

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※
※
玉米雜種優勢之基因表現差異分析(二)
※
※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

執行期間：89年08月01日至90年07月31日

共同主持人：

- ☐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

中 華 民 國 91 年 01 月 17 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-002-192-7606

執行期限：89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

主持人：林順福 國立台灣大學農藝系

一、中文摘要

本計劃利用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 1 號(PCAL210 x Hi31)及台農 2 號(SW558 x Hi31)及其親本、F1、與 F2。本試驗共篩檢 38 個基因表現差異分析之核酸引子組合(primer pair)，分析 2,468 個訊號較強之 cDNA 片段。其中發現 3 個 cDNA 片段表現細胞質遺傳模式，12 個表現顯性遺傳模式，2 個表現超顯性遺傳模式，估算參與雜種優勢表現之基因約為 0.69%。由單雜交種 TNG1 之 cDNA 片段來源分析發現約有 53.5% 之 cDNA 片段為兩親本自交系所共有，而 46.5% 則來自單一個親本，且不同植株間約有 10%-20% 之差異存在。GC12D 片段在 F1 之表現呈現顯性之遺傳模式，但是在 F2 世代分離植株則表現部份顯性至完全顯性之多種表現型，此種結果顯示在 F2 植株在同一基因座之表現程度並不相同，說明 cDNA 片段表現在 F2 並未完全遵循孟德爾遺傳模式或已受到環境等因子影響。

關鍵詞：玉米、雜種優勢、基因表現差異分析、細胞質效應

Abstract

Two single-cross cultivars, including TNG1 (PCAL210 x Hi31), and TNG2(SW558 x Hi31), their inbred parents, and F2 populations were used in this experiment to study genetic mechanisms of heterosis in maize through differential display analysis. Gene expression patterns of 2,468 cDNAs amplified by 38 pairs of

primers were investigated. Three cDNA clones with cytoplasmic inheritance, 12 with dominant, and 2 with overdominant patterns were observed. About 46.5% of investigated cDNAs were from one of the parents and 0.69% were potentially related to heterosis. Difference in band signal (10~20%) was found within inbred lines. Although GC12D cDNA gave a completely dominant pattern in F1, individuals of F2 population segregating with partial to completely dominant phenotypes were detected. No significant correlation between the expression of cDNA and investigated phenotypes of F2 was found indicating that the phenotypes of cDNAs were possible affected by environment factors or the segregation might not follow Mendelian law.

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(14, 3)。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。

在雜種優勢觀念提出初期，僅重視利用雜種優勢於提高作物生產力，對於雜種優勢之理論研究則相當缺乏，後來逐漸才有雜種優勢效應大小及發生之特性調查、遺傳、生理及生化等研究，但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(18)。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(15)。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、生理代謝之刺激或平衡或DNA甲基化等有關(9, 17)。

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(8)。Smith與Smith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(13)。近年來由於分子標識(molecular marker)

之發展與應用，Lee等及Godshalk等使用RFLP測定不同自交系間之遺傳距離，並且預估兩自交系之雜種表現，發現並無顯著相關存在(2, 4)。雖然後來Stuber等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(16)。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(5)。Damerval等利用數量性狀基因定位方法釐定影響玉米PAP之基因位置，他們以RFLP分子標識分析F₂個體之由雙向聚乙醯胺凝膠電泳(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(1)。Tsafaris與Polidoros利用35個被選殖玉米基因當探針進行北方點漬法分析，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，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表現或其他調節基因之參與；且因為雜種優勢很可能受多對基因影響，此種外表型與 RAP 含量之相關未能提供充分之證據(17)。

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(6)，可用於比較同一生物體或同一基因型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(7)。

因此本計劃希望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；包括利用正反交配之雜交設計探討細胞質與雜種優勢之關係、比較兩自交系及其雜交種探討與雜種優勢表現相關基因及其作用、調查雜種優勢有關基因在 F2 以後世代之分離情形是否符合孟德爾之遺傳原理、及進一步比較影響雜種優勢與自交弱勢之基因是否有關等。經由這些問題之探討，可望對玉米雜種優勢之遺傳機制提供更深入之瞭解，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

本試驗共篩檢 38 個基因表現差異分析之核酸引子組合(primer pair)，分析 2468 個訊號較強之 cDNA 片段，平均每一個引子可獲得 65 個 cDNA 片段。其中發現 3 個 cDNA 片段表現細胞質遺傳模式，12 個表現顯性遺傳模式，2 個表現超顯性遺傳模式(圖 1)。可知參與雜種優勢表現之基因約為 0.69%(17/2468)，並非部份學者所認為雜種優勢表現係多數基因參與之結果。

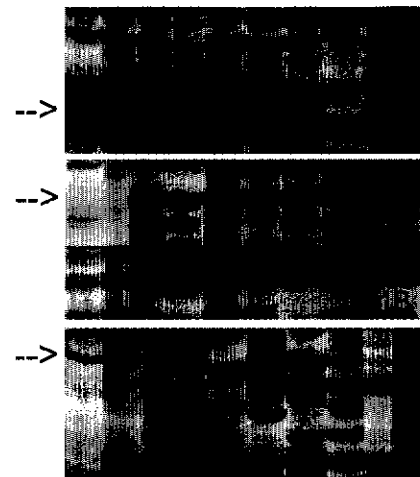


圖 1. 本試驗篩得之超顯性(1A)、顯性(1B)及細胞質遺傳(1C)之 cDNA 片段及引子組合

表 1. 單交雜種(F1)之 cDNA 片段來源

	F1	♀	♂	♀ ♂ 共有	♀ 貢獻	♂ 貢獻
No. of bands	2468	1758	2062	1322	406	740
%	100%	71.2%	83.5%	53.5%	16.5%	30.0%

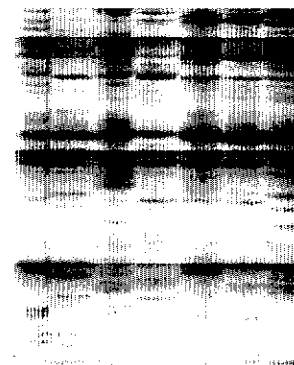


圖 2. 自交系 Hi31a 不同植株間之 cDNA 表現差異

由單雜交種 TNG1 之 cDNA 片段來源分析發現約有 53.5% 之 cDNA 片段為兩親本自交系所共有(表 1)，而 46.5% 則來自單一個親本，其中 16.5% 來自雌親 ICAL210，其餘約 30% 則來自雄親 Hi31a。可知不同自交系之貢獻不一定具有相同之基準。另外以同一自交系 Hi31a 之不同植株為材料分析 cDNA 之差異，結果發現不同植株間約有 10%-20% 之差異存在(圖 2)，顯示自交系在分子層次之雜異度及在進行雜種優勢分析時需要多個單株做為重複之必要性。



圖 3.兩自交系、F1 及其 F2 之 Gc12D 片段分離情形

將 F1 雜種進行自交獲得 F2 種子並且同時種植於田間，調查主要農藝性狀之表現(未列出)，並且分析分析可能與雜種優勢相關之 cDNA 片段，圖 2 係 Gc12D 之 cDNA 片段在 F2 之分離情形(箭頭標示位置)，雖然此一片段在 F1 之表現呈現顯性之遺傳模式，但是在 F2 世代分離植株則表現部份顯性至完全顯性之遺傳(圖 3)。此種結果雖然無法直接解釋雜種優勢減弱或自交弱勢產生之原因，但可知在 F2 世代同一基因之表現程度並不相同，此種現象說明 cDNA 片段表現在 F2 並未完全遵循孟德爾遺傳模式或已受到環境等因子影響，但是並未發現本試驗篩得之 cDNA 片段表現與 F2 外表型有顯著相關存在。

四、計畫成果自評

本計劃利用新近發展之基因表現差異分析技術在 mRNA 層次探討雜種優勢之表現，具有結合新技術應用及重要遺傳性狀探討之特點。選擇以雜交種玉米品種及其親本為材料，除了因為單雜交玉米品種表現較明顯外，傳統之數量遺傳研究之資料亦較完整。本試驗結果除了發現顯性、超顯性及細胞質遺傳物質影響雜種優勢之表現外，同時發現同一雜交親本(自交系)不同植株間具有甚大之分子層次遺傳變異存在，亦說明由自交系評估其雜種優勢潛力之困難。本試驗雖然篩選得到具有雜種優勢表現之 cDNA 片段，但發現 cDNA 片段表現訊號依雜交後代品系而有不同層次之強弱。因此，本試驗結果可供雜交親本選擇及雜種優勢評估之參考。

五、參考文獻

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) Hallauer A. R. and J. B. Miranda (1988) *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Iowa State University Press, Ames, pp 337-373.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) Liang, P. and A. B. Pardee (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- (7) Liang P. and A. B. Pardee (1997) *Differential Display Methods and Protocols*. Humana Press INC. Totowa.
- (8) 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.
- (9) Rhodes, D., G. C. Ju, W. Yang and Y. Samaras (1992) Plant metabolism and heterosis. *Plant Breed Rev* 10:53-91.
- (10) 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.
- (11) Shull, G. H. (1909) A pure line method in corn breeding. *Rpt Am Breeders Asso* 5: 51-59.
- (12) Shull, G. H. (1953) Beginning of the heterosis concept. In: Gowen J. W. (ed) *Heterosis*. Iowa State College Press, Iowa, pp 14-48.
- (13) Smith, J. S. C. and O. S. Smith (1989) The description and assement 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. (14) Sprague, G. F. and S. A. Eberhart (1977) Corn breeding. In: *Corn and Corn Improvement*. Madison, Wisconsin, pp 305-362. (15) Sprague, G. F. (1983). Heterosis in maize: Theory and practice. In *Heterosis : Reappraisal of Theory and Practice*, ed. R. Frankel. Berlin: Springer-Verlag. (16) 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. (17) Tsafaris, 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. (18) Tsafaris, S. A. (1995) Molecular aspects of heterosis in plants. *Physiologia Plantarum* 94: 362-370. (19) Tsafaris, A. S. and M. Kafka (1998) Mechanisms of heterosis in crop plants. *J of Crop Prod* 1:95-111. (20) Wolf, P. W. and A. R. Hallauer (1997) Triple testcross analysis to detect epistasis in maize. *Crop Sci* 37: 763-770.