

準確偵測冬季裡作偶然存在大、小油菜雜交後代之方法

杜元凱¹ 陳涵葳¹ 洪逸筑² 林彥君³ 郭寶錚^{4,*}

摘要

杜元凱、陳涵葳、洪逸筑、林彥君、郭寶錚。2019。準確偵測冬季裡作偶然存在大、小油菜雜交後代之方法。台灣農業研究 68(1):69–77。

油菜為十字花科 (Brassicaceae) 芸苔屬 (*Brassica*) 作物，與大豆、花生及向日葵並列為世界重要油料作物之一。為減少除草劑使用、提升種子質量與培育雄不稔品系，已有許多透過基因改造 (genetically modified; GM) 方式所培育出之基改油菜品系，然而基改油菜所造成之基因流佈 (gene flow) 為不可忽視之潛在問題。除可能與野生種及近緣種相互混雜，影響自然生態，亦可能使非基改作物遭受汙染，致使農民損失慘重。為有效監測基改油菜是否於田間發生非預期性混雜，需要建立一簡單、快速的雜交後代判別方式。本試驗利用「德雜油 18 號」模擬基改大油菜作為父本，再以台灣冬季裡作常見的小油菜品種「農興 80 天」作為母本，以人工雜交所得之後代。依據流式細胞儀結果為主，評估以外觀裂葉性狀及相關序列增幅多型性 (sequence-related amplified polymorphism; SRAP) 分子標誌判定是否為大、小油菜雜交後代之可行性，並進一步利用田間開放授粉所得之雜交後代進行驗證。結果顯示，人工雜交與開放授粉所得雜交後代之外觀形態均有偏向父本之情形，利用外觀裂葉性狀及 SRAP 分子標誌進行雜交後代判斷之敏感度、特異度、陽性預測值及陰性預測值為 100%，兩種檢定方式均能準確判別田間開放授粉所得 F₁ 是否為雜交後代。此結果證實，利用外觀裂葉性狀及 SRAP 分子標誌具相當潛力應用於監測台灣冬季裡作期間，大、小油菜間是否發生因花粉飄散導致雜交後代發生情形。

關鍵詞：大油菜、小油菜、相關序列增幅多型性、裂葉性狀、種間雜交。

前言

十字花科 (Brassicaceae) 可細分為 18 個屬 3,700 多種植物，其中芸苔屬 (*Brassica*) 最具經濟價值。根據 Nagaharu (1935) 的理論，芸苔屬植物依基因組 (genome) 組成，可分為 3 個 2 倍體的原始基因組 (ancestral genome)，包括白菜類之所有物種 *Brassica rapa* (2n = AA = 20)、黑芥 *Brassica nigra* (2n = BB = 16)、甘藍 *Brassica oleracea* (2n = CC = 18)，以及 3 個異源多倍體的複合種，如甘藍型油菜 *Brassica napus* (2n = AACC = 38)、芥菜 *Brassica juncea* (2n =

AABB = 36)、伊索比亞芥 *Brassica carinata* (2n = BBCC = 34)。經遺傳鑑定分類得知，相較於 A 與 B 基因組或 B 與 C 基因組之結合，A 與 C 基因組具有較近之親緣關係 (Chiou *et al.* 2012)。台灣的油菜栽培紀錄始於日據時代，白菜型油菜或一般熟稱的小油菜，是台灣常見的冬季裡作，除了可收取抽苔前的嫩葉食用外，亦可作為綠肥，具有改善土壤理化性質、抑制雜草生長、防治土壤沖刷等效用，開花期間可美化農村景觀並成為冬季重要蜜源之一。

甘藍型油菜或大油菜種子含油量豐富，提

投稿日期：2018 年 5 月 29 日；接受日期：2018 年 10 月 15 日。

* 通訊作者：bjkuo@nchu.edu.tw

¹ 行政院農業委員會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 國立中興大學農藝系研究助理。台灣 台中市。

³ 行政院農業委員會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

⁴ 國立中興大學農藝系教授。台灣 台中市。

煉之油品可供食用或工業用途，與大豆、花生及向日葵並列為世界重要之油料作物。加拿大培育低芥子酸油菜 (low erucic acid rapeseed; LEAT) 並以 'Canadian oil, low acid' 作為行銷口號，之後便將加拿大生產的低芥子酸含量芥花油統稱為 'Canola'，多為 *B. napus*，但也有部分為 *B. rapa*。目前已推出 38 項基改大油菜品系，依目的可分為提升除草劑耐受性、調控授粉模式 (pollination control system)，以及改良質量性狀，如提升月桂酸 (lauric acid) (Del Vecchio 1996) 或表現植酸分解酶 (Maenz *et al.* 1999) 等。基改油菜的栽培以抗除草劑性狀為大宗，以加拿大為例，種植基改油菜具有高產量、低成本及高獲利等優點，農民種植基改油菜意願普遍提升 (Beckie *et al.* 2011)。

2016 年國際農業生物技術應用服務組織 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications; ISAAA) 統計資料顯示，目前已有 28 個國家允許基改作物栽培及商業化生產，全球栽培總面積達 1 億 8 千萬公頃，美國、巴西、阿根廷、加拿大及印度為主要種植區域。基因改造技術不斷更新，許多品系已商業化且大規模的種植，然而其中有許多未知的因子，對環境、食品安全及政治經濟可能造成的危害及衝擊。其中，環境因素包含生物多樣性 (biodiversity) 與基因流佈 (gene flow) (Nicolia *et al.* 2014)。當基改作物與非基改作物共存時，非基改作物田區很可能因為偶發性 (adventitious presence; AP) 的基因流佈現象而混雜基改作物，若原種植非基改作物田區已超過規定之混雜門檻 (threshold)，將會導致農民重大損失。外源基因流佈的樣態，包括花粉與種子，基改作物種子在採收、裝載、運輸的過程都有機會掉落而發展為自生族群 (volunteers)。油菜自生族群除了競爭空間、養分外，可能經過多次的雜交堆疊數種抗除草劑的性狀，或與十字花科作物及其野生近緣種雜交，而成為超級雜草 (super weed) (Warwick *et al.* 1999; Busi & Powles 2016)。德國 (Belter 2016)、日本 (Aono *et al.* 2011)、荷蘭 (Luijten *et al.* 2015) 都曾有基改種子流布紀錄。此外，*B. napus* 及 *B. rapa* 已證實可於自然環境下進

行雜交並繁衍子代，雜交子代亦能與鄰近的 *B. rapa* 進行回交，發生基因流佈現象 (Jorgensen & Andersen 1994)。先前 Hong *et al.* (2016a, 2016b) 以台灣常見的 *B. rapa* 品系「農興 80 天」 [*B. rapa* (*campestris*) L.] 作為母本，並蒐集 4 種中國培育及 1 種台灣自己育成的 *B. napus* 品系為父本，雜交試驗後所得子代經流式細胞儀 (flow cytometry; FCM) 確定為 3 倍體，證實於台灣氣候下，大、小油菜確實具有雜交風險。

本試驗以流式細胞儀判定結果作為雜交子代倍體數真值，評估溫室人工授粉與田間開放授粉下，改以子代裂葉 (lobed-leaf) 型態和相關序列增幅多型性 (sequence-related amplified polymorphism; SRAP) 分子標誌 2 種檢測方式，是否也具有穩定的倍體數鑑別效果。試驗配合二項分布估計有效抽樣數目，並以敏感度 (sensitivity; Sn)、特異度 (specificity; Sp)、陽性預測值 (positive predictive value; PPV) 及陰性預測值 (negative predictive value; NPV) 為評估參數；希望找到一個準確、簡單之方式，進行大、小油菜雜交子代倍體數高通量辨識，加速田間大、小油菜間基因流佈之監控。

材料與方法

植物材料

本試驗以大油菜「德雜油 18 號」作為花粉貢獻親 (父本，基因型為 AACC)，小油菜為花粉接受親 (母本，基因型為 AA)，選用國內常見的「農興 80 天」為材料。溫室人工授粉試驗於行政院農業委員會農業試驗所全密閉溫室進行，溫度約 $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 而相對濕度約 80%。開花期間以鑷子摘取父本雄蕊蘸於母本雌蕊上並套袋，收取授粉成功之果莢，待種子乾燥脫粒後存於夾鏈袋中。田間開放授粉試驗始於 2016 年二期稻作結束後，於農業試驗所生物技術組試驗田區進行，隨機選取大油菜「德雜油 18 號」下風處第 4 列 (35 cm) 處 20 個小油菜「農興 80 天」採樣點，收取種子後進行子代分析。隨機挑選適量的種子，置於濕濾紙上進行催芽，幼苗高約 1 cm 時移植 5 吋黑色軟盆

中，每週澆灌稀釋 1,000× 之花寶 2 號水溶液 (Hyponex, Osaka, Japan)。

雜交子代鑑別

流式細胞儀判定法：待幼苗生長至 4–5 葉齡，選取幼嫩葉片進行分析，每次上機均以同一株「農興 80 天」之幼嫩葉片為標準品，將其 G0/G1 期的螢光讀值固定於 50，並由樣品的相對 DNA 含量推估倍體數。待測樣品切取 1 cm² 之尖端葉片，於 150 μL nuclei extraction buffer 中切碎，再加入 600 μL staining buffer 靜置染色 2 min 後過濾，濾液以流式細胞儀 (Partec PA, Partec GmbH, Münster, Germany) 分析細胞核 DNA 螢光讀值。

葉部型態判定法：裂葉性狀係參考植物新品種保護國際聯盟 (International Union for the Protection of New Varieties of Plants; UPOV) 對大油菜葉片外觀之描述 (International Union for the Protection of New Varieties of Plants 2002)。依據 UPOV 定義，油菜生長達 23–27 d 時期為合適起始觀察時期，若部分葉身 (leaf blade) 之長度與葉柄 (leaf petiole) 連接處之長度相同且其位於較高處葉身之缺口 (notch) 之長度至少為本身長度的一半，則可被視為裂葉。其餘觀察性狀，同 Hong *et al.* (2016a) 所提及之葉緣形狀、葉片是否具蠟質、葉色及基生葉是否具裂葉等特徵。

SRAP 分子標誌判定法：待幼苗生長至四至五葉齡，選取幼嫩葉片抽取 DNA，經超微量分光光度計 (Thermo, Waltham, MA, USA) 定量後稀釋為 100 ng μL⁻¹，保存於攝氏 -20°C。為確保抽取 DNA 品質，以 *Tub 6* 基因作為 internal control 進行增幅，Polymerase chain reaction (PCR) 反應中含 0.5 μL gDNA、0.5 μL 之 Br_TU B6_f (5'-GTGGAATGGATACCGAAC-3') 及 Br_TUB6_r (5'-GTTGCGTCTTGGTATTGC-3')、0.25 μL Takara *Ex Taq* Polymerase、2.5 μL *Ex Taq* 10 × Buffer、2 μL dNTP Mixture，並加入 18.75 μL ddH₂O 使總體積達 25 μL。反應條件為 94°C 持續 5 min，再以 4°C、52°C、72°C 各 30 s 並循環 35 次，最後於 72°C 持續 7 min 進行延展。SRAP 引子序列參考 Li & Quiros (2001)，選擇引子

對 SRAP_me5f (5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3') 及 SRAP_em1r (5'-GACTGCGTACGAATT A AT-3') 進行增幅，增幅條件同 Hong *et al.* (2016a)。PCR 反應結束後，以 1.8% 之瓊脂膠體電泳分離，膠體染色後進行影像判讀。

診斷檢定 (diagnostic test)

本試驗以流式細胞儀確認「農興 80 天」及人工授粉子代之相對倍體數，並作為診斷檢定之真值，再分別進行外觀裂葉性狀及 SRAP 分子標誌之診斷檢定。檢定結果均採二分法，子代雜交者，檢定結果記錄為「有」，未雜交者記錄為「無」。檢定結果之 Sn、Sp、PPV 及 NPV 計算方式參考 Akobeng (2007)。

$$Sn = \frac{\text{檢驗為雜交者}}{\text{雜交之族群}},$$

代表一族群中，雜交者能被找出之機率。

$$Sp = \frac{\text{檢驗為未雜交者}}{\text{未雜交之族群}},$$

代表一族群中，未雜交者能被排除之機率。

$$PPV = \frac{\text{實為雜交者}}{\text{檢驗為雜交之族群}},$$

代表所有檢驗為雜交之族群中，實際為雜交者之機率。

$$NPV = \frac{\text{實未雜交者}}{\text{檢驗為未雜交之族群}},$$

代表所有檢驗為未雜交之族群中，實際為未雜交者之機率。

結果

溫室人工授粉子代倍體數判定

逢機挑選 258 株溫室人工授粉子代進行試驗，待幼苗生長至 4–5 葉齡時進行流式細胞儀分析，每次上機均以同一株「農興 80 天」之幼

嫩葉片為標準品，將其 G0/G1 期的螢光讀值固定於 50，花粉貢獻親「德雜油 18 號」之 G0/G1 螢光讀值為 108.92 ± 7.64 (圖 1)。受試的 258 個樣品中，130 個樣品 G0/G1 螢光峰值落於 51.24 ± 4.26 ，與對照品種「農興 80 天」螢光讀值重疊，判定為沒有發生雜交的 2 倍體 (AA)。另外，128 個樣品 G0/G1 螢光峰值則為 76.23 ± 4.10 ，介於「農興 80 天」與「德雜油 18 號」間，判定為有發生雜交的 3 倍體 (AAC) (圖 1)。

溫室人工授粉子代外觀性狀與 SRAP 分子標誌判定

本試驗觀察前述 258 株溫室人工授粉子代外觀性狀，經流式細胞儀判定為沒有發生雜交的 130 株子代，幼葉邊緣 (margin) 呈細小波浪狀 (undulation)，沒有絨毛 (圖 2A)，成熟葉顏色較淺呈倒湯匙狀，無明顯裂葉特徵，葉面光滑無蠟質 (wax)，與照品種「農興 80 天」一致 (圖 2D)。經流式細胞儀判定為有發生雜交的 128 株子代，幼葉與成熟葉片外觀近似花粉貢獻親「德雜油 18 號」，幼葉葉緣鋸齒明顯，具有絨毛 (圖 2B-2C)。生長週期間之成熟基生葉部分，可發現符合 UPOV 描述之裂葉性狀，葉色較深，部分雜交子代葉表面具有蠟質，初步觀察蠟質較「德雜油 18 號」少 (圖 2D-2E)。258 株子代中僅有 128 株為實際雜交成功，成功率偏低，主要因為母本並未特別進行除雄或進行蕾期授粉。另利用 SRAP 分子標誌分析 258 株溫室人工授粉子代，結果顯示經流式細胞儀判定為有發生雜交的 128 株子代，其條帶位置分布與花粉貢獻親「德雜油 18 號」一致。於 1,000 bp 處有一特異性條帶，沒有發生雜交的 130 株子代，其條帶分布則與照品種「農興 80 天」較為一致，1,000 bp 位置皆無增幅條帶 (圖 3)。

田間開放授粉子代倍體數診斷分析

挑選田間開放授粉試驗下風處第 4 列 (35 cm) 處 20 個採樣點，隨機選取 155 顆種子進行催芽，調查子代裂葉性狀及 SRAP 分子標誌，以進行子代倍體數判定。裂葉性狀與 SRAP 分子標誌判定法，皆判斷其中 139 株子

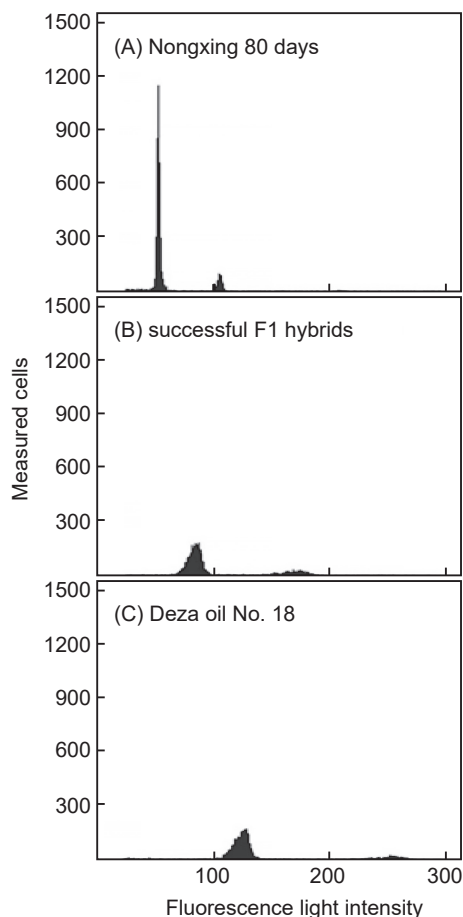


圖 1. 以流式細胞儀判斷雜交子代相對核酸含量。(A)「農興 80 天」；(B) 雜交子代；(C)「德雜油 18 號」。

Fig. 1. Flow cytometry analysis of the DNA content of (A) 'Nongxing 80 days'; (B) successful F1 hybrids; and (C) 'Deza oil No. 18'.

代為沒有發生雜交的 2 倍體，另外 16 株則為有發生雜交的 3 倍體，經流式細胞儀確認倍體數判定無誤。裂葉性狀與 SRAP 分子標誌判定法之 Sn、Sp、PPV 與 NPV 皆為 100% (表 1)，兩種判定方法的準確度與流式細胞儀倍體數判定一致，具有良好的鑑別效果。

討論

台灣目前尚未核准任何基改作物種植，但開放基改油菜種子進口作為榨油使用，運送途中種子外流而造成基改大油菜自生族群的案例已在國外被證實。為了強化國內基改作物檢監

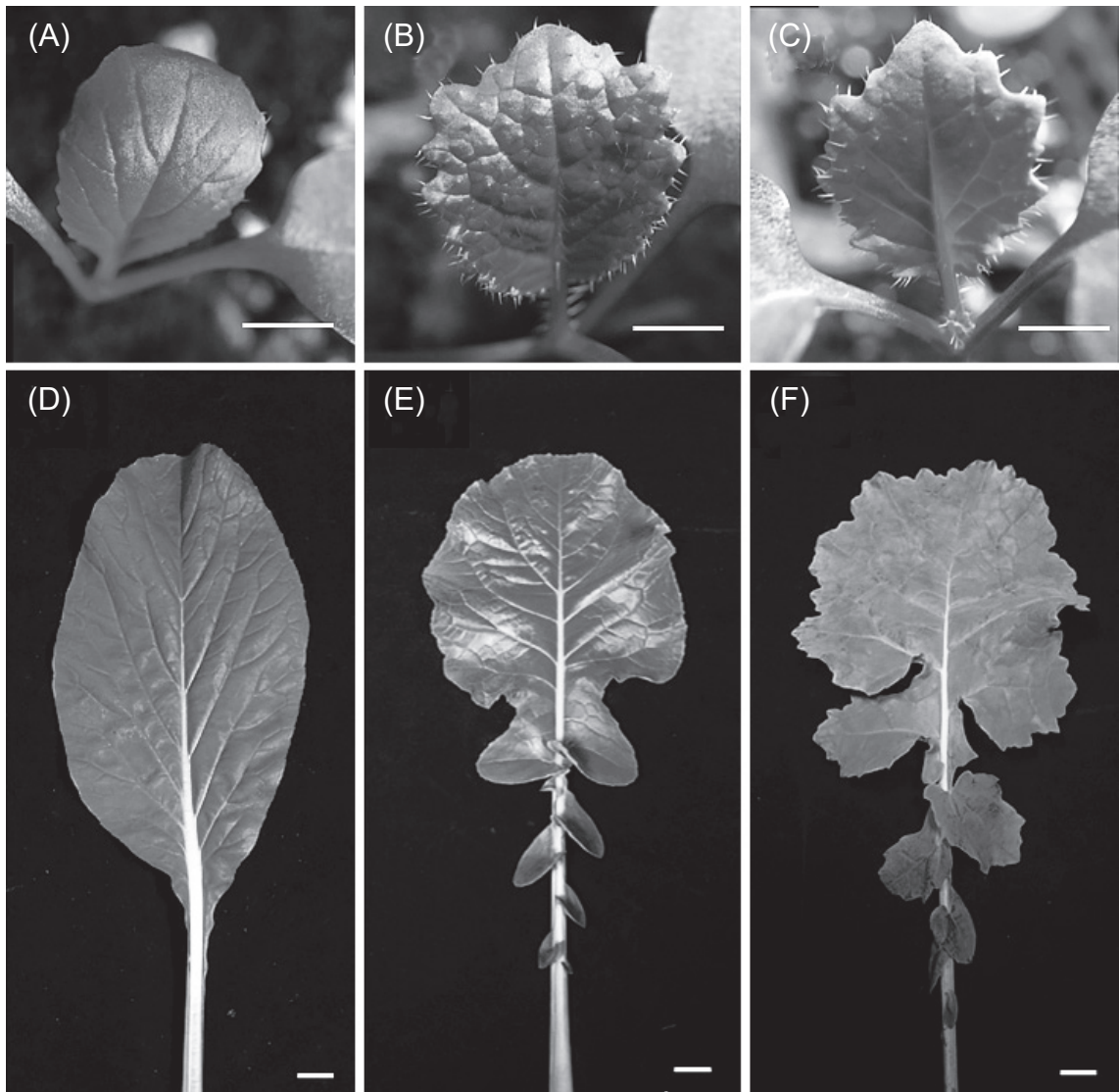


圖 2. 植株幼葉與成熟葉片外觀性狀。(A、D)「農興 80 天」。(B、E) 雜交子代。(C、F)「德雜油 18 號」。標尺 = 1 cm。

Fig. 2. The phenotypes of young leaves and mature leaves in 'Nongxing 80 days' (A, D); 'Deza oil No. 18' (B, E); and successful F_1 hybrids (C, F). Bar = 1 cm.

測效能，本研究以「德雜油 18 號」模擬基改大油菜發生流布的情況，並發展雜交子代快速鑑別法。Luijten *et al.* (2015) 利用流式細胞儀、顯微鏡觀測及 AFLP 的方式得知，*B. rapa* 與 *B. napus* 雜交後代之基因組為 AAC；「農興 80 天」基因型為 AA，作為花粉貢獻親之「德雜油 18 號」基因型為 AACC，兩者雜交子代之基因組亦應為 AAC。由圖 1 流式細胞儀倍

體數判定結果可知，「德雜油 18 號」的核酸含量約為「農興 80 天」的兩倍，雜交子代之核酸含量則介於兩親本間，與 Hong *et al.* (2016a) 之結果相符。Chiou *et al.* (2012) 曾以流式細胞儀鑑別芥藍 (*B. oleracea*) 與油菜 (*B. rapa*) 種間雜交子代，其子代的核酸含量亦介於兩親本間，顯示流式細胞儀是判斷子代相對核酸含量或倍體數的有效工具。

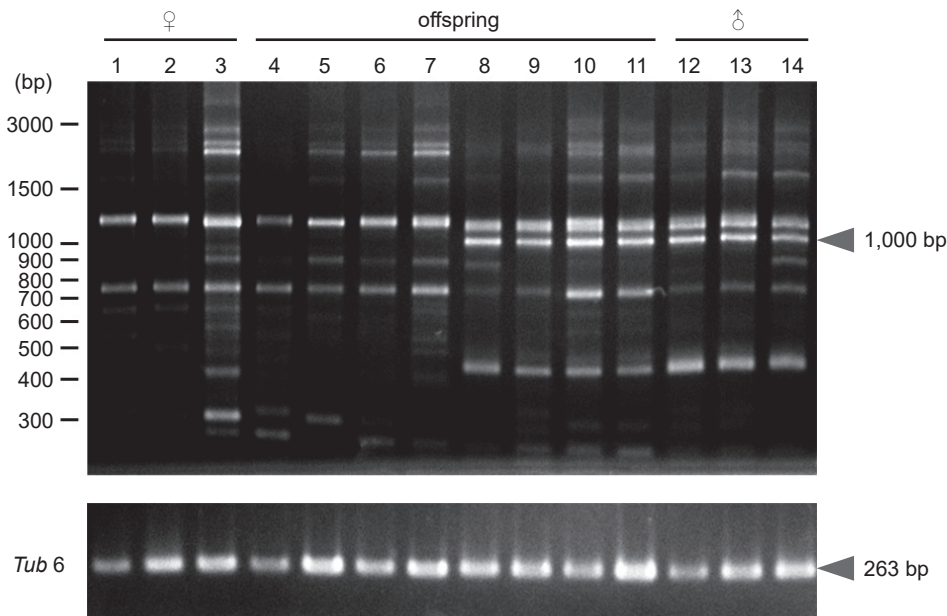


圖 3. 利用 SRAP 分子標記判定雜交子代。以 1,000 bp 之特異性條帶作為鑑別雜交子代之依據。Lanes 1-3 為母本「農興 80 天」；Lanes 4-7 為無特異性條帶之子代；Lanes 8-11 為有特異性條帶之子代；Lanes 12-14 為父本「德雜油 18 號」。

Fig. 3. Hybrids detection method by SRAP marker analysis. Specific band amplification (1,000 bp) was used as the molecular marker. Lanes 1-3: 'Nongxing 80 days' (♀); Lanes 4-7: unsuccessful F_1 hybrids; Lanes 8-11: successful F_1 hybrids; and Lanes 12-14: 'Deza oil No. 18' (♂).

表 1. 評估子代外觀裂葉性狀 (lobe) 及 SRAP 分子標記結果。檢定結果以 Sn、Sp、PPV 及 NPV 做為評估參數。

Table 1. Determination of sensitivity (Sn), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) between the two different diagnostic tests.

Item	SRAP	Lobe
Sn	100%	100%
Sp	100%	100%
PPV	100%	100%
NPV	100%	100%

流式細胞儀判定方法相當快速、準確，但需要購置昂貴的儀器與耗材，不適合作為隨機抽樣篩檢或大量鑑別用途。本研究嘗試以外觀性狀或 SRAP 分子標記判定法判斷雜交子代，作為流式細胞儀判定法的替代方案。本研究發現，台灣冬季裡作常見的「農興 80 天」，幼葉葉緣呈波浪狀、不具絨毛，基生葉無裂葉特徵。「德雜油 18 號」幼葉邊緣呈鋸齒狀，基生葉亦有明顯裂葉性狀，葉色深且有蠟質分布，雜交子代之外觀性狀與父本「德雜

油 18 號」較為接近，幼葉邊緣有鋸齒缺刻，生長期間成熟基生葉亦展現類似大油菜的裂葉特徵。惟雜交子代葉色稍淡，部分子代葉表面具有蠟質，但相對較少於「德雜油 18 號」（圖 2）。油菜基生葉裂葉性狀的調控機制尚未釐清，基因層次的研究仍須進行，但此一性狀容易判斷且具有相當的辨識度，適合作為鑑別雜交的型態標誌 (Ni *et al.* 2015)。而葉面蠟質的部分，雜交子代與「德雜油 18 號」成熟葉均帶有蠟質，葉表面的蠟質是由極長鏈烴 (very

long-chain hydrocarbon compounds; VLCHC) 作為主要成分。*B. oleracea* (CC 基因型) 葉表面具有蠟質分布, 已證實由多基因調控 (Laila *et al.* 2016), 推測蠟質形成相關調控基因應座落於 C 基因組有關。本研究使用「德雜油 18 號」基因組為 AACC, 「農興 80 天」基因型為 AA, 雖觀察部分雜交子代 (AAC) 葉表亦具有蠟質, 但葉表面蠟質容易因為葉片間摩擦、澆水、老化等原因而脫落, 恐無法有效的作為外觀性狀判定用途。另於 SRAP 分析部分, 利用 SRAP_me5f 與 SRAP_em1r 引子對所增幅 1,000 bp 之特異性條帶, 可有效鑑別「農興 80 天」、「德雜油 18 號」與雜交子代, 雖同品系個體間可能存在些微遺傳組成差異, 如「農興 80 天」為開放授粉品系。由於本研究僅使用特定位置之條帶, 在「德雜油 18 號」與雜交子代具有穩定再現性, 又診斷檢定 Sp、Sn、PPV 及 NPV 幾可達 100%, 說明本試驗使用品系內個體間遺傳組成的差異並不影響「農興 80 天」、「德雜油 18 號」與雜交子代之判讀。另外, 「德雜油 18 號」與雜交子代皆帶有 C 基因組 DNA, 合理推測 1,000 bp 之特異性條帶應座落於 C 基因組, 然其是否具有特定基因功能, 仍需進一步研究探討。

本篇研究期望能為找出可鑑別「農興 80 天」、「德雜油 18 號」及其雜交子代的差異之方式, 當未來我國發現可能為 *B. rapa* 與基改 *B. napus* 之雜交後代時, 期望能提供準確、快速且簡便的判別方式, 易於田間實地作業使用, 除判別兩者是否發生雜交外, 亦能監測田間基因流佈之情形。本研究中發現, 當雜交子完整生長期間之基生葉, 皆可觀察到明顯的裂葉性狀。PCR 技術方面, 則可利用 SRAP 之 1,000 bp 條帶做為鑑別標誌。研究中均以有效的抽樣數目確立基因型與兩種檢定方法間之關係, 證明以兩種檢定方式均可得知是否為雜交子代。然而若以田間大規模進行觀測、篩檢情況而言, 考慮時間、人力以及經費等成本支出, 直接以裂葉性狀判別植株是否發生雜交是較為容易且簡便之方式, 倘若對目標植株仍有疑慮時, 則可進一步利用流式細胞儀或 SRAP 等檢定方式加以確認。本研究亦希望未來能利

用 SRAP 及裂葉性狀判定等兩種檢定方式, 並能實際應用於檢測各種不同大小油菜之雜交後代, 成為準確又簡便的檢定方式。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 106 農科-6.3.2-農-C1 計畫經費支持, 謹致謝忱。

引用文獻

- Akobeng, A. K. 2007. Understanding diagnostic tests 1: Sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatr.* 96:338–341.
- Aono, M., S. Wakiyama, M. Nagatsu, Y. Kaneko, T. Nishizawa, N. Nakajima, M. Tamaoki, A. Kubo, and H. Saji. 2011. Seeds of a possible natural hybrid between herbicide-resistant *Brassica napus* and *Brassica rapa* detected on a riverbank in Japan. *GM Crops* 2:201–210.
- Beckie, H. J., K. N. Harker, A. Légère, M. J. Morrison, G. Séguin-Swartz, and K. C. Falk. 2011. GM canola: The Canadian experience. *Farm Pol. J.* 8:43–49.
- Belter, A. 2016. Long-term monitoring of field trial sites with genetically modified oilseed rape (*Brassica napus* L.) in Saxony-Anhalt, Germany. Fifteen years persistence to date but no spatial dispersion. *Genes* 7:3.
- Busi, R. and S. B. Powles. 2016. Transgenic glyphosate-resistant canola (*Brassica napus*) can persist outside agricultural fields in Australia. *Agric. Ecosyst. Environ.* 220:28–34.
- 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 Chinese with English abstract)
- Del Vecchio, A. J. 1996. High laurate canola: How Calgene's program began, where it's headed. *Inform.* 7:230–242.
- Hong, H., T. K. Lin, Y. K. Du, and B. J. Kuo. 2016a. Identifying the F1 hybrids of the simulated GM *Brassica napus* and *Brassica rapa*. *Crop Environ. Bioinform.* 13:53–66. (in Chinese with English abstract)
- Hong, H., T. K. Lin, Y. K. Du, and B. J. Kuo. 2016b. Using SRAP marker to identify the difference among *Brassica rapa*, *Brassica napus*, and F1 Hybrids. *Crop Environ. Bioinform.* 13:208–222. (in Chinese with English abstract)

- International Union for the Protection of New Varieties of Plants. 2002. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Rape seed (*Brassica napus* L. *oleifera*). UPOV, Geneva, Switzerland. https://www.upov.int/en/publications/tg-rom/tg036/tg_36_6_corr.pdf (visit on 2/1/2018)
- Jorgensen, R. B. and B. Andersen. 1994. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (Brassicaceae): A risk of growing genetically modified oilseed rape. *Amer. J. Bot.* 81:1620–1626.
- Laila, R., A. H. K. Robin, K. Yang, J. I. Park, M. C. Suh, J. Kim, and I. S. Nou. 2016. Developmental and genotypic variation in leaf wax content and composition, and in expression of wax biosynthetic genes in *brassica oleracea* var. *capitata*. *Front. Plant Sci.* 7:1972.
- Li, G. and C. F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 103:455–461.
- Luijten, S. H., N. S. Schidlo, P. G. Meirmans, and T. J. de Jong. 2015. Hybridisation and introgression between *Brassica napus* and *B. rapa* in the Netherlands. *Plant Biol.* 17:262–267.
- Maenz, D. D., C. M. Engele-Schaan, R. W. Newkirk, and H. L. Classen. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 81:177–192.
- Nagaharu, U. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *J. Jpn. bot.* 7:389–452. (in Japanese)
- Ni, X., J. Huang, B. Ali, W. Zhou, and J. Zhao. 2015. Genetic analysis and fine mapping of the *LOBED-LEAF 1* (*BnLL1*) gene in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica* 204:29–38.
- Nicolia, A., A. Manzo, F. Veronesi, and D. Rosellini. 2014. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Crit. Rev. Biotechnol.* 34:77–88.
- Warwick, S. I., H. J. Beckie, and E. Small. 1999. Transgenic crops: New weed problems for Canada? *Phytoprotection* 80:71–84.

The Accurate Detection Methods for the Adventitious Presence (AP) of Hybrids of *Brassica napus* and *Brassica rapa* (campestris) L. during Winter Cropping in Taiwan

Yuan-Kai Tu¹, Han-Wei Chen¹, Yi-Chu Hung², Yen-Chun Lin³, and Bo-Jein Kuo^{4,*}

Abstract

Tu, Y. K., H. W. Chen, Y. C. Hung, Y. C. Lin, and B. J. Kuo. 2019. The accurate detection methods for the adventitious presence (AP) of hybrids of *Brassica napus* and *Brassica rapa* (campestris) L. during winter cropping in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(1):69–77.

Brassica oilseed is a member of Brassicaceae and is one of the major oil crops along with *Glycine max*, *Arachis hypogaea* and *Helianthus annuus* in the world. Nowadays, many genetically modified (GM) commercialized oilseeds have been bred in order to reduce the use of pesticide and herbicide. However, GM crops may cause the gene flow problem and result in hybridization with wild species or relative species. Therefore, the GM oilseed may cause the contamination of non-GM relatives. As a result, it is necessary to establish a fast and reliable detection method to efficiently discriminate F₁ hybrid derived from crossing GM with non-GM oilseed. In this study, *Brassica napus* from Mainland China called 'Deza oil No.18' was used as donor parent and the winter cropping *Brassica rapa* in Taiwan named 'Nongxing 80 days' was used as recipient parent to produce the F₁ hybrids. In this study, we tested the feasibility of detection methods, including flow cytometry (FCM), lobed-leaf trait investigation and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker analysis. Firstly, the aforesaid detection methods were used to examine the F₁ hybrids derived from crossing by artificial pollination. Then, we verified the detection methods using F₁ hybrids obtained from natural crossing in the field. The results showed that regardless of the F₁ hybrid collected from artificial-crossing or natural-crossing, lobed-leaf investigation and SRAP marker analysis were able to efficiently and robustly identify the F₁ hybrids. Besides, to some extent, we also found that F₁ hybrids are very similar in morphology to their donor parent. Values of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were 100%. The lobed-leaf discrimination and SRAP marker analysis methods could be used for correctly detecting the adventitious presence (AP) of hybrids derived from crossing *B. napus* and *B. rapa* in Taiwan.

Key words: *Brassica napus*, *Brassica rapa*, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), Lobed-leaf trait, Interspecific hybridization.

Received: May 29, 2018; Accepted: October 15, 2018.

* Corresponding author, e-mail: bjkuo@nchu.edu.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistant, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.