研究報告

利用 SRAP 分子標誌進行 *Brassica rapa* 與 *Brassica napus* 及其雜交後代的鑑別

洪鴻 [1]、林子凱 [2]、杜元凱 [3]、郭寶錚 [1,*]

[1]國立中興大學農藝學系

[2]行政院農業委員會農業試驗所作物組

[3]行政院農業委員會農業試驗所生技組

摘要

油菜屬十字花科(Brassicaceae)芸薹屬(*Brassica*)植物，有六個重要種，其中包含異源四倍體(allotetraploid)或雙二倍體(amphidiploid)以及雙倍體(diploid)，這六個種可分成三種不同基因組(genome)，A genome、B genome 和 C genome (n = 10, 8, and 9)。油菜近緣種之間會產生種間雜交，為了解大油菜(*Brassica napus*)與小油菜(*B. rapa*)雜交後的子代變化及如何區分雜交後代，本研究選擇了四種 *B. napus* 品種，搭配臺灣常見的 *B. rapa* 品種，在溫室種植並進行兩者間的人工雜交，先取得雜交後代種子，再進行有關外表型及基因型上的分析。在外表型上的分析結果顯示，雜交後代與親代間的差異性並不明顯，不足以作為辨別的根據，因此進行基因型分析。首先利用流式細胞儀分析雜交後代，結果證實細胞內核酸含量介於兩親之間。在分子標誌部分選擇了 SRAP (sequence-related amplified polymorphism)為應用之技術，在所使用的 7 組 SRAP 引子組合中，除引子組合 5-6 沒有不同的條帶可供辨別外，其餘 6 組引子組合共偵測出至少 6 個以上的可辨別條帶以供親本及雜交後代辨別之用。

*通信作者, bjkuo@nchu.edu.tw

投稿日期：2016 年 11 月 10 日

接受日期：2016 年 12 月 22 日

作物、環境與生物資訊 13:208-222 (2016)

Crop, Environment & Bioinformatics 13:208-222(2016)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng District, Taichung City 41362, Taiwan ROC

關鍵詞：小油菜、大油菜、種間雜交、相關序列增幅多型性。

Using SRAP Marker to Identify the Difference among *Brassica rapa*, *Brassica napus*, and F1 Hybrids

Hong Hong[1], Tzu-kai Lin[2], Yuan-kai Du[2] and Bo-Jein Kuo[1,*]

[1] Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung City 40227, Taiwan ROC

[2] Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City 41362, Taiwan ROC

[3] Biotechology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City 41362, Taiwan ROC

ABSTRACT

Brassica species, belonging to *Brassica*, is a genus of plants in the Brassicaceae family. *Brassica* plants have six important species, which can be divided into three different genome types, including A genome (n = 10), B genome (n = 8), and C genome (n = 9). *Brassica* species can hybridize between their relatives, called interspecific hybridization. In order to identify the difference among *B. rapa*, *B. napus*, and F1 hybrids, we employed four *B. napus* species and a *B. rapa* species which is green manure species grown in Taiwan. We planted all materials in the greenhouse and then implemented the crossing experiments to produce the hybrid seeds, followed by the analysis of their genotype and phenotype. At first, we used the flow cytometric (FCM) to analyze the parents and offsprings. It was found that the DNA content of hybrids was between their two parents. Then, we used 7

primer pairs from the thirty sequence-related amplified polymorphism (SRAP) primer pairs to analyze the hybrids. Except primer pairs 5–6, at least 6 polymorphic molecular markers were found in other 6 primer pairs. These markers could be used to identify all hybrids.

Keywords: *Brassica rapa*, *Brassica napus*, inter-specific hybridization, sequence-related amplified polymorphism (SRAP).

前言

十字花科(Brassicaceae)作物約包含 375 個不同的屬和 3200 個不同種(species)，其中還有許多的近緣種 (Canadian Food Inspection Agency 1994)。在真核生物演化的歷史中，發現部分真核生物基因組存在倍加 (duplicate) 情形，而產生同源多倍體 (autopolyploidy) 或異源多倍體 (allo-polyploidy)，進而使染色體間發生重組或是靜默(silence)現象，產生和親代不同的演化族群(Adams and Wendel 2005)。

自然界中，植物種間出現的天然雜交現象，可能產生多倍體世代，而多倍體後代會產生與親本不同的形態及生理特性，並提升了對環境的耐受性，進而出現與兩親本不同的新形態演化族群 (Xiong and Pires 2011)。根據 Triangle of U (1935)，油菜有六個主要種，*Brassica rapa* (AA, 2n = 20)、*B. napus* (AACC, 2n = 38)、*B. oleracea* (CC, 2n = 18)、*B. carinata* (BBCC, 2n = 34)、*B. nigra* (BB, 2n = 16) 和 *B. juncea* (AABB, 2n = 36)。這六個種可分成三個不同的基因組 (genomes)，A genome、B genome 和 C genome (分別 n = 10, 8, and 9) (Fig. 1)，一般認為是經由二倍體品種雜交後，染色體加倍而產生異源四倍體的品種(Xu *et al*. 2010)。

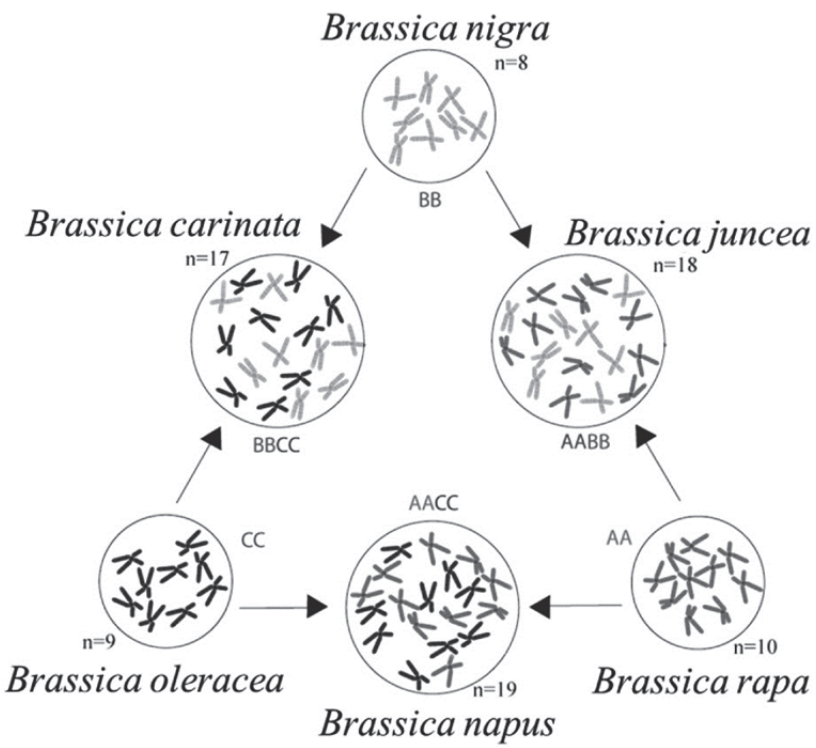


Fig. 1. The "Triangle of U" diagram, showing the genetic relationships between the six species of the genus Brassica. Chromosomes from each of the genomes A, B and C are represented by different colors. (adapted from Nagaharu 1935)

油菜為異交作物，後代會有自交和異交情形出現；花粉型態上屬蟲媒花，但兼具風媒花的輕小和蟲媒花易附著的特性，花粉也可能隨風飄散數公里之遠(Treu and Emberlin 2000)。此外，油菜也有很多近緣品種(relatives)，如 *Raphanus sativus* 及 *Sinapis alba* 等。

FitzJohn*et al.* (2007)為了瞭解油菜近緣種之間雜交後是否可以產生子代及其子代生長的情形，選擇了 58 種不同的油菜近緣種，分別作為父本及母本進行雜交，觀察雜交後可以產生有活力的後代種子的成功機率。結果只有 *B. juncea*、*B. napus*、*B. oleracea* 和 *B. rapa* 等物種間雜交成功率較高，而 *B. carinata*、*B. nigra*、*R. sativus* 及 *Sinapis alba* 等物種間雜交成功率則較低，至於遠源種植物與油菜及油菜近源種間的雜交成功率則相當低或是完全失敗。由所得到的結果得知，在薹苔屬植物中只有 *B. juncea*、*B. napus*、*B. oleracea* 和 *B. rapa* 等物種間雜交成功率較高，而臺灣冬季裡作普遍種植的 *B. rapa* 和主要榨油 *B. napus* 之間雜交成功情形又較其他物種高。

在 2003 年，Warwick *et al.*選擇 *Brassica rapa*、*Raphanus raphanistrum* (2n = 38)、*Sinapis arvensis* (2n = 18) 和 *Erucastrum gallicum* (2n = 36)等四個親緣關係較接近的物種，分別和 *B. napus* 雜交，分別在田間以及溫室中進行雜交試驗，之後將採集的後代種子分別再以除草劑抗性 (herbicide resistance traits; HR)、綠色螢光蛋白(green fluorescent protein marker; GFP) 、species-specific amplified fragment length polymorphisms (AFLPs)和染色體倍體數檢測後代種子是否有受到 *B. napus* 之花粉雜交。研究者先以兩個不同 *B. rapa* 族群作為母本、HR *B. napus* 作為父本(*B. rapa* (♀) × HR *B. napus* (♂))，進行田間模擬試驗。對採集之後代種子進行 HR 的檢測之後，發現在採集的兩個族群後代種子總數中 (13,423、15,850)，有相近的異交比率發生(6.8%、6.5%)。而在進行 *B. rapa* (♀) × GFP *B. napus* (♂)試驗中，對所採集的種子(2,881)，進行分析發現有 7.1%的異交率出現。另外，雜交後代的生長發育情形和花粉的活力並沒有減弱，研究者認為 *B. rapa* × *B. napus* 之雜交族群可以在野外生存及延續(Warwick *et al.* 2003)。研究者接著使用 *R. raphanistrum* (♀) × *B. napus* (♂)進行試驗，先分別採集了加拿大及歐洲的七個不同地區的 *R. raphanistrum* 族群在溫室中進行雜交試驗，利用 AFLP 及染色體倍體數檢測，並無發現有 *B. napus* 之特異性 AFLP 出現，而採集之樣本也都呈現二倍體形式。進行田間試驗的結果，可以發現在 HR 及 GFP 的分子標誌檢測上，出現異交率比例分別為 0.003%和 0。

最後，研究者利用 *Sinapis arvensis* 和 *Erucastrum gallicum* (♀) × *B. napus* (♂)進行雜交試驗，發現所採集的後代皆沒有發生雜交的情形。研究者在進行 *B. napus* 對親緣關係較近的四個物種之雜交之後，可由結果發現除了 *B. rapa* 之外的其他三個物種的後代出現雜交的比例均很低甚至沒有發生(Warwick *et al.* 2003)。

大部分的油菜雜交後代在種子外觀上並無顯著差異性，不若玉米可以藉由花粉直感效應，以種子之種皮顏色來區分，並藉此模擬後代是否有受 GM 玉米之花粉汙染。長久的演化過程中，*Brassica* 屬演化出由三種不同的基因組(A, B, and C genomes)所組成的六種主要物種。由於各油菜物種之間染色體具有部分同源性，加上種間存在雜交現象，所以對於辨別各品種油菜內染色體並沒有一套固定方式。

在 *B. napus* 中存在部分品系具有黃色的種皮，而黃色種皮的品系與黑色種皮的品系相比較發現，具有種皮較薄、含油量較高、木質素和纖維素含量低等優點(Lu *et al.* 2012)。Liu (2005)等研究者利用了兩個春作型 *B. napus* Quantum 和 Sprint 先與一人工合成

的品系 no. 7076 雜交後育成一個雙單倍體(double haploid; HD)品系 no. 2127-17，該品系是透過人工合成的方式將 *B. oleracea* (CC)和 *B. rapa* (AA)合成跟 *B. napus* 一樣的基因組合(AACC)，在之後的四個期作中種皮皆穩定的呈現黃色。

由 Quantum、no. 2127-17 品系種子和其 F_1 種子，經過觀察可以用視覺分辨出黃色和黑色的種子。由此可發現種皮顏色是由細胞核所控制，而且黃色種皮相對於黑色種皮在基因表現上呈顯性(Liu *et al*. 2005)。之後利用 no. 2127-17 品系分別和 Quantum 及 Sprint 雜交的後代 F_1、F_2 及與回交後 BC_1 世代。再利用色度計 CR-300 測量 F_2 及 BC_1 世代(分別與黃種皮的親本和黑色種皮的親本回交)種子的光反射率值(light reflectance values)，而反射光值由 17(黑色種皮)到 49.4(黃色種皮)呈現連續分布。對於黑色種皮的種子光反射值平均為 23.5，對黃種皮的種子光反射值平均為 50.4。

Lu *et al.* (2012)發現利用 Vanillin 和 HCl 配成的溶液，於授粉後的 15 天後，可以有效的利用未成熟種子的種皮判斷出種子的種皮顏色。黃色種皮的種子經過溶液處理之後並不會有顏色的改變，而黑色種皮的種子則是在授粉後 15 天以後的處理皆出現變成紅色的情形。

除了利用種皮顏色來區分油菜之外，Koo *et al.* (2004)則利用人工細菌染色體(bacterial artificial chromosome; BAC)當作探針配合螢光原位雜合(*fluorescence in situ hybridization*; FISH)技術和染色體組的原位雜合(*genomic in situ hybridization*; GISH)，建立油菜染色體組的 karyotype，以區分油菜染色體組 A 和 C 的差異性。他們選擇了 *B. rapa* 自交系 Chiifu 作為材料，將其細胞分裂中期染色體以 FISH 技術做核型分析，利用三種 DNA 序列當作探針(45S rDNA、5S rDNA 和 C11-350H)。之後將以上三種核型分析依大小長短排列，建立了 *B. rapa* 染色體組之 karyotype。

Howell *et al.* (2002)選擇 *B. oleracea* A12DHd 作為材料，將其細胞分裂中期染色體以 FISH 技術做核型分析，利用三種 DNA 序列當作探針(45S rDNA、5S rDNA 和 BoB06G14)，觀察探針在染色體組上標記情形(Howell *et al*. 2002)。

Xiong and Pires (2011)以特殊重複序列作為探針進行 FISH，分別區分出 *B. rapa* (AA)和 *B. oleracea* (CC)之染色體圖，之後再分別將 *B. rapa* 和 *B. oleracea* 之全基因組做螢光探針或不做螢光探針處理，來了解 *B. napus* (AACC)中染色體組和 *B. rapa* 及 *B. oleracea* 之親緣關係及同源性，而藉此發現 A 和 C 染色體組在種間雜交過程沒有發生大規模的基因重組或是消失現象，仍和 *B. rapa* 及 *B. oleracea* 具有高度同源性。另外，選用和 *B. rapa* 互補之 BAC 標記 *B. rapa* 和 *B. oleracea* 染色體組，觀察之間的同源性，發現 A 和 C 基因組間具有極高的同源性(Xiong and Pires 2011)。再利用 BAC clone 做為探針配合 GISH 技術可以有效的辨識物種之間的同源性染色體，除有助於親緣鑑定、了解物種間的演化關係，在育種上亦可應用於同源性基因的辨別。

外表型性狀易受環境影響，而造成判斷是否發生雜交上的困難。植物體內的 DNA 表現並不會因為環境氣候不同有有所變動，因此，可以直接利用分子標誌來鑑別基因組間的差異。標誌(marker)在作物育種、生物遺傳多樣性和系統發生的演化研究上扮演重要的角色(Schulman 2007)。在植物分類上型態標誌雖是最好的分類依據，可以快速地進行鑑別，但是很多型態標誌會受到環境、氣候和植株本身狀況的影響(Forrest *et al*. 2005)，也使得型態標誌在應用上受到不少的限制。隨著分子生物技術的進步，許多新的分子標誌出現，並被廣泛應用於親緣鑑定、基因定位和分子輔助選拔(marker-assisted selection; MAS)等研究上(Schlötterer 2004)。聚合酶連鎖反應(polymerase chain

reaction; PCR)技術配合不同的引子，可以提供在基因組分析上不同方面的訊息，而每個技術都有其優缺點，例如隨機增幅多型性(random amplified polymorphism DNA; RAPD)，雖然便於建立 DNA 指紋圖譜，但卻有較差的一致性和再現性等缺點存在；簡單重複序列(simple sequence repeat; SSR)能產生許多的共顯性標誌，但相對需耗費較多的成本和時間(Li and Quirous 2001)。

最早被應用的 DNA 分子標誌為限制酶片段長多型性(restriction fragment length polymorphisms; RFLP) (Schlötterer 2004)。之後因為 PCR 技術的成熟，逐漸發展出以 PCR 為基礎的分子標誌，這些分子標誌依據所增幅出的條帶類型可以分成：以專一性引子增幅出條代較少的 SSR，以能結合在基因組上較多位置增幅出條帶較多的引子的 RAPD (Welsh and McCelelland 1990)、以 SSR 序列為引子的簡單重複序列區間(inter simple sequence repeat; ISSR) (Zietkiewicz *et al*. 1994)；將 DNA 以限制酵素截切後接上 adaptor，再以具有選擇性的引子進行增幅的增幅片段長度多型性(amplified fragment length polymorphism; AFLP) (Vos *et al*. 1995)，近年也有以上述原理為基礎再加以轉變的分子標誌，如本次研究所應用到的相關序列增幅多型性(sequence related amplified polymorphism; SRAP)，其應用 forward 和 reverse 兩組引子(Table 1)，對開放閱讀空間(open reading frames; ORFs)進行增幅(Li and Quirous 2001)。

在以分子標誌鑑別油菜相關研究中，Plieske and Struss (2001)曾利用簡單重複序列(simple sequence repeats; SSRs)的技術分析從歐洲各國選擇的 32 種不同品種和品系的油菜，其中有 29 種屬於冬季型(winter type)、3 種屬於春季型(spring type)。研究者利用其中一個油菜品種 Vivol 的全 DNA 染色體組先建立了噬菌體 library (phage library)，之後利用二核苷酸為單位重複的衛星序列$(GA)_n$ 和$(GT)_n$ 作為探針，對噬菌體 library 進行篩選，選出了約 500 個陽性的 clones，其中有約 25%(121 個) clones 可用於對油菜之 SSR 探針。這些重複序列重複的次數從 7 到 55 次不等，序列總長度在 80 到 220 bp 之間。研究者接著選用了 81 個微衛星特異性序列為探針，用以區分不同的油菜品種或其他十字花科(crucifer)作物。微衛星序列是一種極短的隨機序列(1–6 bp)，存在於真核生物基因組內，微衛星序列多形性主要因為序列的重複數在每個物種間皆不同，此多形性會以共顯性的方式遺傳，常用於分析遺傳多樣性及對不同族群的分析(Suwabe *et al*. 2002)。若樣本所擴增出來的片段長度和 *B*.

Table 1. Example of forward primers (F) and reverse primers (R) using in SRAP analysis.

Primer name		Sequence (5′-3′)	
HMK2007-95	me 1	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA TA -3′	SRAP primer-F
HMK2007-96	me 2	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA GC -3′	SRAP primer-F
HMK2007-97	me 3	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA AT -3′	SRAP primer-F
HMK2007-98	me 4	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA CC -3′	SRAP primer-F
HMK2007-99	me 5	5′ - TGA GTC CAA ACC GGA AG -3′	SRAP primer-F
HMK2007-100	em 1	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT AAT -3′	SRAP primer-R
HMK2007-101	em 2	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT TGC -3′	SRAP primer-R
HMK2007-102	em 3	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT GAC -3′	SRAP primer-R
HMK2007-103	em 4	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT TGA -3′	SRAP primer-R
HMK2007-104	em 5	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT AAC -3′	SRAP primer-R
HMK2007-105	em 6	5′ - GAC TGCGTA CGA ATT GCA -3′	SRAP primer-R

In this study, primer pairsme5- em 6 show as 5-6, and primer pairs me 1- em 1 show as 1-1.

napus 品種 Vivol 所擴增出的片段長度相似時，就會視此擴增出的片段為微衛星序列擴增的產物。而以此規則，可以大概推測各品種之間以及與 *B. napus* 關係的遠近(Plieske and Struss 2001)。

分子標誌能檢測出 DNA 層次的多型性，能提供較多的資訊進行分析，在 SRAP (sequence-related amplified polymorphism)的部分已被應用於許多不同物種間及物種內部的遺傳性變異研究。例如在香蕉收集系(Phothipan *et al.* 2005)、花生栽培種(Raina *et al.* 2001)、香菇(*Lentinula edodes*)收集系(Fu *et al.* 2010)以及在美國的南瓜(*Cucurbit pepo*) (Ferriol *et al.* 2003)和甘藍(*Brassica oleracea*) (Li and Quirous 2001)的研究中，都有使用 SRAP 作為分析的依據。

本研究選擇了四種 *B. napus* 品種，分別是自大陸地區引進了三種商業上推廣種植的 *B. napus* 品種，分別是「萬油 25 號」('Wan Oil No. 25')、「中油 36 號」('Zhong Oil No. 36')及「貴雜 4 號」('Guiza No. 4')，以及臺灣自己育成的「鳳試 1001 號」('FTHEB 1001')品種，搭配臺灣常見的 *B. rapa* 品種，「農興 80 天」('Nongxing 80 days')，在溫室種植並進行人工雜交，先取得雜交後代種子後進行有關外表型及基因型上的分析。

在前人研究中使用多種對於油菜雜交後代的分析方式，本研究希望能以較為簡單快速的方式進行篩選，研究中先以流式細胞儀(Flow CytoMetry; FCM)分析親代和子代的染色體倍數性，再利用 SRAP 分析後代和親代間的基因組多型性，比對外表型觀察結果，找出親本跟雜交子代的差異性。

材料與方法

一、試驗材料

由大陸地區所蒐集的大油菜(*B. napus*)品種包括「萬油 25 號」(甘藍型細胞核不稔兩系雜交品種)、「中油 36 號」(甘藍型半冬性中早熟細胞質雄不稔三系雜交品種)、「貴雜 4 號」(甘藍型兩系雜交品種)共三種以及臺灣本土馴化育成的大油菜(*B. napus*)品種「鳳試 1001 號」。小油菜(*B. rapa*)品種則使用臺灣地區常見的「農興 80 天」，屬於開放授粉品種，外表型會有較不一致之呈現。每個品種中選出較為健壯的植株，移到盆栽內栽植，待植株進入開花期時進行人工授粉，以產生雜交後代種子。為增加雜交之成功率，所有雜交組合皆採用蕾期授粉法。雜交試驗總共產生正反交共 8 個雜交組合，組合選擇約 3 到 5 串花串進行雜交試驗，待果莢成熟後收集雜交 F_1 種子，種植之後萃取葉片之 genomic DNA 用以進行 SRAP 分析比對之用。並進行雜交子代之外表型觀察、genomic DNA 之萃取、SRAP 分析樣本及 PCR 反應及流式細胞儀分析(Flow CytoMetry; FCM)，請參考 Hong *et al.* (2016)。

二、雜交子代分析方法

試驗時以 4 個母本、4 個父本及 4 個子代的樣本同時進行 SRAP 分析，利用親代多型性的差異和子代比較。先假設子代如果沒有受到雜交，則呈現的多型性條帶應會與母本相同，但因為雜交的關係，所以子代會帶有父本的多型性條帶。因此，若在子代多型性條帶中，產生了母本沒有而父本擁有的多型性條帶，即可視為此條帶是由父本基因組所增幅產生的條帶。後續試驗均將依據上面的方法，在人工雜交的子代分析結果中觀察不同的多型性條帶。所有的雜交組合都會使用 7 種引子組合進行分析之後觀察結果。在反交的部分，試驗以 3 組引子組合 1-5、2-6、5-1 進行分析比較，所有雜交後代皆取 4 個樣本進行分析，分析方式會將相同親本的正反交組合放在一起比較。

結果與討論

一、雜交結果

本研究試驗材料中的 4 個大油菜(*B. napus*)品種及小油菜(*B. rapa*)品種，在使用蕾期授粉的方式下，所有雜交組合皆可收穫到

雜交種子，但在以 *B. rapa* 為母本的雜交組合中種子收穫量不如以 *B. napus* 為母本的收穫量。推測原因可能是因為 *B. rapa* 的花器相較於 *B. napus* 為小，所以人工授粉時的失敗機率較高，加上採收時間過晚，導致多數種子發霉或是在果莢之中發芽。建議之後可以提早收獲果莢，當果莢由綠開始轉黃時就可以採收，而後放置室溫陰乾果莢，待種子成熟後收集。而 *B. napus* 因為本身花苞較大，加以花苞間排列較 *B. rapa* 疏鬆，較容易進行授粉。因此，在以 *B. napus* 為母本的雜交組合中，所收穫到的雜交種子外觀及之後的發芽狀態都很好。

在長久的演化過程中，*Brassica* 演化出由 3 種不同的基因組(A、B and C genomes)所組成的 6 種主要物種。由於各油菜物種之間染色體具有部分同源性，所以 3 個基因組之間的親緣關係非常接近，各物種之間存在種間雜交的可能性。FitzJohn *et al.* (2007)的研究中發現，*B. juncea*、*B. napus*、*B. oleracea* 和 *B. rapa* 等物種間雜交成功率較高，而 *B. carinata*、*B. nigra*、*R. sativus*、*Sinapis alba* 及其他遠源種植物的種間雜交成功率則相當低或完全失敗。

除了 *B. juncea* 的基因組屬於 AABB 之外，其餘 *B. napus*、*B. oleracea* 和 *B. rapa* 等物種基因組組成，則分別屬於 A 或 C 基因組。因而在各基因組中以 A 和 C 基因組在種間雜交上的成功率，較高於 A 和 B 及 B 和 C 基因組之間的種間雜交成功率。而 A 及 C 基因組之親緣關係也較 A 和 B 及 B 和 C 基因組之親緣關係更為接近(Chiou *et al.* 2012)。

二、以外表型判斷親代及雜交子代差異

取得雜交子代之後先與親本一起種植於盆栽之中，觀察最直觀之外表性狀差異性，先代植株生長至 4、5 片葉齡時，對植株進行拍攝比較，會將雜交子代植株和親本放置一起分別拍攝正向拍攝圖、鳥瞰圖和單一葉片的比較圖如 Fig. 2。

在比較後代和親本的外表性狀後，母本外觀上葉緣較為平滑，而父本則有鋸齒狀葉緣出現。在雜交子代部分，則是有些與母本相似而有部分與父本相似。葉片基部，則是父本有產生小裂葉而母本無，小裂葉的出現是雜交子代中較為一致的呈現，但是在幼葉部分仍無法明顯觀察到這個現象。*B. napus* 之葉片較 *B. rapa* 品種為厚，但是在後代表現的觀察結果中，仍不足以作為可靠的差異性狀。在葉色部分，因為在 *B. napus* 品種中即沒有一定的性狀表現，而子代表現上也沒有差異，葉面雖有蠟質但卻不如父本明顯。有研究指出，薹苔屬中的油脂含量和種皮顏色等遺傳性狀，會受授粉母本細胞質的影響。在葉片部分，Chiou *et al.* (2012)在進行 *B. oleracea* 和 *B. rapa* 的雜交試驗後，確實觀察到兩者正反交的雜交後代在葉片質地及葉色有偏向母本的情形。

本試驗目的，是希望在未來能夠快速地進行雜交種子之鑑別區分，因此主要觀察植株幼年期的性狀表現，期望找出不會因為人住觀判斷不同而有所差異，且足以精確作為區分的性狀，以利之後調查的快速進行。而在試驗中所有雜交組合的雜交後代植株外表性狀，並無偏向母本的情形，但亦無明顯偏向父本的外觀性狀產生。且試驗中觀察植株是於溫室中栽培，未來在自然環境下外表型可能會受環境影響，而導致外觀性狀有不同於在溫室中的表現。因此，在 4 個雜交組合之中，所觀察的植株在幼年期的外觀性狀，無法明確的區分出子代與父母本之差異。

三、以流式細胞儀檢測親代及雜交子代細胞核酸含量差異

在外觀性狀無法區分差異後，接著想利用細胞內核酸含量的不同，找出子代和親本之差異。Halfhill *et al.* (2002)曾以流式細胞儀方式比較 *B. napus* 與 *B. rapa* 雜交後代之細胞核酸含量，結果發現雜交後代核酸含量介於 *B. napus* 與 *B. rapa* 之間(Halfhill *et al.*, 2002)。Chiou *et al.* (2012)也曾在芥藍與油菜

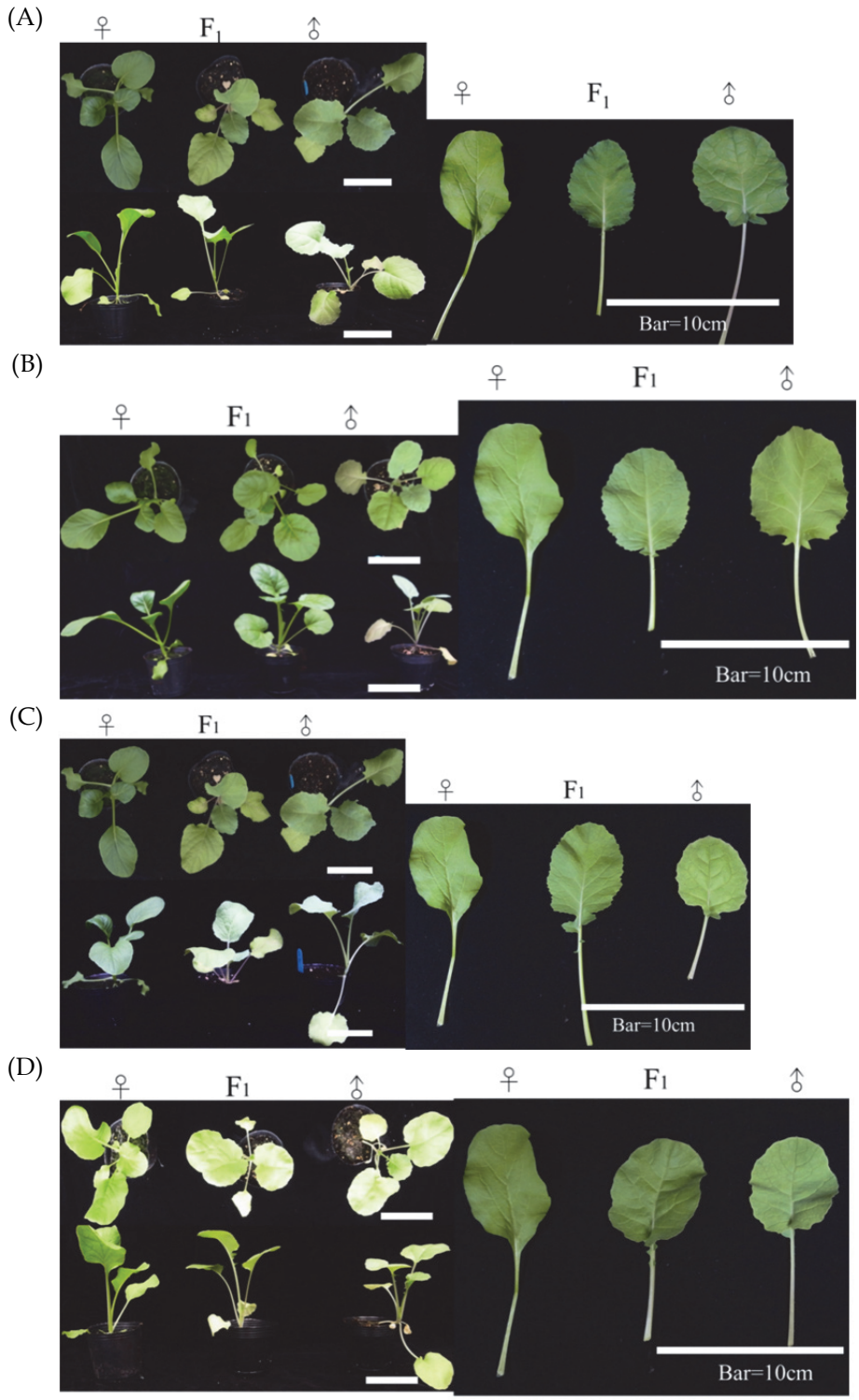


Fig. 2. The plants' front side, upper side, and single leaf comparison between hybrid and parental plant. (A) 'Nongxing 80 days' × 'Wan oil No. 25'. (B) 'Nongxing 80 days' × 'Zhong oil No. 36'. (C) 'Nongxing 80 days' × 'Guiza No. 4'. (D) 'Nongxing 80 days' × 'FTHEB 1001'.

流式細胞儀進行 *B. oleracea* 和 *B. rapa* 雜交後代的鑑別，發現在雜交子代的核酸含量介於兩親本之間。Chiou *et al.* (2012) 在試驗中亦發現 A 基因組與 C 基因組的細胞內核酸含量值相近，估推測 AC 基因組織核酸含量應為 A 基因組之兩倍。*B. rapa* 的染色體數為 20(基因組 AA)，而 *B. napus* 之染色體數為 38(基因組 AACC)，故雜交後代之染色體數應為兩親之一半(染色體數 29)，而細胞內核酸含量也應介於兩者之間。

進行流式細胞儀所得結果如 Fig. 3，由此可明顯觀察到 *B. rapa* 之螢光強度讀值約在 50 與 100，*B. napus* 之螢光強度讀值約在 110 與 220 左右，兩者相差約兩倍。而將子代分析結果放大觀察發現，子代所表示的光譜讀值則約在 70–80 左右(Fig. 4)，所以發現在 4 個以 *B. rapa* 為母本的雜交組合中，所有的雜交子代細胞內的核酸含量皆介於兩親本之間。說明以 *B. rapa*、*B. napus* 以及兩者間的後代，經流式細胞儀進行分析後，在細胞核酸含量上有差異存在。

四、利用 SRAP 分析親本與雜交子代之結果

(一)分析親本基因多型性結果

本研究中所使用的分子標誌 SRAP 由 foreard 和 reverse 兩組引子進行增幅，藉由"CCGG"在 exon 以及"AATT"在 intron 和 promoter 較高的出現機率，能增幅出更多的多型性條帶(Li and Quirous 2001)。對於遺傳背景較接近的兩種作物，能有效區分出基因組變異情形，且高保留性區域 (highly conserved region)在遺傳變異的程度很小。因此，本試驗選擇 SRAP 作為主要使用之分子標誌，希望藉由引子增幅區域主要位於高保留性區域的特性，來區分兩油菜品種 (*B.rapa* and *B. napus*)雜交後代。

同品種的油菜(*B. rapa* and *B. napus*)個體間在基因組內部可能會產生不同程度的差異性，為了掌握在同品種間的所有差異性，先利用 SRAP 分析親本內部的基因多型性，來了解並排除這些差異性對判斷後代雜交與否所造成的影響。

在 *B. napus* 部分，使用了 3 種大陸現有商業用栽培品種，分別為「萬油 25 號」、「中油 36 號」及「貴雜 4 號」，以及臺灣自己育成的「鳳試 1001 號」品種。在「萬油 25 號」為樣本的 SRAP 分析結果觀察，7 組使用的引子組合所得結果中，所有受測樣本間差異皆不大，總共產生 26 個一致性條帶，每個引子組合分析結果都有一致性條帶呈現。其中，使用引子組合 1-5 及 5-1 的分析結果所產生的一致性條帶最多，共有 5 個，而使用引子組合 3-5 的分析結果所觀察到的一致性條帶有兩個為最少的。在「中油 36 號」為樣本的 SRAP 分析結果觀察，7 組引子組合中以 5-3 的一致性條帶數最多，共 6 組，而以所有引子組合共產生 26 個一致性條帶，其餘的多型性條帶在品種間表現差異也不大(Table 2)。

以「貴雜 4 號」為樣本的 SRAP 分析結果觀察，使用的 7 組引子組合的分析結果中，可以發現「貴雜 4 號」的 30 個受測樣本間的差異性比前面 3 個品種的 *B. napus* 受測樣本間的差異大。總共只產生 23 個一致性條帶，而且各引子組合中產生之一致性條帶數目差異不大(Table 2)。

另對臺灣本土育成的「鳳試 1001 號」進行 SRAP 分析結果觀察，使用的 7 組引子組合的分析結果中，一致性條帶分別為，引子組合 1-5 有 1100 bp 、750 bp 、450 bp 、400 bp 等 4 組，引子組合 2-6 有 750 bp 、400 bp 等 2 組，引子組合 3-5 有 1600 bp 、1400 bp 、900 bp 等 3 組，引子組合 3-6 有 1100 bp 、800 bp 、700 bp 、550 bp 等 4 組，引子組合 5-1 有 1100 bp 、1000 bp 、700 bp 、400 bp 等 4 組，引子組合 5-3 有 1300 bp 、1000 bp 、900 bp 、450 bp 等 4 組，引子組合 5-6 有 1000 bp 、800 bp 、550 bp 、450 量的條帶產生，而以引子組合 2-6 所觀察到

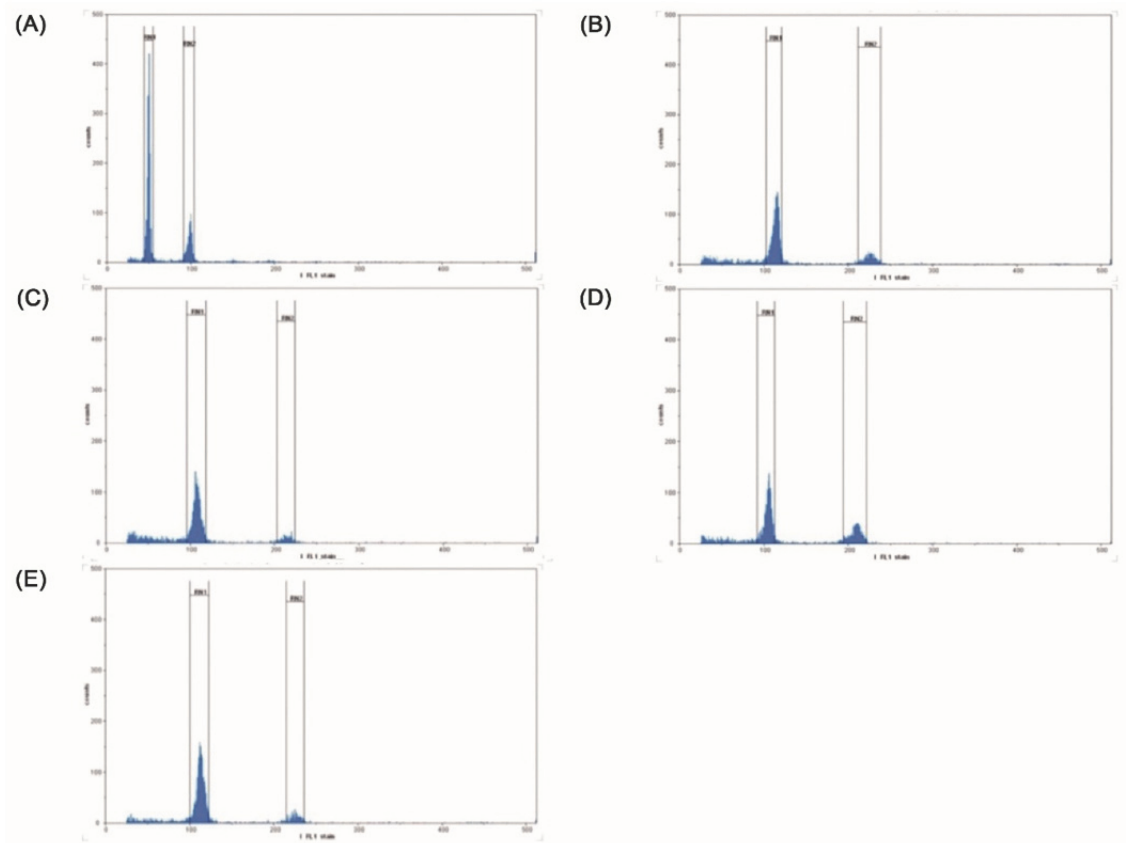


Fig. 3. The flow cytometry data of *B. rapa*. (A) 'Nongxing 80 days'. The flow cytometry data of *B. napus*. (B) 'Wan oil No. 25', (C) 'Zhong oil No. 36', (D) 'Guiza No. 4', and (E) 'FTHEB 1001'.

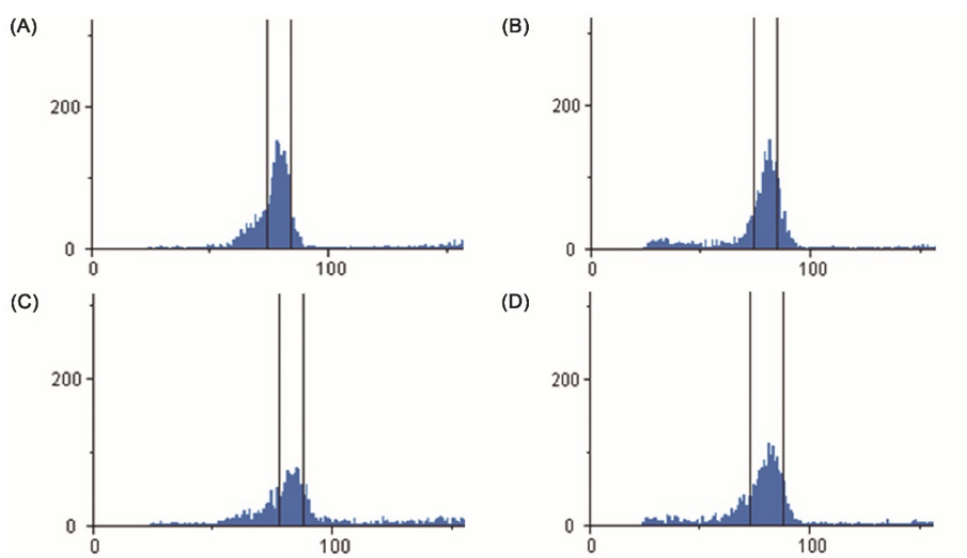


Fig. 4. The chromosome analysis of 15 hybrid groups by using flow cytometry. (A) 'Nongxing 80 days' × 'Wan oil No. 25'. (B) 'Nongxing 80 days' × 'Zhong oil No. 36'. (C) 'Nongxing 80 days'×'Guiza No. 4'. (D) 'Nongxing 80 days' × 'FTHEB 1001'.

的一致性條帶最少，其餘的引子組合分析結果，在所選擇的 30 個樣本間的基因歧異度很小，比其他 4 種 *B. napus* 品種的品種內部 SRAP 歧異度低(Table 2)。

觀察「農興 80 天」的 SRAP 分析結果，共有 13 個可清楚辨識的一致性條帶，其中以引子組合 5-3 最多，引子組合 3-5 沒有發現。以上所得到的分析結果，將會在子代分析中使用，來觀察子代與親代差異之處(Table 2)。

Table 2. Using different SRAP primers to analyze *B. napus* and *B. rapa*.

No.	*B. rapa*	*B. napus*			
	Nongxing 80 days	Wan oil No. 25	Zhong oil No. 36	Guiza No. 4	FTHEB 1001
1-5-1500	0	*	7	7	28
1-5-1100	*	*	*	*	*
1-5-900	27	*	19	*	0
1-5-750	0	0	*	*	*
1-5-450	17	*	*	6	*
1-5-400	*	20	21	0	*
2-6-1000	0	*	*	*	0
2-6-750	0	*	21	*	*
2-6-600	*	*	*	22	25
2-6-400	*	*	*	*	*
3-5-1600	0	*	*	*	*
3-5-1400	0	*	0	*	*
3-5-900	10	27	*	*	*
3-6-1100	0	*	*	*	*
3-6-900	*	*	0	26	0
3-6-800	17	20	3	26	*
3-6-700	0	*	*	*	*
3-6-550	23	27	*	*	*
3-6-400	*	*	10	24	0
3-6-350	10	28	*	0	0
5-1-1100	20	28	*	*	*
5-1-1000	*	*	*	29	*
5-1-900	11	*	*	5	0
5-1-700	13	*	27	26	*
5-1-550	*	28	*	*	29
5-1-500	0	0	4	*	0
5-1-400	0	0	*	28	*
5-3-1300	0	*	*	*	*
5-3-1200	27	28	21	27	29
5-3-1000	*	*	*	27	*
5-3-900	0	*	*	*	*
5-3-700	*	27	*	*	25
5-3-600	0	*	*	*	26
5-3-450	*	*	*	*	*
5-6-1000	0	*	*	*	*
5-6-800	25	*	*	*	*
5-6-550	*	*	*	*	*

* Means all of the samples (30) show the same bands. The number means how much sample show that bands.
* The No. 1-5-1500 means we use primer pairs 1-5 to analyze our sample and the polymorphism bands show at 1500 bp.

分別就 *B. napus* 以及 *B. rapa* 的觀察結果，發現 *B. napus* 和 *B. rapa* 皆出現的條帶分別是引子組合 1-5 的 1100 bp、引子組合 2-6 的 400 bp 及引子組合 5-3 的 450 bp 等 3 組；而只有在 *B. napus* 出現而 *B. rapa* 未出現的條帶有 4 組，分別是引子組合 3-6 的 1100 bp 及 700 bp、引子組合 5-3 的 1300 bp 及 600 bp。上述所有的一致性條帶將會在雜交子代用於與親本比對，找出親代與子代的差異性。

(二)分析子代正交之多型性結果

試驗結果以不同引子組合對 4 種以 *B. rapa* 為母本的雜交組合分別進行討論，所使用引子組合包含 1-5、2-6、3-5、3-6、5-1、5-3、5-6 等 7 組。

首先，先對以引子組合 1-5 分析的 4 個雜交組合討論並整理成表(Table 3)。觀察以「農興 80 天」為母本的 4 個雜交組合，只有 1 個組合觀察到可用以辨別的條帶，與「萬油 25 號」的雜交組合中在約 1500 bp 的位置。再利用引子組合 2-6 分析 4 個雜交組合後，將分析結果將整理成表(Table 3)觀察，發現 4 個雜交組合在約 750 bp 的位置皆有出現可辨別的多型性條帶。在使用的第三組引子組合 3-5 分析的結果，並整理成表後觀察 (Table 3)，在約 1,600 bp 的位置 4 個雜交組合皆有條帶呈現。

觀察使用的第四組引子組合 3-6 的分析結果，整理成表(Table 3)比較。在對「農興 80 天」為母本的雜交組合進行觀察，發現在 4 個雜交組合中只有與「貴雜 4 號」的雜交組合在約 1,100 bp 的位置沒有出現可辨別條帶；與「中油 36 號」雜交的組合在約 700 bp 的位置沒有出現可辨別條帶。而與「貴雜 4 號」和「鳳試 1001 號」雜交的組合中則在約 450 bp 的位置有出現另一個可辨別條帶。與「鳳試 1001 號」雜交的組合中，在約 1,400 bp 的位置還有一個可辨別條帶。

使用引子組合 5-1 所分析的結果中(Table 3)，對以「農興 80 天」為母本的雜交組合進行整理，在與「萬油 25 號」雜交的組合中，只在約 700 bp 的位置有可辨別條帶；與「中油 36 號」雜交的組合中，在約 900 bp 的位置有可辨別條帶；與「貴雜 4 號」的雜交組合中，有約 700 bp 及 500 bp 的位置有兩個可辨別條帶；與「鳳試 1001 號」雜交的組合中，在 400 bp 的位置有一個可辨別條帶。

Table 3. The 4 hybrid groups analysis based on maternal plant (*B. rapa*) applying with different SRAP primer pairs.

No.	Hybrid			
	Nongxing 80 days × Wan Oil No. 25	Nongxing 80 days × Zhong Oil No. 36	Nongxing 80 days × Guiza No. 4	Nongxing 80 days × FTHEB 1001
1-5-1500	*			
2-6-750	*	*	*	*
3-5-1600	*	*	*	*
3-6-1400				*
3-6-1100	*	*		*
3-6-700	*		*	*
3-6-450			*	*
5-1-900		*		
5-1-700	*		*	
5-1-500			*	
5-1-400				*
5-3-1300	*	*	*	
5-3-900	*	*	*	*
5-3-600	*			*

* Means of the bands which can be used to identify the F_1 hybrids.

整體來說，再利用引子組合 5-1 對以「農興 80 天」為母本的雜交組合的分析結果中所呈現的可辨別條帶雖少，但仍然有可供辨別的條帶。

以引子組合 5-3 對 4 個雜交組合分析的結果，整理成表(Table 3)後觀察發現，所呈現的可辨別條帶位置皆位於約 1,300 bp、900 bp 及 600 bp 的位置，在約 1,300 bp 的位置，只有「農興 80 天」×「鳳試 1001 號」雜交組合未呈現；在約 900 bp 的位置 4 組雜交組合皆有呈現；在約 600 bp 的位置則有「農興 80 天」×「中油 36 號」和「農興 80 天」×「貴雜 4 號」的雜交組合中未有可辨別條帶出現。與其餘引子組合相較，引子組合 5-3 所呈現的可辨別條帶幾乎一致，每個雜交組合至少可以找到個可辨別條帶。最後，整理以引子組合 5-6 對 4 個雜交組合分析的結果，引子組合 5-6 在所選擇的 7 組引子組合中，並無可辨別條帶呈現。

綜合觀察所有的引子組合所分析的雜交組合的結果之後，發現在引子組合 5-6 並無可辨別條帶呈現，而觀察雜交組合的分析結果，除了在引子組合 2-6 和 5-6 之外其餘引子組合在 4 個雜交組合中，在 1,000 bp 以上皆有可辨別的條帶呈現；其餘在約 700–800 bp 的位置也有可辨別的條帶產生，但因為 *B. rapa* 在附近也有條帶出現，所以在判讀上面可能會因為膠圖判讀上產生誤判。而引子組合 5-6 在 15 個雜交組合中只有兩個雜交組合出現可判斷條帶，因此之後可以不採用此引子組合進行雜交後代的辨別。根據整理，在與 *B. napus* 品種雜交組合分析結果中，可直接觀察在 1,000 bp 以上有無可辨別的多型性條帶存在，即可初步判斷是否為雜交子代。若無，再觀察其餘的多型性條帶。

(三)分析子代反交之多型性結果

以 4 種 *B. napus* 品種為母本進行雜交，並以上述試驗中所使用的 7 組引子中的 3 組引子組合 1-5、2-6、5-1 分析，用以判斷是否會與 *B. rapa* 為母本和以 *B. napus* 為父本之雜交子代具有差異。

以引子組合 1-5 的分析結果觀察，以 *B. rapa* 為母本的 4 個雜交組合中，與親本所比對出的可辨別多型性條帶，再與以 *B. napus* 為母本的雜交組合比對後，有相同的多型性條帶呈現，而且其餘多型性條帶呈現情形也一致。接著整理引子組合 2-6 所的到的結果，正反交組合呈現結果皆一致。最後，觀察以引子組合 5-1 的分析結果，所有組合在正反交的結果呈現的多型性條帶皆一致(Fig. 5)。

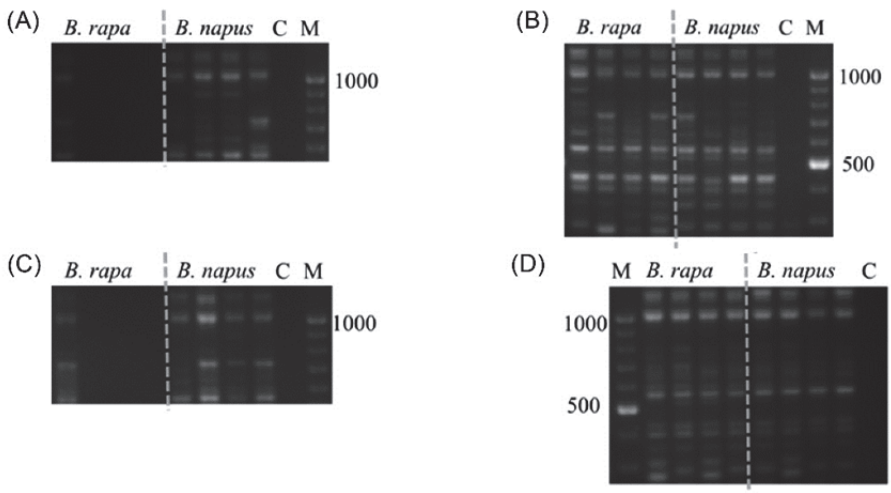


Fig. 5. Using SRAP primer pairs 5-1 to analyze the reciprocal cross hybrids from 4 hybrid groups. (A) 'Nongxing 80 days' × 'Wan oil No. 25'. (B) 'Nongxing 80 days' × 'Zhong oil No. 36'. (C) 'Nongxing 80 days' × 'Guiza No. 4'. (D) 'Nongxing 80 days' × 'FTHEB 1001'.

本研究在進行雜交成功後，收集到雜交後代，並對雜交後代與親本的差異進行探討。先從外觀性狀觀察，發現並無可以清楚界定親代與子代的性狀，因此想從細胞的角度進行分析。在流式細胞儀的分析結果中，兩親代跟雜交子代之間有明顯的差別出現，進一步應用分子標誌，也發現可以用以區分雜交子代的條帶。而用以辨別的條帶，在正反交的結果中並無改變。在研究中能以流式細胞儀直接鑑別雜交後代，並可以 SRAP 進行確認，而未來更可以應用其餘 SRAP 引子組合發掘更多親本跟子代相異的條帶，並進一步產製專一性引子分析雜交後代。

引用文獻

Adams KL, JF Wendel (2005) Novel patterns of gene expression in polyploid plants. **Trends Genet.** 21:539–543.

Canadian Food Inspection Agency (1994) The Biology of *Brassica napus* L. (Canola/Rapeseed). Report No. Regulatory Directive Dir 94–09.

Chiou CC, TK Lin, CY Lin, CN Hsia, ST Wang (2012) Identification of interspecific hybrids from crosses between *Brassica oleracea* and *B. campestris*. (in Chinese with English abstract) **J. Taiwan Agric. Res.** 61:52–63.

Ferriol M, B Pico, F Nuez (2003) Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbit pepo* using SRAP and AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 107:271–282.

FitzJohn RG, TT Armstrong, LE Newstrom-Lloyd, AD Wilton, M Cochrane (2007) Hybridisation within Brassica and allied genera: evaluation of potential for transgene escape. **Euphytica** 158:209–230.

Forrest LL, M Hughes, PM Hollingsworth (2005) A phylogeny of begonia using nuclear ribosomal sequence data and morphological characters. **Syst. Bot.** 30:671–682.

Fu LZ, HY Zhang, XQ Wu, HB Li, HL Wei, QQ Wu, LA Wang (2010) Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD, ISSR and SRAP markers. **World J. Microb. Biot.** 26:709–716.

Halfhill MD, RJ Millwood, PL Raymer, CN Stewart (2002) Bt-transgenic oilseed rape hybridization with its weedy relative, *Brassica rapa*. **Environ. Biosafety Res.** 1:19–28.

Hong H, TK Lin, YK Du, BJ Kuo (2016) Identifying the F_1 hybrids of the simulated GM *Brassica napus* and *Brassica rapa*. (in Chinese with English abstract) **Crop Environ. Bioinform.** 13: 53–66.

Howell EC, GC Barker, GH Jones, MJ Kearsey, GJ King, EP Kop, CD Ryder, GR Teakle, JG Vicente, SJ Armstrong (2002) Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. **Genetics** 161:1225–1234.

Koo DH, P Plaha, YP Lim, Y Hur, JW Bang (2004) A high-resolution karyotype of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* revealed by pachytene analysis and multicolor fluorescence in situ hybridization. **Theor. Appl. Genet.** 109:1346–1352.

Li G, CF Quirous (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.

Liu XP, JX Tu, BY Chen, TD Fu (2005) Identification and inheritance of a partially dominant gene for yellow seed colour in *Brassica napus*. **Plant Breed.** 124:9–12.

Lu Y, X Liu, S Liu, Y Yue, C Guan, Z Liu (2012) A simple and rapid procedure for identification of seed coat colour at the early developmental stage of *Brassica juncea* and *Brassica napus* seeds. **Plant Breed.** 131:176–179.

Nagaharu U (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. **Japan. J. Bot.** 7:389–452.

Phothipan S, B Silayoi, K Wanichkul, S Apisitwanich (2005) Genetic relationship among bananas in AA, AAB and BB groups using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence related amplified polymorphism (SRAP) techniques. **Kasetsart J.** 39:703–710.

Plieske J, D Struss (2001) Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae species*. **Theor. Appl. Genet.** 102: 689–694.

Raina SN, V Rani, T Kojima, Y Ogihara, KP Singh, RM Devarumath (2001) RAPD and ISSR fingerprinted a useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relation shop in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and field

species. **Genome** 44:763–772.

Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers–just a matter of fashion? **Nat. Rev. Genet.** 5:63–69.

Schulman AH (2007) Molecular markers to assess genetic diversity. **Euphytica** 158:313–321.

Suwabe K, H Iketani, T Nunome, T Kage, M Hirai (2002) Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. **Theor. Appl. Genet.** 104:1092–1098.

Treu R, J Emberlin (2000) Pollen dispersal in the crops maize (*Zea mays*), oil seed rape *(Brassica napus* ssp *oleifera*), potatoes (*Solanum tuberosum*), sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) and wheat (*Triticum aestivum)*. National Pollen Research Unit, University of Worcester, UK. 54pp.

Vos P, R Hogers, M Bleeker, M Reijans, T van de Lee, M Hornes, A Friters, J Pot, J Paleman, M Kuiper (1995) AFLP:A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23:4407–4414.

Warwick SI, MJ Simard, A Légère, HJ Beckie, L Braun, B Zhu, P Mason, G Séguin-Swartz, CN Stewart Jr. (2003) Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. **Theor. Appl. Genet.** 107:528–539.

Welsh J, M McClelland (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** 18:7213–7218.

Xiong Z, JC Pires (2011) Karyotype and identification of all homeologous chromosomes of allopolyploid *Brassica napus* and its diploid progenitors. **Genetics**187:37–49.

Xu J, X Qian, X Wang R Li, X Cheng, Y Yang, J Fu, S Zhang, GJ King, J Wu, K Liu (2010) Construction of an integrated genetic linkage map for the A genome of *Brassica napus* using SSR markers derived from sequenced BACs in *B. rapa*. **BMC Genome.** 11:594.

Zietkiewicz E, A Rafalski, D Labuda (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20:176–183.

－編輯：楊純明