

# 二氧化碳氣體打破甘藍自交不親和性商業化 應用之研究<sup>1</sup>

謝明憲 王仕賢 林棟樑 王仁晃<sup>2</sup>

## 摘 要

謝明憲、王仕賢、林棟樑、王仁晃·2003·二氧化碳氣體打破甘藍自交不親和性商業化應用之研究。台南區農業改良場研究彙報 42:45~51。

本試驗之目的在於利用 CO<sub>2</sub> 打破甘藍自交不親和性，建立甘藍商業化親本採種生產模式。本研究以甘藍商業品種“初秋”為供試材料，在苗齡達 45 天時以 1000Lux 光度，5°C 低溫處理 45 天進行春化處理誘導開花。開花期間配合釋放蜜蜂授粉並採隔日處理 3% 或 5% CO<sub>2</sub> 氣體一次，處理時間為下午 6:00 至翌日上午 9:00，各計處理 7 次。試驗結果以 3% 及 5% 濃度 CO<sub>2</sub> 氣體處理的單莢平均結籽數(0.73 粒及 0.79 粒)顯著高於開花授粉者 0.30 粒及 0.34 粒，但尚乏經濟採種效益。

**關鍵詞：**甘藍、自交不親和性、種子生產、二氧化碳

接受日期：2003 年 4 月 3 日

## 前 言

十字花科作物常利用自交不親和特性於雜交種子生產，自交不親和性(self-incompatibility, SI)是受一 S 基因座(S-locus)多基因控制。S 基因控制的不親和性可以分為配子體型及孢子體型。配子體型不親和性(gametophytic incompatibility)其親和與否取於花粉所帶的 S 基因是否與雌蕊所帶的 S 基因相同，若相同則為不親和；孢子體型不親和性(sporophytic incompatibility)其親和與否，不取決於花粉本身所帶的 S 基因，而取決於產生花粉的父本是否具有與母本不親和的基因型，甘藍菜的自交不親和性即屬於孢子體型，因此兩親本的 S 基因型必須不同才能生產雜交種子<sup>(10)</sup>。

對於高度自交不親和性之十字花科自交系親本之維持，過去一直採用蕾期授粉克服自交不親和障礙，但存在費工，費時及成本高等諸多不利因素。對於如何簡化該類自交系親本之留種操作，迄今較成功的研究結果係以提高 CO<sub>2</sub> 濃度或施用鹽液以克服自交不親和性障礙<sup>(5)</sup>。

---

1. 行政院農業委員會台南區農業改良場研究報告第 289 號。

2. 台南區農業改良場助理研究員、助理研究員、副研究員、副研究員兼課長。台南市林森路一段 350 號。

12, 13, 14, 15, 22, 23)。而商業生產利用 CO<sub>2</sub> 處理取代蕾期授粉，首推日本 Takii 種子公司，曾於 1983 年在花椰菜利用氣密性塑膠袋套花莖方式注入 10% CO<sub>2</sub> 氣體，打破自交不親和性，進行商業雜交種之親本繁殖，平均每株可生產 12.5 克種子<sup>(4)</sup>。

CO<sub>2</sub> 氣體處理效果，主受供試材料所帶的自交不親和性對偶基因不同及遺傳背景差異影響<sup>(20)</sup>。本試驗供材料甘藍商業品種“初秋”所帶的自交不親和性基因型為 S33/S56，相關的研究報導並未提及此類基因型是否可藉由 CO<sub>2</sub> 氣體處理有效打破自交不親和性障礙，但本場曾於 2000 年採行 4.5%CO<sub>2</sub> 氣體處理進行試驗及評估，證實確有打破甘藍自交不親和性之效果<sup>(1)</sup>；唯該項試驗係採小規模之實驗室操作及人工授粉，其結果欲應用於商業化生產，仍需評估其可行性。因此本試驗在方法上，參考 Nakanishi & Hinata (1973) 在甘藍以 CO<sub>2</sub> 氣體處理進行 2 至 6 小時期間對自花花粉在柱頭上的發芽率並無顯著性差異影響，在花粉管的穿透率則有顯著性提升效果；而處理進行 6 至 24 小時期間仍能維持與處理 6 小時者具相近的發芽率及穿透率。因此本試驗在處理時間上採過夜(PM6:00-AM:9:00)處理，處理間隔上為考量降低處理成本，採隔日處理 CO<sub>2</sub> 氣體一次；並以昆蟲授粉取代人工授粉之操作(AM9:00 人工授粉；PM0:30 CO<sub>2</sub> 氣體處理)，期能建立甘藍親本商業化採種模式。

## 材料及方法

一、試驗材料：甘藍商業品種“初秋”及 CO<sub>2</sub> 氣體。

二、試驗方法：

(一)供試品種於 2001 年 9 月 5 日以 128 格穴盤播種育苗，播種後 30 天苗齡之穴盤苗假植於 3.5 吋盆；上盆後 15 天之盆苗置入 5℃ 冷藏庫，配合 1000Lux 光照進行春化處理 45 天，滿足其春化作用所需之低溫需求，處理後移植於可密閉式塑膠棚溫室內，栽培管理至開花。

(二)2002 年 1 月 8 日開始進行打破自交不親和性障礙試驗，試驗處理如下：1. 施放 CO<sub>2</sub> 氣體處理，處理方法為每隔一日於下午 6:00 至翌日上午 9:00 以 CO<sub>2</sub> 氣體灌施一次；處理濃度及期間為同一材料分別於 2002 年 1 月 8 至 1 月 22 日以 5%CO<sub>2</sub> 氣體濃度灌施處理，及於 1 月 24 至 2 月 7 日以 3%CO<sub>2</sub> 氣體濃度灌施處理。2. 對照組 (不施 CO<sub>2</sub> 氣體)。

(三)CO<sub>2</sub> 氣體施用方法(如圖 1)為在每隔日下午 5 時整，將溫室內氣體施放管連接於二氧化碳鋼瓶，直接施放 CO<sub>2</sub> 氣體於氣密溫室內(氣體施放流速約為 50L · CO<sub>2(L)</sub>/min)，並開啓內循環風扇，使氣密溫室內之 CO<sub>2</sub> 氣體能均勻擴散；另配合氣體抽出管，定時抽出溫室內氣體，再經由氣體濃度分析儀分析 CO<sub>2</sub> 氣體濃度，以供作為決定終止 CO<sub>2</sub> 氣體施放之依據。

(四)CO<sub>2</sub> 氣體處理組及對照組分別於 1 月 8 日、1 月 22 日及 2 月 7 日在各花枝上花芽未開放及已開放間掛標示牌以作區隔。處理結束 50 天後調查各項處理之每莢平均種子數及莢數。

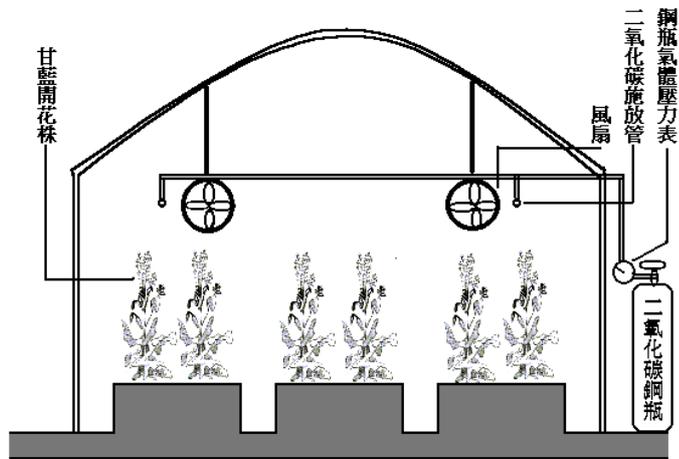


圖 1、初秋甘藍應用 CO<sub>2</sub> 氣體處理情形

Fig 1. Situation of cabbage (K-Y cross) flowers treat with CO<sub>2</sub>.

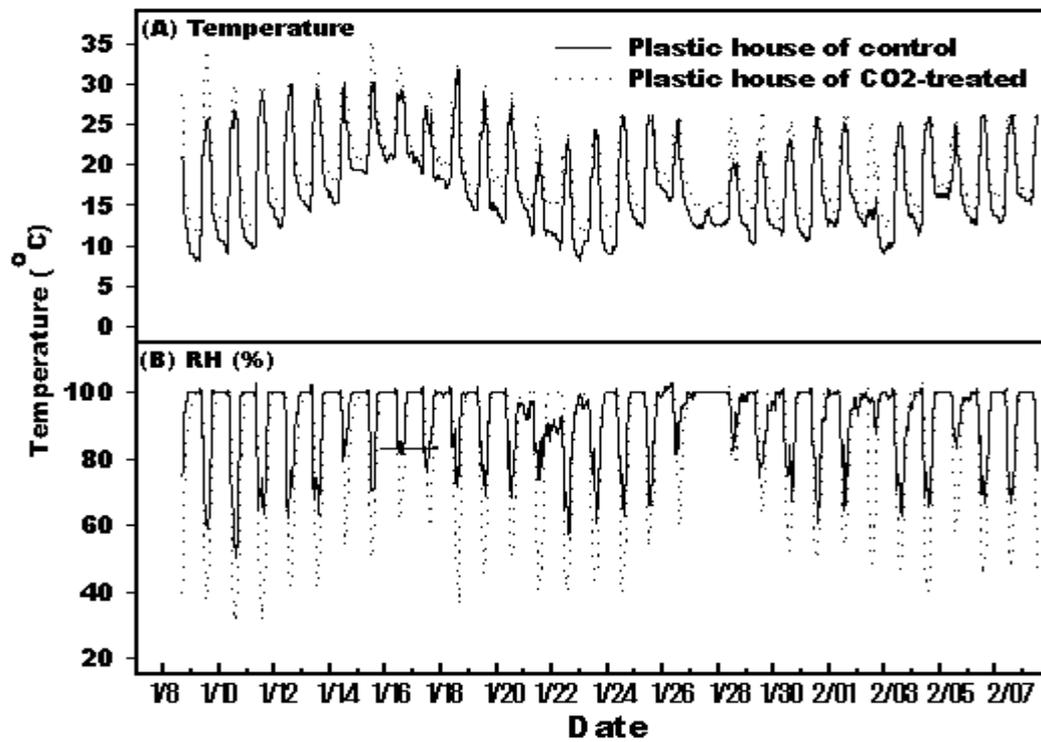


圖 2、CO<sub>2</sub> 處理組及對照組塑膠棚溫室內溫度及相對濕度變化圖

Fig 2. Temperature and RH (%) in plastic house of CO<sub>2</sub> treated and control from Jan. to Feb. 2002

表 1. 初秋甘藍應用 CO<sub>2</sub> 氣體處理之單莢平均結籽數及單株產量(克)<sup>X</sup>

Table 1. Results of self-pollination at CO<sub>2</sub> treatment in the “K-Y cross” cabbage, Given in mean number of seed per silique and yield per plant.

處理別 treatment	單莢平均結籽數 mean number seeds of per silique	單株產量(克) yield per plant(g)
CK-1 (1/8~1/22)	0.30a <sup>Y</sup>	0.44a
5% CO <sub>2</sub> (1/8~1/22)	0.73b	0.94b
CK-2 (1/24~2/7)	0.34a	0.48a
3% CO <sub>2</sub> (1/24~2/7)	0.79b	0.99b

<sup>X</sup> 調查期：2002 年 5 月 2 日。

<sup>Y</sup> 在直列相同的英文字母表示在顯著水準  $\alpha = 0.05$ ，經鄧肯氏多變域區間測驗其差異不顯著。

## 結果與討論

研究 CO<sub>2</sub> 氣體處理在打破自交不親和性障礙的商業化應用，與實驗室小規模 CO<sub>2</sub> 氣體處理操作二者間最大的不同，在於人工授粉操作改由昆蟲代勞—蜜蜂授粉，目的在於節省人力支出，降低成本。基於本場在 2000 年曾以甘藍“初秋”品種在人工授粉後 3 個小時應用 4.5%CO<sub>2</sub> 氣體處理 2 個小時，所得結果顯示 CO<sub>2</sub> 氣體處理的單莢平均結籽數(4.1 粒)顯著高於開花授粉者 0.3 粒<sup>(1)</sup>。然本試驗結果由表 1 中可知，雖然在單莢平均結籽數以 5% 及 3%CO<sub>2</sub> 氣體處理組（分別為 0.73 及 0.79 粒）最高，且顯著高於對照組 CK-1 及 CK-2；單株種子產量亦 5% 及 3%CO<sub>2</sub> 氣體處理組（分別為 0.94 及 0.99 克）最高，且顯著高於對照組 CK-1 及 CK-2，但仍不具商業化應用價值，顯示實驗室結果尚未能於採種生產上直接應用。

探究本試驗在打破自交不親和性障礙未達預期成效的原因，基於供試材料仍是甘藍“初秋”品種，排除材料所帶的自交不親和性對偶基因不同及遺傳背景差異影響<sup>(20)</sup>；最大的影響因子可能是氣密溫室內的微氣候條件及蜜蜂在溫室內的適應性問題。然有關蜜蜂對 CO<sub>2</sub> 氣體的反應，Deyme & Begue-Deyme(1977)研究高濃度 CO<sub>2</sub> 氣體致使蜜蜂被麻醉(anaesthetizes)的劑量反應，指出蜜蜂在 30%CO<sub>2</sub> 氣體濃度的環境並無被麻醉反應，但在 40%CO<sub>2</sub> 氣體濃度的環境則發現 2 天齡大的蜜蜂在 CO<sub>2</sub> 處理後 80 分鐘，呈現被麻醉反應，而高於 40%CO<sub>2</sub> 氣體濃度的環境則所有蜂齡的蜜蜂均快速的被 CO<sub>2</sub> 氣體麻醉。另有研究指出蜜蜂在純 CO<sub>2</sub> 氣體環境超過 15 秒即呈現被麻醉反應<sup>(8)</sup>。而低濃度的 CO<sub>2</sub> 氣體環境對蜜蜂的影響，目前僅已知小群體(small colonies)蜜蜂蜂巢內的 CO<sub>2</sub> 氣體在夏季時期當濃度約近 1%時，蜂巢內的蜜蜂開始出現振翅舞動(fanning)現象，在冬季時期則在濃度達 2~6%時，始出現振翅舞動現象<sup>(18)</sup>；然小群體蜜蜂蜂巢內以人為方式導入 CO<sub>2</sub> 氣體試驗，發現在濃度達 0.10~4.25%時，也會致使蜂巢內的蜜蜂出現振翅舞動現象<sup>(16)</sup>。而蜂巢內的蜜蜂出現振翅舞動目的在於控制蜂巢內溫度及移走過多的 CO<sub>2</sub> 氣體<sup>(18, 19)</sup>。但截至目前尚無研究報告指出當大氣 CO<sub>2</sub> 氣體在該濃度範圍內會對蜜蜂造成無法回復的傷害。

打破甘藍自交不親和性障礙所需的 CO<sub>2</sub> 氣體濃度約在 3~5%<sup>(7,13,14,15)</sup>，推測屬蜜蜂仍忍

受的 CO<sub>2</sub> 氣體濃度範圍內。本研究基於前述結果，擴大試驗規模，改以昆蟲授粉取代人工授粉之操作(AM9:00 人工授粉；PM:0:30 CO<sub>2</sub> 氣體處理)，處理時間及間隔上採過夜(PM6:00-AM:9:00)處理及隔日處理一次。而根據以往的研究可知環境因子影響，如處理當日的濕度不足或夜溫過低下均有礙花粉發芽及穿透花柱，而日照量不足則有礙授粉昆蟲活動而間接影響授粉率<sup>(3)</sup>，本試驗對照組與 CO<sub>2</sub> 氣體處理組在溫度及濕度的差異，由圖 2A 可知 CO<sub>2</sub> 氣體處理組塑膠棚內的溫度均比對照組為高，且溫度均在 11℃ 以上，推測夜溫因子應不足以影響 CO<sub>2</sub> 氣體處理效果；此外在白天期間 CO<sub>2</sub> 氣體處理組與對照組塑膠棚內溫度多在 30℃ 以下，屬於蜜蜂可正常活動的溫度範圍<sup>(19)</sup>。此外，Nakanishi 等學者指出 CO<sub>2</sub> 氣體處理期間低濕環境，會降顯著地降低青花菜自花花粉在柱頭上的發芽率及花粉管的穿透率<sup>(13)</sup>。而由圖 2B 顯示 CO<sub>2</sub> 氣體處理組塑膠棚內的相對濕度在白天均低於對照組，其原因係 CO<sub>2</sub> 氣體處理組塑膠棚均於每日上午九時三十分至下午四時期間開啓排氣風扇，造成大量通風所致。但因甘藍類作物通常在授粉後 24 至 48 小時始開始進行雙重受精作用(double fertilization)<sup>(17)</sup>。在授粉後花粉發芽至完成受精期間，白天期間濕度過低是否顯著地影響花粉的發芽及花粉管的穿透，則有待進一步釐清。

基於日本商業種子公司曾在花椰菜以毛刷輕拭開花花朵，於授粉後 8 至 10 分鐘後將單株套氣密性塑膠袋方式灌施 10% CO<sub>2</sub> 氣體處理 24 小時打破自交不親和性，進行商業雜交種之親本繁殖，平均每株可生產 12.5 克種子的成功例子<sup>(4)</sup>；唯其 CO<sub>2</sub> 氣體施用上以套住花莖，而未影響葉片，本試驗夜間相對濕度高達 100%，則可能對植株養份之吸收造成傷害，致使花粉生育受阻。2000 年試驗曾以甘藍“初秋”品種在人工授粉後應用 CO<sub>2</sub> 氣體處理，也獲得單莢平均結籽數 4.1 粒<sup>(1)</sup>，證實“初秋”甘藍品種可藉由 CO<sub>2</sub> 氣體處理，打破自交不親和性障礙；且本試驗在正常情況下以蜜蜂授粉所獲得單莢平均結籽數 0.30 及 0.34 粒與 2000 年以人工開花授粉所得結籽數 0.3 粒相似，但當配合 CO<sub>2</sub> 氣體處理，單莢平均結籽數僅 0.73 及 0.79 粒，顯然有極大落差，因此有必要釐清在所應用的昆蟲授粉與人工授粉在效率上的差異。以求能順利應用 CO<sub>2</sub> 氣體處理打破自交不親和性障礙，建立商業化親本採種程序。

## 引用文獻

1. 謝明憲、林棟樑、王仕賢。2000。打破甘藍自交不親和性障礙之研究。台南區農業改良場研究彙報。37:65-70。
2. 顏永福、王仕賢、楊藹華、林怡廷、楊雅玲。2002。利用限制酶分解聚合酶連鎖反應物之片段鑑定甘藍自交不親合基因。海峽兩岸遙測及農業生物技術研討會。p.121-132。
3. 菜種子生產研究會。1988。 野菜 採種。誠文堂新光社。日本·東京。
4. Billing, J. 1984. Self-incompatibility and the production of hybrid cauliflower. *Pollination 84* : Proceedings of a symposium held at University of Melbourne, Australia. Edited by Williams, E. G. and R. B. Knox. P.119-121.
5. Carafa, A. M. and G. Carratu. 1997 Stigma treatment with saline solutions: a new method to overcome self-incompatibility in *Brassica oleracea* L. *Journal of Horticultural Science*. 72: 4, 531-535.

6. Deyme, A. and G. I. Begue-Deyme. 1977. Determination of the anaesthetizing dose of carbon dioxide in regulation to age of the worker honeybee. *Apidologie*. 8(3):217-228.
7. Dhaliwal, A. S. and C. P. 1982. Effect of CO<sub>2</sub> in overcoming self-incompatibility barriers in *Brassica campestris* L. var. *toria*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences Plant Sciences*. 91: 3, 227-234.
8. Ebadi, R., N. E. Gary and K. Lorenzen. 1980. Effects carbon dioxide and low temperature narcosis on honey bees, *Apis mellifera*. *Environmental Entomology*. 9(1):144-147.
9. Fu, T. D., P. Si, X. N. Yang and G. S. Yang. 1992. Overcoming self-incompatibility of *Brassica napus* by salt (NaCl) spray. *Plant Breeding*. 109: 3, 255-258.
10. Kuckuck, H., G. Kobabe and G. Wenzel. 1991. *Fundamentals of plant breeding*. With the scientific cooperation of D. Boringer et. al. Berlin ; New York : Springer-Verlag. p.61-64.
11. Möhring , S. and E. Esch and G. Wricke. 1999. Breeding hybrid varieties in winter rapeseed using recessive self-incompatibility. *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia*. 4:228-229. The Regional Institute Ltd.
12. Monteiro, A. A. , W. H. Gabelman and P. H. Williams. 1988. Use of sodium chloride solution to overcome self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Hortscience*. 23: 5, 876-877.
13. Nakanishi, T., Y. Esashi and K. Hinata. 1969. Control of self-incompatibility by CO<sub>2</sub> gas in *Brassica*. *Plant & Cell Physiology*. 10: 5, 925-927.
14. Nakanishi, T. and K. Hinata 1975: Self-seed production by CO<sub>2</sub> gas treatment in self-incompatible cabbage. *Euphytica* 24, 117-120.
15. Nakanishi, T. and K. Hinata. 1973. An effective time for CO<sub>2</sub> gas treatment in overcoming self-incompatibility in *Brassica*. *Plant & Cell Physiology*. 14: 5, 873-879.
16. Seeley, T. D. 1974. Atmospheric carbon dioxide regulation in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Insect Physiology*. 20:2031-2305.
17. Shixiong, L., S. Shuxing, and Z. Chenghe. 1995. Studies on the biology of reproduction and embryology of inbreedings and crossings in the common cabbage. *Acta Horticulturae*. 402:222-226
18. Simpson, J. 1961. Nest climate regulation in in honey-bee colonies. *Science*. 133:1327-1333.
19. Takahashi, M. 1992. Regulation of hive temperature and carbon dioxide concentration by fanning (*Apis mellifera*). *Mitsubachi Kagaku*. 13(3):120-124.
20. Taylor, J. P. 1982. Carbon dioxide treatment as an effective aid to the production of selfed seed in kale and Brussels sprouts. *Euphytica*. 31: 3, 957-964.
21. Tao, G. H. and R Yang. 1995. Use of CO<sub>2</sub> and salt solution to overcome self-incompatibility of Chinese cabbage (*B. campestris* ssp. *pekinensis*). *Cruciferae Newsletter*. 1986. No. 11, 75-76.
22. Yang, R., Y. J. Yu, J. B. Xu, G. Chen and F. L. Zhang 1995. Studies on techniques of spraying NaCl solution on flowers combined with honeybee pollination to overcome self-incompatibility of Chinese cabbage. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*. 10: 2, 77-81.
23. Zhang, E. H., and Y. M. Lu. 1996. Effect of salt and boron on self-incompatibility in cabbage. *China Vegetables*. No. 5, 29.

# **Studies on Commercial Technique of Carbon Dioxide Gas to Overcome Self-incompatibility in Cabbage<sup>1</sup>**

Hsing M. H., S. S. Wang, D. L. Lin, and R. H. Wang<sup>2</sup>

## **Summary**

This study was attempted to develop a method to overcome self-incompatibility in cabbage for seed production. Cabbage seedlings (K-Y cross) were vernalised in a growth chamber programmed for 1000 lux. of 16-hrs alternate light period at 5°C for 45 days. The plants then were grounded in the green house. At the flowering stage the plants were pollinated with honey-bee for 2 weeks. In this period, the plants were treated with CO<sub>2</sub> gas at 3% or 5% level every other day for 7 times from 6:00 pm to 9:00 am. Results indicated that the plants treated with 3% and 5% in average produced 0.73 and 0.79 seed per silique comparing to that of 0.32 seed per silique in the treatment without CO<sub>2</sub> gas. Though it is breakthrough out it still can not be need for commercial production of cabbage seed. Further studies are needed.

Key word : cabbage, self-incompatibility, seed-production, carbon dioxide

Accepted for publication : 23 Apr:1, 2003

- 
1. Contribution No.289 from Tainan District Agricultural Improvement Station.
  2. Assistant Horticulturist, Assistant Horticulturist, Associate Horticulturist, and Associate Horticulturist and Head of Crop Improvement Division, respectively.