

大、小油菜與野生近緣種薺菜、蔊菜及葶藶之基因流動風險評估¹

沈雅鈞²

摘 要

本研究為進行基因改造油菜發生垂直基因流動之可能性，將大油菜(*Brassica napus* L.)品種臺中特 1 號、小油菜(*Brassica rapa* L.)地方收集品系農興 80 天、農興 90 天分別和十字花科(Brassicaceae)近緣野生物種進行人工雜交試驗，選擇臺灣地區常見野生雜草，如薺菜(*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic)、蔊菜(*Cardamine flexuosa* With.)、葶藶(*Rorippa indica* (L.) Hiern)等作為評估對象，試驗結果發現雜交的可能性皆小於 0.67% (1/150)。進一步進行模擬田間栽培試驗，將農興 80 天與薺菜栽培於同一環境下開放自然授粉，試驗結果發現兩者自然授粉率小於 0.5% (1/200)。推論雖物種間具有自然生殖隔離現象，亦不排除發生雜交的可能性，但根據試驗結果，認為大、小油菜與近緣野生物種薺菜、蔊菜及葶藶自然雜交發生垂直基因流動的可能性偏低，若要有效進行基因改造油菜之管理，相關管控方式和流程仍必須建立。本研究提供基因改造油菜發生垂直基因流動評估與大、小油菜雜交近緣野生物種之相關資訊。

關鍵詞：十字花科、基因改造、共存、花粉飄散、屬間雜交

前 言

一、基因改造油菜現況

根據國際農業生物技術應用推廣協會(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA)統計 2017 年全球基因改造作物(genetically modified crop)(以下簡稱基改作物資料)，全世界目前共有 24 個國家種植基改作物；世界總種植

¹ 行政院農業委員會桃園區農業改良場研究報告第 511 號。

² 桃園區農業改良場助理研究員(通訊作者，usagi3662@mail.afa.gov.tw)

面積達 189 mha 且有持續增加的現象；主要種植的作物為大豆(soybean)、棉花(cotton)、玉米(maize)及油菜(canola)；主要栽種國家為美國(USA)、巴西(Brazil)、阿根廷(Argentina)及加拿大(Canada)(總栽種面積依序各為 75、50、23 及 13 mha)，相當於世界總種植面積之 85%；主要改造項目為雙抗(抗殺草劑 herbicide tolerance、抗蟲 insect resistance) 40%、抗殺草劑 16%、作物品質(product quality)13%及抗蟲 12%等(ISAAA, 2018)。

目前世界基改油菜總種植面積為 56 mha (佔總栽種面積的 30%)，共有 41 個品項，主要為抗除草劑與混合型之品項，而目前在臺灣已申請核准進口者，包括耐嘉磷塞 GT73、73496、耐除草劑 RF3、MS8、RF3 × MS8、耐草甘膦 MON88302、混合抗性 MS8 × RF3 × GT73、MON88302 × RF3、MON88302 × MS8 × RF3 等 9 個基因改造油菜品項(衛生福利部食品藥物署核可基因改造食品查詢網站，統計至 2018 年 7 月)，但截至目前尚未有任何基改品項被核准田間栽種。

二、種植基因改造油菜可能產生之環境議題

垂直性基因轉移(vertical gene transfer)或垂直基因流動(vertical gene flow)是指基因型不同的兩種活體物種或族群之間，以有性的方式發生基因轉移之現象；而這種基因垂直性的轉移現象，能在油菜種間或是在種對其他野生物種間發生(Devos *et al.*, 2004)。種植基改油菜最主要的問題就在於基因流動(gene flow)，轉基因(transgene)片段可能藉由花粉飄散(pollen dispersal)汙染到非基改油菜、油菜野生族群或其他近緣物種，也就是發生基因改造的垂直性汙染事件；也可以藉由種子散佈(seed dispersal)汙染到其他田區或野地，造成轉基因逃逸(transgene escape)之現象(Beckie *et al.*, 2003；Messeguer, 2003)。基改油菜發生轉基因流動時，最主要問題在於可能導致其接受親(recipient parent)的適應力增強或改變，因此，可能會導致某物種或族群的大量繁殖或適應性變化，進而影響其他物種生存、改變物種多樣性以及改變原棲地生態系統等環境議題(Bauer-Panskus *et al.*, 2013；Gueritain *et al.*, 2002；Song *et al.*, 2010；Warwick *et al.*, 2003)。

油菜花粉污染方面，由於油菜主要的授粉方式為蟲媒(蜜蜂為主)與風媒，因此，花粉會隨著昆蟲的飛行而飄散；再者風向是多變化的，其所產生的氣旋也可能讓花粉達成遠距離飄散，有時也可以經由物理接觸(人類或動物等)將花粉傳送到其他植株上(Rieger *et al.*, 2002；Hüsken and Dietz-Pfeilstetter, 2007)。國際間對於花粉飄散議題之研

究相當頻繁，但由於雜交率的評估非常複雜，因涉及到試驗田區設計方式、貢獻親(donor parent)與接受親的數量、密度、環境因素、植株的生長情形、開花期、授粉昆蟲的活動、試驗當地氣候及地形等問題，其中又是否具有交感作用等，使得花粉飄散難以設置一個標準化的評估方式(Devos *et al.*, 2009; Hüsken and Dietz-Pfeilstetter, 2007; Ronca *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018)。

油菜種子污染方面，由於油菜種子具有休眠性，若採收時掉落於田間，可能之後的數年都可以發現油菜的蹤跡(Lutman *et al.*, 2002)；而且油菜種子輕又小，可以藉由風和動物短距離的傳送，也可能在收穫時散落到鄰近田區(Munier *et al.*, 2012)，也可能在運輸的過程掉落而沿途污染整個路線；甚至在進出口時被夾帶，造成跨國傳送污染等問題(Hecht *et al.*, 2014; Nishizawa *et al.*, 2009; Pascher *et al.*, 2017; Schulze *et al.*, 2015)。

有鑑於基改作物可能帶來之環境衝擊，世界各國均相當重視基改與非基改作物之間的共存(co-existence)栽培問題，進行許多相關之花粉飄散、基因流動、種內(間)雜交等試驗，以求建立適合當地之共存管理模式。近年來國際間不時有傳出基改油菜轉基因逃逸的案例，如 2010 年加拿大田埂和鐵路旁發現到轉基因流動至野生油菜(Knispel and McLachlan, 2010)、2011 年日本在河岸邊發現殺草劑抗性的油菜雜交種(Aono *et al.*, 2011)、2016 年德國油廠附近檢測出基改油菜種子(Franzaring *et al.*, 2016)等案例。基改油菜相關的管理制度是需要持續被評估與建立的，其中防範轉基因流動之可能性產生為重點之一。

三、油菜與其他物種雜交可能性

油菜英文名稱為 oilseed、oilseed rape、rapeseed 或 canola 等，為芸苔屬(*Brassica*)的常異交作物，自然異交率約為 20%-40% (Becker *et al.*, 1992)。幾個前人研究中曾統整了大油菜(*B. napus*)與芸苔屬物種之小油菜(*B. rapa*, syn. *B. campestris* L.)、*B. juncea* L. (Czern)、*B. oleracea* L.、*B. nigra* (L.) W. D. J. Koch、*B. fruticulosa* Cyr.、*B. tournefortii* Gouan、*B. maurorum* Durieu 及 *B. carinata* A. Braun，另外如一些近緣物種，如 *Hirschfeldia incana* (L.) Lagr.-Foss.、*Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz、*Raphanus raphanistrum* L.、*Raphanus sativus* L.、*Sinapis arvensis* L.、*Sinapis alba* L.、*Diplotaxis muralis* (L.) DC.、*Diplotaxis eruroides* (L.) DC.及 *Diplotaxis catholica* (L.) DC.等之正反交、自然雜交、可獲得種子量、後代回交親本、漸滲雜交(introgressive hybridization)或

雜交風險等級等結果(Devos *et al.*, 2009 ; Eastham and Sweet, 2002 ; Liu *et al.*, 2013 ; OECD, 2012 ; Warwick *et al.*, 2003), 可以得知大油菜與許多物種雜交具有親和性 ; 因此存有不同程度的基因流動可能性, 其中與小油菜雜交最是無礙, 也因此基因流動風險等級被視為最高。

大油菜和小油菜習慣上統稱為油菜, 前人研究發現大油菜是從小油菜和甘藍(*B. oleracea*)雜交而來的異源四倍體(allotetraploid) (Qiao *et al.*, 2016), 且大、小油菜兩物種要從外觀來區分確實有難度(Hong *et al.*, 2016a ; Luijten and Jong, 2010), 以分子檢測分析基因組可能是最有效的區分方式(Hong *et al.*, 2016b)。然而兩物種間自然雜交無礙(Jong *et al.*, 2018), 物種間發現到有基因流動的現象, 且不論以自然或是人工授粉的方式, 皆可以獲得大量具有稔性之後代(Johannessen *et al.*, 2006); 後代也可再回交親本, 而且不論是栽培種或野生種均可雜交, 甚至在自然環境中也可發現到雜交而來的後裔或漸滲雜交種, 物種之漸滲雜交種形成兩者間基因轉換的穩定態(Hansen *et al.*, 2001 ; Qian *et al.*, 2006)等現象, 均已被學者們所驗證。

四、臺灣油菜現況與其近緣物種

大、小油菜有許多變種和亞種, 包括 *B. napus* var. *napobrassica* (L.) Rchb.、var. *pabularia* (DC.) Rchb.、subsp. *campestris* (L.) A. R. Clapham、subsp. *oleifera* (DC.) Metzg.、subsp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt、subsp. *dichotoma* (Roxb.) Hanelt、subsp. *chinensis* (L.) Hanelt、subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt、subsp. *nipposinica* (L. H. Bailey) Hanelt、*B. rapa* subsp. *rapa* (L.)等(OECD, 2012), 這些物種也包括油菜、小白菜、蕪菁及甘藍等一些常見的食用蔬菜。在臺灣, 大油菜品種有臺中特 1 號、臺中選 2 號、臺中 3 號、新竹特 1 號、新竹 1 號、桃園 3 號及桃園 4 號等可作為榨油和蔬菜用, 小油菜有綠肥用之地方收集品系農興 80 天與農興 90 天等。現今農民慣於二期作採收後或二期作休耕期, 種植小油菜作綠肥或觀賞用途, 也有少量栽培葉用油菜或其他近緣食用作物之習慣。在臺灣野外常見的野生近緣物種, 舉凡全境低海拔地區常能發現的薺菜(*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic)、蔊菜(*Cardamine flexuosa* With.)或是蔊蔊(*Rorippa indica* (L.) Hiern)等(Bailey *et al.*, 2006), 皆屬於十字花科(Brassicaceae)的物種。在臺灣薺菜、蔊菜及蔊蔊生長的季節約為每年 12 月跨到隔年 5 月之間, 這段栽種期間恰逢油菜冬季裡作或短期蔬菜栽培的季節, 開花期亦會有所重疊, 由於這些野生近緣物種的親緣關係、生長環境、植株形態及開花期等均與油菜相近, 因此不排除發生垂直性汙染的可能性。

有鑑於此，本研究以臺灣非基因改造的油菜栽培種與常見的十字花科近緣野生物種進行屬間雜交(intergeneric cross)，作為垂直基因流動評估試驗，提供臺灣油菜共存栽培或油菜與野生物種雜交研究等相關之參考資料。

材料方法

一、試驗材料蒐集與選育

試驗蒐集非基因改造之大油菜栽培種臺中特 1 號、小油菜綠肥用之地方收集品系農興 80 天及農興 90 天種子，於 2014 年 10 月份在本場生技研究室隔離溫室中進行育苗。將油菜栽培種種子播種後栽培 20 日，選本葉達 4 片葉者移植至 2.5 吋盆各 30 株，進行 4℃春化處理 15 日，移至隔離溫室中觀察抽苔情形並進行授粉作業。同時於 2015 年 2 月在本場試驗田間蒐集到野外近緣物種薺菜(圖 1A)及於田溝內蒐集到蔊菜(圖 1B)，以及在新北市低海拔山區蒐集到蔊蔊(圖 1C)之族群，選生長勢強健、無病蟲害且已開花植株各 30 株，移植至隔離溫室的 2.5 吋盆中，以利進行試驗。2015 年 10 月以同樣方式進行農興 80 天育苗並於 2016 年 2 月採集野生薺菜。

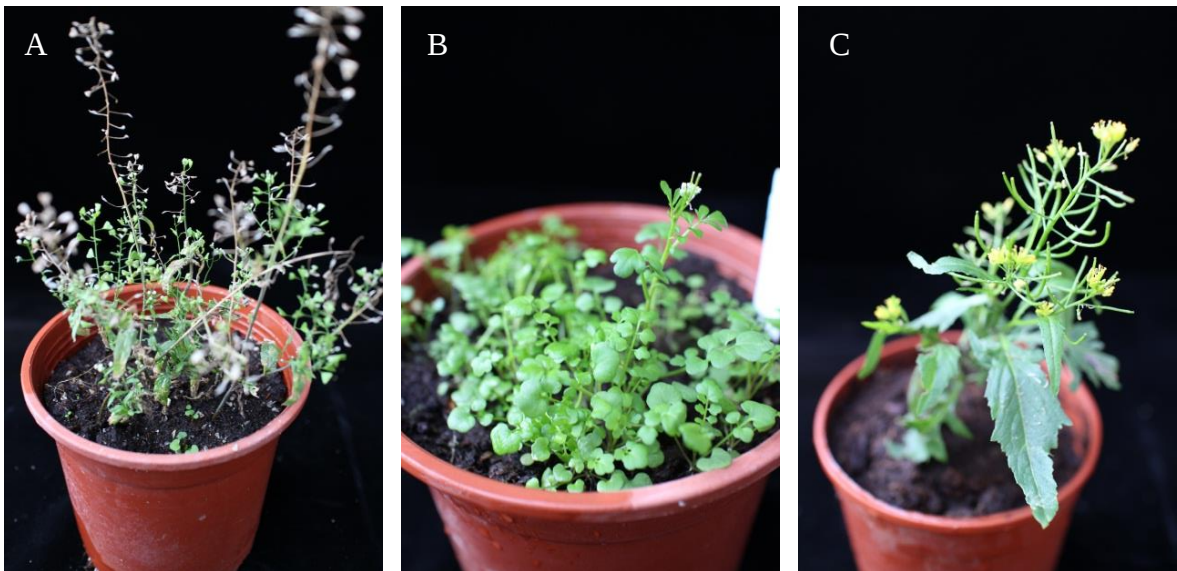


圖 1. 野生十字花科近緣物種移植後單株情形。A 為薺菜，B 為蔊菜，C 為蔊蔊

Fig. 1. The wild Brassicaceae relative species after transplanting. A: *Capsella bursa-pastori*, B: *Cardamine flexuosa* and C: *Rorippa indica*.

本次試驗中近緣種調查路線為大臺北地區、桃園市、新竹縣及苗栗縣，未往中南部調查，以縣市為單位，每縣市取兩個行政區為代表尋找近緣種族群，每一族群取 30 株植株做調查，共調查 10 個族群。觀察發現薺菜的分布範圍廣，栽培田間、道路旁都可發現蹤跡，通常一個族群的個體數量多，且族群內開花較為一致，故不難發現，通常在結莢後會慢慢枯黃，種子掉落後越年才會再萌發；蔊菜在田溝邊、較陰涼潮溼之處幾乎全年可見，只是生長勢與族群大小有所差異，春季生長勢與族群大小較夏季佳，種莢與油菜一樣成熟後容易自然開裂；蔊蔊在低海拔山區發現，生長環境為陽光充足的溪水旁或田區水分充足之陰涼處，與其他試驗材料相比，其外觀與油菜最為相近；開花期方面，薺菜約在 2-5 月間，蔊菜約在 2-9 月間，蔊蔊為 12 月至隔年 8 月間(表 1)，植株性狀與台灣植物誌第二版記載資料相符(Ying, 1996)。而油菜栽培種大約播種後 3 個月會開始抽苔，其中小油菜地方收集品系農興 80 天約播種後 80 天、農興 90 天約播種後 90 天、大油菜栽培種臺中特 1 號約播種後 100 天開始抽苔，臺灣北部地區裡作油菜的開花期間受當年氣候狀態會影響，最早約 1 月開花，2-3 月會盛開，至 4 月就會凋謝殆盡。本次試驗考量移植距離與族群數量採集本場試驗田間與新北市低海拔山區蒐集到野生近緣物種薺菜、蔊菜及蔊蔊作為試驗之樣本。

表 1. 十字花科近緣物種地方收集系之基本資料

Table 1. The information of Brassicaceae wild relative regional line.

中文名稱	薺菜	蔊菜	蔊蔊
學名	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medic	<i>Cardamine flexuosa</i> With.	<i>Rorippa indica</i> (L.) Hiern
別名	薺、扇子草、護生草、菱開菜、牧人的錢包	蔊菜、細葉碎米薺、小葉碎米薺、彎曲碎米薺	印度蔊菜、野油菜、山芥菜、水芥菜
分類地位	十字花科、薺屬(<i>Capsella</i>)	十字花科、碎米薺屬(<i>Cardamine</i>)	十字花科、蔊蔊屬(<i>Rorippa</i>)
植株特性	越年生草本，莖直立，平均株高 26.7 ^a cm，葉叢生，具長柄，倒卵形、羽狀深裂或為不規則粗鋸齒狀，頂端裂片三角形或卵狀披針形，花白色，總狀花序，果為短角果	多年生草本，莖直立，平均株高 17.8 ^b cm，葉互生，羽狀分裂，花白色，總狀花序，果為長角果	多年生草本植物，莖直立，平均株高 32.4 ^c cm，葉互生，琴形或長橢圓狀披針形，葉緣不規則鋸齒狀，花黃色，總狀花序，果為長角果
分佈	臺灣全島低、中海拔皆常見	臺灣全島低、中、高海拔皆常見	臺灣全島低海拔常見
開花期	2-5 月	2-9 月	12 月至次年 8 月

註：1. a,b,c 根據 2015 年調查盛花期地方收集系之單株平均資料。

2. 本表概況參考台灣植物誌第二版。

Note: 1. According to the average data of individual plants at the flowering period in 2015.

2. The character profiles are referred to CRUCIFERAE. Flora of Taiwan, second edition.

二、模擬垂直性基因流動評估(十字花科作物-近緣野生物種雜交)

(一) 人工授粉

於 2014 年 10 月份在本場生技研究室隔離溫室中進行育苗，開花期將每個物種各別選拔生長勢強健、無病蟲害且開花一致之植株 15 株作為試驗組，每個組合皆進行正反交，並以同樣方式再各別選 15 株作為對照組進行種內個體雜交(表 2)。授粉前先將花朵套袋以免汙染，授粉當日選擇母本約一兩日後會開放的花苞，去除花瓣和雄蕊，取父本中當日開放花朵之花粉，授於母本未開放花苞之柱頭上，之後套袋及標記日期，最後去除其他花朵及未分化之花序，每株植株皆各做 10 朵花，最後每個組合可獲得 150 朵試驗樣本。

表 2. 人工雜交授粉結莢情形

Table 2. The result of artificial hybrid pollination.

父本/母本	薺菜	蔊菜	葶蔞	農興 80 天	農興 90 天	臺中特 1 號
薺菜	O	-	-	△	△	△
蔊菜	-	O	-	X	X	X
葶蔞	-	-	O	X	X	X
農興 80 天	X	X	X	O	-	-
農興 90 天	X	X	X	-	O	-
臺中特 1 號	X	X	X	-	-	O

註：O 表有種子產生，△表果莢發育不良或黃化萎凋，X 則表示無。

Note: O means seeds were produced, △ means pods dysplasia or yellowing withered and X means no seeds.

(二) 網室模擬開放授粉

試驗分別於 2014、2015 年 10 月在本場生技研究室隔離溫室中進行育苗，試驗選擇農興 80 天與薺菜作為模擬試驗之對象，將栽培種育苗後，選本葉達 4 片葉之植株 1,000 株定植於本場蔬菜研究室之簡易塑膠網室，近緣物種自本場田溝間採集 1,000 株並進行移植。簡易塑膠網室設施全長 25 m，寬 6 m，為東北、西南走向，定植前按慣行農法施用基肥，整地後做 4 畦，每畦種植 2 行油菜、1 行近緣物種，模擬田間栽培情形，試驗組為農興 80 天與薺菜各 1,000 株，對照組各 200 株，同樣栽培於網室中，唯加設隔離網進行隔離，於開花期間施放蜂箱授粉(圖 2)，觀察結莢情形並收穫種子。收穫種子時，選擇花序較上位之種莢，每株採收 3 莢，最後將種子混合在一起，取其中 200 粒種子播種栽培，進一步觀察是否有外表形介於兩親之間的雜交個體。



圖 2. 小油菜與薺菜網室模擬與開放授粉情形。

Fig. 2. The field cultivation and open pollination of *B. rapa* and *C. bursa-pastori* in insect screen nets.

(三) 後代外表型評估

於同年秋季將收穫之子代與親本種子種植於盆栽之中，等植株成長至約 5、6 片葉齡時進行外形比較，觀察植株大小、葉片形狀及葉緣有無鋸齒狀等特徵，再待至開花期間，觀察花朵顏色、大小等特徵。

結果與討論

一、油菜栽培種與野生近緣物種間人工授粉

試驗組人工授粉後，皆未獲得能成活雜交種個體(表 2)，授粉後所有雜交組合皆出現花朵逐漸乾枯與未成功結莢的現象，惟農興 80 天 × 薺菜、農興 90 天 × 薺菜及臺中特 1 號 × 薺菜曾出現莢果發育不良或自然黃化萎凋等現象；反之，對照組人工授粉後，結莢情形良好，果莢乾燥後可獲得能生長發育之正常種子，子代外觀與親本無明顯不同。

本試驗中每物種各別選 15 株，每株植株皆各做 10 朵花作為試驗組，因此每個組合可獲得 150 朵試驗樣本($15 \times 10 = 150$)。觀察大、小油菜雜交薺菜的 150 個試驗樣本，未發現該組合有獲得雜交後代之情形，反交亦然，因此推論大、小油菜正反交薺菜成

功率可能皆小於 0.67% (1/150)。推測可能如同 Zhao 等(2006)試驗之結果，學者發現基因改造大油菜 Q3 與薺菜為高度雜交不親和，授粉後花粉管有生長受阻現象，會停滯於柱頭表面或花柱的上部而無法成功受精，因此認為大油菜 Q3 與薺菜間發生基因流動可能性極低。本試驗中觀察到以大、小油菜作為母本與薺菜雜交時，會少量形成比油菜自交時更為細且短的果莢，惟果莢乾燥後的種子外形乾扁，以一般栽培方式播種後，無法獲得成活的植株，反交則無法產生此種形態之果莢，推測兩物種間為高度不親合。

以葶藶為母本，油菜為父本，正反交亦皆無雜交成功植株產生。Dai 等(2005)曾以不同的油菜物種雜交葶藶，28 個大油菜品系作為母本，有 10 個組合雜交成功，共獲得 134 粒雜交種子，其中 34 粒有發芽，最後 29 株成活，以小油菜和芥菜為母本則無雜交種子產生。因此認為不同種(或品系)的油菜與雜交葶藶可能會有不同程度的親和性。推測本次試驗所使用的 3 種油菜栽培品種及葶藶地方收集系，可能為雜交親合性較低的組合，大、小油菜正反交葶藶成功率皆小於 0.67% (1/150)。

以蔞菜為母本，油菜為父本，正反交亦皆無雜交成功植株產生，雜交成功率皆小於 0.67% (1/150)，尚未尋獲相關前人研究。在自然環境下，物種(species)間可能有地理或是生殖隔離之雜交障礙，蕁苔屬種間雖有程度不等的雜交親合性，亦有完全不親合者，遑論是與十字花科其他遠緣的物種屬間雜交。在過去前人研究中，蕁苔屬與近源物種或野生種雜交時，發生障礙可能原因，如不同種(或品系)、試驗設計、試驗環境、交互作用、開花期未重疊、花粉不親合、染色體無法配對或配子敗育等問題(Devos *et al.*, 2009 ; Kaneko and Bang, 2014 ; Song *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2006)，故若欲進行種間雜交，有時需要一些方法才能達成，舉凡蕾期授粉、生長調節劑、體細胞融合、胚培養等(Dai *et al.*, 2005 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2003)，但有時亦無法獲得成活的雜交後代，或者產生的後代會有植株殘弱、稔實性低或不稔等現象(OECD, 2012)，這些都屬於種間雜交發生障礙之情形；本次試驗結果發現大、小油菜與 3 種十字花科地方收集系雜交後均無獲得雜交後代，可能原因為物種高度不親合，可待進一步研究已確認為授精前或後之敗育。

本試驗選擇的材料在自然情形下，不論生長環境、植株形態或開花期等條件皆為相近，為探討自然雜交的可能，依循正常開花時期進行人工授粉，惟考量人工授粉的時機，另外進行早花授粉之測試。試驗方法以同樣的雜交組合於進行授粉作業時，僅改以 4、5 日後才會開放之花苞做母本，每株植株另授 5 朵花(15*5 = 75)，觀察後續結

莢情形，發現到授粉後第 5 日，就出現明顯黃化現象，然後自然萎凋，試驗結果各組合正反交亦皆無雜交成功植株產生，雜交成功率可能小於 1.33% (1/75)，因此認為提早授粉也無法提高雜交成功率。

二、小油菜與薺菜田間開放授粉

在人工雜交試驗時，發現大、小油菜做為母本與薺菜雜交，會少量出現細短的果莢，因此認為油菜可能與薺菜雜交機率較高，故將油菜與薺菜於本場蔬菜研究室之簡易塑膠網室一同栽培，進一步模擬田間栽培試驗。而臺灣北部農民慣於二期作採收後或二期作休耕期，種植小油菜作綠肥或觀賞用途，因此，選用較可能大量栽培的農興 80 天作為試驗材料，並於開花期間施放蜂箱。觀察開花期試驗田區亦有野外蜜蜂、紋白蝶、花虻等可能之媒介昆蟲飛來，選擇花序較上位之種莢收穫種子，試驗組小油菜與薺菜各 1,000 株，每株採收 3 莢，朗物種每莢均約有 20 顆種子，分別收穫約 6 萬顆種子，以同樣收穫原則，對造組各 200 株，分別收穫約 1.2 萬顆種子。考量試驗人力，將試驗組小油菜、試驗組薺菜、對造組小油菜及對造組薺菜種子分別混合後，從不同組不同物種混和樣本中各取其中 200 粒種子播種做後裔觀察，其餘預留至進一步分子鑑定分析；觀察後代生長情形，不論從小油菜或薺菜母株所採收之種子，其外觀皆與母本相近，無明顯不同，推測是雜交種後代的可能性極低，為種內交可能性較大，因為種屬間的雜交，通常後代表應該會有介於兩親之表現，或是後代表現不一致，有遺傳分離的傾向(Chiou *et al.*, 2012 ; Dai *et al.*, 2005 ; Jiang *et al.*, 2007)，故認為無雜交種產生；未來可再進一步進行分子標誌分析確認，對照組外表型與母本相近，因此，認為兩者之天然雜交機率可能小於 0.5%(每組每物種取 200 顆種子，結果未觀察到疑似雜交種者，故推論雜交成功機率可能小於 1/200)。

三、雜交風險與垂直汙染可能性

綜上，本試驗所選油菜品種農興 80 天、農興 90 天、臺中特 1 號分別與近緣物種薺菜、蔊菜及蔊蔊人工授粉正反交，其成功率可能皆小於 0.67% (1/150)，早花授粉成功率皆小於 1.33% (1/75)，而農興 80 天與近緣種薺菜田間開放自然授粉率可能小於 0.5% (1/200)，顯示試驗選用的油菜品種與野生近緣物種地方收集系間之雜交可能性偏低，試驗結果能作為油菜與近源物種間垂直性基因流動評估、雜交育種等相關研究之參考資料。

基因改造作物的環境風險，在於其種子是否會成為強勢物種而破壞生態平衡，或者花粉是否會產生基因流動轉移到其他近緣物種，提高物種的競爭性與雜草的抗性，以及基因改造作物可能對農業生產體系與生態多樣性具有衝擊等。許多油菜的共存研究，都將目標設定在估算花粉飄散距離，以期能有效防止基因流動造成汙染的可能性。然而這些研究可能僅能提供一個估計的風險值，因為試驗會受到許多因素影響。雖然大部分的異交都發生在 10 m 內的距離，但也有可能在 1.5 km 處發現異交株，或是同樣在估算 20 m 處的異交率，卻得到 0.004%-1.5%不同的結果等。也因此花粉飄散難以設置一個標準化的評估方式，若要有效防止基因流動，可能無法從建議距離來管控，而這些轉基因逃逸的可能性也應該在轉基因作物商品釋放前進行評估(Liu *et al.*, 2013)。

我們可能無法防止物種間自然發生基因流動的現象，因為花粉和種子太容易分散，並且太遠而無法實現遏制(Warwick *et al.*, 2003)，近幾年來許多共存相關研究被廣泛討論(Devos *et al.*, 2004；Devos *et al.*, 2014；Dolezel *et al.*, 2017；Liu *et al.*, 2013)。若要有效進行共存管理，可能可以從幾個方法著手進行，包括(一)利用基因改造工程改變基因改造作物的基因組，如雄不孕、種子不稔、化學誘導/刪除(chemical induction/deletion of transgenes)產生非轉基因花粉等方式，防止帶有轉基因片段的花粉造成基因流動、基因改造工程改變植株形態，以防止與近緣物種雜交之可能性；(二)改變耕作模式，如以輪作方式減少同物種間基因流動之可能、輪用除草劑改變物種族群、定期耕作以減少土壤中轉基因種子銀行、延遲栽培和錯誤播種以摧毀土壤自生族群；(三)改善運輸工具以減少轉基因種子掉落土壤和路邊的可能性；(四)規劃鄰近或區域農業系統組織(例如轉基因與傳統品種共存)等方式。雖然試驗結果顯示所選用的油菜品種與野生近緣種地方收集系間之屬間雜交可能性偏低，但仍不排除可能性，若要有效管理基因逃逸的可能性，建議還是要從管理層面著手，防止轉基因片段流出為首要之工作。

藉由本研究觀察臺灣農民栽種油菜情形，調查常見野生近緣物種，觀察兩者生長之習性與開花期，並進行雜交試驗以研究垂直性汙染的可能性，可提供評估雜交潛力的相關資訊，以利未來進一步進行基因流佈的相關防範與管理。

致謝

試驗期間特別感謝苗栗區農業改良場徐培修先生協助蜂箱施放與飼養，以及生技室徐桂文先生、姜禮全先生、黃楚雁小姐、呂彩燕小姐、葉秀梅小姐協助樣本採集、育苗、栽培及田區管理等作業。

參考文獻

- 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.
- Bailey, C.D., M.A. Koch, M. Mayer, K. Mummenhoff, S.L. O'Kane, S.I. Warwick, M.D. Windham, and I.A. Al-Shehbaz. 2006. Toward a global phylogeny of the *Brassicaceae*. *Mol. Biol. Evol.* 23:2142-2160.
- Bauer-Panskus, A., B. Breckling, S. Hamberger, and C. Then. 2013. Cultivation-independent establishment of genetically engineered plants in natural populations: current evidence and implications for EU regulation. *Environ. Sci. Eur.* 25:34.
- Becker, H.C., C. Damgaard, and B. Karlsson . 1992. Environmental variation for outcrossing rate in rapeseed (*Brassica napus*). *Theor. Appl. Genet.* 84:303-306.
- Beckie, H.J., S.I. Warwick, H. Nair, and G.Séguin-Swartz. 2003. Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola. *Ecol. Appl.* 13:1276-1294.
- 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*. (in Chinese with English abstract) *J. Taiwan Agric. Res.* 61:52-63.
- Dai, X.I., C.M. Cheng, L.Q. Song, T. Jie, R.X. Xiong, T. Zhang, X.F. Zou, and J.M. Zhang. 2005. Germplasm enhancement through wide crosses of *Brassica napus* X *India rorippa*. *J. of Plant Genetic Reso.* 6:242-244.
- Devos, Y., D. Reheul, A. de Schrijver, F. Cors, and W. Moens. 2004. Management of herbicide-tolerant oilseed rape in Europe: a case study on minimizing vertical gene flow. *Environ. Biosafety Res.* 3:135-148.

- Devos, Y., A.D. Schrijver, and D. Reheul. 2009. Quantifying the introgressive hybridisation propensity between transgenic oilseed rape and its wild/weedy relatives. *Environ. Monit. Assess.* 149:303-322.
- Devos, Y., J. Aguilera, Z. Diveki, A. Gomes, Y. Liu, C. Paoletti, P. du Jardin, L. Herman, J.N. Perry, and E. Waigmann. 2014. EFSA's scientific activities and achievements on the risk assessment of genetically modified organisms (GMOs) during its first decade of existence-looking back and ahead. *Transgenic Res.* 23:1-25.
- Dolezel, M., M. Miklau, A. Heissenberger, and W. Reichenbecher. 2017. Are limits of concern a useful concept to improve the environmental risk assessment of GM plants? *Environ. Sci. Eur.* 29:7.
- Eastham, K. and J. Sweet. 2002. Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer. EEA. Environment Issue Report no. 28. 8. (European Environment Agency, Copenhagen)
- Franzaring, J., K. Wedlich, A. Fangmeier, S. Eckert, J. Zipperle, I. Krah-Jentgens, C. Hünig, and W. Züghart. 2016. Exploratory study on the presence of GM oilseed rape near German oil mills. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23:23300-23307.
- Gueritain, G., M. Sester, F. Eber, A.M. Chevre, and H. Darmency. 2002. Fitness of backcross six of hybrids between transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Mol. Ecol. Resour.* 11:1419-1426.
- Hansen, L. B., H.R. Siegmund, and R.B. Jørgensen. 2001. Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. *Gene. Res. Crop Evol.* 48:621-627.
- Hecht, M., B. Oehen, J. Schulze, P. Brodmann, and C. Bagutti. 2014. Detection of feral GT73 transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) along railway lines on entry routes to oilseed factories in Switzerland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21:1455-1465.
- 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.
- 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.

- Hüsken, A. and A. Dietz-Pfeilstetter. 2007. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Transgenic Res.* 16:557- 569.
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. 2018. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. ISAAA Brief No. 53. Ithaca, NY.
- Jiang, S.H., R.Z. Guan, S.Y. Tang, R.U. Xin, H.S. Zhang, L.Q. Zhao, and Q.Y. Pan. 2007. Somatic hybrids between *Rorippa indica* (Linn.) Hiern and *Brassica napus* L. through protoplast-fusion system. *Yi Chuan.* 6:745-750 (in Chinese with English abstract).
- Johannessen, M.M., C. Damgaard, B.A. Andersen, and R.B. Jørgensen. 2006. Competition affects the production of first backcross offspring on F1 hybrids *Brassica napus* x *B. rapa*. *Euphytica* 150:17-25.
- Jong, de T.J., K. Escobedo Quevedo, C.A.M. van der Veen-van Wijk, and M. Moshgani. 2018. Performance of aneuploid backcross hybrids between the crop *Brassica napus* and its wild relative *B. rapa*. *Plant Biol.* 20:67-74.
- Kaneko, Y. and S.W. Bang. 2014. Interspecific and intergeneric hybridization and chromosomal engineering of Brassicaceae crops. *Breed. Sci.* 64:14-22.
- Knispel, A.L. and S.M. McLachlan. 2010. Landscape-scale distribution and persistence of genetically modified oilseed rape (*Brassica napus*) in Manitoba, Canada. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 17:13-25.
- Liu, Y.B., W. Wei, K. Ma, J.S. Li, and Y.Y. Liang. 2013. Consequences of gene flow between oilseed rape (*Brassica napus*) and its relatives. *Plant Sci.* 211:42-51.
- Luijten, S.H. and T.J. de Jong. 2010. A baseline study of the distribution and morphology of *Brassica napus* L. and *Brassica rapa* L. in the Netherlands. COGEM report: CGM. 2010-03.
- Lutman, P.J.W., G.W. Cussans, K.J. Wright, B.J. Wilson, G.M. Wright, and H.M. Lawson. 2002. The persistence of seeds of 16 weed species over six years in two arable fields. *Weed Res.* 42:231-241.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. 2012. Consensus Document on the Biology of the Brassica Crops (*Brassica* spp.). Organisation for Economic Co-operation and Development. ENV/JM/MONO. 41.

- Messeguer, J. 2003. Gene flow assessment in transgenic plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73:201-212.
- Munier, D.J., K.L. Brittan, and W.T. Lanini. 2012. Seed bank persistence of genetically modified canola in California. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21:1-4.
- Nishizawa, T., N. Nakajima, M. Aono, M. Tamaoki, A. Kubo, and H. Saji. 2009. Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3- year observations. *Environ. Biosafety Res.* 8:33-44.
- Pascher, K., C. Hainz-Renetzeder, G. Gollmann, and G.M. Schneeweiss. 2017. Spillage of viable seeds of oilseed rape along transportation routes: ecological risk assessment and perspectives on management efforts. *Front. Ecol. Evol.* 5:104.
- Qian, W., J. Meng, M. Li, M. Frauen, O. Sass, J. Noack, and C. Jung. 2006. Introgression of genomic components from Chinese *Brassica rapa* contributes to widening the genetic diversity in rapeseed (*B. napus* L.), with emphasis on the evolution of Chinese rapeseed. *Theor. Appl. Genet.* 113:49-54.
- Qiao, J., M. Cai, G. Yan, N. Wang, F. Li, B. Chen, G. Gao, K. Xu, J. Li, and X. Wu. 2016. High-throughput multiplex cpDNA resequencing clarifies the genetic diversity and genetic relationships among *Brassica napus*, *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Plant Biotechnol. J.* 14:409-418.
- Rieger, M.A., M. Lamond, C. Preston, S.B. Powles, and R.T. Rouch. 2002. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 296:2386-2388.
- Ronca, S., J. Allainguillaume, C.S. Ford, J. Warren, and M.J. Wilkinson. 2017. GM risk assessment: pollen carriage from *Brassica napus* to *B. rapa* varies widely between pollinators. *Basic Appl. Ecol.* 19:36-44.
- Song X., Z. Wang, J. Zuo, C. Huangfu, and S. Qiang. 2010. Potential gene flow of two herbicide-tolerant transgenes from oilseed rape to wild *B. juncea* var. *gracilis*. *Theor. Appl. Genet.* 120:1501-1510.
- Schulze, J., P. Brodmann, B. Oehen, and C. Bagutti. 2015. Low level impurities in imported wheat are a likely source of feral transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) in Switzerland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22:16936-16942.

- Wang, Y.P., K. Sonntag, and E. Rudloff. 2003. Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridisation between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. Theor. Appl. Genet. 106:1147 -1155.
- Warwick, S.I., M.J. Simard, A. Légère, H.J. Beckie, L. Braun, B. Zhu, P. Mason, G. Séguin-Swartz, and C.N. Stewart. 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
- Ying, S.S. 1996. Cruciferae. p. 745-769. In: T.C.Huang(ed.). Flora of Taiwan, 2nd ed. Department of botany, NTU, TWN.
- Zhang, C.J., M.J. Yook, H.R. Park, S.H. Lim, J.W. Kim, J.S. Song, G. Nah, H.R. Song, B.H. Jo, K.H. Roh, S. Park, Y.S. Jang, I.S. Nou, and D.S. Kim. 2018. Evaluation of maximum potential gene flow from herbicide resistant *Brassica napus* to its male sterile relatives under open and wind pollination conditions. Sci. Total Environ. 634:821-830.
- Zhao, X.X., Q.X. Xia, D.L. Lu, W.P. Lu, C.K. Qi, H.M. Pu, G.S. Liu, J. Zhao, and Y.P. Wang. 2006. Gene flow from genetically modified herbicide-resistant rapeseed to cruciferous weeds. Prog. Nat. Sci. 16:936-941.

The Risk of Vertical Gene Flow between *Brassica rapa* L. and Their Wild Relatives: *Capsella bursa-pastori* (L.) Medic, *Cardamine flexuosa* With. and *Rorippa indica* (L.) Hiern¹

Shen Ya Jyun²

Abstract

This study is to investigate the possibility of vertical gene flow in genetically modified canola. *Brassica napus* L. variety Taichung No. 1, local collected lines of *Brassica rapa* L. including Nongxing 80 days, Nongxing 90 days were used to hybridize with cruciferous wild relatives, respectively. The cruciferous wild relatives are common wild weeds in Taiwan, such as *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic, *Cardamine flexuosa* With., and *Rorippa indica* (L.) Hiern, being selected as evaluation targets in this study. The result showed that the hybridization rate was less than 0.67% (1/150) in all cases. Furthermore, we carried out the field study for growing Nongxing 80 days and *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic together, in order to simulate an environment for their natural hybridization. The results showed that the natural hybridization rate was less than 0.5% (1/200). Therefore, reproductive isolation indeed occurs between species, but the hybridization between them could also happen. According to the results in this experiment, vertical gene flow barely occurred between canola and the wild relatives of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic, *Cardamine flexuosa* With., and *Rorippa indica* (L.) Hiern. However, the management methods and processes must be established for effectively controlling the genetically modified canola. In summary, this study provides information on the vertical gene flow of genetically modified canola and intergeneric crosses between canola and their wild relatives.

Key words: Brassicaceae, genetically modified, co-existence, pollen dispersal, intergeneric cross

¹. Contribution No.511 from Taoyuan DARES, COA.

². Assistant Researcher (Corresponding author, usagi3662@mail.afa.gov.tw), Taoyuan DARES, COA.