

水稻過氧化酶修飾基因座 $M-Pox-1$ 位置之釐定

吳永培 白 鎰

國立中興大學農藝學系

摘要：本試驗係利用染色體轉座連鎖分析法和傳統之連鎖分析法，探討水稻過氧化酶 $Pox-1$ 之修飾基因座 $M-Pox-1$ 所屬之染色體，並釐定其相對位置。經配合二種分析法進行分析，結果發現： $M-Pox-1$ 基因座與轉座品系 E42 之斷點 (1-5d) 間有連鎖關係，其重組值為 8.3%，但與轉座品系 E22、E23 和 E43 之斷點 (1-5b、1-5c、5-6a) 則呈獨立關係。而經由傳統之連鎖分析發現，修飾基因座 $M-Pox-1$ 與標識基因 $gl-1$ 呈完全連鎖關係，即其重組值為 0%，屬於第 5 連鎖群，但與同群之 $d-1$ 、 $nl-1$ 和 $gh-1$ 等三基因座則呈獨立關係。由此可知過氧化酶修飾基因座 $M-Pox-1$ 屬於第 5 連鎖群 (第 5 染色體)，其與各轉座品系斷點之順序為：
(1-5b)-(1-5d)-(gl-1) / ($M-Pox-1$)。

關鍵語：水稻、過氧化酶、修飾基因、連鎖分析。

Determination of the modifier locus $M-Pox-1$ of peroxidase isozymes in rice (*Oryza sativa* L.)

Yong-Pei Wu and Chiang Pai

Department of Agronomy, National Chung-Hsing University,
Taichung, Taiwan, Republic of China

Abstract. In order to determine the modifier locus $M-Pox-1$ of peroxidase isozymes, both reciprocal translocation method as well as conventional linkage analysis method of estimating linkage intensities were employed. The results obtained from the experiments are: A linkage relation was discovered between the locus of $M-Pox-1$ and the chromosome breakpoint (1-5d) of RT line E42, with a recombination value of 8.3%. However, no linkage relation was detected between the locus, $M-Pox-1$ and the chromosome breakpoints 1-5b (RT E22)

1-5c (RT E23) and 5-6a (RT E43), respectively. Results from conventional linkage analysis method showed that the locus *M-Pox-1* and *gl-1* found to be linked completely, because there was no recombination between these two loci. However, no linkage relation was observed between the locus of *M-Pox-1* and the loci of *d-1*, *nl-1*, and *gh-1*, respectively. According to these results, it is concluded that the locus of *M-Pox-1* is located on the chromosome 5 with the following order of gene arrangement: (1-5b) – (1-5d) – (*gl-1*) / (*M-Pox-1*).

Key words: Rice, Peroxidase, Modifier gene, Linkage analysis.

前 言

水稻同功酶的研究，自Chu(1967)開其先端後，至今已有14種酵素、40個以上的基因座被發現(Second 1982, Morishima and Glaszmann 1986)，而有連鎖關係發現者則有9種酵素、19個基因座(Nakagahra 1977; Sano and Barbier 1985; Rajhan et al. 1986; Ishikawa et al. 1986, 1987; Wu et al. 1988)，其中只有*Amp-3*、*Est-2*、*Pgi-2*、*Pox-5*、*Cat-1*等5個基因座已經完成基因的定位(Kinoshita 1990)。至於其餘的基因座，則僅知其連鎖關係或所屬連鎖群，而其基因則都尚未完成定位，有待進一步之分析。

水稻之過氧化酶(peroxidase)迄今已發現有五個構造基因座(Second 1982, Wu et al. 1988)，5個調節基因座(Kinoshita 1990, Pai et al. 1973)及一個修飾基因座(Pai 1985)，其中除*Pox-5*已完成基因定位外，僅知*Pox-2*位於第12連鎖群上，至於其餘基因座的連鎖情形，至今仍然未知。因此，本試驗乃利用染色體相互轉座分析法(reciprocal translocation method)與傳統的連鎖分析法(linkage analysis method)來探討供試基因與轉座斷點(interchanged breakpoint)或標識基因間的連鎖關係，以確定其所屬之染色體(連鎖群)及相對位置，藉以完成基因的定位，但由於基因數目眾多，本次僅就已分析完成之修飾基因座*M-Pox-1*進行探討。

材料與方法

一、供試材料

本試驗之水稻供試品系為梗稻「蓬117A」(701)，它帶有隱性修飾基因*M-Pox-1*¹和顯性構造基因*Pox-1*^{2A}，而轉座品系與標識基因品系則帶有顯性修飾基因*M-Pox-1*²和

顯性構造基因 *Pox-1^{2A}* (Pai 1985)。所使用之染色體相互轉座同源品系列於表1，各品系染色體相互轉座的情形如表內所示，同時其遺傳背景皆為台中65號；惟其中E42與E43二品系，除了具有轉座染色體外，並帶有標識基因。再者，所使用之標識基因同源品系則如表2所示，其遺傳背景亦為台中65號，惟連鎖群編號及染色體編號係經新修訂而已統一 (Kinoshita 1990)。上列供試材料各個體均先經電泳鑑定同功酶各基因座皆為同質接合 (homozygous) 後方供做為親本材料，進行雜交以獲得分析用的各種雜交組合。

二、電泳分析

過氧化酶之分析方法乃根據Pai et al. (1973)之澱粉膠體電泳法 (starch gel electrophoresis)。過氧化酶修飾基因座 *M-Pox-1* 係在稈稻701品系中發現，當其為隱性同質接合時，能使過氧化酶 *Pox-1* 基因座各活性基因所控制電泳條帶之移動度 (mobility) 偏向陰

Table 1. Isogenic reciprocal translocation lines used in the experiment.

Strain No.	Interchanged chromosomes	Source
E22	1 - 5b	Taichung 65, Tr1
E23	1 - 5c	Taichung 65, Tr8
E31	1 - 3b	Taichung 65, Tr55
E32	1 - 2c	Taichung 65, Tr30
E34	1 - 4d	Taichung 65, Tr39
E35	1 - 8b	Taichung 65, Tr20
E42 ¹⁾	1 - 5d (<i>gl-1</i>)	Taichung 65, Tr34. <i>gl</i>
	(<i>la</i>)	Taichung 65, Tr34. <i>la</i>
E43 ¹⁾	5 - 6a (<i>nl-1</i>)	Taichung 65, Tr52. <i>nl</i>

1) Reciprocal translocation lines with marker genes.

Table 2. Isogenic marker gene lines used in the experiment.

Code number	Gene symbol	Character	Chromosome ¹⁾ number
T65 <i>gl, la</i>	<i>gl-1</i> <i>la</i>	glabrous leaf and hull and 'lazy' growth habit	5 11
T65 <i>lg, g-1</i>	<i>lg-1</i> <i>g-1</i>	liguleless and long sterile lemmas-1	4 7
T65 <i>nl, bc-1</i>	<i>nl-1</i> <i>bc-1</i>	neck leaf-1 and brittle culm-1	5 3
T65 <i>d-1</i>	<i>d-1</i>	daikoku dwarf	5
H75 <i>gh-1</i>	<i>gh-1</i>	gold hull and internode-1	5

1) cf. Kinoshita (1990).

極(cathod) 7mm (Pai 1985)。本試驗供試材料之構造基因均為 $Pox - I^{2A}$ 修飾基因除701品系為隱性 $M - Pox - I^1$ 表現出2mA型外，其餘者均為顯性之 $M - Pox - I^2$ ，因此，其表現型為2A型(圖1)。至於樣品則採用成株之葉鞘，鮮用或冷藏(-70°C)備用。樣品數親本為10株， F_2 族群在利用轉座分析法者為100個體，而利用傳統連鎖分析法者為250~500個體。

三、性狀調查

各標識基因品系之標識性狀如表2所示。調查時，依標識性狀出現的時期進行調查。轉座系的稔性調查，在抽穗後3~4週，穀粒已漸成熟時以肉眼辨識。一般轉座品系(同質接合)的稔性良好， F_1 雜種個體則呈半不稔性，而 F_2 族群因轉座染色體之分離，所以形成稔性與半不稔性兩群。

四、資料分析

依據各種雜交組合之 F_2 族群表現型之分離情形，進行 χ^2 獨立性測驗，若其 χ^2 顯著，則以Fisher(1928)之最大概度法(maximum likelihood)或Immer(1930)之乘積法(product method)來估算重組值。

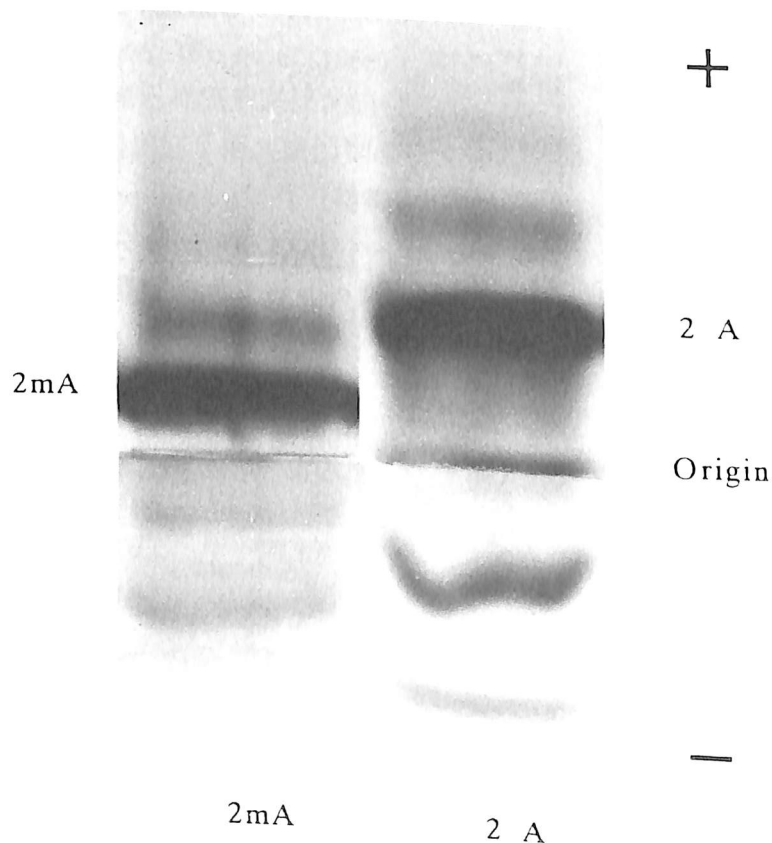


Fig. 1. Two zymograms for $Pox-1$ locus of peroxidase isozyme in rice.

結 果

一、轉座分析法

使用701品系與8個轉座品系的雜交組合，進行連鎖分析的結果如表3所示： $M-Pox-1$ 基因座與轉座品系E42之斷點有連鎖關係存在，其重組值為8.3%，機差為0.04。同時，利用重組值求得 F_2 族群表現型之理論頻度，進行觀測值與理論值之 χ^2 適合度測驗，發現其 χ^2 值不顯著，因而知 $M-Pox-1$ 基因座隸屬於轉座染色體1或5上，但由於 $M-Pox-1$ 與轉座品系E31、E32、E34和E35之斷點，均呈獨立關係，因此，可判定 $M-Pox-1$ 基因座在第5染色體上。此外， $M-Pox-1$ 基因座與同為染色體1-5轉座之轉座系E22、E23之斷點則呈獨立關係。

二、傳統之連鎖分析法

以701品系與標識基因品系雜交的6個 F_2 族群，進行連鎖分析之結果如表4所示：在 $701 \times T65gl,la$ 與 $701 \times E42gl,la$ 二個雜交組合中，發現修飾基因座 $M-Pox-1$ 與標識基因 $gl-1$ 有連鎖關係，其重組值為0%，即完全連鎖。而標識基因 $gl-1$ 之表現型為葉、穎無毛，位於第5連鎖群，即第5染色體上，由此可知修飾基因 $M-Pox-1$ 亦位於此一染色體緊鄰 $gl-1$ 基因之座位上。但 $M-Pox-1$ 與同群之 $nl-1$ 、 $d-1$ 及 $gh-1$ 等三基因座則無連鎖關係。

Table 3. Linkage analysis for $M-Pox-1$ locus of peroxidase isozyme by translocation method.

Cross combination	Phenotype of F_2 ¹⁾					Independence test			Recombination value(%)
	2AF	2AS	2mAF	2mAS	Total	χ^2	df	p value	
701 × E22					100	0.12	1	>0.5	8.3 ± 0.04
701 × E23	41	42	7	10	100	0.05	1	>0.5	
701 × E31	36	38	14	12	100	3.29	1	0.1-0.05	
701 × E32	42	25	14	19	100	0.10	1	>0.5	
701 × E34	44	44	5	7	100	1.34	1	0.2-0.3	
701 × E35	35	47	11	7	100	1.30	1	0.2-0.3	
701 × E42	O 34	47	4	12	100	13.22**	1	<0.005	
	E (28.8)	40	23	3	100	3.09	2	0.2-0.3 ²⁾	
701 × E43	45	22	15	18	100	3.48	1	0.1-0.05	

1) F: Fertility; S: Semisterility; O: Observed frequency.

E: Expected frequency calculated according to the estimated recombination value (8.3%).

2) This χ^2 value with two degrees of freedom is a statistic for the test of goodness of fit.

** Significant at 1% level.

Table 4. Linkage analysis for *M-Pox-1* locus of peroxidase isozyme.

Cross combination	Marker gene	Phenotype of F ₂ ¹⁾					Independence test			Recombination value(%)
		2AM	2Am	2mAM	2mAm	Total	χ^2	df	p value	
701 × T65 <i>nl, bc-1</i>	<i>nl-1</i>	147	44	59	20	270	0.05	1	>0.5	
	<i>bc-1</i>	150	41	54	25	270	2.60	1	0.2-0.1	
701 × T65 <i>d-1</i>	<i>d-1</i>	135	42	56	15	248	0.08	1	>0.5	
701 × T65 <i>gl, la</i>	<i>gl-1</i>	259	115	126	0	500	48.80**	1	<0.005	0
	<i>la</i>	280	93	96	31	500	0.001	1	>0.975	
701 × H75 <i>gh-1</i>	<i>gh-1</i>	54	18	19	9	100	0.23	1	>0.5	
701 × E42 <i>gl, la</i>	<i>gl-1</i>	45	29	26	0	100	12.50**	1	<0.005	0
	<i>la</i>	57	17	23	3	100	0.95	1	0.4-0.5	
701 × E43 <i>nl-1</i>	<i>nl-1</i>	51	17	30	2	100	3.85*	1	0.05-0.01	>50

1) M, m: Marker character.

* and ** Significant at 5% and 1% level.

討 論

在水稻過氧化酶之 *Pox-1* 基因座上，已發現有四個等位基因，即 *Pox-1^{oc}*、*Pox-1^{2A}*、*Pox-1^{4A}* 及 *Pox-1^{Nul}*；其中 *Pox-1^{Nul}* 為缺失型，其同質體酶譜 (zymogram) 之 *Pox-1* 區上，不顯現任何條帶，與其它三個等位基因間之相互關係屬顯隱性，而其它三個基因彼此間則為共顯性 (codominance)，其同質體之酶譜上分別顯現移動度不同之同質二量體 (homodimeric) 條帶，分別為 0C、2A 與 4A，且彼此間之雜種 F₁ 個體均有異質二量體 (heterodimeric) 之雜種條帶 (hybrid band，介於二種親本條帶之間) 產生 (Pai *et al.* 1973)。再者，Pai (1985) 在一種稻品系「蓬117A」(701) 中，發現過氧化酶 *Pox-1* 基因座有一修飾基因，當其為顯性時 *Pox-1* 基因座各等位基因之條帶表現出如上所述者，但當其為隱性同質接合時，則使 *Pox-1* 基因座各活性基因所控制條帶之移動度偏向陰極 7mm，此一修飾基因座即名為 *M-Pox-1*。本試驗所使用之材料，其過氧化酶之構造基因均為 *Pox-1^{2A}*，而修飾基因則除 701 外，皆為顯性之 *M-Pox-1²*，其表現之條帶為 2A，而含有隱性 *M-Pox-1¹* 同質接合之 701 則表現出 2mA 條帶 (圖1)，因此，在電泳分析時從酶譜上即可明確地辨識各個體之基因型。

過氧化酶之修飾基因座 *M-Pox-1*，經連鎖分析之結果發現，其與標識基因座 *gl-1* 間的重組值為 0%，即呈完全連鎖之關係，同時位於第 5 連鎖群，但與同群之 *d-1*、*nl-1* 和 *gh-1* 卻呈獨立的關係，造成此種現象的原因，是因 *M-Pox-1* 基因座與此三個基因座距離過遠所致。

經由轉座品系進行連鎖分析，發現 *M-Pox-1* 基因座與 E42 之斷點 (1-5d) 有連鎖關係存在，其重組值為 8.3%，但卻與 E22 之斷點 (1-5b) 呈獨立之關係，此與 Sato *et al.* (1982)

得到的結果 $gl-1$ 與 E22 之斷點 (1-5b) 有 36.3% 重組值之連鎖關係並不一致，即依此結果而論，修飾基因座 $M-Pox-1$ 與 E22 之斷點，似應有連鎖關係存在。然而，造成此種不一致現象的原因，是因為第 5 染色體之中節 (centromere) 位於 1-5b (E22) 與 1-5 (E42) 之間 (Kinoshita 1984)，致使 E22 之斷點與 $M-Pox-1$ 基因座間的交換率受到干擾，因而使得此二者間呈現獨立的關係。至於 $M-Pox-1$ 基因座未能與相互轉座品系 E23 和 E43 之斷點間發現連鎖關係，由上述之分析及 Sato *et al.* (1982) 之結果，當可獲得說明。

綜合上述之結果，可以確定水稻過氧化酶修飾基因座 $M-Pox-1$ 位於第 5 染色體上，同時由上述之分析及 Sato *et al.* (1982) 的研究報告，可推得連鎖圖的基因座順序為：
(1-5b)-(1-5d)-($gl-1$)/($M-Pox-1$)。

引用文獻

- Chu, Y. E. (1967) Variation in peroxidase isozymes of *Oryza perennis* and *O. sativa*. *Japan. J. Genet.* 57:143-244.
- Fisher, R. A. (1928) On a property connecting the χ^2 measure of discrepancy with the method of maximum likelihood. *Atti del Congresso Internazionale dei Matematici* (Bologna) 6:95-100.
- Immer, F. R. (1930) Formula and tables for calculating linkage intensities. *Genetics* 15:82-89.
- Ishikawa, R., Kinoshita, T. and Morishima, H. (1986) A preliminary report on trisomic analysis of genes for isozymes. *Rice Genet. News.* 3:54.
- Ishikawa, R., Kinoshita, T. and Morishima, H. (1987) Trisomic analysis of genes for isozymes: Location of *Cat-1*, *Acp-1* and *Pox-1* on chromosomes. *Rice Genet. News.* 4:75-76.
- Kinoshita, T. (1984) List of genes of genetic stocks. *Rice Genet. News.* 1:28-53.
- Kinoshita, T. (1990) Report of the committee on gene symbolization, nomenclature, and linkage groups. **IV**. Current linkage group. *Rice Genet. News.* 4:11.
- Morishima, H. and Glaszmann, J. C. (1986) Gene Symbols for Isozymes. *Rice Genet. News.* 3:15-17.
- Nakagahra, M. (1997) Genetic analysis of esterase isozyme loci in cultivated rice. *Japan. J. Breed.* 27:141-148.
- Pai, C. (1985) A modifier gene for peroxidase isozymes in rice. *Rice Genet. News.* 2:63-64.
- Pai, C., Endo, T. and Oka, H. I. (1973) Genic analysis for peroxidase isozymes and their organ specificity in *Oryza perennis* and *O. sativa*. *Can. J. Genet. Cytol.* 15:845-853.
- Ranjhan, S., Glaszmann, J. C. and Khush, G. S. (1986) Localization of *Pgi-1*, *Sdh-1*, *Est-9* and *Adh-1* on rice chromosomes by trisomic analysis. *Rice Genet. News.* 3:57-58.
- Sano, R. and Barbier, P. (1985) Analysis of five isozyme genes and chromosomal location of *Amp-1*. *Rice Genet. News.* 2:60-62.
- Sato, S., Muraoka, K. and Sano, Y. (1982) Reconstruction of a linkage group corresponding to the Nishimura's second chromosome in rice, *Oryza sativa* L. *Japan. J. Breed.* 32:232-238.
- Second, G. (1982) Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp): Study of the

polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Japan. J. Genet.* 57:25-75.

Wu, K. S., Glaszmann, J. C. and Khush, G. S. (1988) Chromosomal locations of ten isozyme loci in rice (*Oryza sativa* L.) through trisomic analysis. *Biochem. Genet.* 26:303-320.

收稿日期：82年5月22日，接受刊登日期：82年6月24日。

編輯：高景輝