

夏威夷基改木瓜檢測與生物安全（下）

沈翰祖¹、鍾文全²、楊藹華³、李文立⁴

（二）基改木瓜栽培與管理模式

基改作物之栽培在近年來急速增加，2006之ISAAA（International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications）之統計資料顯示，全世界栽培基改作物之耕地面積已達1億零2百萬公頃。基改生物及其產品對生態環境與人體健康所可能產生的衝擊，廣泛的受到世界各國關切並重視。APEC各經濟體均各自訂有基改生物與其產製品之相關管理法規，並針對基改之植物種苗及相關農產品建構檢測及監測平台。全球基改作物中，所轉殖的基因以抗除草劑基因最多，其次是抗蟲基因，全球九千萬公頃的基改作物田，93.7%都在大農制為主的新大陸，以美國為最，其次阿根廷。十年來在美國發生了基改玉米StarLink、BT10、基改稻米LL 601、製藥基改大豆等重大污染事件；種苗受到混雜的情形也層出不窮，導致外銷各國的抗議

或抵制。日本紐澳與歐洲多國，甚至於美國若干地區紛紛成無基改農區。歐盟則強調立法保障有機，慣行與基改農法的共存，目標在降低基改成份的污染在允許門檻之下。有機產業部門則咸信有機與基改無法共存。共存關鍵措施為隔離、公開、與賠償。混雜的來源有作物間異花授粉、種苗本身、操作過程夾帶、以及掉落田間的自生基改作物等，防止花粉混雜的方法包括設定隔距、緩衝帶、或錯開花期等。公開為種植基改作物農民向政府登記，或通知鄰農，發生污染的損害賠償責任在基改方。

全球基改作物栽培有68%之栽培地主要集中於美國。近年來，世界各國政府為能有效管理基改品種之流通，基改品種在種植前需接受生物安全性評估，產品上市後除需標示屬基改作物生產外，亦對該產品進行長期追蹤管理。因此如何快速且有效的鑑定基改作物，是目前急待解決之問題。美國是使用基改技術最廣泛的國家，目前在執行基改品種之檢定工作主要由私人公司負責，但政府相關研究部門則致

1. 種苗改良繁殖場 副研究員

2. 種苗改良繁殖場 副研究員

3. 台南區農業改良場義竹工作站 副研究員兼主任

4. 農業試驗所鳳山分所 助理研究員



圖三、Puna地區外銷日本木瓜集貨場作業情形（一）

力於檢定技術之開發。基改品種由於經由特定外源基因之轉殖程序，基改作物與其原目標作物在遺傳形質比較上，通常帶有一額外之遺傳形質，此遺傳形質則能透過正常生物程序產生蛋白質或酵素蛋白質而產生作用。因此，在檢定上可分別由DNA、RNA層次或蛋白質層次進行。部分帶有抗性基因之轉植株，則可直接利用活植物體進行功能特性檢定。由目前已知之基改技術與相關轉殖程序，以聚合酵素鏈鎖反應（PCR）檢測調控基因之DNA序列是目前最常用之基改植物定量檢測方法，此類DNA序列主要包括與基因表現與轉錄調節有關之啟動子(promoter)終止子(Terminator)等；而即時聚合酵素鏈鎖反應（Realtime PCR）則被利用來進行定量檢測。此外，經由對報導基因之直接檢測，亦是判斷基改植物之有效方法。目前最常用之報導基因為GUS基因與GFP基因。亦

有直接針對轉殖之目標基因進行檢測，而特殊外源基因所產生之蛋白質則可利用抗體抗原反應機制，並藉由酵素連結免疫球蛋白法(ELISA)進行檢測。

我國已制定植物種苗法及基因轉移植物田間試驗管理規範，管理基改作物進出口及相關試驗研究。有關基改作物之進出口管理，現階段將採行境內管理措施，針對較可能進口之基改作物，包括稻米、馬鈴薯、油菜、甜玉米及木瓜等作物，由相關試驗研究單位研發取樣及檢測技術，實際檢測種子或種苗是否為基改作物，並採取適當管理措施。而國內現有已進行隔離田間試驗之基改木瓜包括「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」與「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜葉脈紋病毒性病狀基改木瓜」亟需瞭解國外基改木瓜之栽培與管理情形，目前全球基改木瓜研究最為完整者以美國夏威夷為翹楚，其中又以美國農部位於夏威夷的農業研究單位－太平洋盆地農業研究中心（United States Pacific Basin Agricultural Research Center）之 Dr. Gonsaves及其相關研究人員為主要的研發團隊，因此透過夏威夷大學的安排與Dr. Gonsaves進行基改木瓜生物安全與外銷市場等的討論。

夏威夷木瓜外銷日本已有多年的經驗，由於日本目前尚未開放基改木瓜進口，

由於夏威夷又是允許基改木瓜種植之地區，因此日本對其把關特別嚴格，日本的政策是只要在木瓜樣品中檢測出任何外來之核酸片段，就認定其為基改作物，因此依日方要求，將轉殖片段分為數個片段並以南方墨點（Southern blot）方式進行檢測，只要具有其中一個片段就認定為基改木瓜，但依據多年研究的經驗，發現基改木瓜的遺傳特性非常穩定，不論是自交或是雜交，檢測結果若帶有上述某一片段者，其他片段也都會同時存在，不會發生DNA斷裂或片段遺失的現象，甚至是變異株也是如此，由於轉殖片段中NPTII、35S啟動子、cp gene、gus gene等是連接在一起的，只要檢測出其中之一，就代表該樣品是轉殖植株，而其他基因與片段也都存在。夏威夷為了自我把關外銷日本的木瓜為非基改木瓜，因此設計一套由農民或集貨場自行利用GUS染色的檢測方式，進行外銷的果園於種植至植株約30-50公分高時進行每株檢查，若為基改木瓜則將之砍除，以確保外銷日本之木瓜均為非基改木瓜，詳細的檢測方式於「基改木瓜田間檢測」單元中詳述。

由於基改木瓜是將輪點病毒cp gene片段轉殖至木瓜染色體組中，因此基改木瓜具有與輪點病毒cp gene相同的核酸序列，非基改木瓜是否有可能因為被病毒感染後，在進行基改木瓜檢測時，檢測出病毒的

cp gene片段是許多人所懷疑的。Dr. Gonsalves表示，除非我們是針對植株的RNA進行檢測，否則利用PCR方式針對植株的DNA進行cp gene檢測，是不會檢測到病毒的cp gene片段，病毒也不會把自己的片段插入植株的染色體組中，所以可以放心以PCR方式進行檢測，不至於發生誤判之情形，若是擔心發生上述問題，建議在抽DNA時或抽出DNA後以RNase將RNA分解掉，就沒有任何發生誤判的機會。

Dr. Gonsalves提到於2008或2009年，日本應該會開放從夏威夷進口基改木瓜，他認為基改作物只要是通過人體與生物安全等相關試驗，就可視為安全，所以世界各國是否開放基改作物買賣或種植已非安全問題，而是政策問題。我們提問夏威夷是否有基改木瓜檢測單位取得ISO17025或其他國際認證進行檢測，外銷日本時是否因為已取得國際認可的檢測報告而縮短在日本入關前等待檢測的時間，Dr.



圖四、Pura地區外銷日本木瓜集貨場作業情形（二）

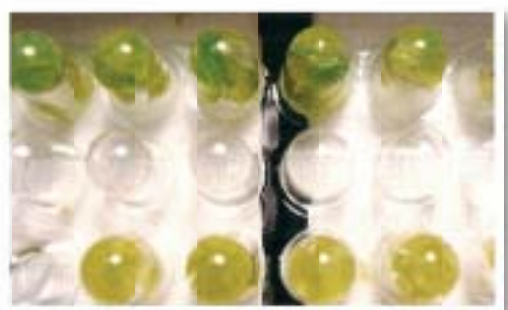
Gonsalves說明這還是政策問題，在夏威夷外銷木瓜均附有病蟲害與非基改等的檢測報告，但日方還是有一套進口時的檢測程序，若出口時完全可符合日方的要求，當然會有某些幫助，但他認為許多進口障礙不是用學術研究的方式能完全解決的。

此外，夏威夷大學為推展基因改造作物，消除民眾對基改作物之疑慮，積極推動從小學教育民眾了解遺傳之特性，了解生物技術結合日常生活的部份，舉凡食品、營養、健康甚至環境資源等。

（三）轉基因木瓜田間檢測

夏威夷木瓜栽培區域原本在歐胡島(Oahu island)，因為1950年代木瓜輪點病毒(PRSV)危害而漸漸將產業移至大島(夏威夷島)(Big island, Hawaii island)，1992年以後，輪點病毒侵入大島的Puna產區，嚴重危害夏威夷木瓜產業，幸好1998年後，基改木瓜通過審查得以在夏威夷地區進行經濟規模栽培，不僅解救了夏威夷木瓜產業，也使全球木瓜產業進入生枝時代。目前主要生產區域在大島(Big island)(佔90%以上)，其他島嶼如歐胡島(Oahu island)、茂宜島(Maui island)、可愛島(Kauai island)及莫洛凱島(Molokai island)均有零星栽培。依照美國農部的統計資料顯示，夏威夷州木瓜栽培面積在2005年為2400英畝(971公頃)，總產量約

3300萬英磅(16500公噸)，產值1124萬美元(約3億7千萬台幣)，主要栽培品種為'Rainbow'(53%)、'Kapoho Solo'(30%)、'Sunrise'(9%)及其他品種(8%)。其中'Rainbow'為基改木瓜，依照美國及加拿大之規定，可以直接銷售至此兩地地區而無須任何標示。日本市場則正在協議且已經完成多項日方要求之研究數據，根據此次拜訪的美國農部太平洋灣農業研究中心(The United States Pacific Basin Agricultural Research Center, USDA)主任 Dr. Dennis Gonsalves表示，日本農林水產省(Ministry of Agriculture Fisheries and Forestry)已於2002年12月通過夏威夷基改木瓜的進口審查，厚生省(Ministry of Health Labor and Welfare)審核中，預計2008年將會通過厚生省審查，首次銷售轉基因木瓜至日本市場。



圖七、基改木瓜GUS快速檢測方法，上排樣品為基改木瓜樣品，葉片組織經GUS染色後出現藍色條斑，下排樣品為非基改木瓜樣品，則不具藍色條斑。

夏威夷基改木瓜於1986年開始進行相關研究，1991年研發出抗PRVS的品系Line 55-1。該品系以'Sunset'品種進行基改而得，後來命名為'SunUp'，屬紅色果肉品種。因為夏威夷木瓜生產者較喜歡黃果肉的'Kapoho Solo'品種，因此利用'SunUp'與'Kapoho Solo'雜交產生F1種Rainbow'，此雜交種果肉為黃色，輪點病毒的抗病力較'SunUp'弱，若在萌芽後3個月後才感染輪點病毒則徵狀非常輕微，因此Rainbow'成為目前夏威夷基改木瓜之主要栽培品種。

基改木瓜的出現，雖然消除了夏威夷輪點病毒的嚴重危害，卻有部分消費者對基改木瓜存有食用與環境安全的疑慮，而主要外銷市場日本仍禁止基改木瓜進口，反GMO團體的壓力與基改木瓜污染非基改木瓜田等問題，尚需要許多時間去溝通並以研究證實其對人體或環境的影響力。事實上，在夏威夷大學研習的這幾天中，因為綠色和平組織與夏威夷反GM人士推動終止夏威夷大學生物技術研究及禁止基因作物在夏威夷生產，美國9位國會議員為此議題前往夏威夷大學瞭解生物技術研究與基改作物實際情形。由於夏威夷州約有500公頃的木瓜園種植轉基因木瓜'Rainbow'且目前也銷售非基改的'Kapoho Solo'品種至日本市場，為了去除消費者對轉基因木瓜污染之疑慮，目前夏威夷對於



圖十、與先鋒種子及先正達公司經理人員會談後合影

外銷日本之木瓜採取單株檢測以確保不會銷售基改木瓜至日本而衍生國際貿易問題，採取單株檢測的方式雖然是最保險與萬全的方式，卻是耗費人力物力最多的一種方式，如何提高檢測效率，縮短檢測時間，降低檢測成本，是一個重要的議題，也是此次研習的重要議題。

透過夏威夷大學 Mr. Melvin S. Nishina 的安排，我們邀請 Mr. Kenn Harada 教導我們有關轉基因木瓜大量且快速的檢測方式。一般在進行轉基因作物檢測時最常採用之方式是PCR檢測法，利用轉入之外源基因片段作為檢測對象，這種方式需要萃取植物的DNA作為檢測之標的，雖然檢測方式較為敏感，可以針對微量的轉基因作物，卻需要耗費較長的時間與較高的檢測成本，此方法是目前國際上較常被採用之檢測方式。而夏威夷地區為了節省時間與成本考量採用較容易產生誤差

，容易大量進行與成本比較低的檢測方法GUS染色法，帶有gus gene的轉殖木瓜葉片組織在染色後會產生藍色條斑。由於Rainbow木瓜所轉入之外源基因包含有原本為了區別已經轉殖或未經過基改的標誌基因，GUS基因，因此夏威夷大學發展GUS染色法作為快速檢測之標準檢測方式，此方式可以快速且大量的進行基改木瓜的篩檢。

六、結論

基改木瓜花粉流佈與共存栽培是一個相當複雜的問題，常受多重因素的影響。目前測定基改植物花粉散佈的方法很多包括親本分析、花粉計數、花粉收集和花粉活力測定等。至於如何證明基改植株花粉的散佈，主要是在實驗中心設置一個基改作物區域，然後在其四周種植非基改或其親緣種作物，於作物成熟期時，在不同方向、不同距離上取一定面積的樣本或一定數量的植株或種子，然後運用形態學特徵分析、細胞學方法(減數分裂和染色體配對分析)、蛋白質及同工酶電泳分析、DNA分子標記技術如PCR、RAPD、RFLP、AFLP等，及分析成熟種子或果實中基改存在的頻率。由於不同傳粉機制的作物受環境因素、氣候因素而影響其傳粉，如風速、風向、降雨、溫度、昆蟲活動等。此外，在研究過程中，基改作物種植

大小亦會影響其測定結果。依據夏威夷大學進行基改與非基改木瓜共存栽培研究結果推測有機田所栽種非基改木瓜中檢測出基改木瓜的污染，應不是來自於基改木瓜花粉，而是栽種者本身未確定的種子來源所造成。因此建議若進行轉殖與非轉殖木瓜共存栽培時，首先必須確定種子來源是來自非基改木瓜植株；其次只栽種兩性(自花授粉)的木瓜植株，不可栽種雌性或雄性的單性植株；第三非轉殖木瓜與轉殖木瓜植株的隔離距離(緩衝區)至少需在400公尺以上。

夏威夷研究基改木瓜發現其遺傳特性非常穩定，不易發生DNA斷裂或片段遺失的現象，甚至是變異株也是如此，因此針對NPTII、35S啟動子、cp gene、gus gene檢測其中之一，就代表該樣品是轉殖植株。夏威夷設計利用GUS染色的快速檢測方式，可由農民進行果園每株檢查，我國亦應發展一套類似的方法，但由於我國的基改木瓜未帶有gus gene，建議未來尚需相關研究單位進一步研究，採取單株檢測的方式雖然是最保險與萬全的方式，卻是耗費人力物力最多的一種方式，如何提高檢測效率，縮短檢測時間，降低檢測成本，是一個重要的議題。