

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

玉米雜種優勢之基因表現差異分析(第一年)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89 - 2313 - B - 002 - 107

執行期間： 88 年 8 月 1 日 至 89 年 7 月 31 日

計畫主持人：林順福

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學農藝系

中 華 民 國 89 年 10 月 27 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-107

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：林順福 國立台灣大學農藝系

計畫參與人員：簡禎佑 國立台灣大學農藝系

一、中文摘要

本計劃利用新近發展之基因表現差異分析技術，探討玉米雜種優勢之遺傳機制。試驗使用之材料為單雜交品種台農一號、台農二號及其自交系親本。試驗結果顯示在台灣北部地區台農二號較台農一號能表現雜種優勢；正反交對產量性狀有較大影響，對株高及穗長之影響較小；同株自交所產生自交系其生長活力稍低於姊妹株交配者；基因表現差異產物分析結果顯示有顯性作用存在，而且細胞質之遺傳物質亦可能與雜種優勢之表現有關，有待進一步探討。

關鍵詞：關鍵詞：玉米、雜種優勢、基因表現差異分析、細胞質效應

Abstract

This project was to study the genetic mechanisms of heterosis in maize with a newly developed technology, differential display. Two single-cross cultivars, including TNG 1 and TNG 2, and their inbred parents were used in this experiment. The result indicated single-cross cultivar TNG 1 expressed better hybrid vigor in the northern area of Taiwan than TNG 2. The effects of reciprocal crosses were obvious in yield but not in plant height and ear length of corn. Inbred

plants propagated from sib-mating had less weakness than plants from self-pollination. Dominance effect was observed in the differential display (D.D.) analysis. Cytoplasmic effect was also detected based on the band density of D.D. More studies are needed to reveal the relation between agronomic traits and D.D. results.

Keywords: Maize, Heterosis, Differential display, Cytoplasmic effect

二、緣由與目的

雜種優勢(heterosis 或 hybrid vigor) 是異花受粉作物常有之現象，在有些自花受粉作物如大豆、小麥、水稻、蕃茄等亦可發現。自從 Shull(1909 & 1952) 提出 'heterosis' 以描述異質遺傳結合狀態對生物體之細胞、生長、及生理活性之刺激作用，此種發現已廣泛被利用於作物品種改良，其中以在玉米品種改良之貢獻最為顯著，也最具示範作用(Sprague & Eberhart, 1977; Hallauer & Miranda, 1988)。在玉米育種係經由自交系選育，產生及檢定雜交種，再推薦優良雜種玉米供農民栽培，由於雜種優勢意味著較強勁之生長活力與較高產量，對農民而言，雜交種象徵著高品質及高收益之特性；對種苗

商而言，非但其所推出種子易受農民喜愛而獲利，經由控制雜交種子親本(自交系)來源，可做為確保長期利益之憑藉；對人類而言，由於人口不斷增加，且可耕地有限情況下，利用雜種優勢增產，為解決人類糧食不足問題之一重要途徑。

即使在雜種優勢觀念提出五十年後，對於雜種優勢遺傳或生理機制之瞭解仍非常模糊(Tsafaris, 1995)。有關雜種優勢之遺傳假說主要有顯性、超顯性、及基因上位性作用等三種假說(Sprague, 1983)。顯性說(dominant and dominant favorable linked-gene hypothesis)：認為雜種是有利顯性基因的聚集，或是不良隱性基因受到遮蔽的結果。超顯性說(overdominance)：認為雜種優勢為異結合基因表現優於同結合個體。基因上位性說(epistasis)，認為雜種優勢是不同基因間相互作用之結果。支持顯性說學者認為若能保留有利顯性基因，則自交後代能維持雜種優勢，但若有許多有利基因影響雜種優勢，則不易在 F2 後代找到具備所有有利顯性基因之個體。此外也有學者認為雜種優勢與粒線體之活力(McDaniel, 1973)、生理代謝之刺激或平衡(Rhodes et al., 1992)或 DNA 甲基化(Tsiftaris & Polidoros, 1993)等有關。

基於上述三種遺傳假說，作物遺傳或育種家嘗試利用親源較遠之材料進行雜交，以期獲得較高的雜種優勢。Moll 等(1965)首先利用玉米形態上差異分析雜種優勢表現，發現雜種優勢與形態差異性成正相關，然而在其他物種則未發現。Smith 與 Smith (1989)研究玉米同功酵素(isozyme)差異性與雜種優勢間並無顯著相關性存在。近年來由於分子標識(molecular marker)之發展與應用，Lee 等(1989)及 Godshalk 等(1990)使用 RFLP 測定不同自交系間之遺傳距離(genetic distance)，並且預估兩自交系之雜種表

現，發現並無顯著相關存在。雖然後來 Stuber 等(1992)在類似的試驗則發現玉米自交系間之 RFLP 差異性與其雜交後代雜種優勢之表現有顯著相關存在，此種進展僅限於自交系親源與雜種優勢間之關係，有助於自交系之區分成雜種優勢群或親本選擇，但並無法提出較直接有效證據，以解釋雜種優勢之遺傳機制或提高雜交後代族群選拔效率。因此，在此領域之研究人員嘗試在既有遺傳親源性研究基礎下，進一步探討基因組(genome)內基因之表現。

基因表現之變異性可以由個別蛋白質含量差異性(protein amount polymorphism, PAP)或 RNA 含量差異性(RNA amount polymorphism, RAP)分析。Leonardi 等(1991)分析 8 個自交系及其全互交產生單雜交種後代之 PAP 與雜種優勢之關係，試驗結果顯示包括產量及株高等農藝性狀之雜種優勢表現與 PAP 有顯著相關。Damerval 等(1994)利用數量性狀基因定位(QTL mapping)方法釐定影響玉米 PAP 之基因位置，他們以 RFLP 分子標識分析 F2 個體之由雙向聚丙烯酰胺凝膠電泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)產生之 72 個未知功能蛋白質含量，結果發現在所有分析單一蛋白質中，有 35% 受到兩個以上之基因控制，有些蛋白質甚至受到 11 對基因影響，但是仍未有報告進一步直接探討 PAP 基因或此等蛋白質與重要性狀雜種優勢關係。Tsiftaris 與 Polidoros (1993) 利用 35 個被選殖玉米基因當探針(probe)進行北方點漬法(Northern blotting)分析，探討玉米兩組單交雜種及其親本在四個不同發育階段之 RAP 表現，結果發現在發育早期有較多之表現基因(active gene)，但是無論雜交親本或其產生之單交雜種在同一發育階段之表現基因相同。此外 RAP 測定結果也符合農藝特性之表現，然而由於此研究所使用之探針多為影響質量性狀(qualitative

trait)基因，未能解釋一般學者認為與雜種優勢相關複雜之數量性狀

(quantitative trait)表現或其他調節基因(regulatory gene)之參與；此種外表型與 RAP 含量之相關未能提供充分之證據。

新近發展之基因表現差異分析(differential display)為測定基因表現之一有效技術(Liang & Pardee, 1992)，可用於比較同一生物體在不同發育階段或不同環境之基因表現，或比較兩不同個體之基因表現。此種技術係將抽取的 mRNA 經由加入長胸腺嘧啶引子(poly-T primer)，例如，T(11)XY，經反轉錄酵素作用合成 cDNA，加入一逢機引子後經由 PCR 反應放大 DNA 片段，然後在聚乙烯醯胺電泳膠比對各 DNA 片段之含量，以對應某一段 mRNA 之含量(mRNA abundant)。因為可選取在電泳膠體上具有差異性之 DNA 片段，故可進行核酸序列分析或當為基因選殖用探針。此一技術目前已廣泛用於基因表達及基因選殖之研究，許多成功例子及詳細操作方法已經有系統整理(Liang & Pardee, 1997)。

因此本計劃預計在兩年期間利用玉米之雜交設計及基因表現差異分析技術測定玉米自交系、單交雜種、及其 F2 族群之基因表達，以探討玉米雜種優勢遺傳機制相關問題；包括細胞質與雜種優勢之關係、雜種優勢表現相關基因及其作用、雜種優勢在 F2 以後世代之分離情形、及雜種優勢與自交弱勢之關係等。經由這些問題之探討，可望對玉米雜種優勢之遺傳機制有進一步的瞭解，有助於育種策略之訂定或選拔，以提高作物生產力，此外亦可提供其他作物利用雜種優勢之參考。

三、結果與討論

表 1. 單雜交種台農一號(TNG 1)及其親本重要農藝性狀之平均值

性狀	ICAL210	Hi31a	TNG1
株高 (cm)	136.3	128.0	148.5
穗長 (cm)	11.7	12.9	13.3
穗行	10.9	12.8	12.0
開花期 (days)	69.6	73.4	71.0
吐絲期 (days)	70.4	74.4	71.3

表 2. 單雜交種台農二號(TNG 2)及其親本重要農藝性狀之平均值

性狀	SW558	Hi31b	TNG2
株高 (cm)	169.0	142.4	192.0
穗長 (cm)	13.9	12.4	16.5
穗行	12.6	13.2	14.2
開花期 (days)	66.6	67.8	60.0
吐絲期 (days)	70.2	70.8	60.3

本試驗以適合本省栽培環境之單雜交玉米品種台農一號及台農二號和其親本為材料，利用基因表現差異分析法(Differential display)探討玉米雜種優勢之遺傳機制。由表 1 及表 2 可見台農一號品種除了株高及穗長兩特性大於兩雜交親本外，其他穗行、開花期及吐絲期則介於自交系 ICAL210 及 Hi31a 間，但是台農一號品種在本省主要玉米栽培區均有良好生育表現，顯見在台北栽培環境未能充分表現其雜種優勢。然而台農二號品種之株高、穗長、穗行數、開花期及吐絲期等均優於兩自交系親本，顯示此一品種在台北栽培環境能表現出雜種優勢。

表 3. 由正反交配產生之台農一號及台農二號單雜交種重要農藝性狀之平均值

	TNG 1		TNG 2	
	正交	反交	正交	反交
株高 (cm)	202.2	207.2	226.8	228.3
穗重 (g)	120.2	111.5	102.2	138.5
穗長 (cm)	18.4	17.6	19.0	19.3

由表 3 正反交配之單雜交種農藝性狀比較可見正反交配對株高及穗長性狀影響較小，但是對產量則有較大影響，推測與

細胞質之遺傳物質有關，值得進一步探討。

表 4. 台農一號兩親本同株自交及姊妹株自交後代之農藝性狀平均值

TNG1	ICAL210		Hi31a	
	Self-mating	Sib-mating	Self-mating	Sib-mating
株高 (cm)	136.4	154.3	128.0	150.9
穗重 (g)	24.1	29.0	51.8	37.4
穗長 (cm)	15.1	12.9	17.0	15.1

表 5. 台農二號兩親本同株自交及姊妹株自交後代之農藝性狀平均值

TNG2	SW558		Hi31b	
	Self-mating	Sib-mating	Self-mating	Sib-mating
株高 (cm)	180.3	184.0	149.7	137.7
穗重 (g)	25.9	37.7	36.8	36.0
穗長 (cm)	15.8	14.8	16.8	14.4

為探討自交弱勢與雜種優勢之關係，本試驗調查四個自交系親本同株自交及姊妹株交配後代之農藝性狀表現，由表 4 及表 5 可知除了自交系 SW558 及 Hi31a 同株自交之穗長大於姊妹株交配者，與 Hi31a 同株自交之穗重大於姊妹株交配者，姊妹株交配產生之自交系表現均優於同株自交者；比較台農二號之兩親本自交系同株自交及姊妹株交配後代之農藝性狀表現亦得到相似結果，唯其差異不大，可能僅一次之同株自交未能充分顯現自交弱勢，將於本計畫第二年試驗調查連續兩次同株自交之反應。

為了在 mRNA 層級探討玉米雜種優勢與自交弱勢，本試驗分別選取多株之單雜交種及多株之自交系進行基因表現差異分析，由圖 1. 可見在相同自交系不同植株間之 mRNA 層次，仍然有許多差異存在，在相同單雜交種不同株間之情形亦相同。顯示傳統方法探討雜種優勢之困難，及進行基因表現差異分析時需選取多株樣品之必要性。由圖 1. D1 箭頭標示位置可見自交系 ICAL210 無 mRNA 產物，而另一親本及雜交種台農一號則有明顯產物，即在 mRNA 層次

有顯性作用存在；而在 D2 箭頭所指位置雖然自交系 ICAL210 有 mRNA 產物，但是其條帶 (band) 強度遠低於另一親本及雜交種台農一號，此又顯現另一類型之顯性作用。至於這些 mRNA 層次之差異與農藝性狀之關係則需在 F2 族群進一步分析確認。

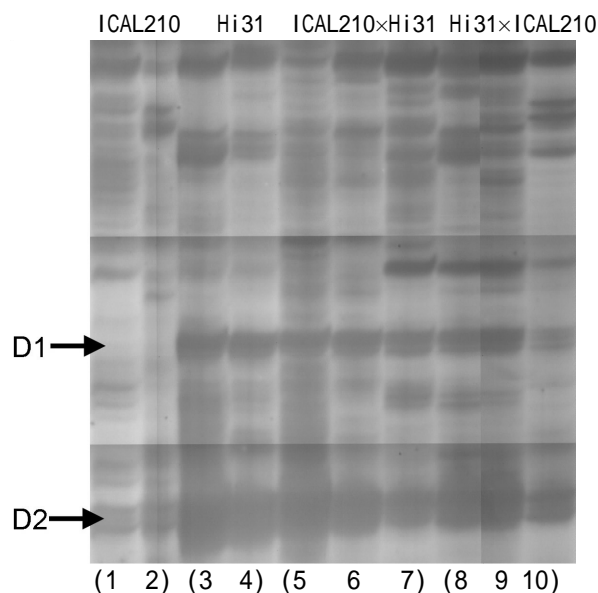


圖 1. 利用 Primers P705+DD99CG 進行台農一號親本及其正反交配植株 differential display 之結果

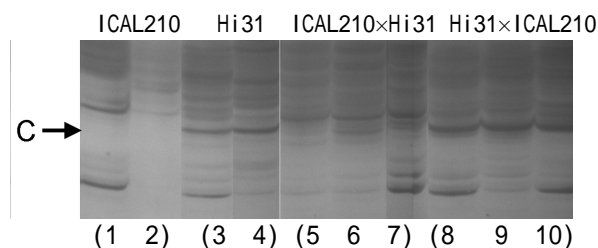


圖 2. 利用 Primers P702+DD99CG 進行台農一號親本及其正反交配植株 differential display 之結果

在圖 2 箭頭 C 所示位置顯示亦有顯性作用現象，此外正反交配之單雜交種也有不同程度之表現，且其表現優於兩雜交親本，推測細胞質遺傳物質可能與雜種優勢之表現有關，有待進一步收集類似產物分析其核酸序列及做為探針追蹤其表現。

四、計劃成果自評

本計畫利用新近發展之 Differential display 技術在 mRNA 層次探討雜種優勢機

制，非但可增進對雜種優勢之瞭解，對此種技術之應用潛力有更深入之認識。

五、參考文獻

Damerval, C., A. Maurice, J. M. Josse, and M. De Vienne (1994)

Quantitative trait loci underlying gene product variation: A novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics* 137:289-301.

Godshalk, E. B., M. Lee and Lamkey (1990) Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize. *Theor Appl Genet* 80:273-280

Hallauer A. R. and J. B. Miranda (1988) *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Iowa State University Press, Ames, pp 337-373

Lee, M., E. B. Godshalk, K. R. Lamkey and W. W. Woodman (1989) Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. *Crop Sci* 29:1067-1071.

Leonardi, A., C. Damerval, Y. Hebert, A. Gallais and D. De Vienne (1991) Association of protein amount polymorphism (PAP) among maize lines with performances of their hybrids. *Theor Appl Genet* 82:522-560.

Liang, P. and A. B. Pardee (1992)

Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.

Liang P. and A. B. Pardee (1997) *Differential Display Methods and Protocols*. Humana Press INC. Totowa.

Moll, R. H., J. H. Lonquist, J. Velez and E. Johnson (1965) The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics* 52:139-144.

Rhodes, D., G. C. Ju, W. Yang and Y. Samaras (1992) Plant metabolism and heterosis. *Plant Breed Rev* 10:53-91.

Russell, W. A., S. A. Eberhart, A. Urbano, and O. Vega (1973) Recurrent selection for specific combining ability for yield in maize population. *Crop Sci* 13:257-261.

Shull, G. H. (1909) A pure line method in corn breeding. *Rpt Am Breeders Asso* 5: 51-59

Shull, G. H. (1953) Beginning of the heterosis concept. In: Gowen J. W. (ed) *Heterosis*. Iowa State College Press, Iowa, pp 14-48.

Smith, J. S. C. and O. S. Smith (1989) The description and assessment of distance between inbred lines of corn. II. The utility of morphological, biochemical, and genetic descriptors and a scheme for the testing of distinctiveness between inbred lines. *Maydica* 34:151-161.

Sprague, G. F. and S. A. Eberhart (1977)
Corn breeding. In: *Corn and Corn
Improvement*. Madison, Wisconsin, pp
305-362.

Sprague, G. F. (1983). Heterosis in
maize: Theory and practice. In
*Heterosis: Reappraisal of Theory and
Practice*, ed. R. Frankel. Berlin:
Springer-Verlag.

Stuber, C. W., S. E. Lincoln, D. W. Wolff,
T. Helentjaris and E. S. Lander (1992)
Identification of genetic factors
contributing to heterosis in a hybrid
from two elite maize inbred lines using
molecular markers. *Genetics* 132:823-
839.

Tsaftaris, A. S. and A. N. Polidoros
(1993) Studying the expression of genes
in maize parental inbreds and their
heterotic and non-heterotic hybrids.
In *Proceedings of XVI Eucarpia Maize
and Sorghum Conference*, eds. A. Bianci,
E. Lupotto and M. Motto: Italy, pp
283-292.

Tsaftaris, S. A. (1995) Molecular
aspects of heterosis in plants.
Physiologia Plantarum 94: 362-370.

Tsaftaris, A. S. and M. Kafka (1998)
Mechanisms of heterosis in crop plants.
J of Crop Prod 1:95-111

Wolf, P. W. and A. R. Hallauer (1997)
Triple testcross analysis to detect
epistasis in maize. *Crop Sci* 37: