

芥藍與油菜種間雜種的獲得與鑑定¹

邱金春² 林子凱^{3,5} 林楨祐² 夏奇鈺⁴ 王三太²

摘 要

邱金春、林子凱、林楨祐、夏奇鈺、王三太。2012。芥藍與油菜種間雜種的獲得與鑑定。台灣農業研究 61:52-63。

遠緣雜交可以擴大物種間基因的轉移，獲得種內雜交難以得到的基因型而進行作物的品種改良。芥藍 (*Brassica oleracea* var. *aboglabra*) 與油菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) 經由蕾期人工授粉，同時進行正交與反交，摘取敗育前的未成熟胚，於經修正之MS培養基分別培育出種間雜交種。*B. oleracea*與*B. campestris*雜種胚培養成功率受胚齡、培養基組成、親本基因型的影響，同一組育種親本其正反與反交胚培養成功率及生育反應不同，以*B. campestris*為母本之雜交組合胚拯救成功率較高，說明母本基因型不同對雜種的誘導率有一定的影響。雜交實生苗經流式細胞儀檢定核酸含量確定為雜交後代，其外表性狀介於兩親之間但有偏雌效應的現象。

關鍵詞：芥藍、油菜、種間雜種、胚拯救。

前 言

萵苣屬蔬菜育種除了在亞種間雜交進行品種改良外，亦可經由遠緣雜交由他種導入遺傳質以獲得種內雜交難以得到的新基因類型。自從1980年以二倍體*Brassica oleracea*與*Brassica rapa*人工雜交形成異源四倍體*Brassica napus*葉菜類‘Hakuran’後，陸續以胚培養及子房培養育出多個十字花科種間 (interspecific) 雜種及屬間 (intergeneric) 雜種 (Kudou *et al.* 1995; Sarmah & Sarla 1998; Wang *et al.* 2008a, 2008b; Wen *et al.* 2008a, 2008b; Zhang *et al.* 2004)，藉

由遠緣雜交技術不僅開發新種質，而且可將抗蟲性、早熟性、抗逆特性等重要經濟性狀轉移至目標作物，例如種間雜交種*B. napus*分別自親本*Brassica oleracea*導入自交不親合性與抗甘藍蚜蟲 (Quazi 1988)；甘藍自*Brassica juncea*導入抗黑腐病特性 (Tonguc & Griffiths 2004)；白菜‘Komatsuna’與甘藍的雜交種再回交親本‘Komatsuna’，選育出抗*Fusarium*的後裔‘YR-Edogawa’ (Noguchi 2004)；*B. oleracea*由*Brassica carinata*導入抗白粉病特性；由*B. napus*轉移抗殺草劑三氮六環衍生物 (triazine) 至*B. oleracea*，轉移抗白銹病Race-7至*B. rapa*

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第2651號。接受日期：101年2月29日。
2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系助理研究員、助理研究員、副研究員兼系主任。台灣 高雄市。
3. 本所作物組助理研究員。台灣 台中市。
4. 本所生物技術組研究員。台灣 台中市。
5. 通訊作者，電子郵件：kai@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302801。

(Ayotte *et al.* 1987)；經由黃籽二倍體 *B. rapa* 與 *B. oleracea* 雜交獲得黃籽 *B. napus* (Wen *et al.* 2008a)；經由種間雜交將 *B. napus* 的不產生芥酸的對偶基因導入 *B. oleracea* (Bennett *et al.* 2008)；在雄不稔系育種中，遠緣雜交更是蔬菜獲得雄不稔特性的重要途徑，結球白菜 (*Brassica campestris* spp. *pekinensis* Olsson) 細胞質雄不稔 (cytoplasmic male sterility, CMS) 基因可轉至羽衣甘藍 (*B. oleracea* var. *acephala* DC.) (Zhu & Wei 2009)，蘿蔔CMS基因可導入蕓苔屬作物 (Paulmann & Röbbelen 1988; Sakai & Imanura 1990) 等。

蕓苔屬植物有A、B和C不同基因組，經由分子層次鑑定分類，已知蕓苔屬不同基因組中A和C親緣關係較A和B或B和C更為接近 (Inomata 2007; Yang *et al.* 2008)。而種原的親疏遠近對於遠緣雜交親本間的親和性具有決定性的影響 (Inomata 2007; Wang *et al.* 2008a)，遠緣雜交的兩親本因染色體同源性低，因此雜交過程中會出現各種障礙，包括有雜交不親和、胚敗育和雜種不稔性等。現在已知發育初期的未成熟胚培養是克服胚敗育最佳途徑之一，可以避免雜交胚的萎縮退化。影響胚培養成功與否的因素很多，尤其是種間雜交的親和性及胚珠退化時間會隨著雜交組合親本的不同而有差異，親本的基因型對其有很大的影響，在雜種胚敗育發生之前，掌握適當的受精胚摘取時間是影響胚培養成功與否的關鍵因子之一 (Inomata 2007; Yang *et al.* 2008)。此外，培植體對培養基組成的要求也會因為不同基因型親本和雜交組合，與培植體切離母體時胚的發育程度而有差異性。本試驗主要探討不同胚齡的雜種胚對 *B. oleracea* 與 *B. campestris* 種間雜交種培育的影響及胚培養的最佳生長條件。

材料與方法

試驗材料

供試的材料來自於農試所作物組與鳳山分

所收集之蔬菜種原，包括芥藍 (*B. oleracea* var. *aboglabra*) 品系‘1506’、‘1507’、‘1508’、西農芥藍 (CN) 與油菜 (*B. campestris* ssp. *chinensis*) ‘B-01’、‘B-02’、‘B-03’、‘B-04’等品系。種子經播種萌芽後種植於栽培盆，定期施肥管理，植株於溫室內培育至開花。以不同品系芥藍與油菜進行正交與反交，其中西農芥藍具細胞質雄不稔性只作為育種母本。

雜交授粉

父本選擇開花前一天之花蕾先進行套袋避免污染，母本則於授粉當天早上選擇約一至兩天後開花之花蕾，除去花瓣及雄蕊，然後取開花當天採集之父本新鮮花粉沾在母本供試植株之柱頭上，套袋隔離，於授粉後7-20日分別取果莢觀察胚發育情形，並培育不同胚齡的呈現褐色果莢供胚培養。

胚培養

採用未成熟胚培養進行雜種胚拯救，分別摘取授粉後第10日、15日的幼嫩果莢，用75%之酒精浸漬數秒後經蒸餾水洗滌，再以0.5%次氯酸鈉溶液於超音波震盪10分鐘，經無菌水洗滌3次後取出材料，以滅菌後的解剖刀切開果莢，放入含NAA (0、0.1、1 ppm)、Kinetin (0、0.1 ppm)、casein hydrolysate 400 ppm及蔗糖5%之MS基本培養基，於22°C ± 1°C培養室中以弱光進行培養並調查可發育胚數；待胚膨脹萌芽後，移入含AgNO₃ 0.5 ppm、Kinetin 0.5 ppm、NAA 0.1 ppm、casein hydrolysate 1000 ppm及蔗糖3%之MS培養基，置於2000 lux光照下繼續培育成苗，然後切取莖頂以側芽增殖方式將每個雜種植株繁殖成單株試管營養系。

種間雜種鑑別

待試管苗根長約0.5-1 cm時進行兩週的馴化，再移出管外以培養土栽培種植於溫室中。待植株達15 cm高時，取新芽之第一片葉展開後切取約1 cm²葉片，加入0.2 mL UV CyStain Precise T萃取緩衝液A (Kit from Partec, Ger-

many)，以刀片將組織切碎過濾，再於濾液中添加0.8 mL Partec Cystain Precise T緩衝液B，靜置染色3分鐘。每樣品取樣2次，以流式細胞儀 (flow cytometry, Partec PA, Germany) 分析系統，檢測5000個細胞核，分析細胞內之核酸含量。

結 果

雜交胚的發育與培養適期

以‘1506’等4個不同芥藍品系與‘B-01’等4個不同油菜品系進行*B. oleracea*與*B. campestris*種間雜交蕾期授粉，無論是正交或反交，授粉後初期子房明顯膨大並轉綠，但隨著授粉後日數增加，子房發育呈現停滯然後逐漸黃化與脫落，最終都無法於活體植株 (*in vivo*) 獲得雜交種子。探討授粉後不同時期胚的發育，可以幫助決定適當胚摘取時間。母本花朵於授粉後5–20日定期切開幼嫩果莢可觀察到雜交胚的發育過程，在授粉後第5–7日可由幼嫩之果莢內部觀察到呈半透明之淡綠色多細胞的球型胚；在授粉後第二週球型胚數量會略增加，胚也漸轉為綠色；但是在授粉後第14日起多數雜交胚在外型上呈扁平化，色澤轉為淡褐色；在授粉後第20日已可觀察到多數雜交胚有皺縮現象，色澤更暗呈現褐色，此時果莢外觀也多為黃化甚至脫落 (圖1)。遠緣雜交育種常因親本間親緣性低，造成兩親本染色體配對困難，使得雜種胚在授粉受精後於發育過程中容易發生胚敗育，授粉後日數越多，敗育的雜種胚數目越多，平均每個幼嫩果莢能順利摘取進行培養的胚數量驟減，但是胚成熟度會影響胚培養成活率，因此掌握適當胚摘取時期非常重要。授粉後第1週雜交胚成熟度普遍不足，授粉第4週後的雜交胚多萎縮呈暗褐色，不僅培植體取得不易且已敗育的雜交胚也難再進行胚拯救；授粉後7–20日的蕓苔屬種間雜交胚都可能經培養而發育成植株，隨著日齡的增加胚發育越趨成

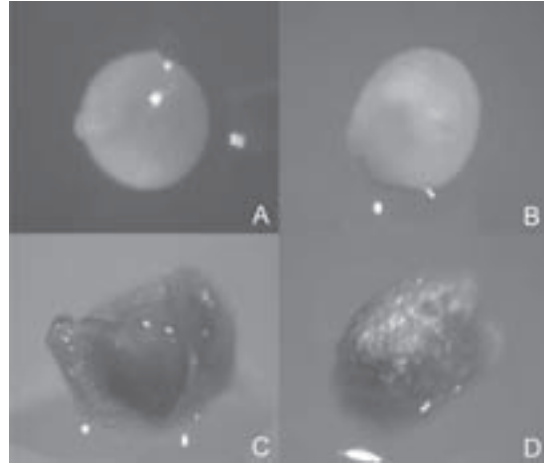


圖 1. 不同發育階段的油菜 × 芥藍種間雜交胚，(A–D)：雜交胚分別為授粉後 5 日、10 日、15 日及 20 日齡。

Fig. 1. Development of hybrid embryos from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* × *B. oleracea* var. *aboglabra* after pollination 5 (A), 10 (B), 15 (C) and 20 (D) days.

熟培養成功率也越高，唯多數邁入第三週齡的遠緣雜交胚常急速轉褐萎縮，果莢內部能摘取培養的雜交胚數目驟減甚至胚完全萎縮死亡無法進行胚拯救。親本基因型會影響遠緣雜交胚衰敗速率，不同油菜品系為母本與同一芥藍品系雜交，‘B-02’ × ‘1507’子房發育期較‘B-04’ × ‘1507’長，‘B-03’ × ‘1508’子房發育期較‘B-01’ × ‘1508’為長，因此‘B-02’ × ‘1507’與‘B-03’ × ‘1508’可取得授粉後20日齡胚進行培養，但是‘B-04’ × ‘1507’與‘B-01’ × ‘1508’子房內部胚已完全萎縮敗育 (表1)。為兼顧培植體取得及胚拯救成功率，因此本試驗分別以授粉後10日、15日與20日齡子房摘取內部的未成熟胚作為胚培養材料來源，唯雜交胚培養適期因親本品系不同而有差異。

親本基因型、正反交及培養基組成對培育種間雜種之影響

以不同品系油菜作為母本與同一芥藍品系雜交，‘B-02’ × ‘1507’培植體生長反應較‘B-04’ × ‘1507’為佳，另‘B-03’ × ‘1508’培植體

表 1. 不同品系油菜母本在油菜與芥藍遠緣雜交胚培養之效果

Table 1. The effect of different parent lines on embryo culture of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* × *B. oleracea* var. *aboglabra*

Embryo (DAF) ^z	Regulator ^y	<i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i> × <i>B. oleracea</i> var. <i>aboglabra</i>			
		'B-02' × '1507'	'B-04' × '1507'	'B-01' × '1508'	'B-03' × '1508'
10	K 0.1, N 1	0/6 ^x	1/7	1/10	0/29
10	K 0.1, N 0.1	0/6	0/7	3/10	2/28
10	K 0, N 1	0/6	0/7	1/10	0/28
10	K 0, N 0.1	1/6	0/7	0/10	1/29
10	K 0, N 0	0/7	0/8	1/10	0/29
15	K 0.1, N 1	1/4	0/2	0/2	3/9
15	K 0.1, N 0.1	2/3	0/2	0/2	2/9
15	K 0, N 1	1/4	0/2	0/2	2/9
15	K 0, N 0.1	2/5	0/2	1/2	3/9
15	K 0, N 0	3/5	0/2	1/2	2/9
20	K 0.1, N 1	2/2	—	—	0/5
20	K 0.1, N 0.1	1/2	—	—	0/5
20	K 0, N 1	1/2	—	—	0/5
20	K 0, N 0.1	1/2	—	—	0/5
20	K 0, N 0	2/2	—	—	0/5

^z DAF means days after pollination.^y Concentration of kinetin (K) and NAA (N) in ppm.^x Number of plantlets/number of cultured embryos.

則較‘B-01’ × ‘1508’容易形成雜交單株 (表1)，胚培養結果顯示雜種胚培養成功率受母本不同基因型的影響。不同品系芥藍與油菜進行種間雜交授粉，獲得正交與反交共14個雜交組合，胚培養結果多數都有發育為雜交單株 (表2)，少數則形成癒合組織伴有根的分化；其中僅3組胚培養後培植體沒有任何生長反應，包括‘1508’ × ‘B-03’、‘1507’ × ‘B-02’是以芥藍作為母本，‘B-01’ × ‘1507’則是以油菜為母本之雜交組合。*B. oleracea*與*B. campestris*種間雜交正交與反交胚培養後培植體生育是不同的，即使同一組育種親本在相同基因型的前提下進行正反交，以油菜為母本的5個雜交組合胚培養成功率較以芥藍為母本的反交組合高，雜交胚於培養基多直接形成雜交單株。以芥藍為母本與不同品系油菜父本雜交，雜交胚培養除成功率較低外，6個有生長反應雜交組合中有5個組

合培植體僅有根形成，也高於以油菜為母本的雜交組合 (表2)，而正反交的根形成並無特定組合較高比例關係。西農芥藍具細胞質雄不稔性只能作為育種母本，經授粉後胚培養結果僅‘CN’ × ‘B-01’形成種間雜交單株，另兩組培植體僅長根無地上部發生。此試驗中不同品系芥藍與油菜正反交結果，8個雜交組合中僅油菜‘B-01’ × 芥藍‘1508’1個組合雜交株具有花粉，經蕾期授粉自交，目前已產生第一代種子，其餘7個組合均為不稔的雜交株。

除了胚成熟度外，培養基中植物生長調節劑的施用也是遠緣雜交胚成活率的影響因子之一。在不含植物生長調節劑之基本培養基中，胚培養也可以育苗，但以日齡較多的雜交胚為宜；僅添加NAA (0.1–1 ppm) 對*B. campestris*與*B. oleracea*種間雜交胚拯救的效果並不明顯，但是同時添加NAA與Kinetin 0.1 ppm則可提高

表 2. 不同品系油菜與芥藍的種間雜交胚培養植株/根之再生率

Table 2. Rate of hybrids/roots regeneration through embryo culture of different lines from crosses between *Brassica campestris* and *Brassica oleracea*

Crosses	Plantlets formed (%)				
	K 0.1, N 1 ^z	K 0.1, N 0.1	K 0, N 1	K 0, N 0.1	K 0, N 0
<i>B. oleracea</i> var. <i>aboglabra</i> × <i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i>					
'CN' × 'B-01'	20.0	0.0	0.0 (30.0)	0.0	0.0
'CN' × 'B-02'	0.0 (35.7) ^x	0.0	0.0 (15.4)	0.0	0.0
'CN' × 'B-03'	0.0 (6.7)	0.0 (6.7)	0.0	0.0	0.0
'1507' × 'B-02'	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
'1508' × 'B-03'	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
'1506' × 'B-01' ^y	0.0	0.0	0.0	0.0 (1.9)	1.9
'1507' × 'B-04' ^y	0.0 (5.3)	0.0	0.0 (5.3)	0.0	0.0
'1508' × 'B-01' ^y	0.0	0.0	0.0 (4.0)	0.0	4.0
<i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i> × <i>B. oleracea</i> var. <i>aboglabra</i>					
'B-01' × '1506' ^y	28.6	7.1	15.4	15.4	7.7
'B-04' × '1507' ^y	11.1	0.0 (22.2)	0.0	0.0	0.0
'B-01' × '1508' ^y	8.3	25.0	8.3	8.3	16.7
'B-01' × '1507'	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
'B-02' × '1507'	25.0	27.3	16.7 (8.3)	30.8	35.7
'B-03' × '1508'	7.0 (4.7)	9.5 (2.4)	4.8 (2.4)	9.3	4.7

^z Concentration of kinetin (K) and NAA (N) in ppm.^y Percentage of root formation from explants.^x Reciprocal hybridization.

雜交胚成活率，尤其對成熟度不足的10日齡胚拯救促進效果較15日齡與20日齡胚顯著，其中同時添加NAA 0.1 ppm與Kinetin 0.1 ppm胚培養育苗效果略優於NAA 1 ppm與Kinetin 0.1 ppm處理者(表1)。不同品系*B. campestris*與*B. oleracea*種間雜交胚培養成功率有差異性，部分雜交組合培植體培養後形成癒合組織僅有根分化而無莖芽的生長。在植物生長調節劑輔助之下，以*B. campestris*為育種母本者胚拯救成功率為4.7–35.7%，都高於其反交組合，植物生長調節劑的添加對以*B. campestris*為母本地雜交胚拯救似乎沒有很明顯的影響，即使在不含植物生長調節劑的基本培養基中也能部分萌芽；但是對以芥藍為母本的雜交組合，於含有NAA 0.1–1 ppm之培養基中則明顯有形成癒合組織及根分化的趨勢，而抑制了雜交胚

的萌發，此現象於NAA濃度達1 ppm時更明顯(表2)。

種間雜種之鑑別

進一步以流式細胞儀分析試驗中各雜交組合的親本及其種間雜種的核酸含量，結果顯示所有種間雜種之相對DNA含量均介於雙親之間；圖2所示為油菜'B-03'與芥藍'1508'雜交組合中，親本與雜種後裔之核酸含量分析結果，若將母本油菜'B-03'之DNA含量設為基準值，則油菜'B-03'、'B-03' × '1508'雜種及芥藍'1508'三者於細胞週期G1 stage測得之平均螢光讀值分別為100、131及154，而於G2 stage時則依序為200、253及303，該種間雜種的相對DNA含量介於雙親之間且趨近於雙親之平均值(圖2)，本試驗依流式細胞儀分析結果可清楚鑑別出種間雜交株。

雜交後裔之外表型

由胚培養獲得的*B. campestris*與*B. oleracea*種間雜交株，經馴化處後已移出管外並種植於溫室，雜交株生長勢強。芥藍為*B. oleracea*的變種之一，葉片為暗或淺灰綠色，葉質較厚；油菜又稱小油菜、白菜型油菜，為*B. campestris*的變種之一，植株矮小，葉質柔軟質地較薄，葉形為近圓或橢圓形，葉淺綠色或黃綠色；雜交株葉色、葉片質地等性狀介於油菜與芥藍之間，以*B. oleracea*為授粉母本則雜交株的葉片略帶革質、葉色呈現暗綠；以*B. campestris*為母本則雜交株葉片質地較薄、葉色較淺綠(圖3)。

討 論

蕓苔屬主要由3個不同基因組的基本種和3個複合種及衍生的變種組成，近年來經由分子層次的系譜分析得知，蕓苔亞族植物可以明顯地區分為*B. nigra*與*B. oleracea*/*B. campestris*兩大族群，表示不同基因組中A和C基因組之間的親緣關係較A和B或B和C更為接近 (Song *et al.* 1988; Warwick & Black 1993; Yang *et al.* 2008)。分屬於*B. oleracea*與*B. campestris*的芥藍與油菜親緣性雖然較A與B基因組或B與C基因組更接近，但在自然狀況下仍難以獲得雜交種子，因此有需要藉助胚拯救技術 (Huang *et al.* 2008; Kudou *et al.* 1995; Man *et al.* 2007;

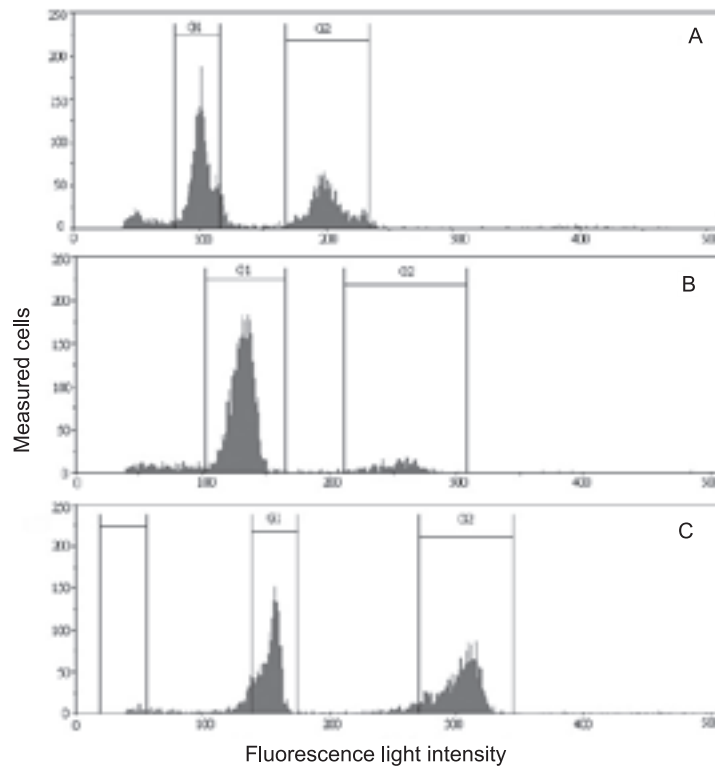


圖 2. 油菜與芥藍種間雜交植株 'B-03' × '1508' 核酸含量介於雙親之間。(A) 油菜；(B) 油菜 × 芥藍；(C) 芥藍。
Fig. 2. Amount of nucleic acid of interspecific hybrid (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* × *Brassica oleracea* var. *aboglabra*) (B), female parent (A) and male parent (C). Note the amount of nucleic acid in the hybrid is between the parents.



圖 3. 油菜與芥藍種間雜交植株其外表型態介於兩親本之間。(A) 由左至右分別為油菜、雜交株及芥藍葉片；(B) 油菜與芥藍種間雜交植株。

Fig. 3. An interspecific hybrid plant (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* × *Brassica oleracea* var. *aboglabra*) (B). Note leaf morphology is different among the hybrid plant (A, center) and its female parent, *B. campestris* (mock pak-choi) (A, left) and male parent, *B. oleracea* (Chinese kale) (A, right).

Wen *et al.* 2008a)。油菜與芥藍為蕓苔屬的不同種，分屬於AA與CC染色體組，藉由觀察雜交胚的發育過程得知，雜交胚約在授粉後第20日起雜交胚在外型上由綠色球型胚開始轉為淡褐扁平化終至褐化皺縮死亡，顯示芥藍與油菜種間雜交胚敗育發生在球型胚時期。授粉後子房發育時間的長短會影響內部胚珠的發育及存活率 (Kudou *et al.* 1995; Wang *et al.* 2008b)，在前人研究中，油菜 × 羽衣甘藍以授粉後7日齡子

房培養其雜交株獲得率最高，但其反交羽衣甘藍 × 油菜僅能以授粉後16–18日齡胚培養獲得雜交株 (Wen *et al.* 2008a)；Zhang *et al.* (2004) 則認為*B. rapa* × *B. oleracea*以授粉後9日的子房為較適合的培養時期；Kudou *et al.* (1995) 以授粉後18–36日齡是青花菜與油菜雜交胚培養獲得很好的結果；其他研究報告也有相似的結論 (Lu *et al.* 2001; Man *et al.* 2007; Takeshita *et al.* 1980)。Zhu & Wei (2009) 曾報導*B. oleracea*與*B. campestris*種間雜交難以著果，並認為胚的皺縮可能由於胚珠組織的扁平化，不充足及有障礙的養分輸送可能為胚敗育的主因。雜交組合及親本基因型的差異會影響遠緣雜交親合性的強弱，因而影響雜交胚在受精後至敗育萎縮前發育期間的長短。我們的試驗結果則認為授粉後10–15日齡的未成熟胚是油菜與芥藍適當胚拯救培養時期，此結果與前人在菜心與芥藍雜交的培養結果相似 (Yang *et al.* 2008)；但與前述部分學者的研究結論不同 (Kudou *et al.* 1995; Lu *et al.* 2001; Man *et al.* 2007)。但是可以確定的是十字花科蔬菜遠緣雜交胚在早期即退化，而且認為適當摘取培養時間會依雜交組合、物種品系及植株生育狀況而有差異，因此遠緣雜交育種胚拯救時確認適當胚的發育期是非常重要的。

近年因技術不斷改良提升，遠緣雜種獲得率大幅提高，明顯地視親本組合、培養基、授粉母本基因型的影響 (Inomata 1978, 2007; Man *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008a; Zhang *et al.* 2004)。種原間的親疏遠近對於遠緣雜交親本間的親和性具有決定性的影響，即使是相同基因型的兩個種原親本進行正交與反交其雜交胚培養成功率及生育反應並不完全相同，此種單方向不親和特性在蕓苔屬族群常見 (Bhat & Sarla 2004; Inomata 1978, 2007; Man *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008a)。就蕓苔屬作物而言，子房培養明顯地可以獲得*B. rapa* × *B. oleracea*雜交

株，但是其反交則無效 (Huang *et al.* 2008; Inomata 1978; Man *et al.* 2007; Nishi *et al.* 1959)；但是 Takeshita *et al.* (1980) 則認為經由胚培養可輕易獲得以 *B. oleracea* 為母本的種間雜交株。合成 *B. juncea* 時以 *B. rapa* 為母本獲得雜交株率較高，以 *B. nigra* 為母本的反交組合則有明顯的不親合性 (Bhat & Sarla 2004)。此試驗以芥藍與油菜進行正反交胚培養結果，以 *B. campestris* 為育種母本時雜交胚多直接萌發成植株，萌芽率較高；若以 *B. oleracea* 為母本之雜交組合僅少數培植體形成雜交單株，多數培植體趨向於形成愈合組織及根分化，後者可能與培養基組成不適合生長或是受育種母本基因型的影響，尚有待繼續探討。但是不同染色體數目的種間雜交時，採用染色體數目高的作母本較易成功，Stewart (2004) 也認為以 *B. oleracea* 為母本與 *B. rapa* 雜交胚培養成功率依然非常低；在前人芥菜型油菜與白菜、菜心與芥藍、甘藍與大白菜的種間雜交也得到相似的結論，並認為正反交差異可能受細胞質基因組的決定 (Man *et al.* 2007; Stewart 2004; Wang *et al.* 2006; Yang *et al.* 2008)；說明蕓苔屬種間雜交母本基因型不同，對雜種的誘導率有一定的影響。

培養基組成已被證實會影響多種作物胚拯救的存活率，進行蕓苔屬蔬菜種間雜交胚培養，有些研究認為在不含生長調節劑的基本培養基未成熟胚培養都無法發育成苗 (Kudou *et al.* 1995)，但是我們以基本培養基培養油菜與芥藍仍然可以獲得少數的雜交株，相同結果亦見於油菜與蕓芥 (Dai *et al.* 2004)、羽衣甘藍與油菜 (Wen *et al.* 2008a) 等種間雜交株的培育，但若在培養基中添加適量的生長調節劑 NAA 及 kinetin 明顯地可促進 *B. campestris* 與 *B. oleracea* 種間雜交胚在試管內的發育，其他研究也獲得相似的結果 (Bennett *et al.* 2008; Dai *et al.* 2004; Kudou *et al.* 1995; Wang *et al.* 2008a; Yang

et al. 2008; Zhang *et al.* 2004)。另外，培養基組成中鹽類濃度含量會影響受精胚的發育，Inomata (1979) 曾提出二倍體植株子房內種子形成時需要較少的硝酸鹽含量，不同基因型或雜交組合的雜交胚對無機鹽類的需求不同。此試驗中以全量 MS 配方為基本培養基，在相同的添加物中以 *B. oleracea* 為母本的組合雜交株獲得率較其反交組合差且培植體生育反應偏向根分化，可能因授粉母本不同對鹽類或滲透壓需求並不相同，此推測尚有待進一步的實驗證實。

經由胚培養獲得之培植體，需進一步鑑定是否確為種間雜交之後裔，通常可利用顯微鏡進行染色體數判斷、核型分析或以螢光原位雜交 (FISH) 等鑑定之，然而若為育種之目的進行大量種間雜交試驗時，快速有效的種間雜種鑑別方法將有助於提升篩選效率，本試驗以流式細胞儀分析雜交組合後裔與親本間之相對 DNA 含量可清楚鑑別出種間雜交株，Fahleson *et al.* (1988) 即以流式細胞儀分析十字花科作物中甘藍與白菜的體細胞雜種之核酸含量，當個體間核酸含量具一定之差異，以該法測定之 DNA 含量與染色體數目之相關係數達 0.91，用之估計雜種染色體數的誤差約在 $\pm 10\%$ 左右，隨後亦有研究以該法分析甘藍類之體細胞雜種 (Sheng *et al.* 2008)，更甚者以該法分析花椰菜與黑芥之非對稱融合體細胞雜種後裔的相對 DNA 含量變異，並藉其證明個體間染色體丟失之程度 (Zhang *et al.* 2008)。本試驗以流式細胞儀分析雜交組合後裔與親本間之相對 DNA 含量，該種間雜種的相對 DNA 含量介於雙親之間且趨近於雙親之平均值，此與南瓜屬種間雜交之結果雷同 (Šiško *et al.* 2003)，相對於前述體細胞非對稱融合而言，種間雜交胚較無因染色體丟失造成之染色體數目變異大的情形，因此更能清楚鑑別出種間雜交株。

Sabharwal & Doležel (1993) 應用流式細胞

儀分析蕓苔屬種間雜交植株倍數性及基因組 (genome) 之組成時指出，CC基因組比AA基因組多了約44%的核酸含量，而本試驗中屬CC基因組之芥藍‘1508’其相對DNA含量約比AA基因組之油菜‘B-03’多了約52–54% (G2與G1 stage)，CC基因組核酸含量明顯大於AA基因組的結果類似，其DNA含量數值之差異可能為核酸染劑不同或試驗材料差異所致。此外，由於CC基因組與AA基因組間核酸含量差異夠大，即使流式細胞儀讀值與染色體數間雖可能有誤差存在，仍能有效區別種間雜種。若為育種之目的而進行回交時，由於染色體之不對等分離將使後裔個體間染色體數有較大之變異，則可能需配合其他方法輔助篩選種間雜交後裔個體。

雜交後裔特性偏雌效應曾經在不同作物發現，在蕓苔屬中如*B. napus*油含量、種子種皮色素遺傳等性狀會受授粉母本細胞質影響等 (Bhat & Sarla 2004; Huang *et al.* 2008; Kondra & Stefansson 1970; Nishi *et al.* 1959; Tian *et al.* 2010; Wang *et al.* 2008a; Wen *et al.* 2008a)。此試驗油菜與芥種間雜交實生後代園藝性狀雖然介於雙親之間，但是由3組正反交實生苗外表型態比較，以*B. oleracea*為授粉母本則雜交株的葉片略帶革質、葉色呈現暗綠，以*B. campestris*為母本則雜交株葉片質地較薄、葉色較淺綠，也有偏母本特性的趨勢，與前人的研究結果相符。此試驗中不同品系芥藍與油菜正反交結果，8個雜交組合中僅油菜‘B-01’×芥藍‘1508’雜交株具有少量花粉，其餘7個組合均為不稔的雜交株。遠緣雜交株普遍有不稔性的障礙，前人研究認為遠緣雜交株在減數分裂時可能有染色體數分配不均勻及染色體丟失干擾花粉正常基因功能 (Huang *et al.* 2008; Tian *et al.* 2010; Wang *et al.* 2008a, 2008b)，利用染色體倍加技術提高遠緣雜交株的稔實性目前已有初步成果，將近一步探討遠緣雜交種後裔表現。

引用文獻 (Literature cited)

- Ayotte, R., P. M. Harney, and M. V. Souza. 1987. Transfer of triazine resistance from *Brassica napus* to *B. oleracea* L. I. Production of F₁ hybrids through embryo rescue. *Euphytica* 36:615–624.
- Bennett, R. A., M. R. Thiagarajah, J. R. King, and M. H. Rahman. 2008. Interspecific cross of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* and *B. napus*: effects of growth condition and silique age on the efficiency of hybrid production, and inheritance of erucic acid in the self-pollinated backcross generation. *Euphytica* 164:593–601.
- Bhat, S. and N. Sarla. 2004. Identification and overcoming barriers between *Brassica rapa* L. em. Metzg. and *B. nigra* (L.) Koch crosses for the resynthesis of *B. juncea* (L.) Czern. *Genet. Resour. Crop Ev.* 51:455–469.
- Dai, L. J., X. Li, C. Y. Guan, and J. Zhong. 2004. On ovary and embryo culture of hybrid between rapeseeds and rocketsalad. *Hunan Agric. Univ.* 30:201–204. (in Chinese with English abstract)
- Fahleson, J., J. Dixelius, E. Sundberg, and K. Glimeilius. 1988. Correlation between flow cytometric determination of nuclear DNA content and chromosome number in somatic hybrids within *Brassicaceae*. *Plant Cell Rep.* 7:74–77.
- Huang, T., J. Sun, F. Xu, J. M. Yin, Z. L. Tang, and J. N. Li. 2008. A preliminary study on resynthesizing *Brassica napus* through (*B. oleracea* var. *alboglabra* × *B. oleracea* var. *acephala*) × *B. campestris* var. *oleifera*. *Chin. Agric. Sci. Bull.* 24:134–138. (in Chinese with English abstract)
- Inomata, N. 1978. Production of interspecific hybrids in *Brassica campestris* × *B. oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries. I. Development of excised ovaries in the crosses of various cultivars. *Jpn. J. Genet.* 53:161–173.
- Inomata, N. 1979. Production of interspecific hybrids in *Brassica campestris* × *B. oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries. II. Development of excised ovaries on various culture media. *Jpn. J. Breed.* 29:115–120.
- Inomata, N. 2007. *Brassica* vegetable crops. p.115–146. *in: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Vegetable Crops, Volume 3.* (Singh, R. J., ed.) CRC Press. New York. 552 pp.
- Kondra, Z. P. and B. R. Stefansson. 1970. A maternal

- effect on the fatty acid composition of rapeseed oil (*Brassica napus*). *Can. J. Plant. Sci.* 50:345–346.
- Kudou, R., Y. Fujime, and N. Fukada. 1995. Raising of *Brassica* interspecific hybrids by embryo culture. *Acta Hort.* 392:87–95.
- Lu, C. M., B. Zhang, F. Kakihara, and M. Kato. 2001. Introgression of genes into cultivated *Brassica napus* through resynthesis of *B. napus* via ovule culture and the accompanying change in fatty acid composition. *Plant Breeding* 120:405–410.
- Man, H., C. H. Zhang, X. E. Wang, and G. H. Zhang. 2007. Obtaining and identification of the allotetraploid from $4\times$ flowering Chinese cabbage $\times 4\times$ kailian. *Acta Hort. Sin.* 34:1163–1168. (in Chinese with English abstract)
- Nishi S., J. Kawata, and M. Toda. 1959. On the breeding of interspecific hybrids between two genomes, “c” and “a” of *Brassica* through the application of embryo culture techniques. *Jpn. J. Breed.* 8:215–222. (in Japanese with English abstract)
- Noguchi, T. 2004. The breeding of Komatsuna parent ‘YR-Edogawa’ and F1 hybrid ‘01-Shikoh No.12’-introduction of the cabbage *Fusarium*-resistance to the Koinatsuna. *Bull. Tokyo Metro. Agric. Exp. Sta.* 32:1–20.
- Paulmann, W. and G. Röbbelen. 1988. Effective transfer of cytoplasmic male sterility from radish (*Raphanus sativus* L.) to rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding*. 100:299–309.
- Quazi, M. H. 1988. Interspecific hybrids between *Brassica napus* L. and *B. oleracea* L. developed by embryo culture. *Theor. Appl. Genet.* 75:309–318.
- Sabharwal, P. and J. Doležel. 1993. Interspecific hybridization in *Brassica*: application of flow cytometry for analysis of ploidy and genome composition in hybrid plants. *Biol. Plantarum* 35:169–177.
- Sakai, T. and J. Imamura. 1990. Intergeneric transfer of cytoplasmic male sterility between *Raphanus sativus* (cms line) and *Brassica napus* through cytoplasm-protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 80:421–427.
- Sarmah, B. K. and N. Sarla. 1998. *Erucastrum abyssinicum* \times *Brassica oleracea* hybrids obtained by ovary and ovule culture. *Euphytica* 102:37–45.
- Sheng, X., F. Liu, Y. Zhu, H. Zhao, L. Zhang, and B. Chen. 2008. Production and analysis of intergeneric somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Matthiola incana*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92:55–62.
- Šiško, M., A. Ivančič, and B. Bohanec. 2003. Genome size analysis in the genus *Cucurbita* and its use for determination of interspecific hybrids obtained using the embryo-rescue technique. *Plant Sci.* 165: 663–669.
- Song, K. M., T. C. Osborn, and P. H. Williams. 1988. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). I. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor. Appl. Genet.* 75:784–794.
- Stewart, A. 2004. A review of crossing relationship between cultivated *Brassica* species. *Cruciferae Newsl.* 25:25–26.
- Takeshita, M., M. Kato, and S. Tokumasu. 1980. Application of ovule culture to the production of intergeneric and interspecific hybrids in *Brassica* and *Raphanus*. *Jpn J. Genet.* 55:373–387.
- Tian, E. T., Y. F. Jiang, L. L. Chen, J. Zou, F. Liu, and J. L. Meng. 2010. Synthesis of a *Brassica* trigeneric allohexaploid (*B. carinata* \times *B. rapa*) de novo and its stability in subsequent generations. *Theor. Appl. Genet.* 121:1431–1440.
- Tonguc, M. and P. D. Griffiths. 2004. Development of black rot resistant interspecific hybrids between *Brassica oleracea* L. cultivars and *Brassica* accession A 19182, using embryo rescue. *Euphytica* 136:313–318.
- Wang, A. Y., X. Li, and D. Y. Hu. 2008a. Obtaining intergeneric hybrids between *Brassica* species (*B. juncea* and *B. nigra*) and *Orychophragmus violaceas* via ovary culture. *Acta Agron. Sin.* 34:1557–1562.
- Wang, D., W. H. Wang, S. F. Xu, J. X. Luo, C. J. Chai, and F. H. Liang. 2006. Access and identification of intergeneric hybrid between *Brassica juncea* \times *B. pekinensis*. *Chin. Agric. Sci. Bull.* 22:389–392. (in Chinese with English abstract)
- Wang, X. E., C. H. Zhang, S. X. Xuan, H. Man, H. H. Liu, and S. X. Shen. 2008b. Monosomic addition lines of flowering Chinese cabbage (*B. campestris* L. ssp. *chinensis* var. *parachinensis* L. H. Bailey)-Chinese kale (*B. oleracea* L. var. *alboglabra* L. H. Bailey). *Agric. Sci. China* 7:656–663.
- Warwick, S. I. and L. D. Black. 1993. Molecular rela-

- tionships in subtribe Brassicinae (Cruciferae, tribe Brassiceae). *Can. J. Bot.* 71:906–918.
- Wen, J., J. X. Tu, Z. Y. Li, T. D. Fu, C. Z. Ma, and J. X. Shen. 2008a. Improving ovary and embryo culture techniques for efficient resynthesis of *Brassica napus* from reciprocal crosses between yellow-seeded deploids *B. rapa* and *B. oleracea*. *Euphytica* 162:81–89.
- Wen, G. J., H. Zhao, Y. D. Guo, and F. Liu. 2008b. Production and identification of interspecific hybrids between *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* and *B. nigra*. *ACTA Agric. Boreali-Sinica* 23:105–109. (in Chinese with English abstract)
- Yang, H., C. H. Zhang, H. Man, and X. E. Wang. 2008. Embryo development observation of 4× flowering Chinese cabbage × 2× Chinese kale and obtaining of the allotriploid by ovary culture. *J. Plant Genet. Resour.* 9:297–301. (in Chinese with English abstract)
- Zhang, G. Q., G. X. Tang, W. J. Song, and W. J. Zhou. 2004. Resynthesizing *Brassica napus* from interspecific hybridization between *Brassica rapa* and *B. oleracea* through ovary culture. *Euphytica* 140:181–187.
- Zhang, L., H. Zhao, and F. Liu. 2008. Identification and analysis of asymmetric somatic hybrids between *B. oleracea* and *B. nigra*. *Mol. Cell Biol.* 41:265–274. (in Chinese with English abstract)
- Zhu, P. F. and Y. T. Wei. 2009. Compatibility, production of interspecific F₁ and BC₁ between improved CMS *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and *B. oleracea* var. *acephala*. *J. Plant Breed. Crop Sci.* 1:265–269.

Identification of Interspecific Hybrids from Crosses between *Brassica oleracea* and *B. campestris*¹

Chin-Chun Chiou², Tzu-Kai Lin^{3,5}, Chen-Yu Lin², Chi-Ni Hsia⁴, and San-Tai Wang²

Abstract

Chiou, C. C., T. K. Lin, C. Y. Lin, C. N. Hsia, and S. T. Wang. 2012. Identification of interspecific hybrids from crosses between *Brassica oleracea* and *B. campestris*. *J. Taiwan Agric. Res.* 61:52–63.

In some crops, inter-specific hybridization is more useful than intra-specific hybridization for improvement of crop yield and quality. The objective of this study was to develop interspecific hybrids using different lines of *Brassica oleracea* var. *aboglabra* and *B. campestris* ssp. *chinensis*. After reciprocal bud pollination, immature hybrid embryos were collected and cultured on the modified Murashige and Skoog's medium. Results showed that the efficiency of producing interspecific hybrids was affected by embryo stage, genotype and medium composition. The efficiency of embryo rescue was affected by genotype and more interspecific hybrids were produced when *B. campestris* was used as female. The phenotype and relative amount of DNA in hybrids were between their parents but these characteristics were affected more by female parent than male parent.

Key words: *Brassica oleracea* var. *alboglabra*, *Brassica campestris* ssp. *chinensis*, Interspecific hybridization, Embryo rescue.

-
1. Contribution No. 2651 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: February 29, 2012.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Assistant Researcher, and Associate Researcher, Department of Vegetables, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, TARI, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
 3. Assistant Researcher, Crop Science Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 5. Corresponding author, e-mail:kai@tari.gov.tw; Fax: (04)23302801.