然界中已有不少植物的基因

片段經轉型作用進入微生物的案例。如在沼澤等低氧環境下，可旺盛生長的透明顫菌屬 (*Vitreoscilla* sp.) 會表現一種血紅蛋白 (hemoglobin) 以提高菌體氧氣利用能力，而這種蛋白與羽扇豆所表現的豆科血紅蛋白 (leghemoglobin) 之序列具有高度同源性 (Wakabayashi *et al.* 1986)，可能是物種間發生轉型作用的結果 (Nielsen *et al.* 1998)。本試驗檢測 pflp 香蕉轉殖系根圈土壤微生物對 Kan 的抗性，轉殖系定植 1 mo 後，僅 MVCS-6 轉殖系根圈土壤中 iPSB 族群對 Kan 抗性提升 (表 3)，但對抗性菌落進行 PCR 則沒有偵測到 *nptII* 外源基因 (圖 1)；檢測宿根栽培第 3 年根圈土壤微生物對 Kan 抗性結果顯示，轉殖系 MCPER-3、MVES-3 及 MVES-4 分別顯著提高 PB、CDB 及 NOB 族群對 Kan 之抗性 (表 3)，本試驗共檢測 2,052 個菌落，皆未檢測出有外源基因 *nptII* 的水平轉移情形 (圖 2)。一般情況下物種間基因水平轉移發生機率相當低，約在

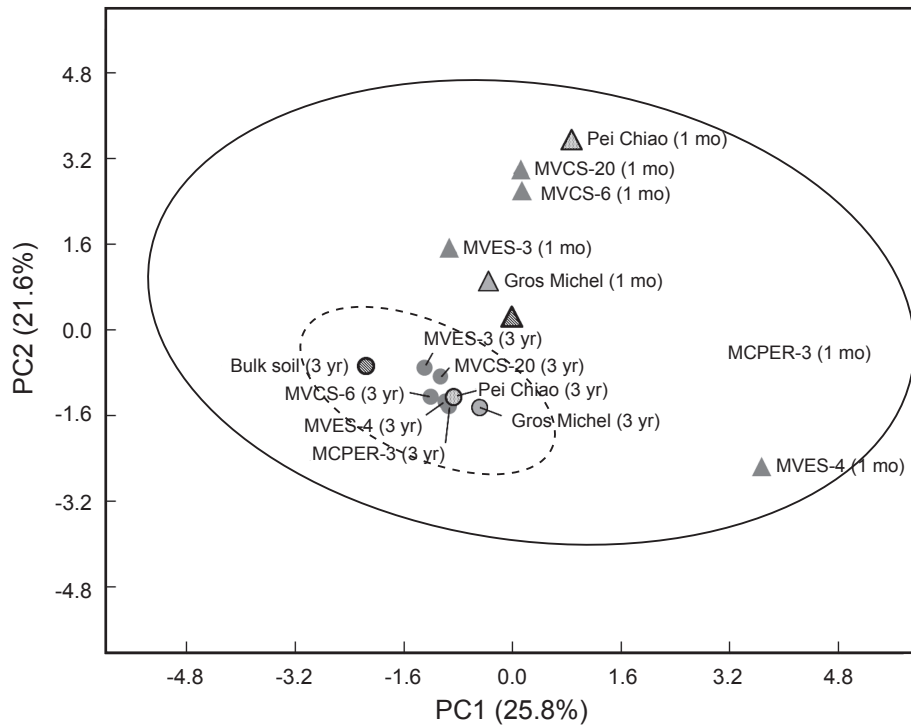


圖 1. 不同香蕉品系根圈土壤微生物對 EcoPlate™ 碳源利用之主成分分析。

Fig. 1. Principle component analysis of EcoPlate™ carbon substrates utilized by microflora in rhizosphere and bulk soils of different banana lines. Scores of each sample for the first and second PCs were plotted. Symbol type indicates different rhizosphere soil sampling times. The soil samples were collected from the rhizosphere of each banana lines at 1 mo (triangle symbol) and 3 yr (circle symbol) after transplanting. Bulk soil samples were collected outside the rhizosphere of banana plants. The solid and dashed ellipses describe 95% confidence region of 1 mo and 3 yr samples respectively.

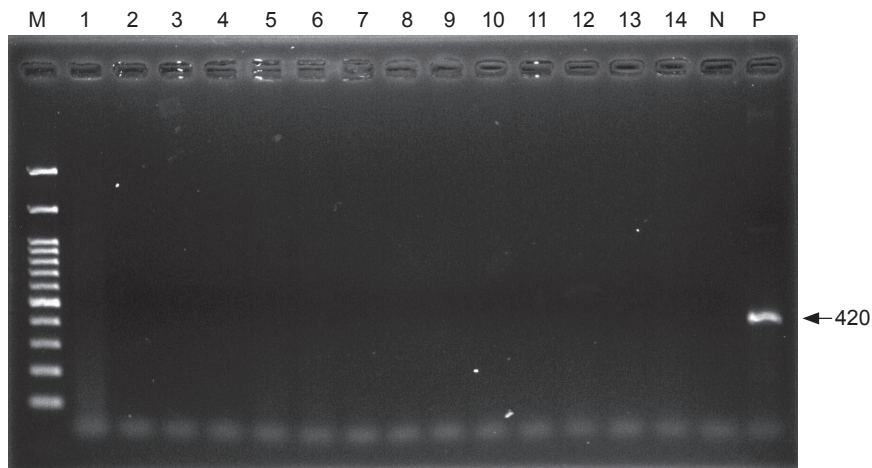


圖 2. 以聚合酶鏈鎖反應檢測基改香蕉外源基因水平流佈。

Fig. 2. The gene flow detection of soil microorganisms in field-cultivated pflp transgenic banana lines. Lane M, 100 bp marker; Lane 1–14, Kanamycin-resistant iPSB isolated from MVES-6 rhizosphere soil; Lane N, negative control line; and Lane P, positive control (*ntpII* gene).

表 3. 功能性根圈土壤微生物對卡納黴素之抗性反應。
Table 3. Kanamycin resistance rate of functional microflora in rhizosphere soils of pfp and non-transgenic banana lines^z.

Transplanting period	Sampling site ^y	Kanamycin resistance rate (%)							
		PB	CDB	iPSB	UB	AZ	NOB	AOB	
1st month	Bulk soil	017.5 ± 6.6 b ^x	03.7 ± 1.9 b	01.7 ± 1.8 b	00.0 ± 0.0 a	0.4 ± 0.2 bc	0.2 ± 0.1 d	0.0 ± 0.0 b	
	Gros Michel	059.4 ± 18.7 a	00.7 ± 0.3 b	03.6 ± 3.2 b	00.0 ± 0.0 a	0.8 ± 0.5 abc	0.3 ± 0.3 cd	0.0 ± 0.0 b	
	Pei Chiao	000.9 ± 1.6 b	28.9 ± 10.5 a	03.9 ± 3.5 b	00.0 ± 0.0 a	1.6 ± 0.3 ab	0.1 ± 0.1 d	0.3 ± 0.2 ab	
	MVES 3	027.3 ± 25.5 ab	08.3 ± 4.4 b	03.1 ± 2.8 b	00.0 ± 0.0 a	1.8 ± 2.0 a	0.0 ± 0.0 d	2.3 ± 4.1 a	
	MVES 4	003.0 ± 2.9 b	03.0 ± 5.2 b	01.2 ± 2.1 b	00.0 ± 0.0 a	0.3 ± 0.6 c	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 b	
	MVCS 6	003.4 ± 2.2 b	22.9 ± 25.1 a	45.9 ± 21.5 a	00.0 ± 0.0 a	0.4 ± 0.3 bc	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 b	
	MVCS 20	016.7 ± 2.3 b	05.1 ± 0.4 b	06.0 ± 6.2 b	00.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d	0.6 ± 0.5 ab	
	MCPER 3	033.7 ± 19.3 ab	04.2 ± 1.9 b	00.6 ± 1.1 b	00.0 ± 0.0 a	0.8 ± 0.5 abc	0.9 ± 0.8 bc	1.2 ± 0.5 ab	
	Bulk soil	044.7 ± 12.0 b	04.6 ± 0.4 b	00.8 ± 0.8 a	02.2 ± 3.8 a	0.3 ± 0.5 b	0.0 ± 0.0 b	0.6 ± 0.5 b	
	Gros Michel	034.8 ± 50.2 b	10.0 ± 8.6 b	01.1 ± 0.4 a	00.0 ± 0.0 a	0.5 ± 0.8 b	0.5 ± 0.9 b	2.0 ± 1.4 ab	
3rd year	Pei Chiao	050.8 ± 12.8 b	08.9 ± 10.4 b	02.2 ± 1.9 a	00.0 ± 0.0 a	6.8 ± 2.5 a	0.0 ± 0.0 b	1.3 ± 1.2 b	
	MVES 3	032.4 ± 10.1 b	56.4 ± 48.6 a	01.4 ± 0.3 a	00.0 ± 0.0 a	4.6 ± 6.3 b	2.8 ± 2.6 ab	1.6 ± 1.8 ab	
	MVES 4	007.4 ± 8.0 b	14.2 ± 6.8 b	01.7 ± 0.6 a	02.8 ± 4.8 a	2.2 ± 2.5 b	4.7 ± 3.4 a	1.5 ± 1.3 ab	
	MVCS 6	045.0 ± 33.1 b	26.9 ± 12.7 ab	02.4 ± 1.1 a	00.0 ± 0.0 a	4.8 ± 4.6 b	0.8 ± 1.4 b	1.8 ± 1.1 ab	
	MVCS 20	024.6 ± 5.6 b	03.3 ± 0.5 b	01.3 ± 0.3 a	00.0 ± 0.0 a	3.1 ± 1.8 b	2.8 ± 3.4 ab	4.6 ± 3.9 a	
	MCPER 3	106.7 ± 39.0 a	23.6 ± 2.9 b	03.1 ± 3.0 a	06.7 ± 11.5 a	2.7 ± 3.4 b	1.8 ± 1.6 ab	3.5 ± 1.6 ab	

^z Microflora testing included proteolytic bacteria (PB), cellulose decomposing bacteria (CDB), inorganic phosphate solubilizing bacteria (iPSB), ureolytic bacteria (UB), *Azotobacteria* (AZ), nitrite oxidizing bacteria (NOB), and ammonia oxidizing bacteria (AOB). The selective media contained kanamycin (50 mg L⁻¹).

^y Rhizosphere soil from the 3 sampling point per site were mixed as a composite rhizosphere soil sample.

^x Means ± standard error (n = 3) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

10^{-3} – 10^{-17} 間 (Nielsen *et al.* 2000; Meier & Wackernagel 2001); Nicolia *et al.* (2014) 更指出, 水平轉移可能只在特定實驗室條件下低頻率發生。基因水平轉移難偵測且常常被低估原因, 是在於大部分發生移轉的基因都呈現鑲嵌 (mosaic) 的狀態, 而自然狀況下基因發生移轉到新性狀表現需要的時間可能需要數百萬年, 除非改變環境, 提高選拔壓力, 或是增加重組頻率才有可能加速, 但這也不是在基改作物單一生長週期內可能發生的現象 (Heinemann & Traavik 2004)。

pflp 香蕉轉殖系根圈土壤微生物群落層級生理分析

CLPP 是一個快速簡便且靈敏度高的方法, 可以獲得較為詳盡的環境微生物群落結構和功能多樣性方面的資訊, 其在研究微生物群落功能多樣性上頗具潛力, 目前也有廣泛的應用。本試驗利用 Biolog 公司生產之 EcoPlate™ 微孔盤, 檢測 pflp 轉殖系根圈土壤微生物群落對 31 種碳源的利用能力, 得到 CLPP 資料訊息。將微孔盤樣品吸光值資料計算 AWCD 後進行校正後進行統計分析, 主成分分析結果顯示第一主成分 (PC1) 占總變異的比例達 25.8%, 31 種碳源中以 pyruvic acid methyl ester、L-asparagine 及 putrescine 等為主要變異量; 第二主成分 (PC2) 占總變異的比例為 21.6%, 其中 D-mannitol 及 putrescine 對第二主成分的影響較大, PC1 與 PC2 無法區別 pflp 轉殖系與未轉殖對照品系根圈土壤樣品微生物對碳源利用的差異, 但可見宿根種植第 3 年之香蕉根圈土壤樣品點集中於的 3 象限。定植後 1mo 之根圈土壤樣品點則沿 PC2 正向分布, 顯示 PC2 對定植 1 mo 之 Pei Chiao、Gros Michel、MVES-3、MVCS-6 及 MVCS-20 根圈土壤微生物影響較 PC1 大, 且定植後 1 mo 之 bulk soil 樣品相當接近原點, 表示該取樣位置的微生物群落對各種碳源的利用率均低 (圖 1)。植物根系分泌物組成成分影響根圈微生物的生長, 缺乏植物根際分泌物及養分之 bulk soil 微生物含量通常較低 (Somers *et al.* 2004), 而香蕉根圈微生物群落對不同碳源代謝能力, 在定植

1 mo 時歧異度較大。由圖 1 可知, MCPER-3 與 MVES-4 樣品點位於第 4 象限, 定植 1 mo 的根圈土壤樣品點 95% 信賴區間大於宿根種植第 3 年之樣品點, 轉殖系與未轉殖對照品系間的差異無法區分 (圖 1)。將 CLPP 參數進行群集分析, 由圖 3 亦可見宿根種植第 3 年的根圈土壤微生物群落對碳源利用能力較相似。本試驗之主成分分析與群集分析結果, 可區別定植後 1 mo 與宿根栽培第 3 年之根圈土壤樣品, 但無法區分轉殖系與未轉殖對照品系間差異。CLPP 之生物多樣性分析的結果也顯示, pflp 轉殖系不會影響根圈土壤微生物群落多樣性及均勻度 (表 2)。Lu *et al.* (2008) 利用 Biolog GN™ 微孔盤探討 Gus-nptII 香蕉轉殖系根圈土壤微生物群落結構與功能, 研究結果指出轉殖系對樣品槽平均發色變化曲線、Shannon index、Shannon evenness、Simpson index、Mcintosh index 及 Mcintosh evenness 均無顯著影響, 顯示 Gus-nptII 香蕉轉殖系對根圈土壤微生物群落結構和功能多樣性沒有影響。

結論

本試驗分析不同採樣時間的香蕉根圈土壤微生物, CDB、AZ 及 NOB 族群數量在轉殖系定植後 1 mo 顯著降低, 但宿根栽培第 3 年之轉殖系根圈土壤樣品 PB 菌落數顯著高於未轉殖對照組, 且 pflp 單位根長度的根毛數量與未轉殖對照品種間並無顯著差異。在外源基因水平轉移風險評估方面, 共檢測 2,052 個菌落, 皆未檢測出有外源基因 nptII 的水平轉移情形。CLPP 參數經群集分析及生物多樣性分析結果顯示, pflp 轉殖系對根圈土壤微生物群落多樣性及均勻度沒有顯著影響。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 104 農科-6.3.2-農-C1 計畫經費支援, 以及中研院馮騰永研究員提供香蕉轉殖系作為試驗材料, 謹申謝忱。

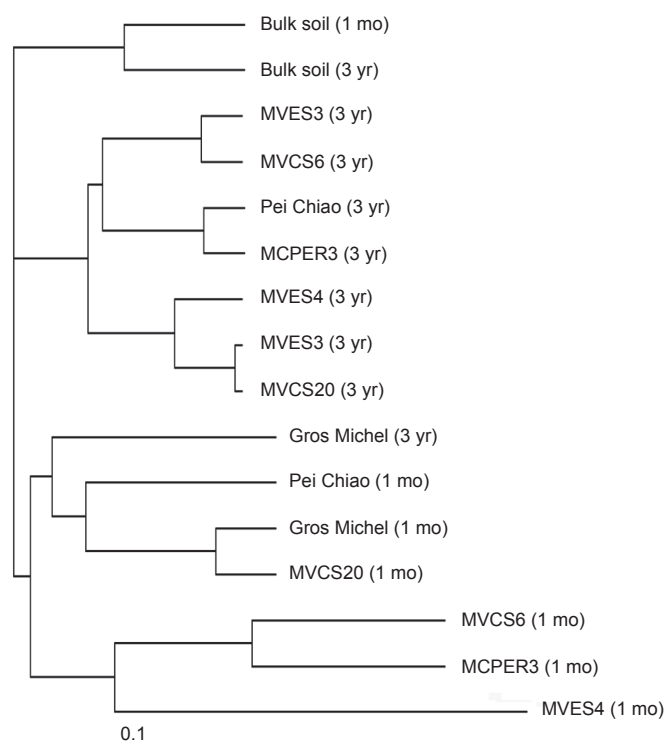


圖 3. 根圈土壤微生物樣品之群集分析。

Fig. 3. Cluster analysis using Jaccard coefficients of similarity and weighted pair groups for different rhizosphere soil samples. Similarity was analyzed using the Past3 and TreeView software. The soil samples were collected from the rhizosphere of different banana lines 1 mo and 3 yr after transplanting. Bulk soil samples were collected outside the rhizosphere of banana plants. Scale bar indicates percentage of similarity.

引用文獻

- Amann, R. and W. Ludwig. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:555–565.
- Angle, J. S. 1994. Release of transgenic plants: Biodiversity and population-level considerations. *Mol. Ecol.* 3:45–50.
- Battraw, M. J. and T. C. Hall. 1990. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-beta-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol. Biol.* 15:527–538.
- Benfey, P. N. and N. H. Chua. 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244:174–181.
- Chan, L. F., H. Y. Lu, C. T. Lu, and M. L. Wei. 2004. Risk assessment procedures and methods of the safety of transgenic crops. *J. Agric. Sci.* 52:120–130. (in Chinese with English abstract)
- Dayakar, B. V., H. J. Lin, C. H. Chen, M. J. Ger, B. H. Lee, C. H. Pai, D. Chow, H. E. Huang, S. Y. Hwang, M. C. Chung, and T. Y. Feng. 2003. Ferredoxin from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) intensifying harpin-pass-mediated hypersensitive response shows an enhanced production of active oxygen species (AOS). *Plant Mol. Biol.* 51:913–924.
- de Vries, J., P. Meier, and W. Wackernagel. 2001. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:211–215.
- Fang, M., R. J. Kremer, and P. P. Motavalli. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of non-transgenic and transgenic corn. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4132–4136.
- FAOSTAT. 2016. Food and agriculture organization statistics data. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (visited on 5/4/2016)
- Heinemann, J. A. and T. Traavik. 2004. Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 22:1105–1109.

- Heslop-Harrison, J. S. 2011. Genomics, banana breeding and super domestication. *Acta Hort.* 897:55–61.
- Kawabe, A. and N. T. Miyashita. 2003. Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species. *Genes Genet. Syst.* 78:343–352.
- Lu, Y., C. P. He, W. H. Wu, and Z. W. Fan. 2008. Effect of transgenic banana plants on the microorganism in the soil. *Chinese J. Trop. Crops* 29:38–41. (in Chinese with English abstract)
- Meier, P. and W. Wackernagel. 2003. Mechanisms of homology-facilitated illegitimate recombination for foreign DNA acquisition in transformable *Pseudomonas stutzeri*. *Mol. Microbiol.* 48:1107–1118.
- Mislivec, P. B., L. R. Beuchat, and M. A. Cousin. 1992. Yeast and molds. p.239–249. *in*: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (Vanderzant, C. and D. S. Splittoeffer, eds.) AJPB Pub. New York. 1219 pp.
- Nardi, S., G. Concheri, D. Pizzeghello, A. Sturaro, R. Rella, and G. Pavoli. 2000. Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere* 5:653–658.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:265–270.
- Nicolia, A., A. Manzo, and F. Veronesi. 2014. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Crit. Rev. Biotechnol.* 34:77–88.
- Nielsen, D. M., A. M. Bones, K. Smalla, and J. D. van Elsas. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacterial- A rare event? *FEMS Microbiol. Rev.* 22:79–103.
- Nimusiima, J., M. Köberl, J. B. Tumuhairwe, J. Kubiriba, C. Staver, and G. Berg. 2015. Transgenic banana plants expressing *Xanthomonas* wilt resistance genes revealed a stable non-target bacterial colonization structure. *Sci. Rep.* 5. doi:10.1038/srep18078.
- Philippot, L., J. M. Raaijmakers, P. Lemanceau, and W. H. van der Putten, L. 2013. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:789–799.
- Pontiroli, A., M. T. Ceccerini, and J. Pote. 2010. Long-term persistence and bacterial transformation potential of transplastomic plant DNA in soil. *Res. Microbiol.* 161:326–334.
- Shannon, C. E. and W. Wiener. 1963. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press. Urbana, IL. 125 pp.
- Shin, L. J., H. E. Huang, H. Chang, Y. H. Lin, T. Y. Feng, and M. J. Ger. 2011. Ectopic ferredoxin I protein promotes root hair growth through induction of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 168:434–440.
- Somers, E., J. Vanderleyden, and M. Srinivisam. 2004. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30:205–240.
- Swennen, R. and D. Vuylsteke. 1993. Breeding Black Sigatoka resistant plantains with a wild banana. *Trop. Agric.* 70:74–77.
- Teather, R. M. and P. J. Wood. 1982. Use of Congo-red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:777–780.
- Ting, M. Y., H. D. Shih, and C. Y. Lin. 2008. Increased susceptibility of rice following insertion of amylopullulanase gene, to brown spot caused by *Bipolaris oryzae*. *J. Phytopathol.* 156:530–533. (in Chinese with English abstract)
- Trevors, J. T., P. Kuikman, and B. Watson. 1994. Transgenic plants and biogeochemical cycles. *Mol. Ecol.* 3:57–64.
- Wakabayashi, S., H. Matsubara, and D. A. Webster. 1986. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature* 322:481–483.
- Wang, B., W. Wang, H. J. Han, H. B. Hu, and H. F. Zhuang. 2012. Nitrogen removal and simultaneous nitrification and denitrification in a fluidized bed step-feed process. *J. Environ. Sci.* 24:303–308.
- Yip, M. K., S. W. Lee, K. C. Su, Y. H. Lin, T. Y. Chen, and T. Y. Feng. 2011. An easy and efficient protocol in the production of *pflp* transgenic banana against *Fusarium* wilt. *Plant Biotechnol. Rep.* 5:245–254.

Biosafety Assessment of GM Banana: The Effect on Microflora Community in Rhizosphere Soil

Han-Wei Chen¹, Jing-Wen Chen², Ching-Shan Tseng¹, Min-Tze Wu³, and Yuan-Kai Tu^{1,*}

Abstract

Chen, H. W., J. W. Chen, C. S. Tseng, M. T. Wu, and Y. K. Tu. 2017. Biosafety assessment of GM banana: The effect on microflora community in rhizosphere soil. *J. Taiwan Agric. Res. 66(2):134–145.*

The environmental impacts on genetically modified (GM) crops are still unknown. This study aimed to explore the potential risk of pflp (plant ferredoxin-like protein) transgenic banana lines on rhizosphere microbial community and to investigate whether the gene flow occurs through horizontal gene transfer. The conventional plate counting method and the community-level physiological profiles (CLPP) method were used for evaluating rhizosphere microbial community. The results showed that most rhizosphere soil samples taken from pflp transgenic banana lines had reduced levels of *Azotobacteria* and nitrite oxidizing bacteria at respective 5.38–5.96 (\log_{10} CFU g⁻¹) one month after transplanting. However, no significant difference was found in the quantity of culturable microorganisms in rhizosphere soils 3 years after transplanting. In this study, 2,052 colonies were analyzed for horizontal gene transfer, but no *np1II* fragment was detected. Results of cluster analysis for CLPP showed no difference between transgenic banana lines and their non-transgenic counterparts in microflora community composition. In addition, no significant difference was observed in species diversity and evenness of rhizosphere microorganisms between GM and non-GM banana plants. We conclude that pflp transgenic banana lines may not affect the diversity of rhizosphere microflora community structure, but have slight effects on microbial community in rhizosphere during first few months after transplanting.

Key words: Genetic modified crops, Biosafety assessment, Rhizosphere, Microflora community.

Received: May 20, 2016; Accepted: August 8, 2016.

* Corresponding author, e-mail: yktu@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Crop Improvement Division, Taitung District Agricultural Research and Extension Station, Taitung, Taiwan, ROC.

³ Research Fellow and Director, Plant Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan, ROC.