

異戊烯轉移酶 (*ipt*) 基因轉殖青花菜花粉活性及其相近菜種雜交之研究¹

丁柏瑜² 張 翔³ 高于雯³ 呂秀英⁴ 陳榮芳⁵ 吳明哲³ 陳烈夫^{3,6}

摘 要

丁柏瑜、張翔、高于雯、呂秀英、陳榮芳、吳明哲、陳烈夫。2010。異戊烯轉移酶 (*ipt*) 基因轉殖青花菜花粉活性及其相近菜種雜交之研究。台灣農業研究 59:261–274。

基因流佈 (gene flow) 是基因轉殖作物生態風險評估中一個重要指標，而花粉活性與雜交稔實率是影響作物異交潛力的主要因子。本試驗利用異戊烯轉移酶 (isopentenyltransferase, *ipt*) 基因轉殖青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 103 品系與非轉殖青花菜對照組 (104 品系及品種‘綠王’)，和另外 5 種相近菜種 [白花芥藍 (*B. oleracea* var. *alboglabra*)-‘富悅’、黃花芥藍 (*B. oleracea* var. *alboglabra*)-‘白格林’、花椰菜 (*B. oleracea* var. *botrytis*)-‘麗雪’、小白菜 (*B. rapa* var. *chinensis*)、小油菜 (*B. rapa* var. *japonica*)] 等材料，透過分析花粉活性與雜交率對青花菜異交潛力進行評估，提供基因轉殖青花菜商業栽培需隔離與建立共存之參考。結果顯示在一般栽培條件下，於 2007–2008 兩年間基因轉殖青花菜與其他相近菜種之花期重疊日數分別為 3–28 天及 8–44 天。以兩種染色法及離體發芽法分析青花菜及其他各品種 (系) 間之花粉活性。由螢光染色法 (fluorescent diacetate, FDA) 檢測，各材料間差異未達顯著水準 ($P > 0.05$)；以氯化三苯基四氮唑染色法 (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 及離體發芽法 (*in vitro* germination) 檢測轉殖青花菜與其他材料以及它們的 F_1 雜交後代之花粉活性有顯著差異 ($P < 0.05$)，並顯示轉殖品系及其雜交後代仍具有相當之雜交能力。將基因轉殖青花菜 103 品系與其他 5 種相近菜種進行雜交、蜜蜂授粉及田間自然雜交，分別得到種內稔實率變幅為 86.0–100%、1.1–42.5%及 0–9.0%。與小白菜及小油菜沒有雜交現象。本研究顯示基因轉殖異戊烯轉移酶對青花菜品種異交潛力的改變甚低 (6.4–9.0%)，仍存在著基因流佈的可能性風險。

關鍵詞：芥藍、基因流佈、雜交率、花期重疊、轉基因青花菜。

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2439 號。接受日期：99 年 12 月 1 日。
 2. 朝陽科技大學生化科技研究所博士班。台灣 台中市。
 3. 本所生物技術組聘用研究員、研究助理、研究員兼組長、助理研究員。台灣 台中市。
 4. 本所研究員兼副所長。台灣 台中市。
 5. 中央研究院植物暨微生物學研究所研究員兼副所長。台灣 台北市。
 6. 通訊作者，電子郵件：leevchan@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

前 言

自 1983 年首例基因轉殖菸草研發成功後，至 1996 年基因轉殖大豆、玉米、油菜及番茄相繼開始大規模田間生產。之後，世界上許多國家也都開始對基因轉殖作物進行研究及商業化種植，使得全球基因轉殖作物栽培面積快速擴增。據國際農業生物技術諮詢及服務機構 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA) 之報告，轉殖作物栽培面積於 2008 年已達 1 億 1,430 萬公頃，並涵蓋 23 個國家，12 年間即增加近 67 倍，預估未來全球生物技術作物面積將持續增長 (James 2009)。各界對於基因轉殖作物及其產物在人畜食用安全性、基因污染及其他層面的生態環境安全問題仍存有疑慮 (Ramessar *et al.* 2007)，亟須在推廣基因轉殖作物前進行相關的科學評估與研究。讓公眾瞭解基因轉殖作物在生態環境中可能造成的風險，並使其降低至最小或甚至接近零風險，儘可能防止任何負面影響的發生 (Chandler & Dunwell 2008)。

基因流佈 (gene flow) 是基因轉殖作物生態風險評估中一個重要指標 (Jørgensen *et al.* 1999; Haygood *et al.* 2003; Andow & Zwahlen 2006)。基因流佈可以花粉、種子和無性繁殖體等形式進行傳播 (Ellstrand *et al.* 1999)。對於顯花植物 (phanerogams) 而言，花粉散佈 (pollen dispersal) 是最主要的傳播形式 (Scheffler *et al.* 1993; Paul *et al.* 1995; Lefol *et al.* 1996a)。植物的花粉是有性生殖過程中的雄性供體，花粉釋放後的運動走向及散佈範圍直接影響植物的繁殖系統及遺傳結構，而測定花粉散佈的範圍是確定有效居群大小的重要基礎 (Mikkelsen *et al.* 1996)。基因流佈的可能性與發生程度不僅與花粉傳播距離有關，而且與基因轉殖作物包括花粉、交配、種子、植株等繁殖和生長發育性狀的生態適合度 (fitness) 改變也有極大的關係

(Mikkelsen *et al.* 1996; Hokanson *et al.* 1997; Schular *et al.* 1999; Barton & Dracup 2000; Pertl *et al.* 2002)。但發生基因流佈也不是件容易的事，因其會受到一系列因素的影響及限制，必須是在適當的時間、地點、場合，遇到適當的對象，即基因轉殖作物和相近菜種必須生長在同一個地方，在同一時間段內開花，還要有適當的花粉傳播媒介 (風媒或蟲媒)，而且它們之間還必須是有性親和的。故此，基因能否透過花粉流佈至相近菜種，必須具備 3 個基本條件：(一) 在空間上，基因轉殖作物與相近菜種分佈重疊或相鄰生長；(二) 在時間上，開花期重疊且花期須相遇，包括 1 年之內的開花時段及 1 天之內的開花授粉時間相吻合；(三) 在生物學上，基因轉殖作物與相近菜種需具有一定的雜交親和性，其雜交後代能正常繁殖下一代，並能維持整個族群的穩定 (Crawley *et al.* 2001; Simard & Legere 2004; Kuparinen *et al.* 2007)。基因轉殖作物花粉的數量、生活力、擴散形式及傳播距離是基因流佈研究的主要內容。而其中花粉發芽率是衡量花粉生活力狀況的主要指標，同時花粉管長度亦在一定程度上反映出花粉的生活力狀況。花粉離體發芽一般在培養基上進行，常用的培養基成分是糖類及微量元素 (硼酸)。其濃度一般為蔗糖 10–20%，硼酸 0.001–0.005%，pH 值 5.8–6.5，蔗糖的作用是提供合適的滲透壓和花粉管形成所需的能量，硼酸中的硼元素為微量元素，能促進花粉管的發芽。不同植物花粉發芽所需要的培養基種類和濃度不同，二細胞型花粉較易發芽，一般在基本培養基上培養即可，而三細胞型花粉如菊花、水稻、甘藍等較難發芽，要在基本培養基的基礎上添加其他促進花粉發芽的元素，如 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 MgSO_4 、 KH_2PO_3 、 VB_1 (維生素 B_1)、PEG 等 (Chiang 1974; Shivanna *et al.* 1991; Stone *et al.* 1995; Dafni & Firmage 2000)，亦有以葡萄糖液作為培養基，花粉發芽效果也較

好，因葡萄糖是真正的小分子物質，較蔗糖易被細胞吸收之研究 (Rodriguez-Riano & Dafni 2000)。有關轉殖基因的插入是否會引起性狀的變異，藉由近年來水稻 (*Oryza sativa* L.) 的花粉離體發芽和雜交稔實研究結果，發現轉殖基因插入對水稻品種花粉活性無顯著影響，轉殖水稻各雜交組合稔實率的總變幅並沒有超出非基因轉殖水稻的變幅範圍，顯示轉殖基因的插入對水稻品種異交潛力之影響甚微 (Chen *et al.* 2004; Song *et al.* 2004; Lu & Snow 2005; Wei *et al.* 2005)。亦有研究報告指出水稻不同品種之間的基因流佈頻率很低，在少於 1 m 距離的情況下，抗蟲基因水稻中的外源基因流佈到非基因轉殖水稻親本品種的頻率均在 0.9% 以下，倘設立 5–10 m 的空間隔離，其頻率會迅速降至 0.01–0.001% (Rong *et al.* 2007)。

青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 屬異花授粉的十字花科作物，與其相近菜種有一定的雜交親和力 (Prakash & Hinata 1980; Roy 1980; Scheffler & Dale 1994)。試驗顯示基因轉殖甘藍型油菜 (*Brassica napus* var. *oleifera* Metzger) 與其相近菜種間，包括同屬之蕪菁 (*Brassica rapa* L.) 及異屬的野生蘿蔔 (*Raphanus raphanistrum* L.)、野芥 (*Sinapis arvensis* L.)、白芥 (*Sinapis alba* L.) 等，存在著外源轉殖基因流佈的可能 (Inomata 1988; Bing *et al.* 1996; Sridevi & Sarla 1996; Seiki *et al.* 1998; Hansen *et al.* 2001; FitzJohn *et al.* 2007; Li *et al.* 2008)。以轉殖 *bar* 基因油菜與野芥間的雜交授粉特性進行研究，結果顯示花粉發芽率在轉殖與非轉殖油菜間無顯著差異，轉殖油菜與野芥雜交親和性亦較弱，因此在自然條件下很難發生授粉而造成外源基因的流佈 (Lefol *et al.* 1996a, b)。而利用其 F_1 雜交種再與野芥回交之後裔的田間試驗，卻發現可產生較高活性的花粉 (Mikkelsen *et al.* 1996)。以轉殖油菜和野生蘿蔔之 F_1 雜交種再與野生蘿蔔回交，並調查至 F_4

世代的可稔性，發現基因轉殖的傳遞頻率在雜交後的幾個世代中有逐漸降低的趨勢 (Cherve *et al.* 1997, 2000)。在英國採集不同生態條件下生長的 102 種野芥與 6 個不同遺傳背景的甘藍型油菜 (*Brassica napus* L.)，在溫室中以野芥作為母本，不同甘藍型油菜作為父本，進行人工授粉後檢測其雜交親和性，發現若不借助胚拯救 (embryo rescue) 和胚珠培養 (ovule culture) 的方法，得不到後代種子 (Moyes *et al.* 2002)；但以甘藍型油菜作為母本，野芥作為父本時的反交試驗 (reciprocal cross)，才能得到雜交後代，即使如此，成功雜交率在不同組合間仍甚低，只有 0–0.0049% (Ayotte *et al.* 1987; Sarla & Raut 1988; Sharma *et al.* 1996; Sarmah & Sarla 1998; Stewart 2002)。本試驗之研究目的是藉由花粉發芽與人工雜交、蜜蜂授粉、田間自然雜交等不同花粉傳播途徑，探討轉殖 *ipt* 基因青花菜與其受體品種及相近菜種在花粉活性與雜交稔實性狀的差異性，以分析插入 *ipt* 基因對青花菜異交潛力的影響，據此評估該基因轉殖青花菜之商業栽培利用或採種檢查等物理性隔離範圍與共存可行性。

材料與方法

試驗材料

本試驗所採用之青花菜材料是以農桿菌法 (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation) 將細胞分裂激素合成基因 [cytokinin synthase (isopentenyl transferase gene, *ipt* gene)] 與和老化有關基因 (senescence associated genes, SAGs) 啟動子基因導入青花菜商業品種‘綠王’植株中。構築 *ipt* 基因所使用的質體為 pSG766A，包含 SAG₁₃₋₁ 啟動子引導 *ipt* 基因與 NOS 啟動調控 *NPTII* 植物篩選基因。經由抗生素 (kanamycin) 篩選、聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 與南方氏雜交分析 (Southern blotting) 確定 *ipt* 基因已成功被

導入青花菜基因組中，且證實部分轉殖系在延遲採收葉片及花球之黃化上具有明顯效果 (Chen *et al.* 2001; Chan *et al.* 2009)。

本試驗材料係以該轉殖 *ipt* 基因青花菜自交五代 (R5) 的選拔，自分離後代中選出一個園藝性狀優良且具延遲花球黃化之中生轉殖青花菜自交系 (103 品系) 做為花粉貢獻親、非轉殖青花菜自交系 (104 品系對照組) 與品種‘綠王’及其他 5 個相近菜種 [白花芥藍 (*B. oleracea* var. *alboglabra*)-‘富悅’、黃花芥藍 (*B. oleracea* var. *alboglabra*)-‘白格林’、花椰菜 (*B. oleracea* var. *botrytis*)-‘麗雪’、小白菜 (*B. rapa* var. *chinensis*) 及小油菜 (*B. rapa* var. *japonica*)]，共 7 種作為花粉接受親。其中小白菜及小油菜與青花菜為同屬不同種之試驗材料，以檢測青花菜品系間、與其他變種間及種間之雜交能力。

田間試驗

試驗於 2007–2008 年在農業試驗所隔離設施內進行。採秋作種植，即於每年 11 月初在隔

離溫室育苗，種子先播種於 48 格之穴盤，經培育 3 週，本葉達 4 片葉時，定植於隔離試驗田。田間配置採逢機完全區集設計 (randomized complete block design, RCBD)，將基因轉殖青花菜自交系 (103 品系) 種植於田區中間，共 600 株。四周設置成 4 區集，各區集逢機種植 2 種非轉殖青花菜及 5 種相近菜種，每小區畦長 10 m 及寬 1.5 m (含畦溝寬度)，株距 45 cm、行距 60 cm，共種植 15 株 (圖 1)。試驗期間記錄各參試材料的始花期及終花期，並計算各品種 (系) 間之花期重疊日數。同時，青花菜在田間任其開放授粉，於受體材料成熟後，按品種 (系) 收穫小區之種子，於隔離溫室培育成苗後，再進行後續之葉片材料 PCR 檢測工作。

溫室基因轉殖青花菜與其相近菜種雜交

隔離溫室所使用的試驗材料與前述之田間試驗相同，每一品種 (系) 種植 4 株，於隔離溫室育苗，種子先播種於穴盤 (4.5 cm × 4.5 cm × 5 cm)，經培育 3 週當本葉達 4 片葉時，移植至

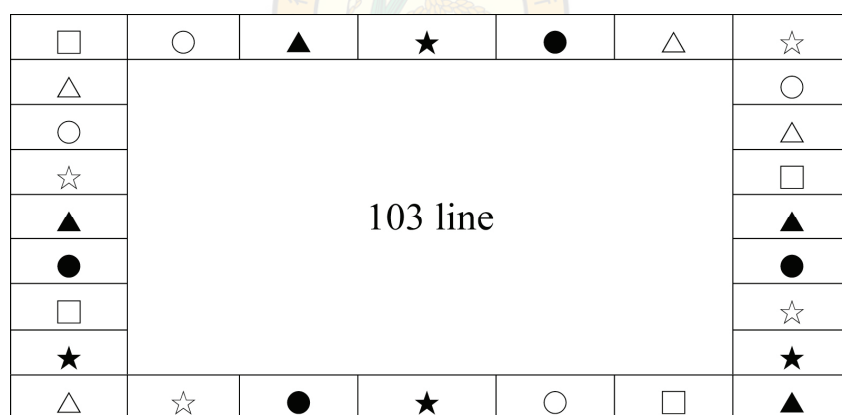


圖 1. 轉殖 *ipt* 基因青花菜 (103 品系) 及其相關菜種在農業試驗所隔離田之種植配置示意圖。□：花椰菜-‘麗雪’；○：白花芥藍-‘富悅’；●：黃花芥藍-‘白格林’；△：小油菜-‘小油菜’；▲：白菜-‘小白菜’；☆：青花菜-‘綠王’；★：青花菜-104 品系 (CK)。

Fig. 1. Field layout for transgenic *ipt* broccoli (103 line) and its close relatives planted in isolated plot of Taiwan Agricultural Research Institute. □, *Brassica oleracea* var. *botrytis*-‘Li Syue’; ○, *Brassica oleracea* var. *alboglabra*-‘Fu Yue’; ●, *Brassica oleracea* var. *alboglabra*-‘Bai Ge Lin’; △, *Brassica rapa*-‘Rapa’; ▲, *Brassica rapa* var. *chinensis*-‘Pakchoi’; ☆, *Brassica oleracea* var. *Italica*-‘Green King’; ★, *Brassica oleracea* var. *Italica*-104 line (CK).

盆栽 (26 cm × 29 cm)。盆內栽培介質混合複合肥料一號 (台灣肥料股份有限公司出品)，其施用量為 N : P₂O₅ : K₂O = 270 : 150 : 200 kg/ha，分 4 次施用，每隔 20 天施用 1 次，其間並送至可調控溫度之人工光源室進行為期 1 個月的春化處理 (日/夜溫為 20/10°C)，待至抽苔時再分別移入隔離溫室進行人工授粉或進行蜜蜂授粉試驗。授粉 1 星期後，所收穫的種子，於隔離溫室培育成苗後，再進行後續之葉片材料 PCR 檢測工作。

基因轉殖植體檢測分析

所收穫之雜交後代種子數量，若每株 1000 粒以下時取一半種子，1000 粒以上時取 1/3 量種子 (95% 信賴水準下最大取樣誤差為 ± 1.9%) 進行播種。播種培育後，利用 PCR 對幼苗葉片進行檢測 *ipt* 基因是否存在。依 Chen *et al.* (2001) 之 PCR 分析方法，預期 PCR 擴增 *ipt* 之片段大小為 750 bp，據此評估基因轉殖青花菜與其他菜種雜交之後代是否帶有 *ipt* 基因片段。青花菜小苗於定植 3 週後，取 0.5 g 之葉片，依據 Plant Genomic DNA Purification Kit Protocol (Gene Marker, Taiwan) 抽取總 DNA，以確定具轉殖基因之轉殖植株。

聚合酶連鎖反應：所檢測之 *ipt* 基因正向引子 5'-ACCCATGGACCTGCATCTA-3' 與逆向引子 5'-GGAGCTCAGGGCTGGCGTAACC-3' 進行聚合酶連鎖反應，取 1 μg 植物基因組 DNA 作為模版，對照組取 100 ng 質體 DNA 作為模版，加入 200 μM dATP、dTTP、dCTP、dGTP，1× PCR buffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) gelatin]，1.5 units Dynazyme Taq DNA polymerase，引子各 1 μM，總反應體積為 25 μL。反應條件如下：以 94°C 加熱 2 分鐘，再經 25 個循環之 94°C 處理 1 分鐘，60°C 處理 1 分鐘，及再升高到 72°C 3 分鐘的條件，最後再於 72°C 處理 7 分鐘使反應完全後，預期 PCR 擴增 *ipt* 之片段大小為 750 bp。

取出樣品至於冰上備用，每個樣品各取 10 μL PCR 產物至 1.2% 之瓊脂膠體 (agarose gel)，以電壓 110V 於 0.5× TBE (Tris-Borate-EDTA buffer) 溶液中進行電泳，分析其 DNA 片段。

雜交頻率計算：雜交頻率 (%) = (含轉殖基因株數/總檢測株數) × 100。

花粉活性測定

本試驗各品種 (系) 每一重複至少觀察 1000 粒花粉粒，花粉活性測定同時採用 3 種不同方法：TTC 染色測定法 (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) (Norton 1966)、螢光染色法 (fluorescent diacetate, FDA) (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1970) 及花粉離體發芽測定法 (*in vitro* germination) (Seiki *et al.* 1998)。以染色花粉或發芽花粉數佔觀察花粉總數的比率，表示花粉活性的高低。3 種花粉活性測定之操作方法分述如下：

TTC 法：依據 Norton (1966) 之方法，先配置磷酸緩衝液。以 Na₂HPO₄·2H₂O 83.2 mg 加上 KH₂PO₄ 27.3 mg，加 2 次水定量至 100 mL，並調整 pH 值至 7.1。染劑溶液配置以 35 mg 的氯化三苯基四氮唑 (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 加入 100 mL 磷酸緩衝液，取 20 μL 染劑滴入每一花藥花粉，30°C 培養 20 分鐘。此方法的原理是活細胞內脫氫，活性酵素能將無色的 TTC 還原成不溶於水的紅色沉澱之化合物 formazan，而 formazan 不能滲出細胞外，因此死亡細胞中仍維持為無色，依據染色的分佈部位及顏色深淺，即可判定有活力的花粉變成紅色，無活力的花粉不染色。

FDA 法：依據 Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1970) 之方法，以雙醋酸螢光素 (fluorescent diacetate, FDA) 測試細胞是否具有活性。首先配製 0.5% (W/V) 之雙醋酸螢光素溶於丙酮中備用，然後採摘每個花藥加入 20 μL 之 16% 蔗糖溶液中，再加上 10 μL 雙醋酸螢光素，混合後滴在載玻片上，蓋上蓋玻片，於螢光顯微

鏡下進行觀察，即可判定具有活性花粉細胞發出綠色螢光，無活性之花粉細胞則無螢光，可統計出花粉細胞存活率。

花粉離體發芽測定法：依 Seiki *et al.* (1998) 液體培養基配方加以修正，觀察基因轉殖青花菜與其受體品種及相近菜種花粉的離體發芽情形。培養基之發芽液配方為 H_3BO_3 80 ppm、 $CaCl_2$ 80 ppm、BSA 0.4%及 Sucrose 16%，以 H_2O 定量至 100 mL。在青花菜花蕾開裂前，以鑷子取出花藥，放入載玻片上加入 10 μ L 液體培養基，夾破花藥釋放出花粉粒後，充分將花粉粒分佈均勻，蓋上蓋玻片，於 25°C 培養 2 小時，在顯微鏡下計算花粉發芽數目，以花粉管長度大於 1/2 花粉粒直徑作為花粉發芽之判定標準。

統計分析

基因轉殖青花菜與其花粉接受親（非基因轉殖青花菜及相近菜種）間之花粉活性測定及雜交頻度的差異顯著性測驗，係利用 SAS 9.1 統計分析軟體 (SAS Institute, Inc. 2004) 進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA) 及最小顯著差異性 (least significant difference, LSD) 測驗。

表 1. 轉殖 *ipt* 基因青花菜 (103 品系) 及其相關菜種之花期重疊性 (2007 及 2008 年)

Table 1. Overlapped of flowering periods for transgenic *ipt* broccoli (103 line) and its close relatives (in 2007 and 2008)

Variety (line)	Flowering period (month/day)		No. flowering days		Overlapped flowering days	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -103 line	1/22-2/18	1/05-2/17	28	44	—	—
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -‘Green King’	1/18-2/28	12/29-2/17	42	51	28	44
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> -‘Fu Yue’	2/02-2/04	1/19-1/26	3	8	3	8
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> -‘Bai Ge Lin’	1/24-2/23	1/06-1/30	31	25	28	25
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> -‘Li Syue’	1/31-2/18	2/07-2/16	19	10	19	10
<i>Brassica rapa</i> -‘Edible rape’	1/15-2/10	1/13-2/01	27	20	27	20
<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i> -‘Pakchoi’	1/15-2/22	1/29-2/18	39	21	28	21
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -104 line (CK)	1/15-2/18	1/05-2/17	35	44	28	44

結 果

基因轉殖青花菜與相近菜種之花期重疊觀察

基因轉殖青花菜透過花粉將基因流佈至相近菜種，花期重疊是必要基本條件。在正常栽培條件下青花菜及其他菜種，雖然開花期有早晚之分，但由於花期較長，作物間具有不同程度的開花重疊期，2007 年間之重疊期可達 3–28 天，以白花芥藍‘富悅’3 天之花期重疊天數最短，‘綠王’、黃花芥藍‘白格林’、小白菜及 104 品系之花期重疊 28 天最長；在 2008 年間花期重疊亦達 8–44 天，以白花芥藍‘富悅’8 天之花期重疊天數最短，‘綠王’及 104 品系之花期重疊 44 天最長 (表 1)。

花粉活性測定

以兩種染色法 (TTC 及 FDA) 及離體發芽法分析青花菜及各供試品種 (系) 間之花粉活性。檢測結果顯示，以 FDA 法檢測各品種 (系) 間差異均未達顯著水準 ($P > 0.05$)；TTC 法檢測各品種 (系) 間有顯著差異存在 ($P < 0.05$)，以小白菜及小油菜各 79.9%及 78.2%花粉活性為最高，‘麗雪’、‘富悅’、‘白格林’、103

品系、104 品系 (CK) 次之，介於 56.8–72.6% 之間，而以‘綠王’49.2%為最低。103 品系為 62.6%，104 品系 (CK) 為 56.8%，顯示轉殖品系花粉具有相當之活性。離體發芽法檢測則以油菜 34.1%最高，小白菜 20.9%次之，‘富悅’、‘綠王’、‘麗雪’、103 品系則介於 6.8–12.7%間，而以 104 品系 (CK) 之‘白格林’最低 (4.4–5.8%)。103 品系之花粉活性 7.3%、104 品系 (CK) 為 5.8% (表 2)，亦顯示出轉殖品系花粉仍具有活性。

利用 103 品系為花粉貢獻親，其 F₁ 雜交後代以 FDA 法檢測，結果顯示母本為 103 品系、‘綠王’、花椰菜‘麗雪’、104 品系 (CK) 之 F₁ 後代的花粉活性較母本為白花芥藍‘富悅’及黃花芥藍‘白格林’之 F₁ 後代高且達顯著差異水準 (P < 0.05)；TTC 法檢測 F₁ 雜交後代花粉結果顯示母本為花椰菜‘麗雪’之 F₁ 後代的花粉活性最高 (75.0%)，而母本為 103 品系之 F₁ 後代的花粉活性較母本為 104 品系 (CK) 的 F₁ 後代為高。離體發芽法檢測 F₁ 雜交後代則以母本為花椰菜‘麗雪’之 F₁ 後代的花粉活性最低 (4.0%)，而母本為 103 品系之 F₁ 後代的

花粉活性與母本為 104 品系 (CK) 之 F₁ 後代沒有顯著差異，顯示出轉殖品系 F₁ 雜交後代仍具有相當的花粉活性 (表 3)。

人工雜交、蜜蜂授粉及田間之自然雜交試驗

以轉殖 103 品系為父本，‘綠王’、104 (CK) 之‘富悅’、‘麗雪’、‘白格林’、小白菜及小油菜為母本，分別進行人工雜交後，將所收穫的種子催芽播種。小苗經 PCR 檢測帶有 *ipt* 基因之雜交後代比例 (圖 2)，以‘綠王’、104 品系 (CK) 之‘富悅’、‘麗雪’及‘白格林’較高，分別為 95.8、92.2、100、95.1、86.0%，而小油菜及小白菜雜交授粉後稔實率為 0%，明顯較其他甘藍變種為低 (表 4)。蜜蜂雜交授粉試驗部份，以花椰菜‘麗雪’之雜交率最高為 42.5%，其次白花芥藍‘富悅’為 37.8%，其餘材料之雜交率皆不到 10% (表 4) 。

‘富悅’、小油菜、小白菜之田間自然雜交率近於零，而其他品種 (系) 雜交率也甚低，低於 10% (表 4)。綜合以上結果，顯示基因轉殖青花菜的外源基因在人工雜交、蜜蜂雜交和田間自然授粉條件下向周圍非轉殖作物的基因流佈是存在的。

表 2. 轉殖 *ipt* 基因青花菜 (103 品系) 與其相關菜種利用 FDA、TTC 及離體發芽法分析花粉活性之比較

Table 2. Pollen viability of transgenic *ipt* broccoli (103 line) and its close relatives by FDA, TTC and *in vitro* germination tests

Variety (line)	Pollen viability (%)		
	FDA	TTC	<i>in vitro</i> germination
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -103 line	71.6 ± 3.9 a ^z	62.6 ± 3.9 ab	7.3 ± 1.0 c
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -‘Green King’	73.9 ± 6.6 a	49.2 ± 17.9 c	12.5 ± 1.7 c
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> -‘Fu Yue’	78.5 ± 4.1 a	70.4 ± 4.0 ab	12.7 ± 3.0 c
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> -‘Bai Ge Lin’	72.3 ± 4.7 a	68.0 ± 3.6 ab	4.4 ± 0.3 d
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> -‘Li Syue’	73.5 ± 3.5 a	72.6 ± 7.4 ab	10.7 ± 1.4 c
<i>Brassica rapa</i> -‘Edible rape’	72.7 ± 16.2 a	78.2 ± 3.2 a	34.1 ± 4.2 a
<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i> -‘Pakchoi’	70.5 ± 14.2 a	79.9 ± 4.1 a	20.9 ± 3.1 b
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -104 line (CK)	65.6 ± 2.9 a	56.8 ± 8.4 b	5.8 ± 1.7 d

^z Mean ± standard error (n = 4); each value in the same column followed by the same letter are not different at 5% significant level by LSD test.

表 3. 轉殖 *ipt* 基因青花菜 (103 品系) 與其相關菜種之 F₁ 雜交後代利用 FDA、TTC 及離體發芽法分析花粉活性之比較

Table 3. Pollen viability of F₁ progenies between transgenic *ipt* broccoli (103 line) and its close relatives by FDA, TTC and *in vitro* germination tests

Variety (line) as pollen recipient	Pollen viability (%)		
	FDA	TTC	<i>in vitro</i> germination
<i>Bassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -103 line	71.6 ± 3.9 ab ^z	62.6 ± 3.9 ab	7.3 ± 1.0 ab
<i>Bassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -‘Green King’	79.9 ± 2.3 a	69.6 ± 5.2 ab	6.9 ± 1.7 ab
<i>Bassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> -‘Fu Yue’	63.6 ± 5.6 bc	40.9 ± 1.6 c	5.1 ± 0.6 b
<i>Bassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> -‘Bai Ge Lin’	55.5 ± 2.8 c	62.7 ± 1.4 ab	9.9 ± 3.1 a
<i>Bassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> -‘Li Syue’	76.3 ± 2.6 a	75.0 ± 5.7 a	4.0 ± 0.6 b
<i>Brassica rapa</i> -‘Edible rape’	—	—	—
<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i> -‘Pakchoi’	—	—	—
<i>Bassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -104 line (CK)	77.0 ± 0.8 a	59.6 ± 5.6 b	5.2 ± 1.1 b

^z Mean ± standard error (n = 4); each value in the same column followed by the same letter are not different at 5% significant level by LSD test.

103 Progenies of ‘Green King’ × 103 line

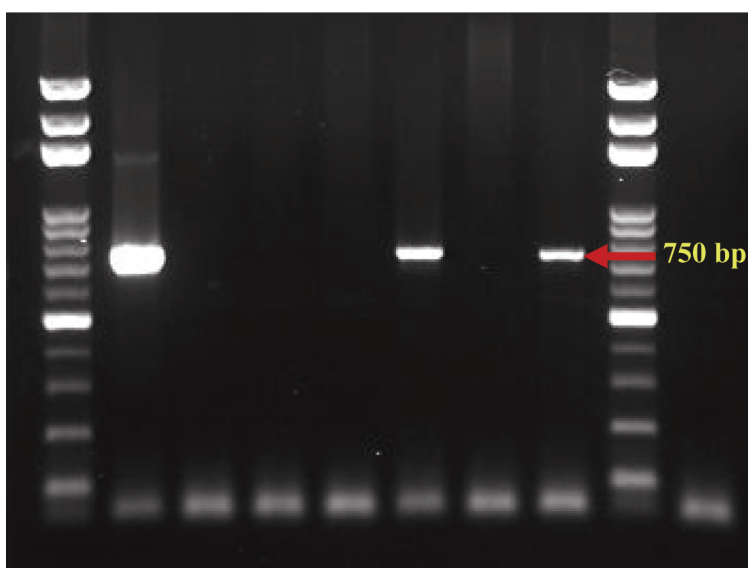


圖 2. 轉殖 *ipt* 基因青花菜 (103 品系) 與‘綠王’在田間自然雜交之後代的 PCR 檢測。使用專一性引子預期擴增的 DNA 大小為 750 bp，專一性條帶位置以箭頭標式於圖右側。

Fig. 2. PCR analysis for natural outcross between transgenic *ipt* broccoli (103 line) and ‘Green King’ broccoli in isolated plot. DNA fragment of expected size of 750 bp amplified from the transgenic lines by PCR using the primers specific to the foreign gene. The specific fragment was indicated by a arrowhead on the right.

表 4. 轉殖 *ipt* 基因青花菜 (103 品系) 與其相關菜種經由人工雜交、蜜蜂授粉、田間自然雜交之雜交率比較
Table 4. Hybridization percentage between transgenic *ipt* broccoli (103 line) and its close relatives by hand, bees and natural pollination

Variety (line) as pollen recipient	Hybridization percentage (%)		
	Hand pollination	Bee pollination	Natural pollination
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -‘Green King’	95.8 ± 3.6 a ^z	7.5 ± 6.2 b	6.4 ± 1.8 a
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> -‘Fu Yue’	100.0 ± 0.0 a	37.8 ± 4.0 a	—
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> -‘Bai Ge Lin’	86.0 ± 11.5 a	1.1 ± 0.5 b	1.1 ± 0.5 b
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> -‘Li Syue’	95.1 ± 4.3 a	42.5 ± 15.0 a	9.0 ± 4.7 a
<i>Brassica rapa</i> -‘Edible rape’	—	—	—
<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i> -‘Pakchoi’	—	—	—
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> -104 (CK)	92.2 ± 7.1 a	2.6 ± 1.3 b	2.1 ± 1.5 b

^z Mean ± standard error (n = 4); each value in the same column followed by the same letter are not different at 5% significant level by using LSD test.

討 論

隨著各種基因轉殖作物的環境釋放與大規模商品化的生產，轉殖基因是否會藉由花粉流佈至同一品種、相關的菜種或野生種中，從而引起環境及食品的安全性問題，是國際上對 GMO 商業化之前安全評估的關鍵內容，有必要以科學為基礎的客觀評估。在台灣，蕓苔屬作物包括青花菜、花椰菜、芥藍等大多數為越冬作物，一般可分為商業化栽培生產與採種生產。商業化栽培生產是於秋季播種，若為採種生產則須留至翌年春季開花。若青花菜栽培發生在採後棄田，使青花菜進入開花期及發生於留種田，使得這些作物進入開花期，雖栽種地點與時間有所區隔，但仍可能導致高度花期相遇。況且，生長期較長，且同一區域各類蕓苔屬作物均有種植，相鄰生長且分佈重疊性高，其開花期亦長，多屬無限花序作物 (indeterminate inflorescence crops)，因此在正常栽培條件下，與大多數相近菜種在開花時間上較為一致，花期具有不同程度的重疊期，極易發生天然雜交 (Paul *et al.* 1995; Brown *et al.* 1996;

Moyes *et al.* 2002; Simard & Legere 2004; FitzJohn *et al.* 2007)。而在雜交育種中，為解決親本花期不一致及遠距離雜交問題，必需瞭解花粉的運動及其生活力，如花粉與柱頭、花粉管與花柱及雌雄配子之間的相互作用。花粉傳播是種子植物族群生活史中一個重要生命活動現象，是種子植物受精的必經階段。花粉的運動在很大程度上決定了植物個體間的基因流佈及群體的交配方式，對族群的遺傳與變異起著重要作用。花粉以雄性結構傳送到雌性結構表面需借助一定的媒介，並跨越一定的空間。同時，花粉必須在具有活力時到達適宜的接受柱頭才能完成授粉過程，即柱頭處於可授粉期。花粉保持活力的時間長短與柱頭可授粉期的長短組合在一起，深刻影響著開花不同階段的授粉成功率。植物族群能否進行有效的繁殖，授粉效率至為重要 (Knox *et al.* 1986; Stone *et al.* 1995; Dafni & Firmage 2000)。本研究結果顯示，基因轉殖 *ipt* 青花菜與相近菜種之花期重疊期可高達 44 天，以‘綠王’及 104 品系 (CK) 之花期重疊期為 28–44 天最長，‘白格林’為 25–28 天，小白菜為 21–28 天及小油菜為 20–27 天，

可能發生花粉流佈的現象。花期重疊與否是產生基因流佈的基礎，亦是作物雜交育種成敗之首要關鍵。而白花芥藍‘富悅’之花期重疊期僅 3–8 天，與花椰菜‘麗雪’為 10–19 天 (表 1)，相較之下花期重疊期較短，基因流佈的程度也相對較低。本試驗在田間自然相近菜種雜交試驗中，白花芥藍‘富悅’未得到雜交後代種子，推測可能由於花期過短，授粉重疊期只有 3–8 天所致 (表 1、表 4)。

雜交是否成功的先決因子為花粉活性，此不僅與品種有關，也與開花時外界環境因素如溫度、濕度等密切相關 (Barton & Dracup 2000; Wu *et al.* 2008)。利用染色法進行花粉活性測定有快速簡便的優點，但易受花粉特性的影響，因此染色法只適合某些特定植物之花粉活性測定，其中以 TTC 法較為常用；此外，染色法雖可直接反映出花粉的代謝情形或營養物質的含量，但由於具有發芽能力的花粉在授粉後未必能正常稔實，無法直接表現花粉的發芽率。本試驗中以 TTC 法檢測之花粉活性較 FDA 法所得者低 (表 2)，推測可能是由於花粉外壁太厚，TTC 溶液進入花粉內受到限制的緣故。本試驗進行之花粉離體發芽法亦依據 Seiki *et al.* (1998) 液體培養基配方加以修正，結果顯示出花粉離體發芽除花椰菜‘麗雪’之花粉活性較低外，其他品種 (系) 差異並不顯著 (表 3)，顯示出轉殖品系花粉仍具有相當活性。因此就整體而言，花粉離體發芽法的結果較直接可靠，且方法簡單、迅速、合理，是唯一可適用於所有植物的花粉活性測定，但不同材料需要不同的培養基，故培養條件有差異時，測定結果可能有差異，尤其是蔗糖濃度對花粉活性的影響較大 (Barton & Dracup 2000)。值得一提的是花粉活性高並不全代表其雜交率高，而只是具有相當的雜交潛力。

除花粉活性之外，親和性是發生基因流佈的首要條件。由於蕓苔屬作物之基因組間存在

部分同源性，各個物種間均具有親緣關係，種間雜交具有不同程度的親和性，雜交後代在自然授粉條件下或回交情況下，能正常繁殖且可稔性續漸恢復 (Pertl *et al.* 2002; FitzJohn *et al.* 2007)。雖然大油菜與其他二倍體之種間雜交組合之稔實能力存在顯著差異，但各雜交組合稔實率的總變幅並沒有超過親本間的變幅範圍 (Watts 1968; Nishiyama *et al.* 1991; Jørgensen & Andersen 1994; Moyes *et al.* 2002)。本試驗亦發現轉殖 *ipt* 基因青花菜 (103 品系) 與其他材料間之 F_1 雜交後代之花粉活性及雜交能力，並沒有超過非基因轉殖青花菜的變幅範圍 (表 3、表 4)。其他相關研究亦指出，不同作物與其野生種之間的雜交率不同，同一作物在不同條件下與其野生種的雜交率也多少存在差異，如各種植物的花期、生長勢、隔離情形、昆蟲分布及氣候都會影響其表現 (Mikkelsen *et al.* 1996; Cherve *et al.* 1997, 2000)，此是否揭示出每一個基因轉殖材料的花粉活性與其相近菜種雜交之稔實率具有不一致的現象，且可能與整個雜交稔實過程中諸多影響因素有關，有待進一步的探研。

若從整體族群觀點上探究基因流佈的程序，順序是主要的關鍵，單一原因所造成的基因頻率改變的結果，在整體環節上並不太重要，重要的是應注意其連鎖反應是否會導致整個生態系結構性的改變 (Ellstrand 2003; Liao *et al.* 2010)。依據基因轉殖安全評估的個案原則，透過檢測受體植株後代的除草劑抗性檢測基因轉殖油菜花粉的流佈頻率，研究發現抗除草劑基因轉殖油菜花粉向傳統油菜品種的基因流佈頻率，其花粉流佈距離達 2000 m，且隨著與花粉源區距離的增加而減少，但在距花粉源區 33.5–2000 m 的範圍內，花粉流佈頻率均低於 0.015%，且並不隨距離增加而逐漸下降，表現出花粉長距離流佈和授粉的逢機性，絕大多數花粉散佈在花粉源區周圍 4.5 m 範圍內，其

中最大流佈頻率為 1.19%，出現在距源區 1.4 m 的樣區，風向顯著影響花粉流佈的方向與距離，但授粉昆蟲蜜蜂的數量與花粉流佈方向與距離沒有相關性，表明花粉流佈的方向性差異並不是由於蜜蜂的數量及分佈所引起的 (Beckie *et al.* 2003; Li *et al.* 2008)。由本試驗結果得知，基因轉殖青花菜的外源基因在人工雜交和田間自然授粉條件下向周圍非基因轉殖的基因流佈是存在的，但基因轉殖青花菜只有與種內品種 (如白花芥藍‘富悅’、黃花芥藍‘白格林’、花椰菜‘麗雪’) 間才有可能發生基因流佈，而與其他不同種植物 (如小油菜及小白菜) 較難發生基因流佈 (表 4)，此符合所發生之生物學基礎現象 (Pertl *et al.* 2002)。亦即從蕓苔屬的種屬間之遺傳關係來看，其種間雜交親和性與基因流佈頻率高度相關，是種間產生基因流佈的生物學基礎 (Honma & Summers 1976; Damgaard & Kjellsson 2005; FitzJohn *et al.* 2007)。因此，本試驗推論可依據作物之基因流佈頻率的研究結果，來制定相應的生物安全監測和管理措施。

引用文獻 (Literature cited)

- Andow, D. A. and C. Zwahlen. 2006. Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecol. Lett.* 9: 196–214.
- Ayotte, R., P. M. Harney, and V. Souza Machado. 1987. The transfer of triazine resistance from *Brassica napus* L. to *B. oleracea* L. I. Production of F₁ hybrids through embryo rescue. *Euphytica* 36:615–624.
- Barton, J. E. and M. Dracup. 2000. Genetically modified crops and the environment. *Agron. J.* 92:797–803.
- Beckie, H. J., S. I. Warwick, H. Nair, and G. Séguin-Swartz. 2003. Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). *Ecol. Appl.* 13:1276–1294.
- Bing, D. J., R. K. Downey, and G. F. W. Rakow. 1996. Assessment of transgene escape from *Brassica rapa* (*B. campestris*) into *B. nigra* or *Sinapis arvensis*. *Plant Breed.* 115:1–4.
- Brown, A. P., J. Brown, D. C. Thill, and T. A. Brammer. 1996. Gene transfer between canola (*Brassica napus*) and related weed species. *Cruciferae Newsl.* 18:36–37.
- Chan, L. F., L. F. O. Chen, H. Y. Lu, C. H. Lin, H. C. Huang, M. Y. Ting, Y. M. Chang, C. Y. Lin, and M. T. Wu. 2009. Growth, yield and shelf-life of isopentenyltransferase (*ipt*)-gene transformed broccoli. *Can. J. Plant Sci.* 89:701–711.
- Chandler, S. and J. M. Dunwell. 2008. Gene flow, risk assessment and the environmental release of transgenic plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 27:25–49.
- Chen, L. F. O., J. Y. Hwang, Y. Y. Chang, C. W. Sun, and S. F. Yang. 2001. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation. *Mol. Breed.* 7:243–257.
- Chen, L. J., D. S. Lee, Z. P. Song, H. S. Suh, and B. R. Lu. 2004. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Ann. Bot.* 93:67–73.
- Chevre, A. M., F. Eber, A. Baranger, and M. Renard. 1997. Gene flow from transgenic crops. *Nature* 389:924.
- Chevre, A. M., F. Eber, H. Darmency, A. Fleury, H. Picault, J. C. Letanneur, and M. Renard. 2000. Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under agronomic conditions. *Theor. Appl. Genet.* 100:1233–1239.
- Chiang, M. S. 1974. Cabbage pollen germination and longevity. *Euphytica* 23:579–584.
- Crawley, M. J., S. L. Brown, R. S. Hails, D. D. Kohn, and M. Rees. 2001. Transgenic crops in natural habitats. *Nature* 409:682–683.
- Dafni, A. and D. Firmage. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Syst. Evol.* 222:113–132.
- Damgaard, C. and G. Kjellsson. 2005. Gene flow of oilseed rape (*Brassica napus*) according to isolation distance and bufferzone. *Agric. Ecosyst. Environ.* 108:291–301.
- Ellstrand, N. C. 2003. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 358:1163–1170.
- Ellstrand, N. C., H. C. Prentice, and J. F. Hancock. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants to their wild relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30:539–563.

- FitzJohn, R. G., T. T. Armstrong, L. E. Newstrom-Lloyd, A. D. Wilton, and M. Cochrane. 2007. Hybridisation within *Brassica* and allied genera: evaluation of potential for transgene escape. *Euphytica* 158:209–230.
- Hansen, L. B., H. R. Siegismund, and R. B. Jørgensen. 2001. Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. *Genet. Resour. Crop Evol.* 48: 621–627.
- Haygood, R., A. R. Ives, and D. A. Andow. 2003. Consequences of recurrent gene flow from crops to wild relatives. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270:1879–1886.
- Heslop-Harrison, J. and Y. Heslop-Harrison. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Biotech. Histochem.* 45:115–120.
- Hokanson, S. C., J. F. Hancock, and R. Grumet. 1997. Direct comparison of pollen-mediated movement of native and engineered genes. *Euphytica* 96: 397–403.
- Honma, S. and W. L. Summers. 1976. Interspecific hybridization between *Brassica napus* L. (*Napobrassica* group) and *B. oleracea* L. (*Botrytis* group). *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 101:299–302.
- Inomata, N. 1988. Intergeneric hybridization between *Brassica napus* and *Sinapis arvensis* and their crossability. *Cruciferae Newsl.* 13:22–23.
- James, C. 2009. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009. ISAAA Brief No.41. ISAAA. Ithaca, New York.
- Jørgensen, 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. *Am. J. Bot.* 81:1620–1626.
- Jørgensen, R. B., B. Andersen, A. Snow, and T. P. Hauser. 1999. Ecological risks of growing genetically modified crops. *Plant Biotechnol.* 16:69–71.
- Knox, R. B., E. G. Williams, and C. Dumas. 1986. Pollen, pistil and reproductive function in crop plants. *Plant Breed. Rev.* 5:14–79.
- Kuparinen, A., F. Schurr, O. Tackenberg, and R. B. O'Hara. 2007. Air-mediated pollen flow from genetically modified to conventional crops. *Ecol. Appl.* 17: 431–440.
- Lefol, E., A. Fleury, and H. Darmency. 1996a. Gene dispersal from transgenic crops II. Hybridization between oilseed rape and the wild hoary mustard. *Sex. Plant Reprod.* 9:189–196.
- Lefol, E., V. Danielou, and H. Darmency. 1996b. Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Res.* 45:153–161.
- Li, C., B. W. Zhou, X. L. Guo, C. H. Dong, X. J. Hu, M. S. Hou, and S. Y. Liu. 2008. Pollen-mediated gene flow in Chinese commercial fields of glufosinate-resistant canola (*Brassica napus*). *Chinese Sci. Bull.* 53:2333–2341. (in Chinese with English abstract)
- Liao, H. M., C. Wu, Y. C. Cao, Q. Gao, and G. H. Wang. 2010. Structural characteristics and subgroup of rapeseed gene-flow network. *Chinese Bull. Bot.* 45:162–173. (in Chinese with English abstract)
- Lu, B. R. and A. A. Snow. 2005. Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *BioScience* 55:669–678.
- Mikkelsen, T. R., B. Andersen, and R. B. Jørgensen. 1996. The risk of crop transgene spread. *Nature* 380:31.
- Moyes, C. L., J. M. Lilley, and C. A. Casais. 2002. Barriers to gene flow from oilseed rape (*Brassica napus*) into populations of *Sinapis arvensis*. *Mol. Ecol.* 11: 103–120.
- Nishiyama, I., M. Sarashima, and Y. Matsuzawa. 1991. Critical discussion on abortive interspecific crosses in *Brassica*. *Plant Breed.* 107:288–302.
- Norton, J. D. 1966. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 89: 132–134.
- Paul, E. M., C. Thompson, and J. M. Dunwell. 1995. Gene dispersal from genetically modified oilseed rape in the field. *Euphytica* 81:283–289
- Pertl, M., T. P. Hauser, C. Damgaard, and R. B. Jørgensen. 2002. Male fitness of oilseed rape (*Brassica napus*), weedy *B. rapa* and their F₁ hybrids when pollinating *B. rapa* seeds. *Heredity* 89:212–218.
- Prakash, S. and K. Hinata. 1980. Taxonomy, cytogenetics and origin of crop *Brassicaceae*, a review. *Opera Bot.* 55:1–57.
- Ramessar, K., A. Peremarti, S. Go'mez-Galera, S. Naqvi, M. Moralejo, P. Mun'oz, T. Capell, and P. Christou. 2007. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. *Transgenic Res.* 16:261–280.

- Rodriguez-Riano, T. and A. Dafni. 2000. A new procedure to assess pollen viability. *Sex. Plant Reprod.* 12: 241–244.
- Rong, J., B. R. Lu, Z. P. Song, J. Su, A. A. Snow, X. S. Zhang, S. G. Sun, R. Chen, and F. Wang. 2007. Dramatic reduction of crop-to-crop gene flow within a short distance from transgenic rice fields. *New Phytologist* 173:346–353.
- Roy, N. N. 1980. Species crossability and early generation plant fertility in interspecific crosses of *Brassica*. *SABRAO J.* 12:43–53.
- Sarla, N. and R. N. Raut. 1988. Synthesis of *Brassica carinata* from *B. nigra* × *B. oleracea* hybrids obtained by ovary culture. *Theor. Appl. Genet.* 76: 846–849.
- Sarmah, B. K. and N. Sarla. 1998. *Erucastrum abyssinicum* × *Brassica oleracea* hybrids obtained by ovary and ovule culture. *Euphytica* 102:37–45.
- SAS Institute, Inc. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide. Version 8. SAS Institute, Inc., Cary, NC. 5136 pp.
- Scheffler, J. A. and P. J. Dale. 1994. Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Res.* 3:263–278.
- Scheffler, J. A., R. Parkinson, and P. J. Dale. 1993. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oil seed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Res.* 2:356–364.
- Schuler, T. H., G. M. Poppy, B. R. Kerry, and I. Denholm. 1999. Potential side effect of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. *Trends Biotechnol.* 17:210–216.
- Seiki, S., N. Katoh, S. Iwai, and M. Hagimori. 1998. Establishment of reliable methods of in vitro pollen germination and pollen preservation of *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*). *Euphytica* 103: 29–33.
- Sharma, D. R., R. Kaur, and K. Kumar. 1996. Embryo rescue in plants—a review. *Euphytica* 89:325–337.
- Shivanna, K. R., H. F. Linskens, and M. Cresti. 1991. Pollen viability and pollen vigour. *Theor. Appl. Genet.* 81:38–42.
- Simard, M. J. and A. Legere. 2004. Synchrony of flowering between canola and wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Weed Sci.* 52:905–912.
- Song, Z. P., B. R. Lu, and J. K. Chen. 2004. Pollen flow of cultivated rice measured under experimental conditions. *Biodiv Conserv.* 13:579–590. (in Chinese with English abstract)
- Sridevi, O. and N. Sarla. 1996. Reciprocal hybridization between *Sinapis alba* and *Brassica* species. *Cruciferae Newsl.* 18:16.
- Stewart, A. V. 2002. A review of *Brassica* species, cross-pollination and implications for pure seed production in New Zealand. *Agron. N. Z.* 32:63–82.
- Stone, J. L., J. D. Thomson, and S. J. Dent-Acosta. 1995. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. *Am. J. Bot.* 82:1186–1197.
- Watts, L. E. 1968. Natural cross-pollination and the identification of hybrids between botanical varieties of *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 17:74–80.
- Wei, X. H., X. P. Yuan, H. Y. Yu, Y. P. Wang, S. X. Tang, X. Y. Liao. 2005. Effects of transgenes insertion on pollen vigor and hybrid seed set of rice. *Chinese J. Appl. Ecol.* 16:115–118. (in Chinese with English abstract)
- Wu, C., S. M. Tang, Y. Zhang, and C. L. Zhong. 2008. Advances of research on plant pollen culture. *Chinese Agric. Sci. Bull.* 24:146–149. (in Chinese with English abstract)

Pollen Viability and Cross Ability of Isopentenyl Transferase (*ipt*)-Gene Transformed Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and Its Relatives¹

Po-Yu Ting², Hsiang Chang³, Yu-Wen Kao³, Hsiu-Ying Lu⁴, Long-Fang O. Chen⁵,
Min-Tze Wu³, and Lit-Fu Chan^{3,6}

Abstract

Ting, P. Y., H. Chang, Y. W. Kao, H. Y. Lu, L. F. O. Chen, M. T. Wu, and L. F. Chan. 2010. Pollen viability and cross ability of isopentenyl transferase (*ipt*)-gene transformed broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and its relatives. *J. Taiwan Agric. Res.* 59:261–274.

Gene flow is an important index for environmental biosafety assessments. Pollens are potential carriers for genetically modified DNA to other plants. For phanerogams, pollen viability and cross-compatibility are key factors for successful outcross hybridization. In this study, broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) transformed with the *ipt* gene, designated as line 103 was used to investigate its potential outcross by pollen viability test and pollination with non-transgenic broccolis (line 104 and cv. 'Green King') and closely 5 related varieties, such as Chinese kales (*B. oleracea* var. *alboglabra*) 'Fu Yue' (white flower) and 'Bai Ge Lin' (yellow flower), cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis*) 'Li Syue', Pakchoi (*B. rapa* var. *chinensis*), and edible rape (*B. rapa*). These results provide valuable information for isolation and co-cultivation systems. Under field condition, flowering periods of transgenic *ipt* broccoli and non transgenic recipients were overlapping by 3–28 days in 2007 and 8–44 days in 2008. The pollen viability of F₁ hybrids was determined by TTC (triphenyl tetrazolium chloride) method, FDA (fluorescein diacetate assay) and *in vitro* germination. The FDA showed no significant difference ($p > 0.05$) in pollen viability among transgenic line 103, non-transgenic and other tested cultivars. However, the differences of pollen viabilities were significant ($p < 0.05$) using TTC and *in vitro* germination. This result indicated that the cross abilities of transgenic and their hybridized offsprings were still existing. The range of hybridization rates were 86–100%, 1.1–42.5% and 0–9% by hand, insect (bee), and natural pollination, respectively. No hybridization was found from Pakchoi and edible rape as pollen recipients. The results showed that transgenic DNA insertion did not alter potential risk for outcross among broccoli varieties; however, there is possibility of gene transfer between transgenic and non-transgenic broccoli varieties.

Key words: Chinese kale, Gene flow, Hybridization percentage, Overlapped flowering days, Transgenic broccoli.

-
1. Contribution No. 2439 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: December 1, 2010.
 2. PhD student, Graduate Institute of Biochemical Sciences and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Respectively, Researcher, Project Assistant, Researcher and Director, and Assistant Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Deputy Director-general, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 5. Deputy Director-general, Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, ROC.
 6. Corresponding author, e-mail: leevchan@tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.