

植物轉殖DNA序列標誌及檢驗認證系統

園藝系 高建元助理教授

植物品種或基因的檢驗與認證，對於植物產品、育種、智慧財產權、保護施行、檢定和糾紛的仲裁，以及整個農業生產體系的各個環節、進出口市場和植物品種國家法令政策，都有實際而重要的角色。雖然如此，目前國內在轉殖基因植物檢驗認證的工作上，卻留下很大的空窗。以非轉殖基因植物的蘭花為例，我國已成功加入世界貿易組織(WTO)，對農業的衝擊甚囂塵上，蘭花是少數高價值觀賞花卉中，國內業者具有的市場優勢可達上游育種源頭的重點花卉，也是國內蘭花種苗業者具備國際競爭力所據以發展的利基。而這些辛苦多年創新育成的蘭花品系，因為國內外貿易行為的開放和生物技術的發達，使得種源權完全暴露於被無償盜用的威脅中，業者只能用生產和成本上的控管運用來保護，造成蘭花國內外市場的混亂和生產業者很大的壓力。尤其台灣的土地小、資源有限，農業相關產業無法以生產成本為手段，長期與鄰近開發中國家競爭，因此研發建立一套快速、精確的植物分子標誌、檢驗認證技術，將我國政府及民間業者長久以來累積的品種資源和實力，與勞力密集區隔離，並於貿易行為中保護起來，凸顯品種質量上的特點，讓育種業者樂於釋出新奇品種來造成良性循環，創造更多蘭花品系資源，這對於國內蘭花種苗業者能否持續保有競爭力而積極的在國際市場中永續生存發展，具有攸關成敗的絕對重要性，其他植物品種亦然，本文將摘要兩個經濟部科技研究發展專案及 93 年即將實施的計劃內容，共享農友。

由目前臺灣及國際植物分子生物技術的發展應用趨勢來看，可以將轉殖 DNA 序列作為標誌及檢驗認證系統的應用目的，分為二個層面：
1. 非轉殖基因植物的分子標誌、檢驗和認證；
2. 轉殖基因植物及產品的檢驗和認證。這兩個層面的急迫性非常明顯。以臺灣現階段的處境而言，經年累積的植物品種及特有品系紛紛出走而模糊生產優勢，而國際社會間轉殖基因植物及其產品，卻來勢洶洶。以後者而言，根據美國佛羅里達大學 Dr. Vasil 在 NATURE BIOTECHNOLOGY (21:849-851; 2003) 所發表的從 1996 年至今全球共有二十個國家超過四億英畝的土地來商業性生產轉殖基因植物而且已超過十億人口消費過轉殖基因食物，這樣的數據及轉殖基因植物種類，應只會向上攀升。再以前者而言，臺灣在生產工具、成本、數量及內需市場大小上，無法取得競爭優勢，但以蝴蝶蘭生產為例，在植物育種優勢上則不然，民間業者自日據時代以來就累積豐富的品種資源，就如同政府極力想使出走企業的設計研發中心根留臺灣，植物育種就是蝴蝶蘭產業的根，因此這些非轉殖基因植物的分子標誌、檢驗和認證就非常重要。是提昇質進而量的暗棋，國內植物相關產業必然要建立在品種優勢的保護維持上，才有磐石前進爭取世界市場。

以國內重點花卉蝴蝶蘭來說，自從 1949 年 Dr. Rotor 發表蝴蝶蘭的花梗可以用組織培養來生產體細胞複製株以來，直到 1985 年台糖公司投入並引導國內蝴蝶蘭產業蓬勃發展及至目前，可明顯觀察到除了栽培管理以外的兩個研發主軸，一

為育種，另一為分生苗量產技術。這兩種需要耗費很多心血及時間的技術，與時俱進一直被研發應用著，卻曾交會起來在國內上演一部黃帝 Phal Golden Emperor “Sweet” FCC/AOS 從 300 萬元身價直落到 300 元的真實故事，諷刺的是這株“黃帝”曾經申請美國植物專利法和國內經濟部中央標準局註冊。Dr. Kuehnle 明白指出蘭花品系的申請命名登錄和專利，只能提供有限的保護。而這種植物品系累積多年育種成果被非授權的分生苗技術毀於一旦的問題始終存在，現今亦然而且以蝴蝶蘭最為典型。

現行的植物品種鑑定的方法，依發展的時序可分為 1. 利用植株外表形態特徵區別；2. 利用植株特定發育時期或器官蛋白質上的差異（如同功異構酶），由電泳圖譜顯示特殊條帶區別；3. 利用原存於核內染色體基因組 DNA 序列上的差異，篩選內切酶（endonuclease）或 primer，經切段、複製放大後以電泳距離顯示 DNA 序列上差異（如 AFLP、RFLP）。這些技術都受限於下列缺點而顯得滯礙難行：環境影響、耗費時間、無法精確快速、可用變異性少、非絕對證據、無法登記及衍生子代無法鑑定等因素。也因此國內外植物專利種苗法都只能延用最傳統的植株外表形態特徵區別方法。

事實上，針對蝴蝶蘭登記鑑定所發表的研究文獻很有限，台糖公司研究所曾用 DAF (DNA amplification fingerprinting) 技術想找出可區別 F1、F2 及親代蝴蝶蘭植株的特殊 primer，可惜未見進一步研發應用，也未見與性狀相聯的 genomic marker 運用於育種或登記鑑定上。而蝴蝶蘭雜交品系之複雜，理論上其品種間同功異構酶即使存在特殊條帶，也不易顯示到經過繁複雜交所得的品系間。尤其根據林上琪的研究發現蝴蝶蘭細胞染色體組的內多倍體（endoreduplication）是很常見的現象。歸納這三類方法的共同點，是在鑽研發掘植物品種間形態、生理生化或染色體上可利用的差異，作為品種登記鑑定的依據。然而自然界中植物種類非常多且繁雜，而人類所利用的栽培品系（variety）早已超越分類品種（species）的研究範疇，其中又以蝴蝶蘭最為明顯，全世界只有 50 種蝴蝶蘭原種，但已申請命名登錄的雜交品系非常多，而未申請登錄者更多，因此要由有限的蝴蝶蘭品種本身發展出可適用於品系間高複雜性的登記鑑定方法，猶如以傳統電話線想要容納光纖傳輸量，可想而知會遇到的困難。

植物轉殖 DNA 序列之標誌及檢驗認證系統是以人工設計一段 DNA 序列，利用核苷酸排

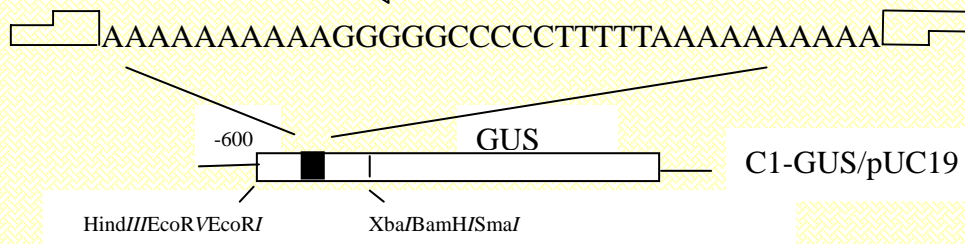
列組合的多樣性，來代表植物品種所有者等資料，將之轉殖進入植物染色體的遺傳形質中，穩定遺傳到其有性或無性增殖子代。因此該種植物品種的量產子代可以非常具體的以聚合鏈反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 或生物晶片 (Biochip) 方式，讀出其 DNA 序列所代表的品種所有者資料，藉以完全保護國內非轉殖基因植物的品種權，而漸趨普遍的轉殖基因植物及其產品，也可檢驗和認證之。茲以下列圖示植物轉殖 DNA 序列之標誌及檢驗認證系統的主要工作。

總之，植物轉殖 DNA 序列之標誌及檢驗認證系統是以人工設計一段 DNA 序列，利用核苷酸排列組合的多樣性，來代表植物品種所有者的資料，利用基因槍 (Biolistic) 或農桿菌 (Agrobacterium) 將之轉殖進入植物染色體的遺傳形質中，穩定遺傳到其有性或無性增殖子代。因此該種植物品種的量產子代或衍生品種，都可以非常具體的以 PCR (Polymerase Chain Reaction) 和生物晶片 (Biochip) 方式，讀出其 DNA 序列所代表的品種所有者資料，轉殖基因植物及產品的檢驗和認證亦然。其預期效益可顯見如下：

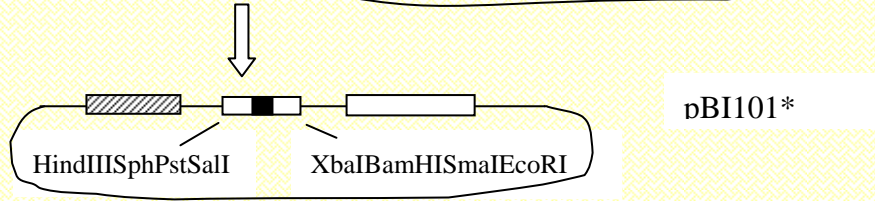
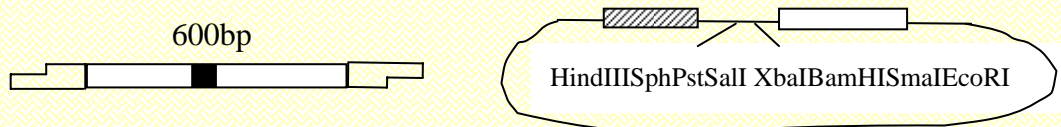
1. 建立非轉殖基因植物的分子標誌、檢驗和認證的常設實驗室及人才，對於植物產品、育種、智慧財產權、保護施行、檢定和糾紛的仲裁，以及整個農業生產體系的各個環結、進出口市場和植物品種國家法令政策，得以明確完整的保護，確保我國政府及民間業者長久以來累積的品種資源和實力，免於國內外業者量產分生苗低價回銷自有品種及混亂市場的威脅。
2. 國內植物品種所有權及其衍生種的智慧財產權，不再單純倚賴模糊的植株相對性狀描述，而有完全具體客觀的 DNA 序列且無法偽造，指明植物品種所有者，杜絕由來已久的盜偷量產植物品種的惡習，加速植物品種更新，帶動產業發展，增加個人財富、產業競爭力及國家經濟實力。
3. 建立植物分子標誌、檢驗和認證的常設實驗室，着眼轉殖基因植物及產品的檢驗和認證，確保消費者知的權利並區隔非轉殖基因植物與轉殖基因植物及其產品，與國際社會同步。
4. 建立植物品種的胚性 (embryogenesis) 或器官性 (organogenesis) 再生途徑和外來基因轉殖方式並與健康優良、量產化的種苗生產體系結合，訓練培養分子生物技術人才，提升生技應用及研發質量。

Asia geological code, AAAAAAAAAA;
 Taiwan code, GGGGG;
 Owner code, CCCCC;
Phalaenopsis code, TTTTT

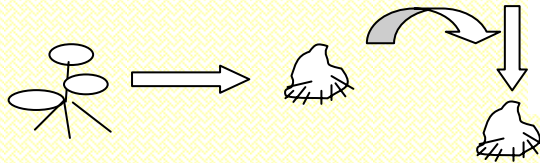
DNA synthesize to specify the ownership and identity



HindIII, XbaI digestion



Transformation by *Agrobacterium*



Mass proliferation



PCR verify DNA sequence and protect ownership heresince



東方梨果實生理和採後處理技術

園藝系 郭純德副教授

前言

梨的種類極多，分佈區域非常廣，但通常分為東方梨 (Oriental pear) 和西洋梨 (Common pear) 二大類。東方梨可分為秋子梨、白梨和砂梨等三類。目前台灣種植之橫山梨、新興、豐水、幸水和新世紀等栽培種均屬於砂梨系統。

一般而言，西洋梨具有呼吸更年性 (Climacteric) 和後熟作用 (Ripening)，此與東方梨有甚大之差異。由於西洋梨、秋子梨和白梨在本省栽培並不普遍，因此，本文主要討論砂梨類之果實生理和採後處理技術。

一、果實生理：

(一)、主要成分

果實含糖量因部位不同而異，靠近果心部之含量低於靠近果皮部，果頂部亦高於果肩部。果實含有主要之醣類，有蔗糖、葡萄糖、果糖、和糖醇（Sorbitol）等。成熟果實果心部之酸味亦較強，主要有機酸為蘋果酸（Malic acid）和檸檬酸（Citric acid），亦含有少量的其他有機酸。果實貯藏期間其有機酸含量變化較大，醣類之變化並不顯著。

(二)、果實的發育

以豐水梨為例，花滿開後約三十日為細胞分裂期，此時果實之生長主要是細胞急速分裂所造成。細胞分裂終了至果實急速肥大之間約有一個月，此期稱為細胞肥大準備期，特徵為細胞壁累積大量之多醣類，果實比重最大。此外，值得注意的是此時果實對氣候之變化最為敏感，其成熟時之生理障礙與此時期之關係密切。之後為細胞肥大期，在此期因水分和糖類大量進入細胞並累積而使果實急速生長與肥大，並逐步地成熟（Maturation）。其後，乙烯誘導果實呼吸率之上升和更年性上升，多種分解酵素活性亦上升，果實乃進入老化期（Senescence）。

(三)、呼吸率、乙烯釋放量和更年性

西洋梨有明顯的更年性，但在東方梨則因品種不同而異。由呼吸率和乙烯釋放量之測定，砂梨中的橫山梨、菊水，和秋子梨中的鴨梨、慈梨均為更年性果實。而砂梨中的二十世紀和新高梨為非更年性果實。由於呼吸率高低與呼吸型式對於園產品之保鮮、貯運和銷售有非常密切的關係，因此需要加以注意。

以橫山梨為例，在 0-20℃，果實乙烯釋放量隨溫度之升高而升高，10℃以上即 20℃時高峯值達 80 μ L/kg.hr。呼吸率亦隨溫度之升高而升高，10℃以上即出現明顯的呼吸高峯，於 30℃時，最高呼吸率為 25mL/Kg.hr。

(四)、果實生理障礙（Physiological disorder）

1. 果肉粉質化：為果實過分成熟有關，嚴重時果肉組織呈水浸狀崩壞現象，且其發生與否和品種關係密切。

2. 水心病（Water core）：東方梨容易發生，於果實內部有水浸狀區域，從外觀不易看出徵狀。此生理障礙與細胞含有大量的糖醇類和缺鈣有關，一般在幼樹齡、生長旺盛或產量較少之果樹較容易發病。這類果實不宜貯藏，若長期貯藏則果肉易褐化發霉。

二、果實之採收與分級

梨果實到了成熟時期時，可溶性醣急速累積，尤其是蔗糖和總糖，因此採收期影響果實品質甚大。常用的成熟期判斷方法有 1. 盛花後日數 2. 果實硬度 3. 果皮顏色 4. 呼吸率和乙烯量 5. 可溶性固形物含量。果實硬度之變化常供西洋梨成熟度之判斷。日本果農則用果實顏色之變化（標準色板）判斷日本梨之成熟度。台灣省果農常依盛花後日數並配合採收觸摸果實來判斷，此方法雖可行，但是容易受氣候環境之影

響。

梨採收後之分級包裝方法宜參照台北農產運銷公司編印之果菜分級包裝手冊進行之，如新世紀梨之分級包裝的做法。

三、果實之貯藏

(一)、採前栽培管理對貯藏之影響

1. 品種特性：新水、幸水和豐水果實脆弱，容易受傷，較不耐貯藏。橫山梨果實雖然較不易受傷，但是易受寒害，貯藏溫度宜稍高，所以也不耐貯藏。二十世紀、新世紀、新興等品種較耐貯藏。

2. 田間管理技術：貯藏時所發生的果肉障礙與栽培管理關係密切，低溫和乾燥會促進水心病之發生。排水不良之肥沃地生產的果實，貯藏時心部易褐化。鈣肥不足，也容易發生障礙。

(二)、貯藏溫度和濕度

低溫可以延遲果肉軟化、減少生理障礙、減少採收後病害和延長貯藏壽命。採收後迅速將果實溫度降低，能有效的保持果實鮮度和品質。因此，不論是立即鮮銷或貯藏之果實均有預冷之必要。預冷方法有室內冷卻（Room cooling）或差壓式預冷（Forced air cooling），而以後者之效果較佳。

適宜之貯藏溫度與果實之品種有關。以巴梨（Bartlett）而言，貯藏在 0-0.5℃下可貯藏一個月，若貯藏在 -1℃下則貯藏期可更長。新水、幸水和豐水貯藏適溫為 0-1℃，適宜之相對濕度為 85-90%。橫山梨果實較宜之貯藏溫度為 10℃，太低之溫度會使橫山梨果肉褐變。

(三)、貯藏方法

1. 低溫貯藏：以豐水梨而言，於 0℃下經過 60 天之貯藏，仍能維持良好的品質。因此有人建議採用冰溫貯藏，其效果雖然較佳，但是不易精準控制溫度。

2. 氣調貯藏（CA Storage）：氣調貯藏法除了低溫外，還控制貯藏環境中之空氣成分，長期貯藏以氣調貯藏為宜。二十世紀梨較佳之空氣組成為氧氣 5%，二氧化碳 3-4% 或氧氣 3%，二氧化碳 0%，溫度為 0℃，相對濕度 90%。二氧化碳濃度若超過 8% 則會發生生理障礙。橫山梨貯藏條件為溫度 10℃，氧氣 5%，二氧化碳 2%，二氧化碳若超過 5%，則造成果肉褐化。氣調貯藏效果雖佳，可惜台灣迄今尚無商業性貯藏。選擇適宜的膜（如塑膠袋）包裝，亦能有改變氣體成分之效果，但是仍有不易精確地控制缺點。

結 論

梨果實採收前田間栽培管理工作決定了果實品質和耐貯性。有良好品質的果實才有處理和貯藏之價值，也才能有較高的收益。慎選果實採收成熟度，小心採收和處理，避免果實受傷，是延長果實貯運壽命之不二法門。若要貯藏時，宜先考慮所生產之果實是否耐貯藏，是否有妥當之貯藏環境。當然，是否合乎經濟效益亦須審慎加以評估的。

