

台灣市售抗固殺草基改大豆之篩選及其基因特性分析

袁秋英*、林李昌、蔣慕琰

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所公害防治組

摘要

台灣每年進口大豆約有 250 萬噸，一般市售的大豆種子尚具有生物活性，本研究於中部零售店收集大豆種子，測定其種子發芽率及幼株對固殺草(glufosinate)除草劑之反應，並由抗性植株葉片中萃取核酸，探討抗固殺草轉基因之構築與特性。將大豆種子於溫室內播種，株齡為 3-5 葉之幼苗噴施固殺草 $0.675 \text{ kg ai ha}^{-1}$ ，施藥後 3-4 日，多數大豆植株呈現傷害徵狀，並於 1 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 0-13%之間，初步推測為抗固殺草之轉基因大豆。進一步抽取大豆幼葉基因組 DNA，以 CaMV 35S 啟動子(promoter)及 35S 終結子(terminator) 核酸序列設計引子，進行 PCR 反應，結果具抗藥之疑似轉基因大豆可增幅約 1.0 kb DNA 片段，非抗性大豆則未增幅出此 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，結果此 PCR 產物由 35S 啟動子(265 bp)、*pat* 基因(501 bp) 及 35S 終結子(110 bp) 等片段組成，顯示此抗固殺草大豆轉基因組成與 LibertyLink (A2704-12) 大豆品系者相同，其中抗固殺草的 *pat* 基因序列與基改玉米 T25 及 Bt11 品系者完全相同。

關鍵詞：基因改造生物體、大豆、固殺草抗藥性、*pat* 基因。

Genomic Characterization of Imported Soybean Resistant to Glufosinate in Taiwan

C. I. Yuan, L. C. Lin, and M. Y. Chiang

Division of Plant Toxicology, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances
Research Institute, Council of Agriculture, 413 Taichung, Taiwan

* 通訊作者。E-mail: yci@tactri.gov.tw

ABSTRACT

Two point five million tons of soybean seeds are imported annually into Taiwan. Most seeds sampled from local shops were found to be viable. Soybean seedlings were established in greenhouse and applied 0.675 kg ai ha⁻¹ of glufosinate to the leaves of these plants. Sensitive seedlings showed symptoms of injury in 3-4 days and died within one week. Glufosinate-resistant seedlings accounted for 6-13% of total samples. The plants survived from glufosinate treatment were subjected to PCR detection and genomic characterization. PCR assay of genomic DNA extracted from soybean leaves, using the CaMV 35S promoter and 35S terminator as primers, produced a 1.0 kb fragments. DNA sequencing using PCR products showed that the fragments included 35S promoter (265 bp), *pat* (501 bp) and 35S terminator (110 bp) were same as of the transgenes of LibertyLink soybeans (A2704-12) from Bayer CropScience.

Key words: Genetically modified organism (GMO), soybean, glufosinate resistance, *pat* gene.

前言

2010 年全球基因改造生物體 (Genetically Modified Organism, GMO) 之栽種面積已超過 10 億公頃，大豆仍為最主要作物 (53%)，且以抗除草劑者佔 63%，其餘為殖入 Bt 基因之抗蟲作物 (ISAAA, 2011)。最初上市之抗除草劑轉基因大豆為抗嘉磷塞大豆的 Roundup ReadyTM 品系，近年對除草劑具耐受特性的大豆品系增為 9 種，自 2002 年起至今已有 4 種品系於台灣衛生署申請食品安全審查，其中僅台灣拜耳股份有限公司申請之 LibertyLink (A2704-12) 品系為抗固殺草大豆，並已於 2007 年 5 月 1 日通過審查 (食品藥物消費者知識服務網, 2011)。

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 (費等, 2010)。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 (Devine et al., 1993; Kishore et al., 1988)，進而達成防除雜草之目的。玉米為最初研發為抗固殺草之轉基因作物，包括 Syngenta、Bayer、DuPont 及 Monsanto 等公司之基因工程產品，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 (GM crop Database from Center for Environmental Risk Assessment, 2011)。

臺灣市售豆類食品之原物料多為進口的大豆，近年進口大豆約為 250 萬公噸，主要來自美國 (行政院農業委員會, 2009)。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，雜草抗藥性、非目標生物毒害及食物鏈破壞等問題，較不易於短期內評估 (Hübner et al., 1999; Peterson et al., 2000)。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 (promoter)、NOS 終結子 (terminator) 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 (Hübner et al., 1999; Kuiper, 1999; Lin et al., 2000; Lipp et al., 1999; Meyer, 1999)。本研究室亦已針對台灣進口抗嘉磷塞大豆，建立 PCR 及 ELISA 等檢測與鑑定方法 (袁及蔣, 2002; 袁等, 2006)。

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，例如抗固殺草玉米各品系構築之轉基因 *pat* 或 *bar* 核酸及構築組成皆不相同，易造成檢測結果之誤判，因此欲正確檢測抗固殺草相關農產品，必須先得知各品系轉基因核酸序列之異同處，本研究針對抗固殺草轉基因大豆進行抗藥特性與 *pat* 轉基因解序，以提供為進口基改大豆不同品系分子鑑定之依據。

材料與方法

一、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, 13.5% 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 熱循環器 (DNA Engin Thermal Cycler, MJ Research PTC-200) 為美國 GMI 公司產品。DNA 定序儀 ABI PRISM 377-96 DNA Sequencer 為美國 Perkin-Elmer 公司產品。

二、大豆噴施固殺草之藥劑反應

2010 年 8-9 月間於臺灣中部地區雜糧零售店及超市，收集大豆種子 7 組樣品，各樣品取 100 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 3-5 葉，噴施固殺草 $0.675 \text{ kg ai ha}^{-1}$ ，水量為 600 L ha^{-1} 。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。

三、抗固殺草大豆材料之製備與篩選

取用前述收集之大豆種子。培育至 3-5 葉，噴施次致死劑量固殺草 ($0.34 \text{ kg ai ha}^{-1}$)，施藥後 7 日，分別採集幼葉外觀傷害及正常生長植株之葉片，設定為非抗藥性及抗藥性基改大豆，進行轉基因選殖之用。

四、抗固殺草大豆轉基因之增幅

採集具傷害徵狀 (非抗藥性者) 1-3 號大豆樣品各 4、2 及 2 植株幼葉，及無傷害徵狀 (具抗藥性者) 大豆植株幼葉，稱取 0.1 g 幼葉萃取基因組 DNA。再依據抗固殺草大豆之轉基因組成 (GM Crop Database from Center for Environmental Risk Assessment, 2011) 設計引子，分別為花椰菜嵌紋病毒之啟動子 (35S promoter: 5'-AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCC-3') 及 35S terminator: 5'-AGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGC-3'。取 $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 抗性植株及非抗性植株大豆基因組 DNA，分別加 $1 \mu\text{L}$ $10 \mu\text{M}$ 引子， $10 \mu\text{L}$ 5X Fast-Run Taq master mix PCR buffer 及 $1 \mu\text{L}$ Pfu DNA polymerase，添加無菌去離子水使總體積為 $50 \mu\text{L}$ 。PCR 反應條件為起始變性溫度 94°C 5 min，變性溫度 94°C 30 S，煉合溫度 50°C 30 S，延展溫度 72°C 30 min，循環 35 週期，最後延展溫度 72°C 7 min。取 $10 \mu\text{L}$ 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⁻¹) agarose gel 之 0.5 X TBE 膠體，以 100 V 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。

五、抗固殺草大豆轉基因之解序

PCR 增幅之核酸片段經溶洗後，進行接合反應 (ligation)，取 $3 \mu\text{L}$ PCR 產物，

添加於 pGEM-T Easy Vector 試劑 (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°C 反應 14-16 h。將單一菌落之大腸桿菌 TG1 strain, 加 3 mL LB 培養液, 於 37°C 振盪培養 14 h, 取 200 μ L 菌液加入接合反應之 10 μ L DNA, 放置於冰上 30 min, 再加入 200 μ L LB 培養液, 於 37°C 振盪培養 1 h, 將菌液塗抹於 LB plate (含 IPTG、X-gal 及 ampicillin), 培養 14-16 h, 選取含有 DNA insert 之白色菌落, 移入 3 mL LB 培養液中, 再於 37°C 培養 14-16 h, 抽取 plasmid DNA, 取 20 μ L plasmid DNA 加 1 μ L *EcoRI* 限制酵素, 於 37°C 反應 2 h, 取出 6 μ L 加入樣品 0.1 倍體積之 EtBr 染劑, 注入於含 1.2% agarose 之 0.5X TBE 膠體, 以 100 V 電壓進行電泳分析。確證轉殖之 plasmid DNA 並進行解序, 利用 NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information, 2011) 的 Blast 功能比對基因庫之核酸序列。

結果與討論

一、大豆噴施固殺草之藥劑反應

大豆種子 7 組樣品, 經播種育苗, 發芽率為 84-90% (Table 1)。大豆幼苗於施藥後 3-4 日, 部份植株開始呈現葉片黃化及褐化之藥害徵狀, 施藥後 7 日, 可明顯區分為正常生長植株及受傷死亡植株, 正常生長之植株佔 0-13%, 可能為具抗固殺草之轉基因大豆, 受傷死亡植株則為無抗固殺草特性的其他品系, 施藥後 7 日全株死亡。本研究室亦曾於 2002 年檢測台灣進口大豆種子, 其中抗嘉磷塞轉基因大豆比率較高, 介於 35-47% 之間 (袁及蔣, 2002), 為此研究抗固殺草大豆的 3 倍以上, 而抗固殺草轉基因玉米含量較少, 僅佔 1-14.7% (袁等, 2003)。

Table 1. Responses of imported soybean* to glufosinate.

Sample	Germination (%)	No. of plant	
		Injured (%)	Normal (%)
1	91	79 (87)	12 (13)
2	80	74 (93)	6 (7)
3	82	77 (94)	5 (6)
4	94	94 (100)	0 (0)
5	83	83 (100)	0 (0)
6	88	88 (100)	0 (0)
7	91	91 (100)	0 (0)
CK	93	94 (100)	0 (0)

* Soybean seeds were collected from local retail shops. Seedlings, 3-5 leaf stage, raised from 100-seeds were evaluated for injury after foliar application of glufosinate at 0.34 kg ai ha⁻¹, CK was non-GM soybean.

二、抗固殺草大豆轉基因之增幅

本研究於基因改造作物資料庫 (GM crop Database from Center for Environmental Risk Assessment, 2011), 得知不同品系之轉基因構築訊息, 拜耳公司之 LibertyLink (A2704-12) 大豆品系, 轉基因主要由 35S 啟動子、*pat* 基因及 35S 終結子組成, 進行 PCR 反應之結果, 抗固殺草大豆 1-3 號樣品, 皆可增幅約 1.0 kb 單一 DNA 片段 (Fig. 1), 非抗固殺草植株則無此增幅之片段。另如抗嘉磷塞轉基因大豆則以 35S 啟動子及 NOS 終結子為引子, 經 PCR 反應, 於抗嘉磷塞轉植株可增幅約 1.8 kb 核酸片段 (袁及蔣, 2002)。抗固殺草轉基因玉米不同品系之構築皆具差異, 以 35S 啟動子及 35S 終結子為引子, 於 T25 及 Event 176 二品系可分別增幅約為 1.0 及 1.2 kb 核酸片段; 若以 35S 啟動子及 NOS 終結子為引子, 則可增幅約為 1.35 kb 的 Bt11 品系 (袁等, 2003)。

三、抗固殺草大豆轉基因之解序

將 PCR 之 DNA 產物由膠體溶洗出, 經接合、轉型反應、抽取 plasmid DNA 及確認單一菌株之 insert DNA 約為 1.0 kb 者, 再抽取此菌株之 plasmid DNA 解序。將 PCR 產物之序列於 NCBI 基因庫, 利用 Blast 功能比對序列, 結果 1.0 kb PCR 產物由 35S promoter DNA 片段 (265 bp)、*pat* 基因 (501 bp) 及 35S terminator DNA 片段 (110 bp) 組成 (Fig. 2), 此結果與 LibertyLink (A2704-12) 大豆品系之構築組成相同, 故本研究中檢測之市售大豆 1-3 號樣品具抗固殺草特性者, 推測應為 LibertyLink (A2704-12) 品系。

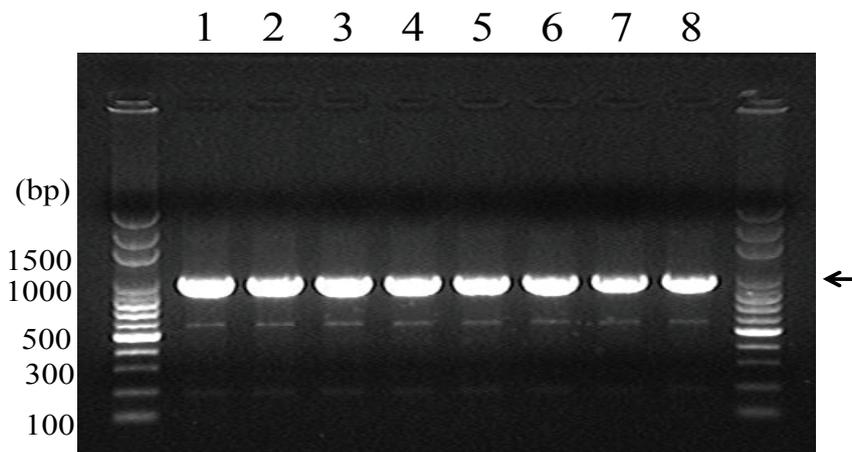


Fig. 1. Genomic DNA of glufosinate-resistant soybean amplified by PCR using 35S promoter/35S terminator primer pairs. Lanes 1-4 were No. 1a-d samples, lanes 5-6 were No.2a-b samples, lanes 7-8 were No. 3a-b samples lane 6, deionized water.

A. Sequence of *pat* and *bar*

```

pat-1 1  atggccgcggtttgtgatatcgtaaccattacattgagacgtctacagtgaactttaaggacagagccacaa
pat-2 1  -----
pat-3 1  -----g-----c--c--c-----c--t--c-----c-----agc--g--c-----cc-t--g-----g--g
bar 1  ---c-g-----c--cacc-----c-----c-----aagc--g--c-----ca-t--c-----g--g

pat-1 73  acaccacaagagtggattgatgatctagagaggttgcaagatagatacccttggttggttgc t gaggttgag
pat-2 73  -----
pat-3 73  --t--g--g-----c--c--c--g--c--cc-c--g--cc-c-----c--c--c--c-----g--
bar 73  ga--g--g-----cg--c--c--c--tcc-tc--gg--gc-c-----c--c--c--c-----g--g

pat-1 145  ggtgtttggctgggtat t gcttacgctgggccctggaaggctaggaacgcttacgattggacagttgagagt
pat-2 145  -----
pat-3 145  --c--c--c--c--c--c--c--c-----c--c-----cc-c-----c-----c--c--tcg
bar 145  ---ag--c--c--c--c--c--c-----g--c-----ac-c-----c-----c-----g--cc--tcg

pat-1 217  actgtttacgtgtcacataggcaccaaaggttgggcctaggatccacattgtacacacatctgcttaagtct
pat-2 217  -----
pat-3 217  --g--g-----c--c--cc-----gc--c--c--a--g--c-----cc-c-----c--c-----g-----c
bar 217  --c--g-----c--c--ccc-c-----gc--ac--a--g--c-----gc-c-----c--c-----g-----c

pat-1 289  atggaggcgcaaggttttaagtctgtggttgcgtttataggccttcca aacgatccatctgttaggttgcatt
pat-2 289  -----
pat-3 289  -----c--g--c--c--c--agc-----c--c--c--c--a--a--c-----c--gagc--gc--cc----c
bar 289  c-----a--g--c--c--c--agc-----c--ct-c--c--ag--t--c-----c--gagc--gc--cca----c

pat-1 361  gaggctttgggatacacagcccggggtacattgcgcgcagctggatacaagcatggtggatggcatgatgtt
pat-2 361  -----
pat-3 361  -----gc-c-----c--g--c--g--gc-----g-----c--c-----c--g--c-----c--c--g
bar 361  -----gc-c-----tg--cc-----c--c--tgc-----g--g--c--c--t-----c--gaac-----c--g

pat-1 433  ggtttttggcaaagggttttgagttgccagctcctccaaggccagttaggccagttaccagatctga
pat-2 433  -----
pat-3 433  --g--c-----gc-c--c--c--c-----g--c--g--cc-c--c--cc-----c--c--a-----
bar 433  -----c-----gct-gac--cagcc---g-ta--g--cc-t--g--cct--c--t--g-----

```

(B) Alignment of PAT

```

PAT-a 1  MSPERRPVEIRPATAADMAAVCDIVNHY IETSTVNFRTPEQTPQEWIDDLERLQDRYPWLVAEVEGVVAG
PAT-b 1  -----
PAT-c 1  -----AD--R--E--P--T-----E---T--V--RE-----D-E---

PAT-a 71  IAYAGPWKARNAYDWTVESTVYVSHRQRLGLGSTLYTHLLKSMEAQGFKSVVAVIGLPNDPSVRLHEAL
PAT-b 71  -----
PAT-c 71  -----A-----P---T-----L-----M-----

PAT-a 141  GYTARGTLRAAGYKHGGWHDVGFWRQDFELPAPRPVPRVPTQI
PAT-b 141  -----
PAT-c 141  --AP--M-----F--N-----L--S--V-----L--E--

```

Fig. 2. Sequence comparison of *pat* and *bar* from glufosinate-resistant soybean and maize. (A) DNA sequence of *pat* from soybean LibertyLink A2704-12 (*pat*-1), maize T25 and/or Bt11 (*pat*-2), *S. viridochromogenes* (*pat*-3, accession no. M22827), and DNA sequence of *bar* from maize Event 176. (B) Alignment of the PAT-a (from soybean LibertyLink A2704-12, PAT-b (from maize T25 and/or Bt11) with the PAT-c sequence (from maize Event 176).

此等抗固殺草大豆的 *pat* 基因與抗固殺草玉米 T25 及 Bt11 品系之 *pat* 基因序列完全相同，可能皆運用 *S. viridochromogenes* 相同菌株之 *pat* 基因之故 (Fig. 2A)。玉米 T25 及 Bt11 品系皆為具抗固殺草特性之基改玉米，但其轉基因組成不同，T25 品系為 35S 啟動子、*pat* 基因及 35S 終結子；而 Bt11 品系轉基因組成為 35S 啟動子、IVS2 (玉米 alcohol dehydrogenase 基因的 intron)、*pat* 基因及 nos 終結子 (袁等, 2003; GM crop Database from Center for Environmental Risk Assessment, 2011)，此二品系之 *pat* 基因與 NCBI GenBank 中 *S. viridochromogenes* 之 *pat* 基因 (M22827) 僅有 71% 一致性 (Fig. 2A)，然而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 胺基酸序列皆相同 (Fig. 2B)。玉米 Event176 品系為抗蟲及抗固殺草之雙抗品系，其抗藥性轉基因為 *bar* 基因。抗固殺草大豆的 *pat* 基因與玉米 Event176 品系之 *bar* 基因亦只有 71% 一致性 (Fig. 3A)，抗固殺草大豆的 PAT 酵素之胺基酸序列 (PAT-a) 與 Event176 品系者 (PAT-b) 仍有 84.7% 一致性 (Fig. 2B)，顯示此相似序列區段與抗固殺草之特性具相關性。

引用文獻

- 行政院農業委員會。2009。中華民國九十九年農產貿易統計要覽。行政院農業委員會。台北。194頁。
- 袁秋英、林李昌、謝玉貞、蔣慕琰。2006。抗嘉磷塞基改大豆之CP4 EPSPS西方墨點法免疫分析。作物、環境與生物資訊。3(3):239-248。
- 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。
- 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研究及相關基改產品檢測。植保會刊45：329-342。
- 費雯綺、王喻其、陳富翔、林曉民、李貽華。2010。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。874-925頁。
- 食品藥物消費者知識服務網。2011。 (<http://consumer.fda.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeID=506&pid=6500>)
- Devine M, SO Duke, C Fedtke (1993) Physiology of herbicide action. pp. 251-294. PTR PrenticeHall, New York, USA.
- GM crop Database from Center for Environmental Risk Assessment (CERA) (2011) (http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database)
- Hübner P, E Studer, D Häfliger, M Stadler, C Wolf, M Looser (1999) Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. Accred.

- Qual. Assur. 4: 292-298.
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) (2011) <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/default.asp>
- Kishore GM, DM Shah (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 627-663.
- Kuiper HA (1999) Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control* 10: 339-349.
- Lin HY, LC Chiueh, DYC Shih (2000) Detection of genetically modified corns and corn by the polymerase chain reaction method. *J. Food Drug Analysis* 8: 200-207.
- Lipp M, E Anklam, P Brodmann, K Pietsch, J Pauwels (1999) Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and corn. *Food Control* 10: 379-383.
- Meyer R, (1999) Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10: 391-399.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2011) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Peterson G, S Cunningham, L Deutsch, J Erickson, A Quinlan, E Raez-Luna, R Tinch, M Troell, P Woodbury, S Zens (2000) The risks and benefits of genetically modified crops: A multidisciplinary perspective. (<http://life.csu.edu.au/consecol/vol14/iss1/art13/>)

