

出國報告（出國類別：研習）

夏威夷基改木瓜檢測與生物安全

服務機關：種苗改良繁殖場、台南區農業改良場義竹工作站、農業試驗所鳳山分所

姓名職稱：鍾文全副研究員、沈翰祖助理研究員、楊藹華副研究員、李文立助理研究員

派赴國家：美國

報告日期：97年1月24日

出國期間：96年12月9日-14日（種苗改良繁殖場）
96年12月9日-17日（台南場、鳳試所）

目 次

一、摘要.....	2
二、前言.....	2
三、目的.....	3
四、行程.....	4
五、內容.....	5
六、心得與建議.....	15
七、附件.....	16

一、摘要

96年12月9日至14日到美國夏威夷研習與參訪，包括參訪夏威夷大學及美國農部太平洋盆地農業研究中心，以瞭解夏威夷基改木瓜栽培與管理情形、研習夏威夷基改木瓜檢測技術等。’Rainbow’為目前夏威夷基改木瓜之主要栽培品種，夏威夷大學瞭解基改木瓜花粉散佈的情形，以進行基改與非基改木瓜共存栽培研究，並以種子的胚進行GUS基因分析，認為有機田所栽種木瓜有基改的污染，應是栽種者本身未確定的種子來源所造成。夏威夷發展GUS染色法作為快速檢測之標準檢測方式，可以快速且大量的進行基改木瓜的篩檢。夏威夷木瓜外銷日本依日方要求，只要檢測出外源基因就認定是基改樣品。並設計利用GUS染色的快速檢測方式，進行外銷果園每株檢查。為推展基改作物，消除民眾疑慮，積極推動從小學教育，了解生物技術結合日常生活的部份。

二、前言

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。根據新修訂之種苗法及相關管理法規，有關基改作物在上市前除須進行生物安全評估外，上市後，產品除須標示外，亦須接受主管機關監控，以維護國內生態環境之安全。但是在執行上，目前僅及於轉殖作物風險評估作業，有關基改作物種苗檢測技術自2003年起才開始由種苗場及農試所等單位針對重要可能進口作物開發檢測技術。

三、目的

現階段國內完成基改作物田間試驗階段者為「抗輪點病毒」木瓜，正在田間試驗階段者有七項，包括稻米（生產豬乳鐵蛋白及高效能植酸素二項）、馬鈴薯（生產高效能植酸素）、青花菜（抗老化）、番茄（抗胡瓜嵌紋病毒）、赤桉（木質素生合成基因）、木瓜（雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜畸葉嵌紋病毒）。此外，基因改造玉米及大豆已為衛生署公告許可上市品項，產品原料雖以大宗穀物途徑進口，但也可能流入田間種植。為國內基改植物之生物安全管理，並了解其或因運輸過程之不當散出或被以非核准目的用途使用之可能情形，有必要儘早建立國內基改植物檢測流程及田間監測體系。故安排參訪夏威夷大學及相關農業研究單位，目的以瞭解夏威夷基改木瓜栽培與管理情形、參觀夏威夷基改木瓜與非基改木瓜共存栽培情形、研習夏威夷基改木瓜檢測技術、瞭解夏威夷其他基改作物發展與管理等情形。

四、行程

起訖日期	天數	到達地點	詳細工作內容
96年12月9日至 96年12月10日	2	夏威夷大學	去程及拜會夏威夷大學 Dr. Hu, Ching Yuan 及農學院辦公室及研究室，並瞭解夏威夷歐胡島木瓜種植情形
96年12月10日至 96年12月13日	3	夏威夷大島 (夏威夷島)	拜會 USDA 太平洋盆地農業研究中心 (United States Pacific Basin Agricultural Research Center)，瞭解基改木瓜栽培與管理模式，並研習基改木瓜田間管理工作、基改木瓜與一般木瓜共存之生產方式、基改木瓜快速檢測方法等，並瞭解夏威夷大島木瓜種植情形
96年12月14日至 96年12月15日	2	夏威夷茂伊島 夏威夷歐胡島	(種苗場人員先行返國) 研習基改木瓜快速檢測方法、基改木瓜田間管理工作，並拜會先鋒種子及先正達公司經理人員，研習基改作物之推動與科普教育方式
96年12月16日	1	夏威夷歐胡島	搭機返台(回程)
96年12月17日	1	台灣高雄機場	抵達台灣高雄(回程)

五、內容

(一) 基改木瓜花粉流佈與共存栽培

基因漂移是指基因通過花粉授精雜交等途徑在種群之間擴散的過程。基改植物外源基因散佈大致上可分為 4 類：一、透過種子在時間上的散佈，二、透過花粉傳播在空間上的散佈，三、透過基改植物殘渣及根系分泌物的散佈，四、透過食物鏈的散佈，其中以基改植物透過花粉散佈是基因散佈的主要管道。基改作物與其親緣相近的栽培種或野生種之間透過花粉傳播而發生基因交換，使得外源基因漂移到親緣相近的物種中，進而破壞生態系統多樣性，導致超級雜草問題的產生。藉由花粉傳播而產生的基因散佈會受族群間的距離、族群大小、過程的長短和新基因適應上的優勢，以及植物本身形態特性包括交配系統、授粉模式和花的結構，以及開花時間與花粉親和性等因素之影響。

目前物種傳粉機制、交配方式因作物不同而有差異，因此，基改植物傳粉距離亦會有所差異。大豆屬於自花授粉作物，雖然有其親緣相近的野生種存在，然因其開花前即完成了受精，柱頭接受外來花粉的成功率很低，天然雜交率通常小於 1% 左右。因此，基改以花粉散佈的可能性變小很多。據文獻指出縱使在蜜蜂大量存在的情況下，於 30 英寸(約 0.76m)距離內，抗草甘膦基改大豆(GMO)與非基改大豆(non-GMO)僅有 1% 的異交率發生。水稻屬於自花授粉作物，開花前即完成受精過程，柱頭接受外來花粉成功率很低，加上花粉傳播距離很近，致使雜交比率更低。據文獻報導當隔離 0.5 公尺並用風扇當作風媒時，基改水稻的傳粉率僅為 4%，而非基改水稻傳粉率則為 9%，因此認為水稻的傳粉力僅有幾米的距離。煙草為自交、蟲媒或風媒傳粉的作物。許多文獻顯示在 21 公尺以內傳粉率僅有 0.04%，若檢測距基改煙草種植點 200 公尺處的近緣野生種 *Solanum nigrum* 和 *S.dulcamara* 植株的種子，則未檢測到有任何抗 kanamycin 基因的存在。高粱屬自花授粉作物，據文獻報導距離基改高粱作物 100 公尺處，石茅高粱與基

改高粱雜交的比率達 25%，但在相隔 100 公尺情況下，與約翰森草雜交的比率僅 2%。麥類屬自花授粉作物，同屬種的數目超過 10 種。據文獻指出轉抗殺草劑基因小麥 (*T. aestivum*) 與野生山羊草 (*A. cylindrica*) 雜交種可以在田間自發地與野生山羊草回交。馬鈴薯屬自花授粉作物，其同屬種數高達 39 種以上。據文獻指出縱使野生種龍葵 (*Solanum nigrum*) 和歐白英 (*Solanum dulcamara*) 與馬鈴薯的開花期一致，也不會發生雜交的情形。若基改馬鈴薯與非基改馬鈴薯直接接觸時，其傳粉率高達 24%，但在隔離 3、10、20 公尺處，其傳粉率分別為 2%、0.017%、0%。顯然，馬鈴薯的花粉散佈會隨種植距離的增加而有明顯降低的趨勢。棉花屬常異交、蟲媒傳粉作物，據文獻報導基改棉花直接相鄰時，其傳粉率高達 1.8%，但在距離 1、10、20 公尺處，其傳粉率則分別僅有 0.4%、0.06%、0.0001%。另有文獻指出在轉 Bt 基因棉花植株周圍 0~6 公尺處，所栽種的內陸地棉品種具有較高頻率的基因流，但隨著距離增加 Bt 基因流明顯降低，最大可達 36 公尺以上。向日葵屬蟲媒傳粉作物，據報導在距離基改作物 1000 公尺處，約有 2% 的栽培與野生向日葵與其雜交。甜菜屬風媒傳粉作物，花粉可傳播至數公里，因此，在甜菜種子生產中要求需有 1 000 公尺以上的隔離距離。但另文獻指出在 30 公尺處的緩衝帶中，沒有檢測到任何甜菜的傳粉現象。油菜屬蟲媒傳粉，據文獻指出在距離基改植株 46、137、366 公尺處，油菜的雜交率分別為 2.1%、1.1%、0.6%。若在周圍種非基改油菜作為緩衝區，且有蜜蜂作媒介的情況下，基改油菜在 1、3、6、12、24、36、47、70 公尺處，其傳粉率分別為 1.6%、0.4%、0.11%、0.016%、0.0041%、0.0011%、0.00034%、0%。顯然，基改油菜花粉只能移動一定的距離，且會隨著距離的增加花粉散佈的情形會越來越少。同種番茄在距離基改番茄 1.8~2.9 公尺處，其雜交率小於 0.005%。轉 Bt 基因玉米花粉落在玉米田間及農田附近馬利筋草 *Aasclepias curassavica* 上的密度，結果顯示 Bt 玉米田中馬利筋草上的花粉平均為 170.06/cm² 而距玉米田邊 2 公尺遠的馬利筋草上的花粉平均為 14.2/cm²。

研究基改植物外源基因散佈的手段和方法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，基改作物種植大小大小亦會影響其測定結果。

本次研習至美國夏威夷大學瞭解基改木瓜花粉散佈的情形，Manshardt 與 Paull 兩位博士親自教授我們如何設計田間試驗證明基改木瓜植株花粉散佈的流程，首先在夏威夷 Puna 地區設置一個基改木瓜作物 (品種 Rainbow) 區域約 0.5 公頃，然後在其四周種植非基改木瓜作物 (品種 Sunrise)，行距 3.5 公尺，株距 1.5 公尺，進行基改與非基改木瓜共存栽培研究，經栽種 21 個月後，將鄰近所栽種的非基改木瓜 56 株兩性株和 44 株雌性植株的果實採收，每棵成熟果實取出 12 粒種子，並以種子的胚進行 GUS 基因分析，他們發現雌性植株具有 70%異花授粉的比率，而兩性株則僅有 13%，種子具有 GUS 基因反應的植株隨栽種距離越遠如 30 公尺，其 GUS 基因的反應非常低，相關係數僅有 $r = -0.32$ 。另外，他們亦檢測在基改木瓜 Rainbow 品種的下風處 400 公尺處，所栽種的非基改木瓜 Sunrise 品種的種子，共計 1000 粒種子，其胚無任何 GUS 基因的反應。在 2003 年歐胡島(Oahu)有機農場試驗區，他們利用葉片檢測法發現 70%植株具有 GUS 基因反應，認為此木瓜栽培者已經栽種基改木瓜植株。同時他們取 20 株非基改兩性木瓜植株所生產的種子，經檢測胚的 GUS 基因反應，只有三株所生產的種子有 GUS 基因反應，比率僅在 3-6%左右。進一步檢測這 20 株非基改兩性木瓜植株的後代中，受檢測 384 種子中僅有 4 粒種子，其胚有 GUS 基因反應，顯示

兩性株異花授粉比率極低僅有 1-2%之間。因此，他們認為有機田所栽種木瓜有基改的污染，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。最後，他們建議有機栽培者有下列幾點：1. 確定種子來源是來自非基改木瓜植株，2. 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，3. 與基改木瓜植株的隔離距離(緩衝區)至少需在 400 公尺以上。

(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立無基改農區。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畸葉嵌紋病毒性狀基改木瓜」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. Gonsalves 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. Gonsalves 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. 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技時代。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個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。

夏威夷基改木瓜於 1986 年開始進行相關研究，1991 年研發出抗 PRSV 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'成爲目前夏威夷基改木瓜之主要栽培品種。其研發過程大要如下：

- 1937 年首次在夏威夷 Oahu island 發現 PRSV。
- 1945 年 PRSV 在 Oahu island 木瓜產區快速蔓延。
- 1978 年開始進行 PRSV 之基礎研究工作。
- 1986 年進行基改木瓜的研發工作。
- 1988 年開始利用基因槍法進行轉基因木瓜研究。
- 1991 年研發出抗 PRSV 的品系 Line 55-1。
- 1992 年在 Oahu island 進行田間試驗。
- 1992 年 Puna 地區 (Big island) 木瓜受 PRSV 嚴重危害。
- 1995 年於 Puna 地區進行大規模田間試驗。
- 1997 年基改木瓜通過 USDA-APHIS, EPA, FDA 等機構審查。
- 1998 年基改木瓜獲得生產執照正式商業規模生產。
- 1999 年 Rainbow 採收並銷售至美國本土。
- 2002 年日本農林水產省通過'Rainbow'木瓜銷日審查，並向厚生省提出審查申請。

- 2003 年加拿大允許'Rainbow'木瓜進口。
- 2008 年日本允許'Rainbow'木瓜進口（預計）

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，爲了去除消費者對轉基因木瓜污染之疑慮，目前夏威夷對於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爲檢測對象，這種方式需要萃取植物的 DNA 作爲檢測之標的，雖然檢測方式較爲敏感，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。而夏威夷地區爲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爲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 染色法作爲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，其操作流程如下：

- 1.田間標示：進行田間取樣時必須對每一株植株進行編號，以方便檢測完成後可以確認每一株植株是否為轉基因植株，標示時以方格方式進行編號，例如 1-1，1-2，1-3 等代表第一行第 1 株，第 2 株，第 3 株等。2-1，2-2，2-3 代表第二行第 1 株，第 2 株，第 3 株等，每一株均需同時在田間及記錄簿上標示清楚。
- 2.取 樣：取樣的部位以嫩葉為主，每株取樣約 1 克，放入已經標示之封口袋中，放置於 4°C 冰箱中，攜回檢驗室進行檢測。
- 3.檢 測：以刀片將木瓜嫩葉將葉片切碎，無須太細碎，仔細將碎片移入檢驗盤中，每一樣品 3 重複。
- 4.加入染劑：滴入已經調配好之 GUS 染劑(100mM phosphate buffer, 10mM Na_2EDTA , 0.5mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.5mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.1% Triton X-100, 10% MeOH, 0.3% x-gluc) 3 滴。
- 5.保 溫：以燈泡進行反應液與樣品之加溫與溫度保持，2 小後檢視樣品是否呈現藍色，若呈現藍色則表示該樣品為基改木瓜。
- 6.資料登錄：檢測結果必須進行記錄保存，若檢測結果為陽性反應（呈現藍色者）將會回到田間將該植株砍除，以避免不慎銷售至日本市場。

六、心得與建議

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。

七、附件



圖一、夏威夷大學 Manshardt 與 Paull 兩位博士親自教授我們如何設計田間試驗證明基改木瓜植株花粉散佈後合影。



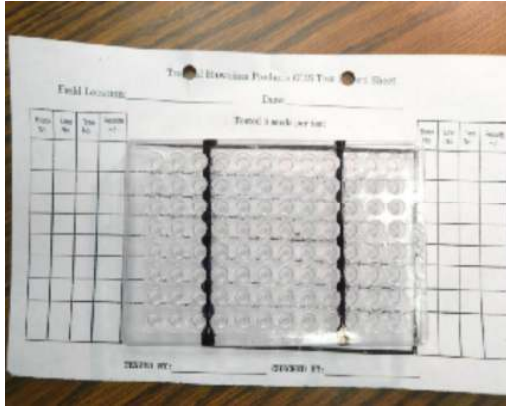
圖二、與 Dr. Danies Gosavan (右二) 會談後合影。



圖三、Puna 地區外銷日本木瓜集貨場作業情形 (一)。

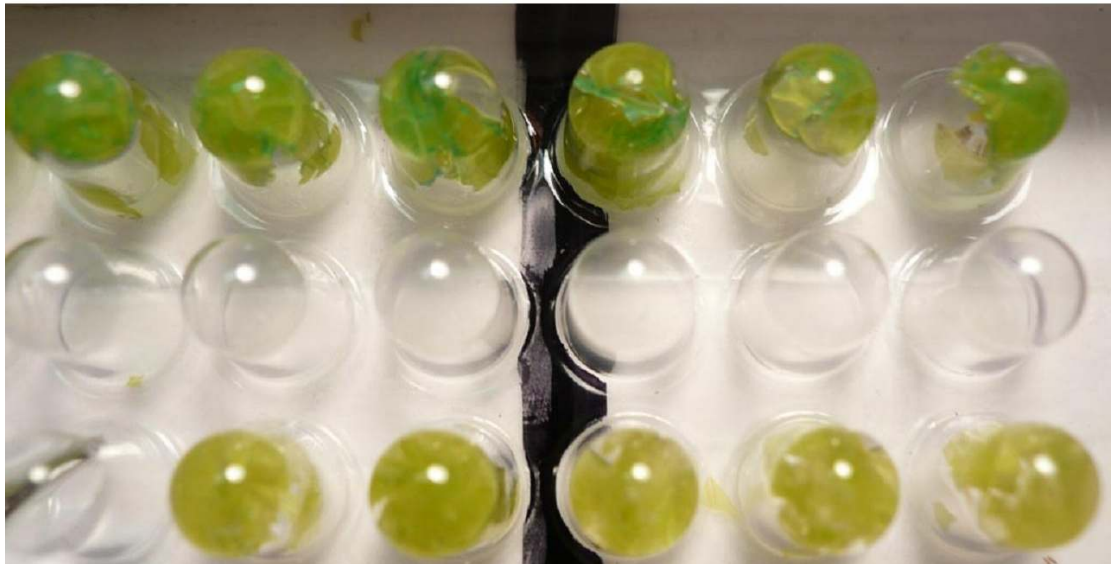


圖四、Puna 地區外銷日本木瓜集貨場作業情形 (二)。



圖五、基改木瓜 GUS 快速檢測方法，先將每一個 96 孔盤均事先黏貼好報表紙以方便記錄，每個樣品 3 重複。

圖六、基改木瓜 GUS 快速檢測方法，於 96 孔盤滴入反應試劑，每個樣品 3 滴。



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。



圖八、夏威夷島木瓜栽培與採收情形。



圖九、夏威夷島木瓜栽培情形。



圖十、與先鋒種子及先正達公司經理人員會談後合影。