

影響葉深甘藍自交不親和性程度之因素及其自交不親和性之打破

Factors Affecting the Degree of Self-Incompatibility and the Breaking of Self-Incompatibility in Yehsen Cabbage

臺灣省農林廳種苗繁殖場

沈再發 廖公益

摘要

1.本試驗為了解葉深甘藍自交不親和性系採取雜交 F_1 時，由系統之差異而有不同比率的 Sibs 發生，此是否與環境因素等有關。並以電助授粉，試圖打破不親和性，探討其採原種之可能性。

2.自交不親和性系統 21D-2-1-1-2-1-1 行自交授粉時，其不親和性程度表現較為弱（平均每莢種子數為 0.14）。此系統易受溫度之變化及老花影響。同時易為電助授粉（EAP）所打破，EAP 之平均每莢種子數大過於蕾期授粉。

3.自交不親和性系統 21B-1-1-2-1-2-1 行自交授粉時，其不親和性程度表現較為強（平均每莢種子數為 0.07）。此系統對於不同溫度表現穩定。雖然老花也有稔性可能，而又為 EAP 所打破，但其數量很有限。

4.此種不同葉深甘藍自交不親和性程度之出現，推測具有修改因子之存在，而對 S-allele 負修改作用。但是引起偽親和性之重要原因，環境因素當比遺傳背景為重要。

一、緒言

目前甘藍雜交 F_1 之種子，係由具同型結合體（Homozygous）之兩個自交系親本雜交而成。此二自交系必需具不同之自交不親和性複相對因子（Incompatibility allele），且其相互交配為親和性。在生理上，每親本之每植物體除必需為自交不親和性（Self-incompatibility）外，其親本系統內之兄妹間雜交也為不親和性（Sib-incompatibility）。如此的話，所採取之雜交 F_1 種子，不具有自

*本文發表於科學發展月刊第四卷第四期。

交或兄妹間交的非雜交 F₁ 種子。一般甘藍類行雜交 F₁ 採種時，通常以蜜蜂為媒。如以 A ♂ B 的話，蜜蜂不僅由 B 系統帶花粉到 A 系統，由 A 系統到 B 系統，往往有 A 或 B 系統的同株異花授粉，或 A 系統之兄妹間，B 系統之兄妹間之授粉存在。雖然在育種的過程中，檢定自交或兄妹間交皆為不親和性 (Self-and Sib-incompatible)，但於大量採種時，由於不同環境因素之影響，而就形成了非雜交性種子，所謂 Sibs 之存在，而減少了 F₁ 之經濟價值。

在本場甘藍 F₁ 雜交育種過程中，確定葉深甘藍為耐熱品種育種材料所必需 (沈再發 1970)⁽¹⁾，並經數代自交後，已具有同型結合之自交不親和性系統，並以此系統開始在本場行 F₁ 雜交採種。此所採取之 F₁ 種子，在臺灣夏季栽培，比霸佔市場的日本種子 - - 長岡交配，初秋甘藍，六十日甘藍，及早秋甘藍等更具高溫結球性，為農民之所歡迎。但是採種時卻發現了兩個問題：第一個問題是在葉深系統所採取之種子，由於系統之不同而有非雜交種子出現，即 Sibs 之問題。據 1973 年之調查結果，有一葉深系統所採之種子可達約 100% 之雜交 F₁，而另有一系統所採取的種子僅為 85% 之雜交 F₁。此原因何在，是目前急切要求知的問題。

有關甘藍自交不親和性之受環境影響，也有很多報告 (Kakizaki 1930; Haruta, 1962; Attia & Munger 1950)^(8,11)，Van Hal⁽²³⁾等 (1968) 報告在溫度高時 (24 °C)，自交不親和性柱頭上的反應轉變為較弱。Johnson (1971)⁽⁹⁾ 在孢子甘藍系統上亦同樣發現兩自交不親和性因子 (S-allele) 受溫度的影響。本省在地種葉深甘藍系統是否也受此影響，抑是一種於老花期之有受精能力的所謂為偽稔性 (Pseudogamy) 之存在。如單係由於溫度之影響，則可尋找出開花適當之溫度，以作為選擇採種地的參考。

其次之問題是：葉深甘藍之自交不親和性也係受芽胞體所支配 (Sporophytic control 1972 沈)⁽³⁾。此自交系親本之維持，有賴於打破此自交不親和性的障礙物 (Self-incompatibility barrier) Linskens 和 Kroh (1967)⁽¹³⁾ 之柱頭切除法，建部 (1968)⁽²¹⁾ 之化學藥品處理法，Kroh (1966)⁽¹²⁾ 的花粉移置法，Nakanishii (1975)⁽¹⁴⁾ 之 CO₂ 處理法，Conai 等 (1971)⁽¹⁷⁾ 之高溫處理法，以及通常所用的蕾期授粉法為最廣泛之應用在雜交種子的原種生產外，其他都未能達實用化。但是蕾期授粉有賴大量的精熟工人操作，且在臺灣開花期短，無法在短時間內行大量之繁殖。如何克服此困難，更有待開發。至 1972 年 Roggen⁽¹⁷⁾ 利用電子顯微鏡發現柱頭之乳頭狀突起細胞 (Pepillae) 存有一臘質層為自交不親和性之障礙物，並開發一種新的方法 - - 電助授粉 (Electric Aided Pollination)^(18,19,20) 來打破此障礙。依其結果，雖然尚未能確立解釋其原因，可是依系統不同而有代替蕾期授粉的可能性，此項 EAP 法是否可應用在葉深系統上的價值，也頗值探討。

二、材料與方法

(一)材料

葉深甘藍系統如下：

系統代號	自交分離代數	備註
(A)21D-2-1-1-2-1-1	6	1.此系統為自交及兄妹間交配不親和性(沈 1972) ⁽³⁾ ，暫定其因子為 S_1S_1 。 2.與(B)系統行自然雜交採種後所得之雜交 F_1 為 85%，即有 15%之 Sibs。
(B)21B-2-1-1-2-1-1	6	1.此系統為自交及兄妹間交配也為不親和性(沈 1972) ⁽²⁾ ，暫定其因子為 S_3S_3 。 2.與(A)系統行自然雜交採種後所得之雜交 F_1 為 90%。

(二)方法

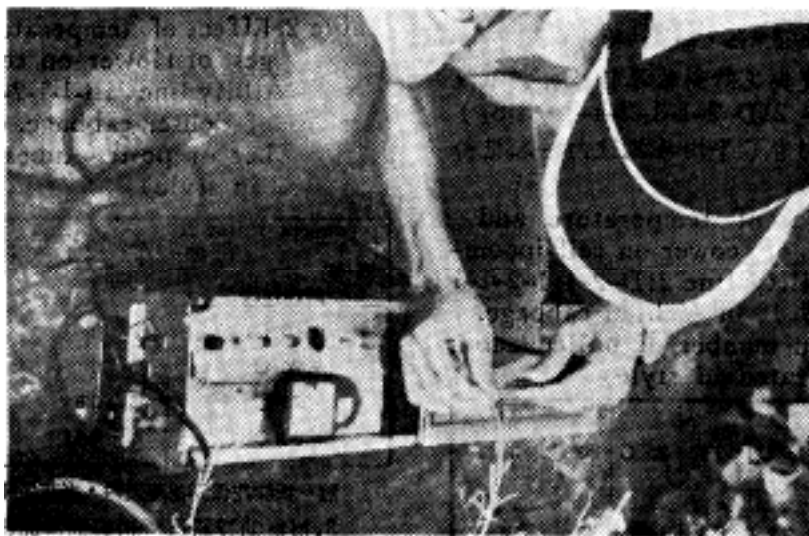
1.於甘藍抽苔時，將第一次之主花苔剪掉，讓其長出第二次之側花苔為材料。每花苔自株上剪取，除去已開放的花朵。同時在蕾期行除雄後，分別插於裝有水的三角瓶內。並置於 15，20，25，30 之定溫箱內，以不同花開日數，一、二、三、四、五天計花齡。用新鮮花粉分別在每日下午五時行自交授粉，十六小時後的次天早上九時取樣。取樣時剪取花柱，用 Carnoy solution(6 ethanol: 3 chloroform:1 glacial acetic acid by volume)行固定，以 1N 之 NaOH 行 69 一小時的軟化，隨即用 0.2% Aniline Blue 溶解於 2%之 K_3PO_4 溶液內行染色，以螢光顯微鏡 100 倍率下檢查花粉發芽後花粉管伸入花柱的情形，並計算其數目⁽⁴⁾。

2.電助授粉 (Electric Aided Pollination)：以本場自為設計乾電池製之電助授粉器行授粉 (如圖一)，可供電壓為 100V 電流為 0.4mA 使用時，負極的電線附著植物之花梗上，而以正極在開花朵上通電流，並以踏板來控制通電之開關。通電授粉時以鑷子夾新鮮花粉行自花授粉，通電二至三秒鐘。以不通電的行人工授粉做對照，並同時行一般原種生產之蕾期授粉來做比較。

三、試驗結果

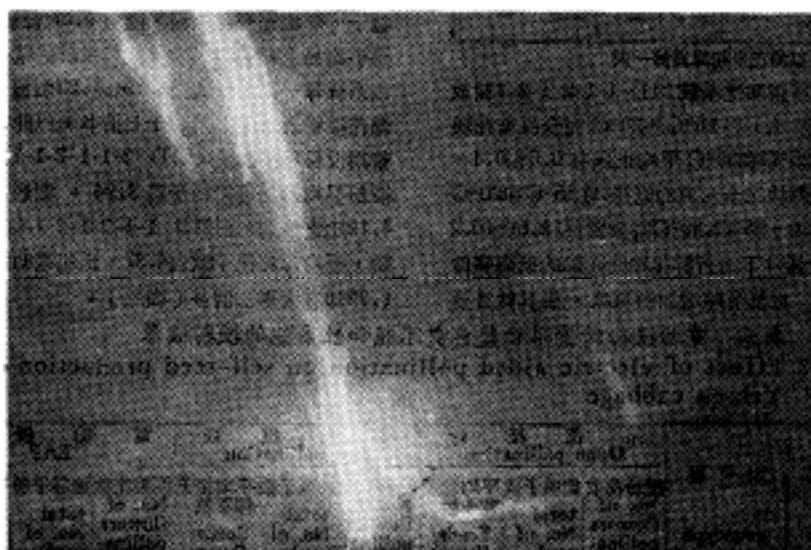
1.葉深甘藍自交不親和性系統 21D-2-1-1-2-1-1 在 15 和 20 條件下，開一天、二天的新鮮花，其自交時花粉管伸入柱頭內的數目較少，每花柱平均為 2.2 6.0 之間。但是溫度 25 及 30 時，雖然剛開一天、二天的花，就有 14.3 18.0 的花粉管伸入柱頭，增加三至六倍之多。在 35 條件下的一、二天新鮮花授粉，則花粉管呈彎曲而無效，很少伸入柱頭，開花三天以上到五天的老花，

在 15 和 20 條件下，有 4.9 17.5 的花粉管伸入，比起一、二天的新鮮花，明顯的隨著開花的天數多，而伸入之花粉管隨而增加。25 和 30 條件時的老花，有 25 31.7 的花粉管伸入，比起在 15 20 的同花齡都增加，而又比起同溫度條件下的新鮮花也增加。在 35 的老花幾乎花粉無效，或為花柱在此條件下多為掉落，而無法檢查（表一）。



圖一、電動授粉器

Fig. 1. Electric aided pollination equipment



圖二、花粉管伸入花柱之情形

Fig. 2. Pollentubes development in the style

2.另自交不親和性系統 21D-1-1-2-1-2-1 開放一、二天的新鮮花，在 15 和 20 完全沒有花粉管伸入柱頭，25 和 30 平均也只有 0.5 和 0.4，也幾近乎 0。在開放三至五天的老花，在 15 和 20 分別為 0.8 和 3.0。25 ，30 時分別為 12.5 與 10.2，比起同溫度條件下的新鮮花和同花齡的低溫條件（15 20 ）也都有略增加的現象，但其數目並不為很多。通常一般親和性的交配，每花柱內可約

有 100 以上到 200 的花粉管伸入花柱內 (表二)。

表一、不同溫度與花齡對葉深甘藍自交不親和性系統 21D-2-1-1-2-1-1 (S₁S₁) 自交的影響 (平均每花柱內伸入花粉管數目)

Table 1. Effect of temperature and stages of flower on self-incompatibility line 21D-2-1-1-2-1-1 (S₁S₁) of Yesen cabbage. (Mean number of pollen tubes penetrated in style)

花齡 stages of flower	temperature 溫度	15	20	25	30	35
	一 天		2.2	3.3	14.3	15.6
二 天		2.6	6.0	18.0	15.0	5
三 天		7.6	12.3	27.3	25.0	-
四 天		4.9	13.5	25.0	31.7	-
五 天		10.1	17.5	29.0	26.0	-

表二、不同溫度與花齡對葉深甘藍自交不親和性系統 21B-1-1-2-1-2-1 (S₃S₃) 自交的影響 (平均每花柱內伸入花粉管數目)

Table 2. Effect of temperature and stages of flower on self-incompatibility line 21B-1-1-2-1-2-1 (S₃S₃) of Yesen cabbage. (Mean number of pollen tubes penetrated in style)

Temperature 溫度	stages of flower 花 齡	新 鮮 花 freshly opened flower	老 花 old flower
	10		0
20		0	3.0
25		0.5	12.5
30		0.4	10.2

註：新鮮花係開花兩天內，老花係開花三天以上者。

3. 以電助授粉行授粉與通常開花授粉及蕾期授粉時 21D-2-1-1-2-1-1 行 103 朵花授粉，共得到十四個種子，平均每授粉一朵花可得有 0.14 的種子，而 21B-1-1-2-1-2-1 在 397 朵自花授粉，有 28 個種子，平均每一花授粉，僅有 0.07 個種子，幾乎很小約為上系統的一半。此二系統的電助授粉，前後系統每一花粉分別為 4.12 和 1.23 個種子，約增加開花授粉的二十九倍和十七倍多。以此電助

授粉與蕾期授粉相為比較, 21D-2-1-1-2-1-1 系統的蕾期授粉平均每莢可得種子為 3.94。顯然電助授粉的 4.12 比之多些, 而 21B-1-1-2-1-2-1 系統之蕾期授粉, 平均每莢種子數為 4.37, 比起電助授粉的平均 1.23 卻有大過三倍多 (表三)。

表三 電助授粉對葉深甘自交不親和性系統的授粉效果

Table 3. Effect of electric aided pollination on self-seed production of Yehsen cabbage

系統 lines	因子型 genotype	開花授粉 Open pollination			蕾期授粉 Bud pollination			電助授粉 EAP		
		授粉 花數 No. of flowers pollinated	總種 子數 Total No. of seeds	平均 每莢 種子數 Seeds/ flower	授粉 花數 No. of flowers pollinated	總種 子數 Total No. of seeds	平均 每莢 種子數 Seeds/ flower	授粉 花數 No. of flowers pollinated	總種 子數 Total No. of seeds	平均每 莢種子 數 Seeds/ flower
21D-2-1- 1-2-1-1	S ₁ S ₁	103	14	0.14	101	753	3.94	266	1095	4.12
21B-1-1- 2-1-2-1	S ₃ S ₃	3.7	28	0.07	556	2429	4.37	345	424	1.23

三、討 論

從試驗之結果得知, 葉深甘藍自交不親和性系統 21D-2-1-1-2-1-1 易受溫度條件所影響, 在超過 25 條件自交時, 本身的花粉管很容易伸進柱頭內。尤其是開放三天以上的老花更為容易。可謂此系統不僅受溫度左右, 同時此系統也有老花偽稔 (Pseudogamy) 之存在。因此利用系統為一親本行雜交採種時, 在開花期如遇高溫或親本花期不一致, 以及媒介昆蟲如蜜蜂過少之條件下, 皆有比較產生非雜交性種子, 即 Sibs 的可行。而自交不親和性系統 21B-1-1-2-1-2-1, 對於各種不同溫度沒有什麼影響, 只有老花又高溫條件 (25 30) 下有少數的花粉管可伸入花柱內。所以此系統不親和性系統較前系統為安定。

此二不親和性系統的安定性, 也可由人工行自花授粉看出, 較安定之 21B-1-1-2-1-2-1 系統每一花授粉僅有 0.07 種子, 而 21D-2-1-1-2-1-1 系統為 0.14 種子 (表三)。因此開花授粉種子數較少者, 對於環境條件如溫度之影響少, 而發生之偽稔性也較低。相反的開花授粉種子較多者, 對於環境條件之影響大。

在電助授粉之結果也可看出, 此電助授粉可以打破自交不親和性, 但是兩系統顯然有差別, 較為穩定的系統 21B-1-1-2-1-2-1 也對電流的效果表安定。而對較不穩定的系統 21D-2-1-1-2-1-1, 卻有很大的效果。此電助授粉法之優點最大的

好處在於開放的花可以取得種子，對於原種生產多能增加每株的種子數，同時也可以節省許多蕾期授粉用鑷子撥開花蕾的時間和手續，本試驗對於兩葉深甘藍，自交不親和性系統都有打破之作用，尤其是對 21D-2-1-1-2-1-1 系統比蕾期授粉可得更多的種子，但對 21B-1-1-2-1-2-1 系統效果比蕾期授粉為低，因此對比較穩定系統之打破，尚有待技術上、方法上的改進。自 Roggen(1972,1973)⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾開發電助授粉行孢子甘藍及縮緬甘藍能打破自交不親和性後，證明其打破程度也依植物種類和系統而有差異。並認為此項打破之原因係由於導電力使花粉粒緊密接觸柱頭上乳頭狀突起細胞，或柱頭上之臘質層受損害及構造之改變，以及電勢之差異使細胞壁受干擾而變成親和性。然而本試驗之兩系統，由開花授粉種子愈少或近於 0，系統 21B-1-1-2-1-2-1（每莢平均 0.07 粒），對電助授粉表較穩定，而開花授粉種子較多系統 21D-2-1-1-2-1-1（每莢平均 0.14 粒）易為電助授粉所打破。因此對電助授粉表較穩定之系統，其對於高溫與老花之影響也小，而電助授粉易打破系統，同樣的也易受高溫及老花的影響。此類由高溫、老花及電助授粉等環境因素所形成的所謂偽親和性（Pseudo-compatibility）是否與系統本身的遺傳因子有關，頗值探討。

在一般市面上的不同雜交 F1 品種中，就發現有不同比率的 Sibs 存在 Johnson(1971)⁽⁹⁾在孢子甘藍之試驗指出自交不親和性的強度，不僅在不同之自交系而有異，同時同一自交系也受環境條件之不同而有差別，因此並非為固定不變的常數。Johnson(1972)⁽¹⁰⁾又指出兩親本的比例，不同的亞系統，植株的大小，媒介昆蟲的種類，都是變更非雜交性種子比例的原因。Nasrallah & Wallace (1968)⁽¹⁵⁾以甘藍自交系開花時於 27 發育六天後，移置於 15 行授粉，每莢增加到十個種子的記錄，並謂此在高溫下發育之花，在低溫行授粉，係由高溫度阻礙了不親和性抑制物質的形成速率及量。Van Hal 等（1968）⁽²³⁾研究孢子甘藍花粉管的發育指出，溫度增加到 24 時，自交不親和性的柱頭反應轉變為較弱（非花粉有所變更）。並在具有相同不親和性因子的不同自交系內，發現有不同程度的自交不親和性，因此該氏認為係修改因子作用。但 Ockendon (1973)⁽¹⁶⁾試驗自交不親和性孢子甘藍系統在高溫條件下（26）顯著的自交親和性之增加，謂此是係由環境作用及在一株不同花上本身的生理上有差異所致。

East (1929)⁽⁶⁾在菸草上認為有副助因子的存在，而對 S-allele 負有修改作用（modifying action）。柿崎（1930）⁽¹¹⁾也以同樣之觀點來解釋甘藍自交不親和性有不同的稔性後代出現。治田（1962）⁽⁸⁾、Thompson (1967)⁽²²⁾等也都認為具有多因子存在，而此多因子有修改自交不親和性 S-allele 之作用。本試驗葉深甘藍自交不親和性系統依此推測也受修改因子（modified gene）之影響，但是此環境條件為主要控制條件。該修改因子在不同環境下，影響許多之因素，諸如花粉之發

芽，花粉管之伸長，胚珠作用有較長久之活力，以及不親和性物質之形成等，促使 S-allele 的修改作用而變成偽稔。

因此，由於此環境條件而引起之 Sibs，本省甘藍開花於三、四月間適為進入高溫期，要如何減少此項比率是個很重要的問題。如果此類非雜交性種子，能在苗期形態特性上辨別，移植時將此非雜交性苗除掉的話，也算是很方便。但是在育種時選拔良好自交系才是根本的方法。所謂良好的自交系，除了選二自交系之雜交 F_1 具有所需園藝性狀，以及此二自交系需為同型結合體，具有不同自交不親和性複相對因子，而相互雜交為親和性外，尚得要留意選拔對環境條件表穩定的自交系。換句話說，即要選取有強 Sib-incompatibility 系統來做親本，才能避免非雜交性種子之比率，當然，採種環境之良好氣候，親本花期之一致者，以及充分的蜜蜂為媒等條件，當也可減少 Sibs 的比率。

參考文獻

- 1.沈再發 (1970): 利用自交不親和性育成甘藍之一代雜種(一) 中國園藝 16(3):26-30。
- 2.沈再發 (1972): 自交不親和性葉深甘藍系統的生理與遺傳之研究(1) 農林廳種苗繁殖場試驗報告 I:1-14。
- 3.沈再發 (1972): 自交不親和性葉深甘藍系統的生理與遺傳之研究(2) 農林廳接苗繁殖場試驗報告 I:15-26。
- 4.沈再發 (1974): 螢光顯微鏡在十字花科蔬菜育種上測定交配親和性之利用研究科學發展 第二卷 10:29-31。
- 5.Attia, M. S. and Munger, H. M. (1950): Self-incompatibility and the production of hybrid cabbage seed. Am. Soc. Hort. Sci. 56:363-368.
- 6.East, E. M. (1929): Self-sterility. Biliogr. Genet. 5: 331-368.
- 7.Gonai, H. & Hinata, K. (1971): Effect of temperature on pistil growth and phenotypic expression of self-incompatibility in Brassica oleracea L. Jap. J. Breed 21: 195-198
- 8.Haruta, T.(1962): Studies in the genetics of self-and cross-incompatibility in cruciferous vegetables. Res. Bull. Takil pl. Breed, Exp. Stn. No. 2 Kyoto, Japan No.2.
- 9.Johnson, A. G. (1971): Factors affecting the degree of self-incompatibility in inbred lines of Brussels sprouts. Euphytica 20:561-573
- 10.Johnson, A. G. (1972): Some cause of variation in the proportion of selfed seed

- present in F1 Hybrid seed lots of Brussels sprouts. *Euphytica* 21:309-316.
11. Kakizaki. Y. (1930): Studies on the genetics and physiology of self-and cross-incompatibility in the common cabbage. *Japan, J. Bot.* 5:133-208.
 12. Kroh, M. (1966): Reaction of pollen after transfer from one Stigma to anther. *Zuchter* 36: 185-189.
 13. Linskens, H. F. & Kroh M. (1967): Inkompatibilität der phanerogamen. In: W. Ruhland, *Handbuch der pflanzenphysiologie*, Bd. 18:506-530.
 14. Nakanishi T. and Hinata K. (1975): Self-seed production by CO₂ gas treatment in self-incompatible cabbage. *Euphytica* 24: 117-120.
 15. Nasrallah, M. H. & D. H. Wallace (1968): The influence of modifier genes on the intensity and stability of self-incompatibility in cabbage. *Euphytica* 17:495-503.
 16. Ockendon, D. J. (1973): Selection for high self-incompatibility in inbred lines of Brussels sprouts. *Euphytica* 22:503-509.
 17. Roggen, H. P. J. R. (1972): Scanning electron microscopical observation on compatible and incompatible pollen-stigma interaction in Brassica. *Euphytica* 21:1-10.
 18. Roggen, H. P. J. R. A. J. Van Dijk and C. Dorsman (1972): Electric aided pollination: A method of breaking incompatibility in Brassica oleracea L. *Euphytica* 21:181-184.
 19. Roggen, H. P. J. R. & Van Dijk A. J. (1972): Breaking incompatibility of Brassica oleracea L. by steelbrush pollination. *Euphytica* 21:424-425.
 20. Roggen, H. P. J. R. & A. J. Van Dijk (1973): Electric aided and bud pollination: which method to use for self-seed production in cole crops. *Euphytica* 22:260-263.
 21. Tatebe. T. (1968): Studies on the physiological mechanism of self-incompatibility in Japanese radish, . Breakdown of self-incompatibility by chemical treatment. *J. Jap. Soc. hort. Sci.* 37:227-230.
 22. Thompson, K. F. (1967): Breeding problems in Kale with particular reference to marrow-stem kale. *Cambridge pl. Breed. Inst. Ann. Rep.* 1965-1966 pp.7-34.
 23. Van Hal J. G. et al (1968): Estimation of the level of self-incompatibility. *Brassica meeting of Eucarpia*, 37-38.

Factors Affecting the Degree of Self-Incompatibility and the Breaking of Self-Incompatibility

in Yehsen Cabbage

Tzay-Fa Sheen & Cong-Ich Liao

Abstract

1. An F_1 hybrid is obtained from two inbred lines of cabbage. These lines have to be developed by inbreeding and each homozygous for different major incompatibility allele and thus mutually compatible. Although, we found that testing of self- and sib-crosses are incompatible in breeding field, but if the circumstance factors of seed producing changed, it may lead to different sib rates in different inbred lines of Yehsen cabbage. This experiment has been carried out to study the effect of environmental conditions on the degree of self-incompatibility and try to know whether it is possible to break the incompatible barrier and get practical use of "electric aided pollination" (EAP) in stock seed production.
2. Self-incompatibility line 21D-2-1-1-2-1-1 of Yehsen cabbage expressed weakly incompatible inbred (mean seed set of 0.14 seeds per pod when selfing) which is influenced by temperature variation and old stages of flower. Besides, it was broken incompatibility barrier easily by EAP. The average seeds of per pollination flower with EAP is higher than with bud pollination.
3. Self-incompatibility line 21B-1-1-2-1-2-1 of Yehsen cabbage expressed strongly incompatible inbred (mean seed set of 0.07 seeds per pod when selfing) which was stable under different temperature regimes. Although, the old stages of flower have some pollen tubes penetrate the style, and was broken by EAP, but there are a few.
4. From the results of the degree of self-incompatibility in Yehsen cabbage. We considered that the presence of modified genes in Yehsen cabbage. But we suspected that these play a minor role in modifying action of S-allele. The major causes of pseudo-compatibility it apparently is conditioned primarily by environmental condition rather than by genetic background.