

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 植物學科

第一名

052101

探討玉米不同種原間減數分裂染色體互換之差異

學校名稱：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作者： 高二 謝允晨	指導老師： 羅尹廷 蘇雨菁
-------------------	-----------------------------

關鍵詞：減數分裂、染色體互換、遺傳多樣性

得獎感言

最初在植微所走廊上，看到很多英文壁報的圖片上，有一個個綠點和紅色絲線不規則的纏繞著，便好奇問了小組的王中茹老師，才知道那是玉米減數分裂的過程，當下只單純感到不可思議，有種美感吸引著我，想不到日後王老師成為我的指導教授，而玉米也成為陪伴我一年的同伴，這就是緣分吧！

研究初期，在了解實驗背景下了很大的功夫，高中比起國中的科展，具備相當的難度也更講求專業。透過教授的視訊會議和面談，我逐漸理解了架構，就開始學習如何種植玉米了，而我剛好很喜歡園藝種植的方面，是我最喜歡的回憶之一，在蒸蒸熱氣的溫室裡，把厚重的土裝進盆栽裡，想像日後會長出高大的玉米桿，這是植物科特有的福利呢。

一個科學研究中不單只有樂趣，也是有坎坷伴隨的。開始學習免疫染色技術後，真的飽嘗失敗的滋味。一開始做出來的玻片，總是只有零星的細胞甚至一片都是細胞雜質，這意味著那一整天費心做的玻片都不能使用。而我也被接連的失敗打擊了信心，懊惱地想著我花的這些時間都付諸流水了。

好在學長姊都很熱心，對製作流程提出許多很好的建議，也指導我更謹慎地操作器具。我滴抗體時不夠迅速也沒考慮避光，使得抗體不能在顯微鏡下顯現螢光，後來我更嚴格的提醒自己後，便漸入佳境在 11 月時順利拍攝正式的玻片。笑著回想起這段歷程，卻不覺得那是浪費時間，如果沒有經歷過，也許我就永遠都不會知道科學研究路上，是需要付出這麼多的代價，才能一步步地向前進。

不管是否得獎，科展總是無形或有形地給予我們珍貴的禮物。原本以為我連校展的佳作都不可能得，身為普通班，曾感到沒有自信，後來奇蹟似般的過關斬將，才開始相信自己是有資格和實力挑戰我未曾想像過的高度，自信正是科展帶給我的成長。

一個人做科展，比起熱鬧，孤獨和無力感是再平凡不過的滋味，想謝謝許多人在背後支持著我走下去。首先，謝謝中研院的王中茹教授，您總是風趣和生活化地把艱澀觀念講的很清楚，祝您早日康復，一年來辛苦了。謝謝指導老師羅尹廷和蘇雨菁老師，親切的指導我也分享許多經驗談；謝謝照顧我的植微所 122 的學長姐，您們是我的榜樣；謝謝一起比賽的附中同學及新認識的各地參賽者，讓短短五天過得很精采也不孤單了；謝謝國中的隊友和老師，成就了今天的我；

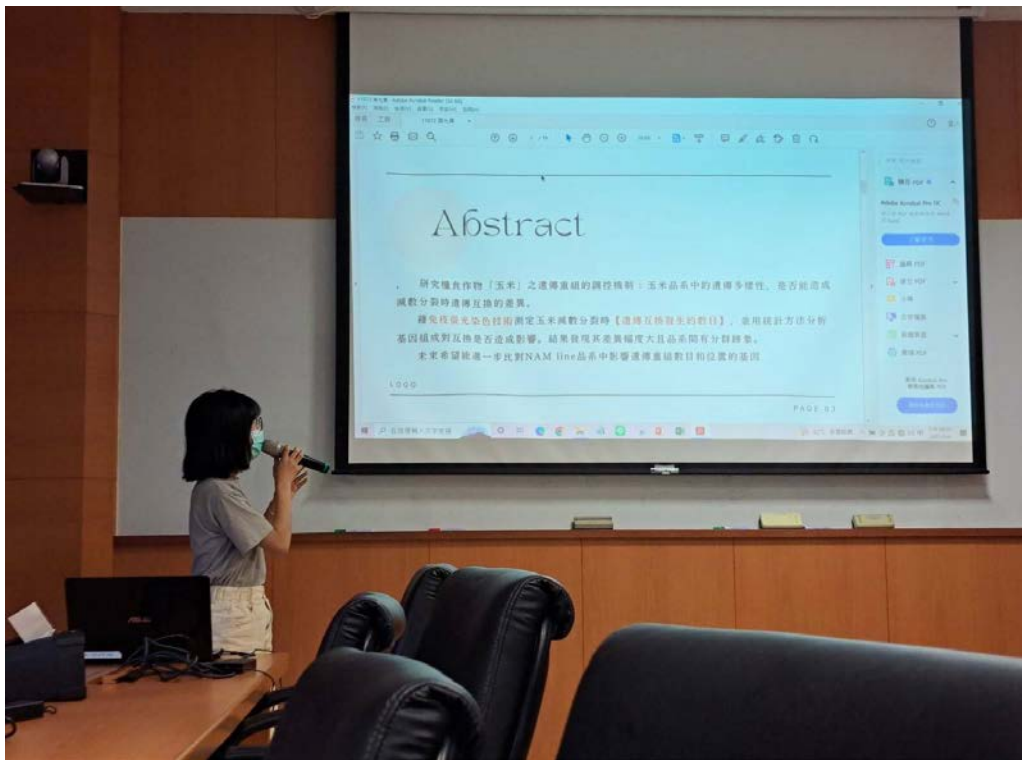
謝謝1571班的朋友們，給予我溫暖的陪伴；謝謝邱翌瑋，包容也支持我去追逐理想，謝謝無條件支持的家人們，希望我能成為讓你們驕傲的女兒。走得越遠之際，願我莫忘初衷，享受科學研究路上的一切風景。



第63屆基隆全國科展比賽照片，很榮幸能在家鄉獲獎！



在溫室裡生長的玉米植株，是相處一年的同伴。



實驗中定期地進度匯報，記錄從零開始的過程。

摘要

減數分裂是育種的基礎，透過其中的遺傳重組可將連鎖的基因分離，以提供研究和篩選優良基因組合的機會。然而遺傳重組的數目在每一次的減數分裂中有天然的限制，也就是每一對同源染色體平均發生兩個互換，並且多位於染色體末端，這使得要尋找合適的遺傳組合成為育種時最耗時的步驟。在這個研究中，利用免疫螢光染色技術分析不同玉米品系間，減數分裂時遺傳重組發生的數目，了解多樣性的基因種源是否對遺傳重組的數目造成影響。結果發現其差異顯著，且品系間有分群的跡象，表示不同種源可能帶有差異性的重組調控相關基因，未來希望能進一步研究控制遺傳重組數目和位置背後的機制。

壹、前言

一、研究動機

玉米為現今世界上產量最大、種植面積最廣的經濟作物，人類面對未來的挑戰，其中一項刻不容緩的工作即為加速優良玉米品種的育成。即便育種技術的進步和基因編輯的發展已大大提升育種效率，然而在育種過程中，無法控制或預測減數分裂時遺傳重組的發生仍是最大的侷限。減數分裂是真核生物有性生殖時必經的過程，以產生染色體數目減半的單倍體配子，同時染色體間發生遺傳重組，增加後代的遺傳組合，這就是遺傳育種的基礎。只是發生遺傳重組的數目和位置仍仰賴自然的安排，也是造成育種過程曠日廢時的主要原因。近年來，對於植物減數分裂遺傳重組的分子機制研究有許多進展，但仍無法了解為什麼每對同源染色體上，大多只發生兩個遺傳重組，而且位置皆靠近染色體末端。這個神祕的現象背後是由什麼分子機制調控呢？

過去許多研究顯示玉米的基因組，在世界各地不同品系之間存在極大的差異，這豐富的種內基因多樣性提供科學家豐富的基因資源，藉由分析不同玉米品系的外顯性狀(例如株高等)，尋找其相關的基因並用於育種篩選。然而，減數分裂的遺傳重組發生在植物特定生殖細胞內，分析遺傳重組在個別減數分裂細胞中的位置和數目更是困難，遑論要研究遺傳重組在不同品系玉米之間的差異了。因此，相對於其他性狀，玉米的種內基因多樣性是否影響減數分裂時遺傳重組的分布和數目仍是個有待研究的課題。

慶幸在過去幾年，科學家在植物遺傳重組的研究奠定基礎並且發展技術平台，使得定位同源染色體間的遺傳重組(也就是互換)的位置成為可能。在這個研究計畫中，我利用螢光免疫染色的技術，藉由 HEI10 抗體標定不同玉米品系的減數分裂細胞的同源染色體上發生

的遺傳重組的位置，並透過統計分析 HEI10 的訊號數目，了解不同種原的玉米是否在減數分裂遺傳重組的調控上存在差異。

二、研究目的

- (一) 研究不同品系中玉米減數分裂之遺傳重組的數目
- (二) 分析不同品系玉米的遺傳重組數目與分佈的差異。

三、文獻回顧

(一) 減數分裂同源重組

減數分裂(meiosis)是有性生殖中特有的細胞分裂方式，可以使親代染色體數目減半，製造出單倍體的細胞(又稱為配子)，使物種在受精後，維持染色體數目的恆定。減數分裂在 DNA 複製後進行兩輪細胞分裂，稱為「第一次減數分裂」及「第二次減數分裂」，最終產生四個子細胞。

於第一次減數分裂中，同源染色體必須配對並正確分離，在同源序列配對的過程中，細胞透過計畫性打斷 DNA 雙股螺旋(Double Strands Break, DSB)，並產生 3'端單股 DNA 的突出端，在重組酶(recombinase)的促進下，這些單股 DNA 啟動同源序列搜尋機制，入侵同源染色體，促成同源染色體配對。經過一連串分子機制過程後，只有少數的入侵點被同源染色體序列修復，並形成同源重組的產物，稱為互換(crossover)；而其他的 DNA 斷點，則修復為非互換(non-crossover)的產物。這些互換點造成染色體間遺傳物質交換，稱為遺傳重組(recombination)，進而形成了有遺傳多樣性的配子。

因此，減數分裂同源重組對生物進化和物種形成至關重要，也是植物新品種培育和開發的基礎。特別是在全球氣候變化下，人類面臨各種挑戰，減數分裂同源重組為新品種的培育和創新提供了基礎。

(二) 互換形成的機制

在減數分裂開始初期，DNA 產生大量雙股斷裂(DSB)，但不管基因組的大小或者染色體數目的多少，只有極少數的斷裂點被修復形成互換(crossover)。比如說，在玉米減數分裂中，細胞學分析認為每個減數分裂的細胞大約形成 300-500 個雙股斷裂，但只有產生約 20 個互換。然而，到目前為止調控互換數目的機制尚不清楚。另外，在大部分生物中，一個互換的形成還會抑制附近位置產生另一個互換，使互換在染色體上並不是隨機分佈，稱為互換干擾(crossover interference)。在大部分的作物中，強烈的互換干擾機制讓互換往往發生在染色體末端。這些嚴格的限制大大影響育種的效率。

在大多數真核生物的減數分裂重組中至少存在兩種不同的互換形成途徑，根據遺傳學和突變品系的分析，分為 I 型互換和 II 型互換。其中的 I 型互換為約佔互換總數的 80%~ 85%，主要由一群 ZMM 蛋白質家族協助執行，包括 MSH4/5, MER3, HEI10 等蛋白。而 II 型互換佔重組的少數，且機制較不清楚，僅知道至少需要靠 MUS81 和 FANCD2 蛋白的參與。雖然目前大約已知有一百個的形成互換的相關基因參與過程，但是詳細的調控機制仍不清楚。尤其是在減數分裂時期，細胞中活化上千個基因表達，遠遠超過已知功能的基因數目，顯示還有許多未知的基因參與調控。

(三) 互換形成的偵測

遺傳上可以利用兩個純品系雜交後繁殖的第二代，分析其中連鎖基因的改變，而估算重組在族群中的發生率。若是要偵測每個減數分裂中的互換發生，則需要觀察第一次減數分裂的終絲期(diakinesis)時，同源染色體互換完成並形成粗短的二價體時，互換位置上可以觀察到同源染色體的連接點，稱為交叉(chiasma)。但是這個時期的染色體只有幾個微米(micrometer)長，想要仔細觀察上面的交叉位置相當難，也不容易精確。過去大多藉此推測互換的數目，2015 年有一篇研究就是觀察不同玉米自交系的終絲期染色體交叉數目，並且報導其中的差異。可惜這種方法，對於 I 型互換或 II 型互換以及互換在染色體上的分佈，沒有辦法有更進一步的分析。

免疫螢光染色是一種原位檢測的方法，通過專一性抗體-抗原的辨認，來偵測特定蛋白質在細胞中的時空變化規律。這項技術需要先產生具有專一性的一級抗體，利用抗體與細胞中的目標抗原(要觀察的蛋白質)結合後，再利用帶有螢光的二級抗體結合一級抗體，而顯現目標蛋白質的位置。為了偵測互換的位置，實驗室已經成功製備專一性的 HEI10 抗體，可以用於分析 HEI10 在染色體上的數目與分佈。

HEI10 蛋白質屬於 ZMM 家族的一員，被認為參與 I 型互換的形成。在不同的實驗中皆顯示 HEI10 基因突變會導致互換數目減少，剩下少數的 II 型互換。細胞學的分析觀察到 HEI10 蛋白質在粗絲期染色體上，聚集在 I 型互換的位置。因此，HEI10 常被用來做為標記 I 型互換的指標性工具。

(四) 玉米的種源多樣性

近年來的研究發現玉米的基因組不斷發生變化，不論是基因的序列和數量，甚至是小規模的缺失和插入，都在不同種源的玉米中被報導。這些變異往往都造成植株的性狀改變。來自不同地區的種源，累積的許多遺傳變異，透過玉米自花授粉八代後，即稱為自交系，有利於科學家探究遺傳多樣性與形狀之間的關係。Edward Buckler 等

人於 2009 年建立 NAM (Nested Association Mapping) 玉米重組自交系，由 B73 和 25 種玉米種源差異性很大的自交系所組成，這珍貴的遺傳資源和近年來對於不同玉米種原的基因組定序資料提供了絕佳的機會。在一份 2009 年的研究中，觀察開花時間與 NAM 玉米對環境的適應性：使用 5000 個 NAM 重組近交系(recombinant inbred line)分析開花時間的變化，獲得品系之間共享許多數量基因座的證據；然而，等位基因效應因親代基因而異。

在 25 個 NAM 品系中，我們挑選比較適合台灣生長的八種自交系，觀察減數分裂粗絲期的染色體，利用 HEI10 的數目與分佈，分析 I 型互換的形成在不同品系間，是否存在差異。玉米有十對染色體，而每對同源染色體大多發生兩個互換，並且多靠近染色體末端，這樣的趨勢在不同玉米自交系間有沒有差異？是否當中有特別的自交系具有較高的變異程度，可能影響同源重組的分佈？這個研究希望有助於我們了解玉米同源染色體重組互換的調控。

(五) 參與重組互換的重要基因

在科學家的努力下，目前已經知道同源染色體互換的大致過程和重要的基因。我從文獻中把這些重要基因分為 DNA 雙股螺旋斷裂形成、單股入侵及同源序列辨識、及重組發生和聯會(Synapsis)形成。

這些步驟的過程和調控可能最終影響了重組互換的數目和位置，作為了解玉米遺傳多樣性對遺傳重組影響的第一步，我先針對這些已知的關鍵基因，分析它們在不同品系間的差異。DNA 雙股螺旋斷裂形成：在此過程中，SPO11-1 和 SPO11-2 蛋白質所形成的複合體，在 PRD1、PRD2 和 PHS1 等蛋白質的協助下，產生 DNA 雙股斷裂。單股入侵及同源序列辨識：DNA 斷點由 MRE11、RAD50 剪切下形成單股 DNA，RAD51 和 DMC1 與單股 DNA 結合，啟動同源序列搜尋機制。

重組發生：當同源配對後，需多蛋白質參與修補斷裂位點，並形成重組及非重組的產物。關鍵的基因包括 MER3、FIGL1、FANCM、HEI10、MLH1、MUS81、MSH4 等。聯會形成：在同源染色體配對和互換的過程中，染色體蛋白軸扮演一個重要的角色，不但是結構基礎也被認為具有調節和聯繫訊息的功能，關鍵的基因有 REC8、ASY1、DSY2 等。一旦同源染色體正確配對，染色體蛋白軸即形成穩定的拉鏈狀結構，稱為聯會複合體，其中重要的蛋白質為 ZYP1。目前最完整的基因組資料來自玉米的 B73 自交系，除此之外，也有不同玉米品系的基因序列資料可供搜尋和比對分析。下表為上述 20 個基因在 B73 自交系中的編號。

Gene ↵	Gene ID in B73 ↵	Gene ↵	Gene ID in B73 ↵
SPO11-1 ↵	Zm00001eb214790 ↵	FIGL1 ↵	Zm00001eb003580 ↵
SPO11-2 ↵	Zm00001eb172550 ↵	FANCM ↵	Zm00001eb201140 ↵
PRD1 ↵	Zm00001eb389920 ↵	HEI10 ↵	Zm00001eb239370 ↵
PRD2 ↵	Zm00001eb180360 ↵	MLH1 ↵	Zm00001eb362590 ↵
PHS1 ↵	Zm00001eb382430 ↵	MUS81 ↵	Zm00001eb141350/ Zm00001eb141330 ↵
MRE11 ↵	Zm00001eb069270/ Zm00001eb171920 ↵	MSH4 ↵	Zm00001eb105070 ↵
RAD50 ↵	Zm00001eb181120 ↵	REC8 ↵	Zm00001eb297000 ↵
RAD51 ↵	Zm00001eb325310/ Zm00001eb138190 ↵	ASY1 ↵	Zm00001eb102420 ↵
DMC1 ↵	Zm00001eb163340 ↵	DSY2 ↵	Zm00001eb233800 ↵
MER3 ↵	Zm00001eb184840 ↵	ZYP1 ↵	Zm00001eb423930 ↵

表一、參與重組互換的重要基因

貳、研究設備與器材

一、研究材料

(一)使用於 2002 年由 Edward Buckler 等人建構之 NAM(Nested Association Mapping)重組自交系中的 8 個親本(Oh 7B、A344、NC358、Oh43、II14H、B97、Kill、Tx303)作為研究材料。

(二)抗體: 如下表

	Primary antibody	Secondary antibody
HEI 10	Anti – HEI 10 (MOUSE)	Anti – mouse - 488
DSY2	A#8 - DSY2 (RABBIT)	Anti – rabbit - 555

表二、本研究使用抗體統整表

二、研究器材

(一)醋酸\

(二)95%酒精

(三)液態氮

(四) Poly-L-lysine 玻片與蓋玻片

(五)玻璃缸

(六) Pipet

(七)藥品:

1. 0.1M Citric acid
2. 0.1M Sodium Citrate

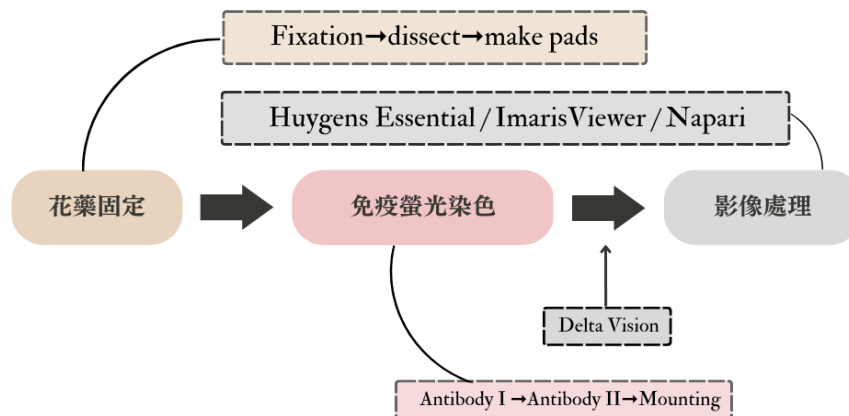
3. 1xPBS
4. Permeability(1xPBS,TritonX-100,1mM EDTA)
5. Pierce TM Protein-Free Blocking Buffer
6. DAPI 染劑

三、研究設備

- (一) Major Science 加熱型乾浴器(型號:MD-01N)
- (二) Major Science 迴轉式振盪器 (型號:MS-NOR-30)
- (三) 高解析度細胞影像分析系統(DeltaVision)
- (四) 軟體:
 1. Huygens Essential
 2. Imaris Viewer
 3. Napari

參、研究過程與方法

一、實驗流程圖



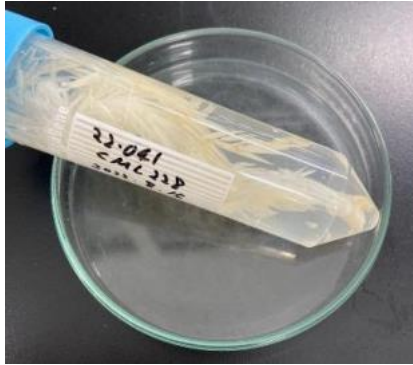
二、實驗方法

主要可分為三個階段：花藥固定(fixation)、免疫螢光染色(immunofluorescence)和影像處理(Image processing)。

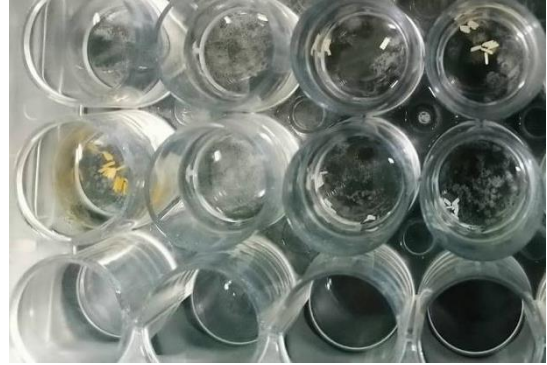
(一) 花藥固定

切取仍在莖內尚未完全成熟之玉米雄花花穗(tassel)，如圖一放置於比例為 3:1 之 95%酒精和醋酸混和溶液一晚，存於-20°C 之 75%酒精溶液中，待需使用時，從冰箱取出即可。固定完後，會呈現如圖.所示之白色或黃色樣本。本實驗用雄花穗內的花藥(anther)，作為觀察減數分裂細胞(meioocyte)染色體重組(crossover)情形之對象。依 NAM line 裡不同自交系之玉米，自花穗內挑選第

一次減數分裂前期之粗絲期(pachytene)大小花藥(約 1.5~2.5 mm，本實驗主要使用 1.6~1.7mm)，分離出內部的減數分裂細胞，如圖二。



圖一、尚未成熟之玉米雄花穗(tassel)



圖二、玉米粗絲期之花藥

(二) 免疫螢光染色

觀察 2D 維度下，HEI10 蛋白標示 crossover 之數目的情形。

1. 取得減數分裂細胞：

如圖三，將儲存於 -20°C 的花藥放置於玻片，滴上 60%醋酸內使被酒精脫水的細胞膨脹。用鑷子與探針把花藥內的減數分裂細胞擠出，並去掉雜質。

2. 變性(denaturation)：

放到液態氮裡急遽降溫如圖四，以刀片去除蓋玻片，將玻片置於加熱型乾浴器加熱到 42°C ，再浸泡於 Citric acid ,Sodium Citrate 的緩衝液內加熱至沸騰，使細胞核內的雙股螺旋 DNA 打開延長，以利後續觀察。

3. 通透(permeabilization)

如圖五，將內含玻片的盒子置於迴轉式振盪器，每隔 5 或 15 分鐘便輪流更替兩種浸泡液 Permeability (1xPBS,TritonX-100,1mM EDTA 的混合液)與 1x PBS，去除細胞質、胞器等外部物質，將細胞膜上開出通道，讓添加的藥品得以進入細胞內。

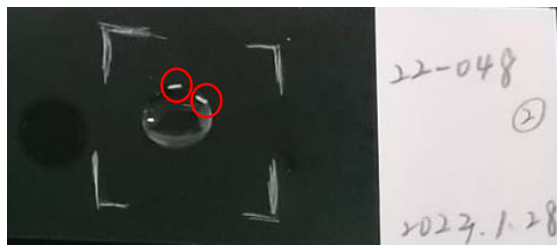
4. 封閉(blocking)

將 Blocking Buffer (Thermo) 浸泡於在迴轉式振盪器上的玻片 15 分鐘。

5. 加入抗體：

使用初級抗體(primary antibody)二級抗體(secondary antibody)，本次實驗所使用之抗體列於表一。利用初級抗體先去辨認和標記特定的目標

蛋白質，之後再利用可產生螢光效果之二級抗體去標誌初級抗體位置，以能看到染色體上 **crossover** 的數量與位置。完成抗體結合後再加入 DAPI 染劑並以指甲油封存即可進入拍攝流程。



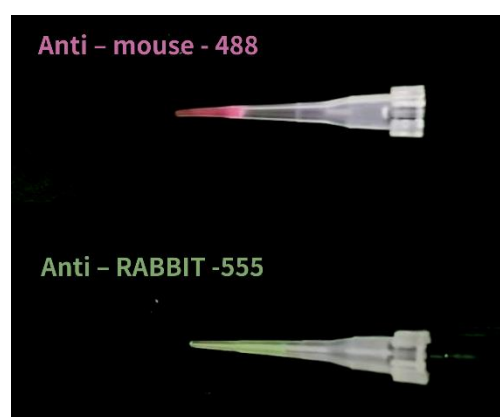
圖三、兩枚花藥置於玻片(紅圈標示)



圖四、將玻片以液態氮降溫



圖五、於緩衝液加熱變性



圖六、使用二級抗體標記 HEI10

(三)影像處理

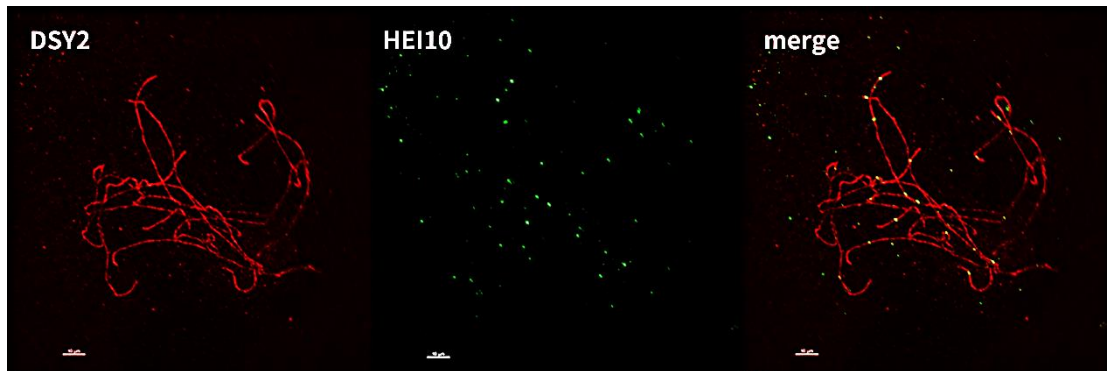
使用高解析度細胞影像分析系統(Delta Vision)拍攝，產生具有厚度的結果圖，使用影像軟體做調整及分析。利用 Huygens Essential 為拍攝之初步結果，實施反摺積 (deconvolution)之影像加工，減緩於拍攝過程中造成影像不清晰之點擴散函數 (point spread function, PSF)、模糊(blurring)和雜訊(noise)等，回復影像原有的實際情況。

再使用 ImarisViewer 和 Napari 展示 HEI10 位置和計算數量。以人工判斷與數點的方式，由一張張經去除背景後的圖片，判斷 HEI10 螢光蛋白坐落之位置是否位於 DSY2 此產生聯會複合體的軸蛋白上，亦或其訊號是否可作為有效之標定目標，若有稍微不明確之結果，即直接不採計，以確保研究之正確性。

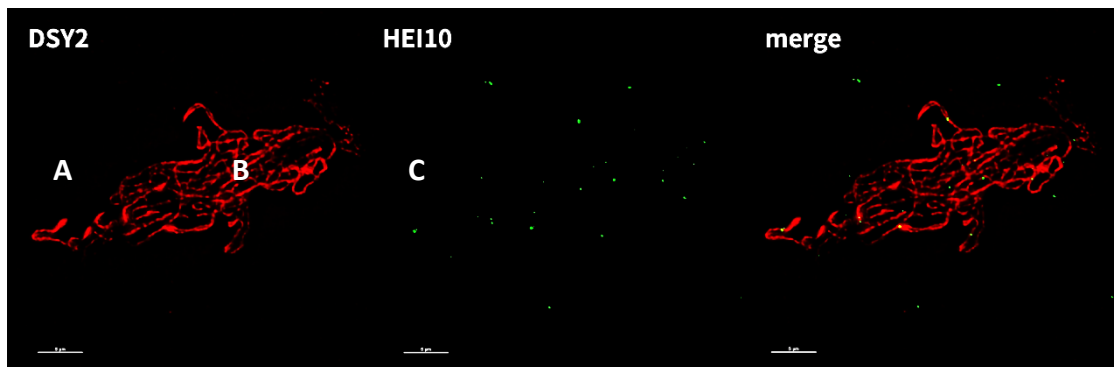
肆、研究結果

一、不同玉米自交系經免疫染色後的情形

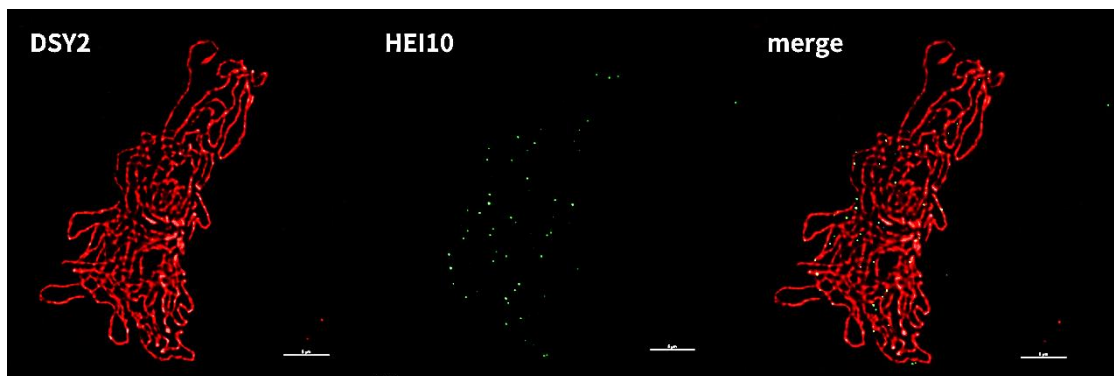
將 8 種玉米自交系的花藥細胞免疫染色後，使用高解析度細胞影像分析系統 (Delta Vision) 進行拍攝。呈現細胞經 Imaris 影像處理與反摺積 (deconvolution) 加工後的顯微鏡圖 (圖七~圖十五)。左圖 (A) 為 DSY2 染色之 DNA；中間圖 (B) 為 HEI10 蛋白染色後的結果，右圖 (C) 為前兩者疊圖的結果。



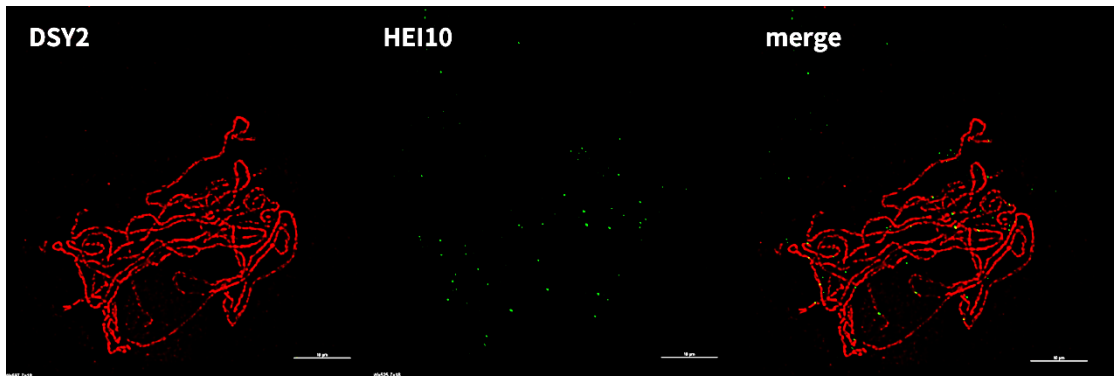
圖七、CML322 自交系



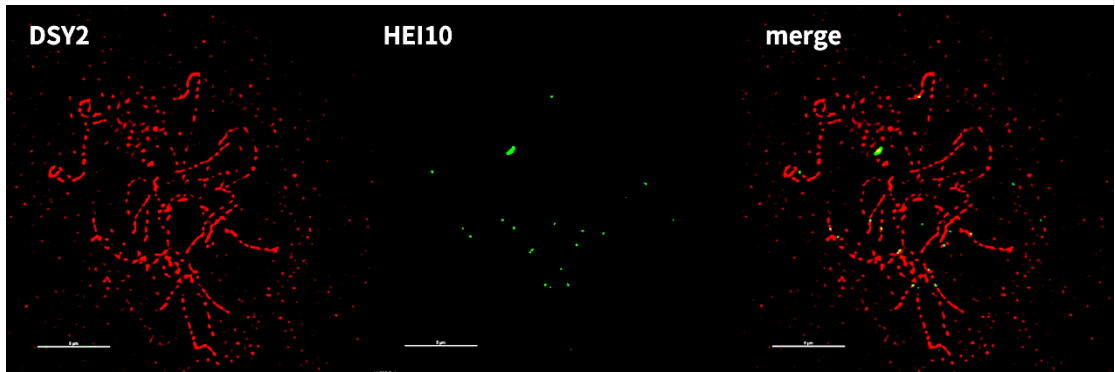
圖八、II14H 自交系



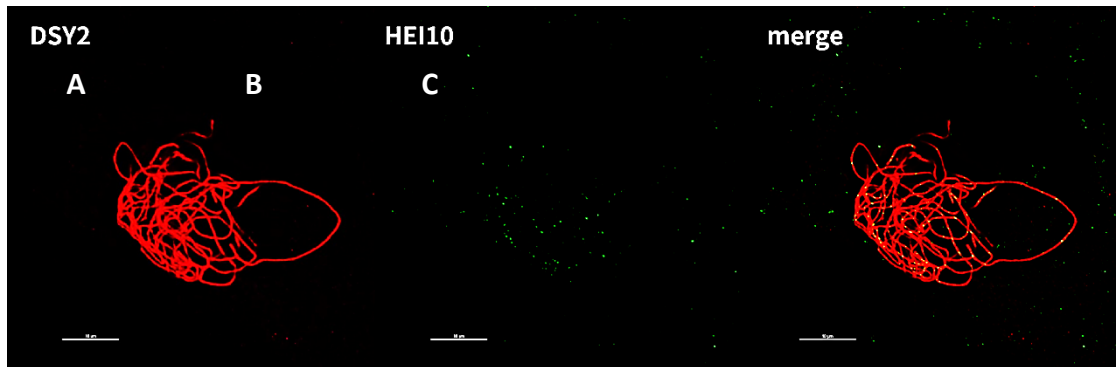
圖九、A344 自交系



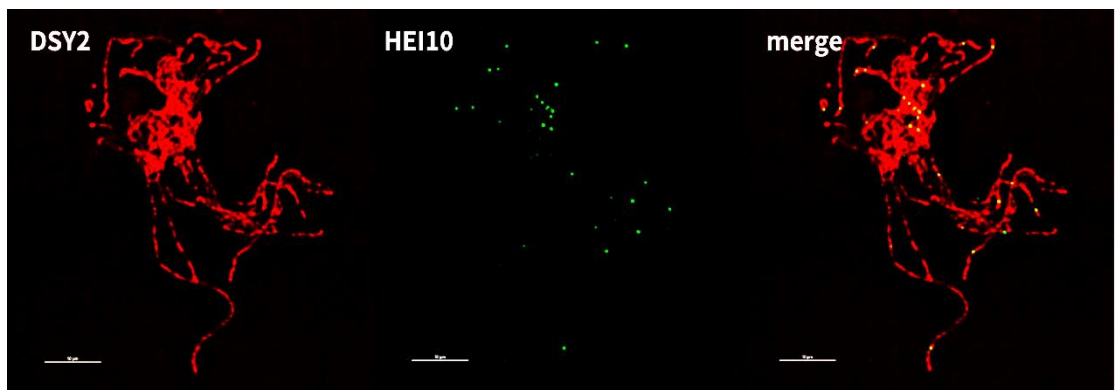
圖十、NC358 自交系



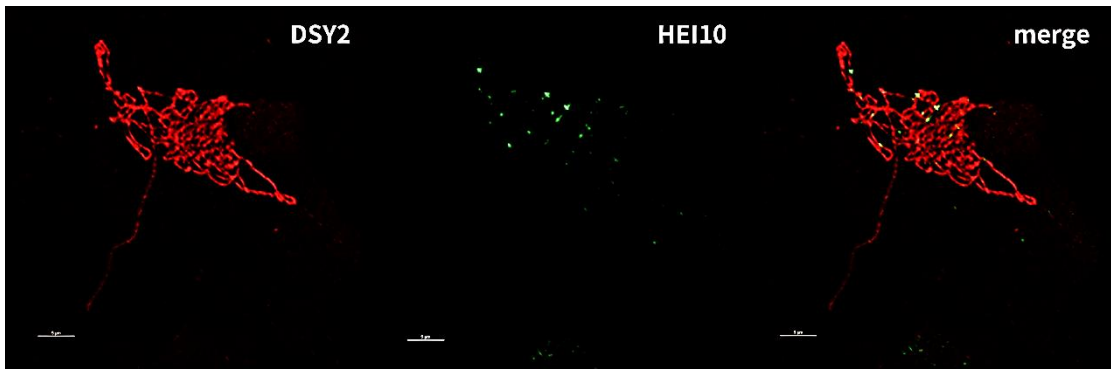
圖十一、B97 自交系



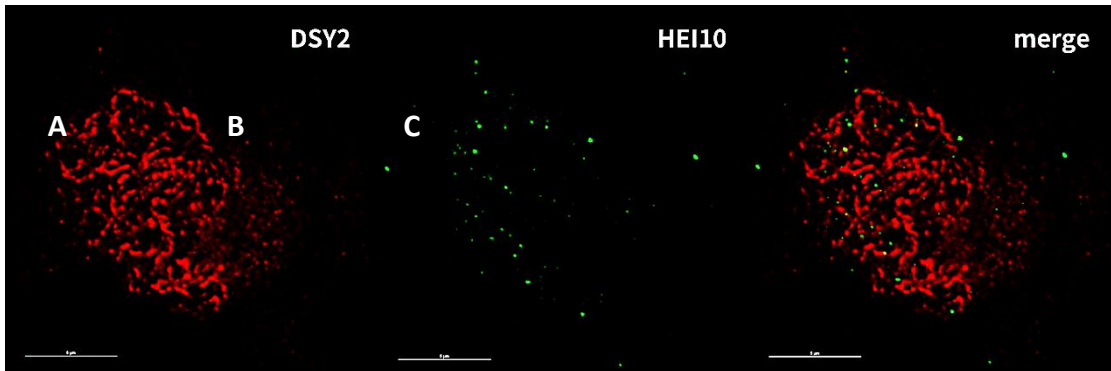
圖十二、Oh 7B 自交系



圖十三、Oh 43 自交系



圖十四、Tx303 自交系



圖十五、Kill 自交系

左邊標示 A 的圖中，由 DSY2 蛋白標示的染色體軸線可看出 DNA 形狀(紅線)，多為不規則狀，再經免疫染色中的變性過程後，呈現拉長的狀態且細胞核皆已消失。而此時期為玉米減數分裂中前期 I 的粗絲期，因此染色體尚未斷裂，可觀察到完整染色體的型態。

中間標示 B 的圖中，由二級抗體標示的 HEI10 蛋白(螢光綠點)可看出其大致分布於左圖染色體軸上之處，比較軸上標示 crossover 蛋白與僅存在於背景值的綠點可以發現其亮暗分明，可以清楚地區別兩者。

右邊標示 C 的圖中，所以由 HEI10 蛋白(螢光綠點)與 DNA(紅線)疊圖的分布情形，可看出兩者形狀的相似程度極高，符合因為 HEI10 蛋白多會附著在 DNA 進行 type I crossover 的位置上的假說，也利於後續 HEI10 數量的計算與分析。

二、不同玉米自交系中的 type I crossover 數目比較

為統整各品系的 crossover 數量，因此取樣本平均值，將品系內各 10 顆細胞的 HEI10 數量平均作為代表該自交系的數量，如表三與表四，比較差異與趨勢。

(一) HEI10 數目平均值大小依序為：II14H > B97 > Kill > Oh 43 > A344 > NC358 > Oh 7B > Tx303 > CML228，不分自交系，全部數據中 HEI10 數量的均值約為

19.93。

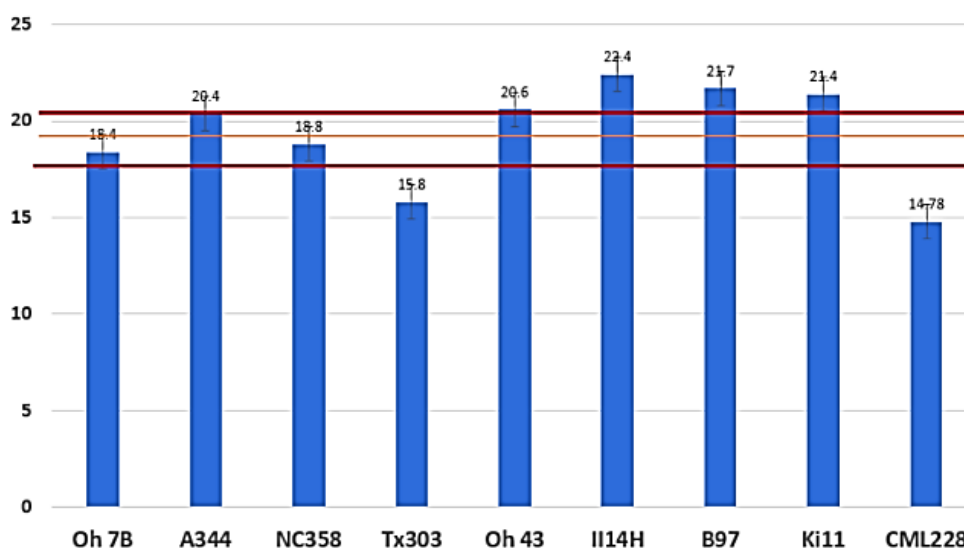
(二) 計算 HEI10 數量，將各品系內不同細胞做數值分散程度的比較，得出之結果如下圖，標準差值在 1.78~2.80 的區間。以 A344 的標準差最小。

NAM line	Oh 7B	A344	NC358	Tx303	Oh 43	II14H	B97	Kill
樣本標準差(s)	2.76	1.78	2.20	2.74	2.01	2.80	2.45	2.37

表三、各品系內之樣本標準差(s)

(四)取各品系之 HEI10 平均值做 NAM line 內的數值離散程度比較，得出標準差(s) 為 2.16；取品系之平均值做 NAM line 內 HEI10 數目理想範圍之估計，得不確定度為 0.76，理想值為 $19.17 < X < 20.69$ ，與理論預測互換數量為 20 相符。

(五)從圖表的紅線可看出 NAM line 預估的理想值範圍，有一些品系與其相差甚遠，如 II14H、CML228、Tx303 等品系，需進一步研究其差異。



表四、玉米不同自交系間染色體上之 HEI10 數量

三、比較玉米自交系間的差異程度

由玉米自交系間染色體上的各自 HEI10 數量平均範圍可發現其數值不一值。因此用 7 組自交系內之 HEI10 數量做單因子變異數分析(Analysis of Variance, ANOVA)，比較差異情形。結果顯示如表四。其 *P-value* 約為 0.00000355，其值遠小於 0.05 ($P < 0.05$)，故可知玉米不同自交系間的 type I crossover 數目的確具有顯著差異。

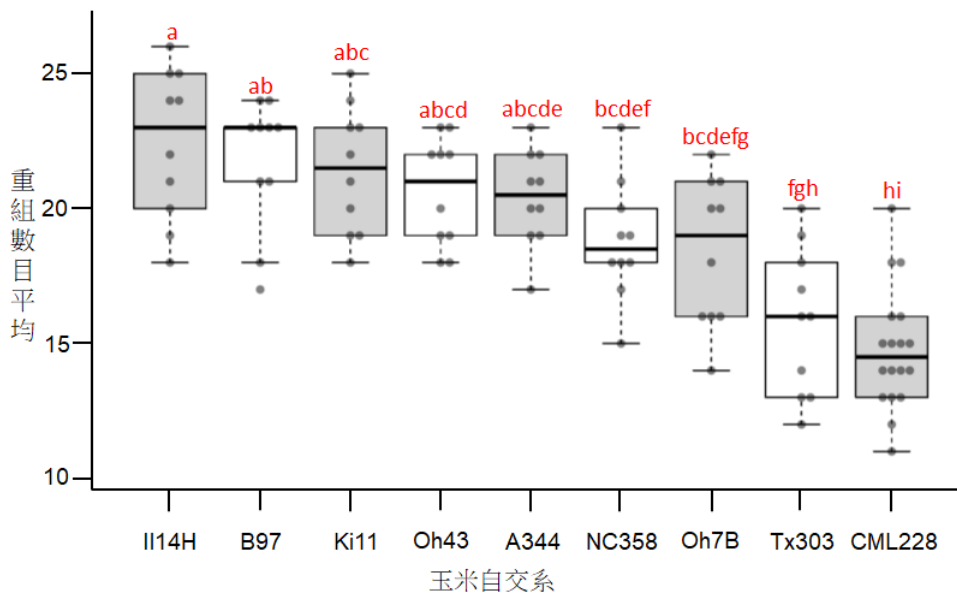
Source of Variation	SS	df	MS	F	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
---------------------	----	----	----	---	----------------	---------------

Between Groups 257.6 5 51.52 8.837611 **0.00000355** 2.38607

表五、不同自交系之 HEI10 數量 ANOVA 檢定

透過 ANOVA 分析可得知玉米自交系間 type I crossover 數目差異程度極高，卻無法得知各品系間的數目關係。為了進一步了解其兩者間或多者間的差異性，所以進一步用多重比較 (multiple comparison) 探討自交系彼此間的差異程度，本次使用 Fisher 的最小顯著差異性測驗 (Fisher's least significant difference test, Fisher's LSD) 作為檢測方式，結果如圖所示。

表五的紅色英文字母為兩兩比較結果，若具有相同字母或字母組合越多，即為差異程度較小的自交系，其 crossover 數目越相似；若無相同字母或字母組合差異大，即代表兩自交系之間具有顯著的差異，藉由此結果，可更了解不同自交系之間的關係，除了用 ANOVA 知道自交系間有差異存在，也可以知道自交系彼此之間更細微的交互關聯性。



表六、玉米自交系間 HEI10 數目盒狀圖

箱型圖上的黑點為原始資料標籤，依據英文字母的排列組合，由表五可知相異程度多寡依序為: Oh7B > NC358 ≅ A344 > Oh43 ≅ Tx 303 > B97 > I114H > CML228。HEI10 平均數目最大的自交系 I114H 為單一字母 A，顯示與其他自交系的相異程度大，而同樣具有 A 代號的「A344、Oh43、B97、Kill」的 HEI10 數目平均值與分布範圍多為 20 以上，可以淺分為玉米自交系中 type I crossover 較多的族群；相對地 HEI10 平均數目最小的 CML228 3 代表字母為

H、I，沒有任何品系與其具有相同英文字母，代表其分布範圍與平均值不同於其他 7 個品系，此品系 HEI10 數目平均值小，多介於 20 個以下，可淺分為玉米自交系中 type I crossover 較少的族群。

除了由英文字母的種類比較 crossover 數目之多寡，亦可依照英文字母比較其不同自交系間的相似程度。具有 6 個英文字母也就是相符合程度最高的為 Oh7B，從盒狀圖可看出其 HEI10 的平均值與範圍介於期待值 20，分布數值相較於其他自交系來的中庸，也具有最大程度的共同特徵。而具單一字母 A 且為平均值最大的 II14H，其數值分布較極端，因此各與其他自交系的相異程度較高。而同樣僅具有兩特定字母 H、I 的 ML228 則剛好相反，其 HEI10 數目均小於 20，與其他自交系相比其互換數目明顯較少，與其他 7 個品系的數據幾乎沒有重疊，視為 NAM line 中較突出的品系，可待深究其因。

四、估計 NAM line 內各自交系之母體族群

根據上述結果得知：不同自交系之 type I crossover 數量具有差異後，於是建立了一定標準之母體範圍。雖然細胞樣本可以視為自交系母體的一部份，但是無法將抽樣的結果完全視為母體，因此利用一樣本均值推論 (inference of one sample mean)，為一未知母體變方之族群估算其平均，產生表六，藉此可以更貼近各自交系的真實減數分裂狀況。

依照 95%信賴區間計算母體族群 type I crossover 的數量。其中 type I crossover 最高的是 II14H，最低的為 Tx303，最極端的兩個品系 type I crossover 估計範圍無重疊，相差甚大。而其估計範圍的差值介於 2.5~4.0，差值平均為 3.42。在 type I crossover 中，同品系內不同細胞間的差異約為 3~4 個 HEI10 蛋白。

Inbred lines	95% confidence intervals of population mean
Oh 7B	16.43 ~ 20.37
A344	19.13 ~ 21.67
NC358	17.23 ~ 20.37
Tx303	13.84 ~ 17.76
Oh 43	19.16 ~ 22.04
II14H	20.40 ~ 24.40
B97	19.95 ~ 23.45
Kill	19.71 ~ 23.09

表七、各自交系平均之 95%信賴區間

伍、討論

一、不同玉米自交系經免疫染色後的情形

- (一) **DSY2** 染色體上的軸蛋白則可以標示染色體形狀與位置且 **crossover** 主要發生在染色軸，可以用其清楚定位。
- (二) 從玉米花藥細胞經免疫染色後於顯微鏡下的圖片可看出 **crossover** (**HEI10** 蛋白)的分布多位於染色體軸上(**DSY2**)，顯示其抗體有成功染色到，惟其因免疫染色中通透不完全，可能有細胞質或遺傳物質等尚未全數去除，導致有些照片原始 **HEI10** 背景值偏高，但經反摺積(**deconvolution**)可清除絕大部分雜質，留下多數清楚標示 **crossover** 的 **HEI10**。若目標細胞的周圍有其他細胞的染色體斷裂，其染色體小片段進入視窗，可能會造成有少數偏離軸上的 **HEI10**，因此需要輔以 **DSY2** 標示染色軸的位置，在計算時僅統計位於軸上且標示清楚的 **HEI10** 蛋白數量。
- (三) **HEI10** 蛋白會出現在染色體互換處(**crossover**)，而二級抗體會與抗原 **HEI10** 蛋白結合，因此透過螢光染色標示 **HEI10** 位置，即可知道 **crossover** 的數目與位置，且在粗絲期時其點的亮度與互換情形時沒有關連性。有時也會因為蛋白揪在一起會比較認不到，所以樣本傾向採用染色體散開一點的細胞，除了能取得更精確的 **HEI10** 分布，也方便日後進階計算 **crossover** 與染色體末端長度。

三、不同玉米自交系中的 **type I crossover** 數目比較

- (一) 雖然細胞樣本可以視為自交系母體的一部份，但是生物學上無法將此抽樣的結果直接代表母體，因此結果的計算方式為同種自交系內不同細胞的目標值(**HEI10** 數量)得出平均，藉此更趨近各自交系減數分裂的真實狀況。在大自然中，由於演化上天然的基因差異與突變，即使是同環境下自交系內的細胞之 **crossover** 數目情形等還是各自有別，因此利用群體的平均狀況，追求最大程度的母體之準確性與異系間經比較呈現出來的趨勢。
- (二) 玉米染色體為 20 條，每條染色體在末端會 **crossover** 一次，根據理想假說其 **type I crossover** 數量應皆為 20。但從平均值看來事實非如此，造成品系間 **crossover** 數值變動的原因是：不同自交系在演化上為了符合當地地理條件或是大自然本就存在的遺傳變異，使得染色體互換數目不定，藉由了解與比對這些 **NAM line** 內的減數分裂重組的情形，可以進一步了解玉米的遺傳機制，甚至可能成功篩選有利基因。
- (三) 若將不同自交系視為各一測量值，而 **crossover** 數量的期待值為全體平

均值，比較 NAM line 內的極端分布狀況可知：全部細胞的 HEI10 數量平均為 19.93，理想狀況下之 HEI10 數量為 $19.17 < X < 20.69$ 。根據「結果四、估計 NAM line 內各自交系之母體族群」可知同品系不同細胞之 HEI10 數量差別約為 3~4 個，超出此範圍的自交系，將其視為差異程度顯著的品系，如 Tx303(15.8)。NAM line 內的自交系之染色體互換數目各有差異，有鑑於此，進一步用統計學的方法來區分自交系間的差異程度。

四、比較比較玉米自交系間的差異程度

(一) 利用統計學中的單因子變異數分析(ANOVA 檢定)，依照平均值得出的 P value 遠小於 0.05，可印證前述結果-NAM line 間 type I crossover 數目具顯著差異，也呼應先前多數的研究用不同方式揭示玉米為遺傳變異大的自然種原：猩猩跟人類之基因差異為 3%，玉米品系間的基因差異卻高達 5%，其差異程度超越跨物種間的遺傳差異，可知玉米品系間的遺傳差異相當具有研究潛力，未來除了可研究 HEI10 蛋白距離 DNA 末端位置，更可就減數分裂不同時期進行探討。(Ertiro, et al.2017) (Haberer, et al. 2020) (Bukler and Stevens, 2005)。

(二) ANOVA 中的 P value 只能證明其全體的差異有別，為了進一步建立模式，使用 LSD 分析，發現與其他自交系差異最大的是 Tx303 品系。環境優劣對減數分裂重組情形也有一定的影響，因此根據此結果比較 Tx303 品系的原生環境條件，可以歸納出減數分裂中染色體互換數目之差異與外在條件的相關性。本次實驗採用之玉米樣本皆種植於生長箱：白天 28°C 16 小時；晚上 22°C 8 小時。然而不同品系適宜的生長條件各異，因此染色體互換差異也跟其原生環境有關係。目前 NAM line 的自交系全部共有 26 種(如表七)，本研究選用其中 8 種，發現染色體互換數目差異大，分析極端品系：Tx303 crossover 數目顯然較低，而其亞群分類上屬「溫熱帶混合型 (Temperate/Tropical mix)，與此篇其他 7 種研究對象之亞群分類不同，日後可以依其屬性分析其遺傳重組情形，並歸類各品系玉米最適生長條件。

	NAME	Subpopulation	ORIGION
1	B97-1.0	Non-stiff-stalk	Iowa, United States
2	IL14H-1.0	Sweet corn	
3	Ki11-1.0	Tropical	
4	NC358-1.0	Tropical	
5	Oh7B-1.0	Non-stiff-stalk	
6	Oh43-1.0	Non-stiff-stalk	

7	TX303	Temperate/Tropical mix	
8	CML52-1.0	Tropical	
9	CML69- 1.0	Tropical	
10	CML103-1.0	Tropical	
11	CML228-1.0	Tropical	
12	CML247-1.0	Tropical	
13	CML277-1.0	Tropical	
14	CML322-1.0	Tropical	
15	CML333-1.0	Tropical	
16	HP301-1.0	Popcorn	Iowa, United States
17	Ki3-1.0	Tropical	
18	Ky21-1.0	Non-stiff-stalk	
19	M37W-1.0	Temperate/tropical mix	
20	M162W-1.0	Non-stiff-stalk	
21	Mo18W-1.0	Temperate/Tropical mix	
22	Ms71-1.0	Non-stiff-stalk	
23	NC350-1.0	Tropical	
24	P39-1.0	Sweet corn	
25	Tzi8	Tropical	

表八、NAM line 自交系的名稱(無 A344)

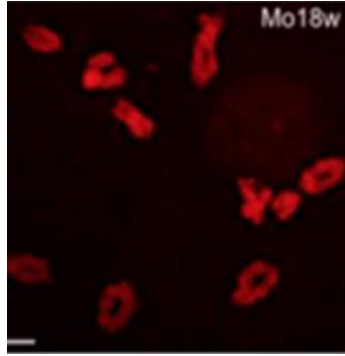
五、估計 NAM line 內各自交系之母體族群

利用一樣本均值推論 (inference of one sample mean) 計算各品系的母體族群範圍可以幫助建立玉米遺傳模式。目前同族群間的信賴區間約為 1.5~2 (乘 2 後為同族群範圍差值 3~4)，比較其他研究，其容忍誤差值偏大，可能造成比對上的不精準。信賴區間越小，表示其數值的準確度越高，因此未來希望可以透過增加樣本數與精進測量穩定度，盡量縮減信賴區間至 0.5~1 (同族群範圍差值 1~2)，歸納出 NAM line 內品系的母體族群 crossover 數量。

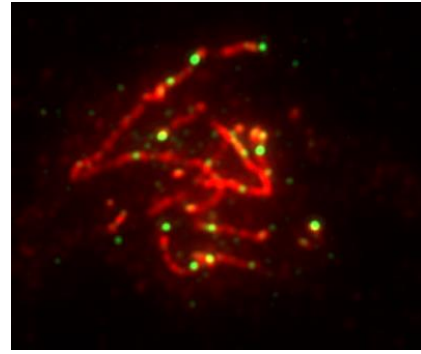
六、與前人研究之結果重疊

過往康乃爾大學觀察重組數目的方法是：在顯微鏡下觀察絲球期細胞經 DAPI 染色的交叉位置，作為計算重組數目的依據，而本研究利用 HEI10 分子標定物質，首次以更清晰、更準確的方式觀測減數分裂的重組情形，如圖之實驗結果相呼應。推測 CML228 可能具有較獨特的遺傳特性，此技術雖尚未成

熟但可視為重大突破，未來可就其原生環境、基因序列等進行比較。



圖十六、康乃爾大學之 DAPI 染色法



圖十七、本研究之 HEI10 染色法

七、未來展望

- (一) 目前已經根據實驗結果，開始比對九個品系中，參與減數分裂之基因序列(見表二)，盼能尋找具有相同特徵(如互換數目較少)的重疊序列，應用於育種篩選上。
- (二) 初期因為尚在尋找最適合的免疫螢光染色方法，導致一開始做的樣本無法在顯微鏡下呈現理想的結果，因此未來預計補齊目前尚未觀察的其餘 18 個品種之實驗樣本，完成更全面玉米自交系間的 **crossover** 機制。
- (三) 目前做出免疫螢光染色的有 2D 的品系 9 種(Tx303、Kill、Oh 7B、A344、NC358、Oh43、II14H、B97、CML228) 期望未來能雙採 2D 平面與 3D 立體的方式，比較兩種維度下，NAM line 內 26 種品系的 HEI10 蛋白數量與距離染色體末端長度，為玉米基因的減數分裂做初步建模。
- (四) 未來可進一步測量特定染色體長度並分析不同品系的重組位置分布，目前已知在顯微鏡下可依未消失的核仁鑑定玉米的第六對染色體。利用 **gammaH2AX** 標定偶絲期 (**zygotene**) 早期細胞中，同源染色體重組起始時 **DSB** 的數目，分析比較不同品系 **DSB** 數目是否有差異。
- (五) 目前為排除生長過程有別等複雜因素，統一種植於生長箱。未來期望能依照各品系最適應的環境條件(如:溫、熱帶)種植樣本，植株發育條件能盡量達到相同標準以維持實驗的公正性，也使減數分裂最接近大多數真實情形，方便日後農業實質應用。
- (六) 將玉米基因庫完整建模後，希望能找出在不同環境下最適當之種植基因組，增加玉米糧產效率與品質，達到育種上的正面效益。

陸、結論

- 一、 **NAM line** 自交系減數分裂時，染色體互換位於染色軸且其數目有差異，可以根據同系各細胞的平均值建立模式。
- 二、 **NAM line** 自交系有分群趨勢，極端值 **CML228** 自交系的染色體互換表現獨特，呼應前人研究。
- 三、 統計學上不同的玉米品系可分群且各異，**HEI10** 數目各自有別。但總數差異不大，表示演化過程中，不同玉米品系多少有受到重組數目的調控。
- 四、 未來還可以針對 **HEI10** 在染色體上的分布位置，做更進一步的分析

柒、參考文獻資料

- 1、 Buckler, E. S. (2009, August 7). *The Genetic Architecture of Maize Flowering Time*. Science.
- 2、 Gage, J. L. (2020, May 12). *Ten Years of the Maize Nested Association Mapping Population: Impact, Limitations, and Future Directions*. National Library of Medicine.
- 3、 Sidhu, G. K. (2015, December 14). *Recombination Patterns in Maize Reveal Limits to Crossover Homeostasis*. National Library of Medicine.
- 4、 Wang, Y. (2018, April 29). *Meiotic Recombination: Mixing It Up in Plants*. National Library of Medicine.
- 5、 An, S. (2022, August 25). *Natural Variation of Meiotic Crossovers in Maize*. 中研院 111 年度 暑期大學生培育計畫專題.
- 6、 S, D. (2019). *抑制植物減數分裂重組的分子机理* (No. 52–56; Hereditas(Beijing)-遗传, Vol. 41, Issue 1). 北京: 科学出版社.
- 7、 *Genetic Variation and Population Structure of Maize Inbred Lines Adapted to the Mid-Altitude Sub-Humid Maize Agro-Ecology of Ethiopia Using Single Nucleotide Polymorphic (SNP) Markers*. (2019). BMC Part of Springer Nature.

【評語】 052101

1. 本研究利用免疫螢光染色技術分析在不同玉米品系間，減數分裂時遺傳重組發生的數目。結果發現其重組發生的數目差異顯著，此外品系間有分群的結果。據此推論在不同的種源中可能帶有差異性的重組調控相關基因，期望未來能進一步研究相關的調控機制。
2. 本研究利用 HEI10 的染色來觀察 I 型染色體互換在玉米不同品系間的差異。論文的撰寫非常專業，背景資料及統計分析都很詳盡。
3. 細胞免疫染色是技術門檻很高的實驗，染色的成果讓人驚艷。

作品海報

探討玉米不同種原間減數分裂染色體互換之差異

摘要

觀察不同品系的減數分裂差異，進而研究背後的調控機制

減數分裂是育種的基礎，透過其中的遺傳重組互換可將連鎖的基因分離，以提供研究和篩選優良基因的機會。然而遺傳重組的數目在每一次的減數分裂中有天然的限制，每一對同源染色體平均發生兩個互換，多位於染色體末端，這使得要尋找合適的遺傳組合成為育種時最耗時的步驟。

本研究利用免疫螢光染色技術分析不同玉米品系中，減數分裂時遺傳重組發生的數目，了解多樣性的基因種源是否對遺傳重組的數目造成影響。結果發現 NAM line 的遺傳重組數目有顯著差異，且具有分群現象，其中CML228為特殊品系，需進一步研究控制遺傳重組數目和位置背後的機制。

壹、前言

一、背景：玉米的基因組在不同品系之間存在極大的差異，可分析其外顯性狀去篩選。

(一) NAM line

Maize Nested Association, NAM，是由B73和25個自交系（25 diverse lines, 25 DL）雜交得到的重組自交系構成，為目前基因庫定位出來的主要玉米族群。

(二) 研究材料

1. NAM重組自交系中的9個親本：Oh7B、A344、NC358、Oh43、IL14H、B97、Tx303、Kil1、CML228
2. 使用小鼠與兔子的抗體HEI10蛋白，如左方表格

	Primary antibody	Secondary antibody
HEI 10	Anti - HEI 10 (MOUSE)	Anti - mouse - 488
DSY2	A#8 - DSY2 (RABBIT)	Anti - rabbit- 555

(三) 玉米減數分裂 meiosis

於DNA複製後行兩輪細胞分裂，製造單倍體細胞。於減數分裂I中，染色體會先打斷雙股螺旋，尋找同源染色體，而染色體會互換(crossover)增加基因變異。故採計確認「已有crossover的前期I-粗絲期」之花藥作為觀察對象。

(四) Crossover機制

玉米有十對染色體，每對同源染色體至少一個位於末端的crossover，主要為I型互換，由ZMM蛋白質家族協助執行，每對染色體的最大crossover數量有限，可將染色體2D平面壓扁以觀察交叉點(chiasma)。

(五) HEI10蛋白的角色

ZMM蛋白質家族之一，可知「去除HEI10蛋白會使減數分裂 type I Crossover消失」可標示遺傳重組但尚未證實功能。利用物種同源性，以阿拉伯芥的HEI10序列為標誌，設計引子、重複PCR，得出玉米DNA的HEI10序列(約500胺基酸)

(六) 抗體製作

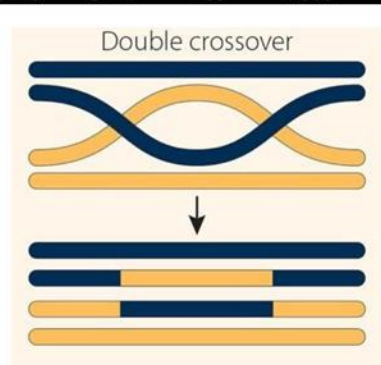
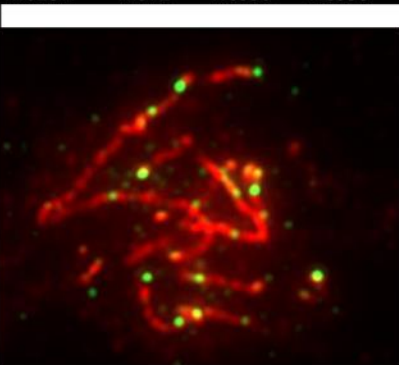
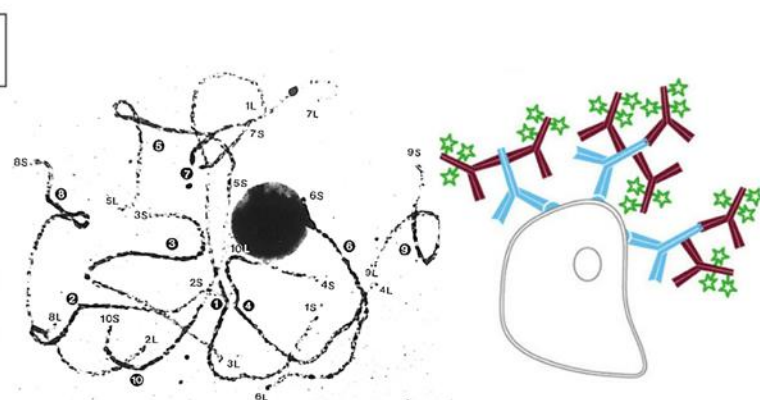
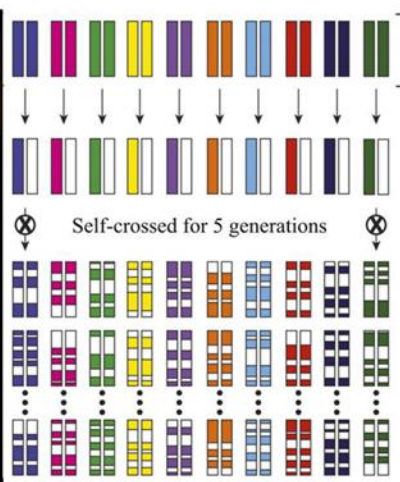
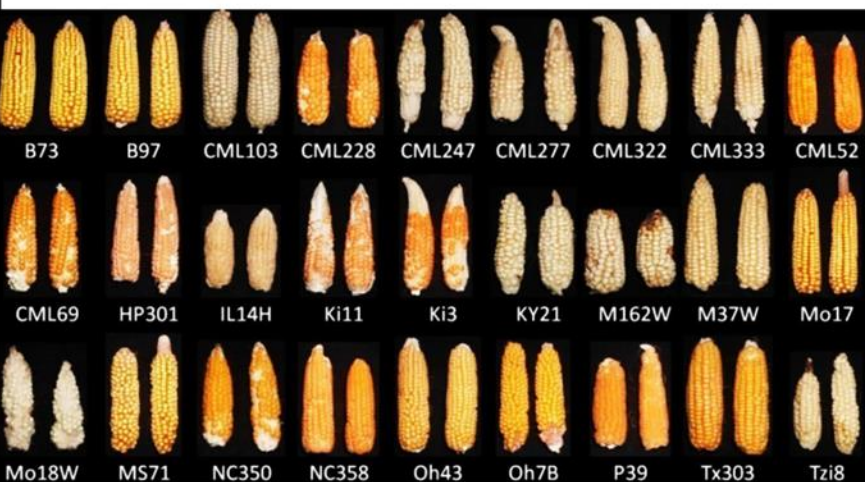
將HEI10序列送入大腸桿菌質體培養，為了辨識加上六個以上組胺酸形成的「TAG」，再將凋亡的大腸桿菌蛋白質萃取出，六個組胺酸容易吸附於二價金屬上，因此將萃取物重複地通過鎳金屬，使其純化並增產。

把DNA序列打入哺乳類動物體內，可產生專一性的HEI10抗體，將哺乳類動物血漿的IGG抗體分離出來，辨別crossover位置。為了更清晰辨認，使用Y型二級抗體加強識別。

(七) 參與重組互換的重要基因

1. DNA 雙股螺旋斷裂：SPO11-1、SPO11-2和^{PRO1 - PRO2/EPH3}
2. 單股入侵及同源序列辨識：MRE11、RAD50形成單股DNA，RAD51和DMC1結合，啟動搜尋同源序列。
3. 重組發生：配對後，蛋白質參與修補斷裂點，包括MER3、FIGL1、FANCM、HEI10等。
4. 聯會形成：染色體蛋白軸具調節和聯繫訊息的功能，關鍵基因有REC8、ASY1、DSY2等。

若同源染色體正確配對，蛋白軸即形成穩定的拉鏈狀結構，稱為聯會複合體



品系名	亞群	起源
B97	非硬莖	美國愛荷華州
CML322	熱帶	
IL14H	甜玉米	
NC358	熱帶	
Oh7B	非硬莖	
Oh43	非硬莖	

二、前人研究：使跳躍子跳到基因間破壞造成變異，建立玉米種原庫，觀察變異後的植株表現。

精細胞變異，不掉花粉 → 雌雄不稔 → 選取同現象植株 → 觀察變異，尋找共同點

三、問題：為什麼每對同源染色體末端上發生的遺傳重組，其數量在NAM不同品系間非一致？

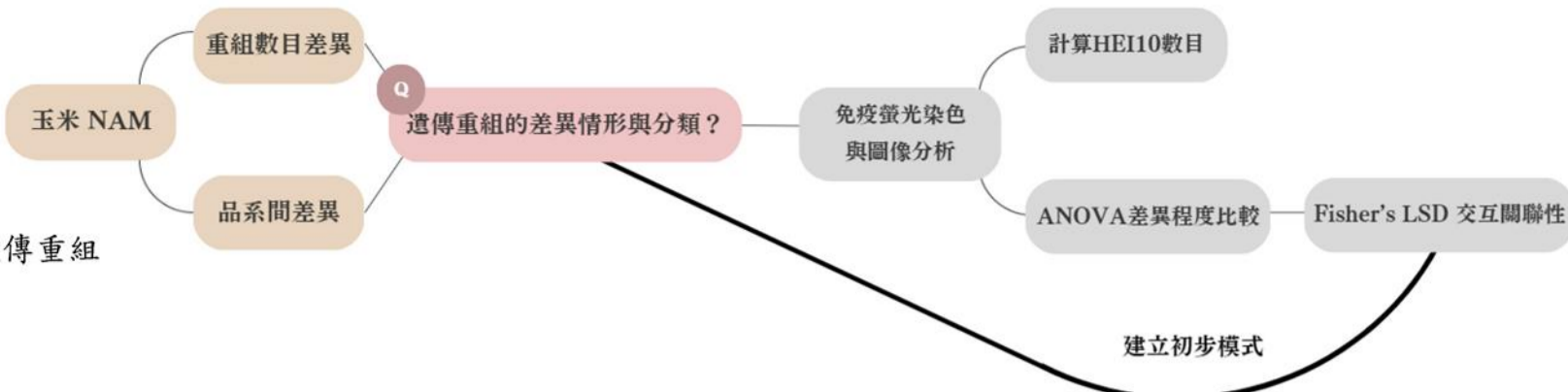
四、阻礙：部分互換的形成會抑制附近產生另一個互換，稱為互換干擾(crossover interference)。此機制使互換往往發生在染色體末端。大大影響育種的效率。

四、方法：利用獨創的螢光免疫染色技術，藉由HEI10抗體標定不同玉米品系的減數分裂細胞的同源染色體上發生的遺傳重組尋找減數分裂互換數目較小的品系，比對其背後可能調控的基因

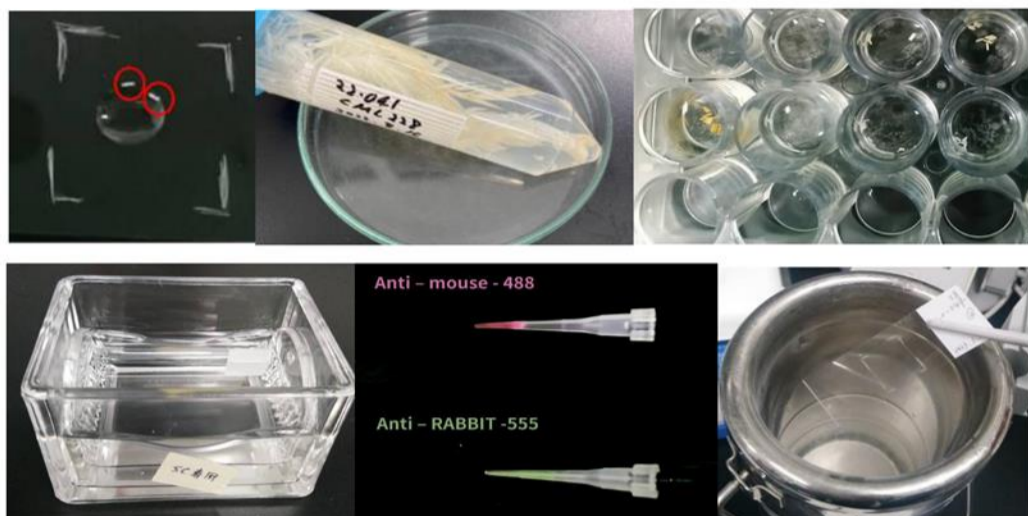
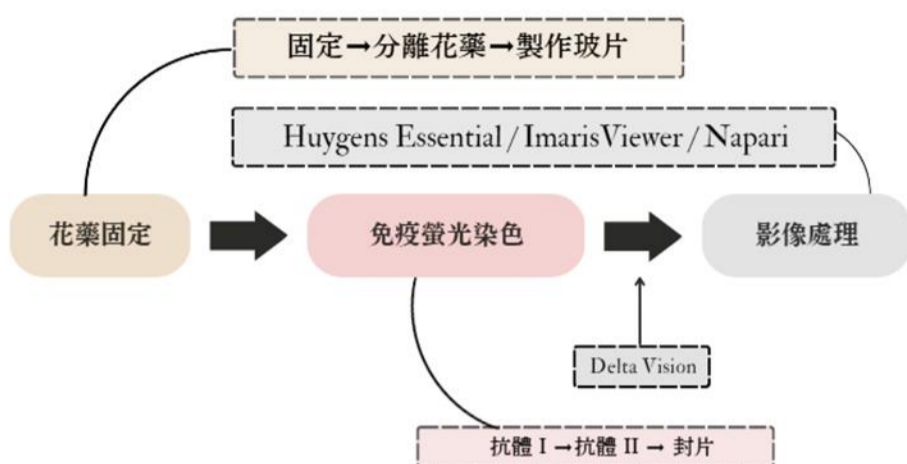
貳、研究目的

一、研究不同品系的玉米遺傳重組的數目情形

二、分析不同品系玉米的遺傳重組數目與分佈的差異。



參、研究過程與方法



一、花藥固定

- 切取未成之玉米雄花穗，放置於95%酒精和醋酸混和溶液固定保存於75%酒精溶液中，待需使用時從-20°C冰箱取出即可。
- 本實驗用雄花穗內的花藥，作為觀察減數分裂細胞染色體重組情形之對象。
- 挑選NAM line 裡不同自交系之玉米粗絲期大小的花藥(本實驗使用1.6~1.7mm)，分離出內部減數分裂細胞

三、影像處理

使用高解析度細胞影像分析系統 Delta Vision 拍攝，用反摺積 deconvolution 之影像加工，減緩拍攝過程中雜訊。再使用 ImarisViewer 和 Napari 展示HEI10位置和計算數量。

二、免疫螢光染色

(一) 取得減數分裂細胞：

將儲存於-20°C的花藥放置於玻片，滴上60%醋酸內使被酒精脫水的細胞膨脹。把花藥內的減數分裂細胞擠出，並去除雜質。

(二) 變性(denaturation)：

放到液態氮急遽降溫，用加熱型乾浴器加熱到42°C，並浸泡於 Citric acid, Sodium Citrate 緩衝液內至沸騰，使細胞核內DNA打開延長。

(三) 通透與封閉

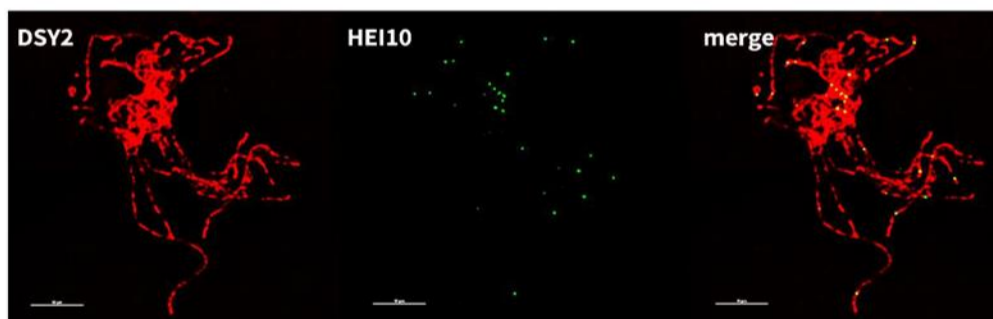
輪流浸泡Permeability 與 PBS，去除外部物質，在細胞膜上開出通道，讓藥品進入細胞內，再使用Blocking Buffer封閉。

(四) 加入抗體：

利用抗體 I 標記特定蛋白質，再利用可產生螢光效果的抗體 II 去標誌抗體位置，以能看到染色體上crossover 數量與位置。

肆、研究結果

一、不同玉米自交系經免疫染色後的情形



Oh 43 自交系



DSY2 染色圖 - DNA 形狀 + HEI10 蛋白染色圖 - crossover 發生於染色體軸上 = 形狀相似，符合假說。

二、不同玉米自交系中的type I crossover 數目比較



(一) 玉米不同自交系間染色體上之HEI10數量

- HEI10 平均值：A344 > Oh 7B > B97 > Oh 43 > CML322 > NC358 > II14H
- 不分種系，全部組別的HEI10數量平均值約為20.38。
- 不確定度為1.15，理想值為 $19.23 < X < 21.53$ ，明顯超出理想值的自交系有 Oh 7B、A344、NC358、II14H。



三、比較玉米自交系間的差異程度

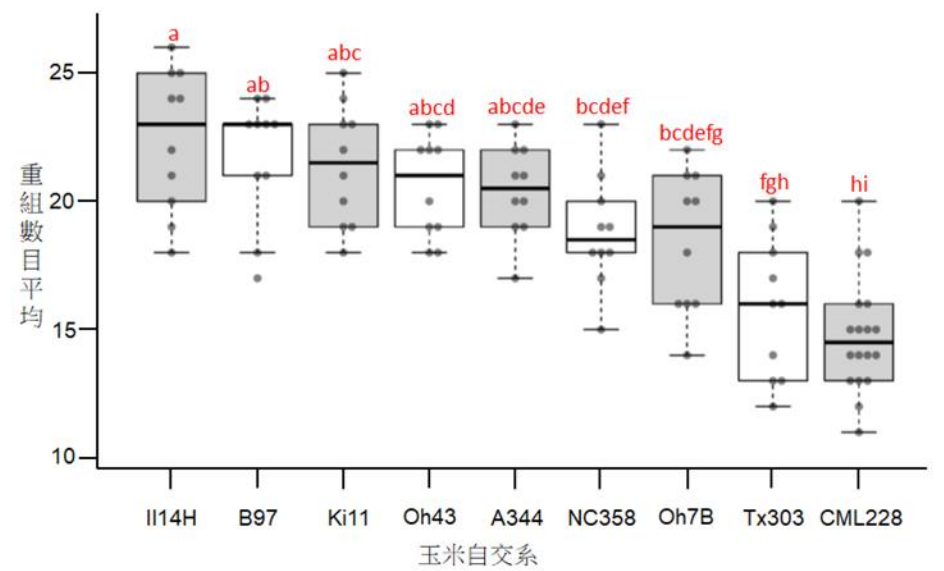
從「二、不同玉米自交系中的type I crossover 數目比較」中，由玉米自交系間染色體上的各自HEI10數量平均值可發現其數值非定值，具有差異。因此7組自交系內之 HEI10 數量做單因子變異數分析(Analysis of Variance, ANOVA)，比較差異情形。結果：其P-value 約為0.0039，遠小於 0.05，故可得知玉米不同自交系之間的 type I crossover 數目的確具有顯著差異。

ANOVA 得出差異性極大	Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Fisher's LSD比較差異程度	Between Groups	184.9524	6	30.8254	5.532764	0.00399631	2.847726

(一) 玉米自交系間HEI10數目盒狀圖

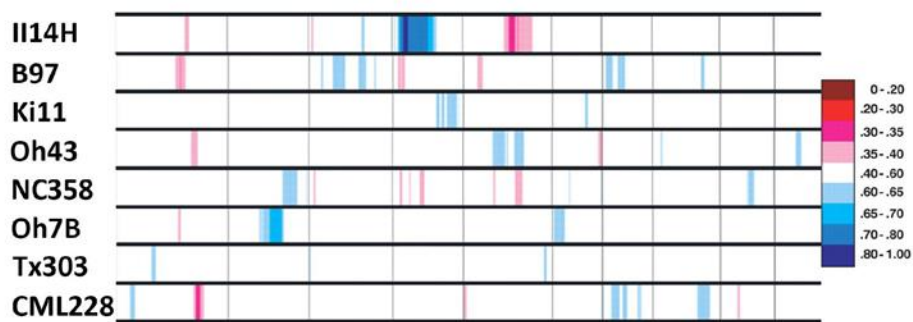
圖中的紅色字母 ABCD 為兩兩經由Fisher's LSD比較後結果。

- 若具有相同字母或字母組合越多，即為差異程度較小的自交系，其染色體互換(crossover)數目越相似。
- 若無相同字母或組合差異大，即代表兩自交系之間具顯著差異
- 相異程度：Oh7B > NC358 . A344 > Oh43 . Tx 303 > B97 > II14H > CML228



- HEI10平均數目最大的自交系A344**
代表字母為A，具有A的自交系「II14H、B97、Ki11、Oh43、A344」平均值都較大。
- HEI10平均數目最少的自交系CML228**
唯獨CML228具備代表字母I，代表其值與其他自交系的同質性較低。
- 具有最多英文字母的自交系 Oh7B**
其HEI10的數值範圍介於平均值20，相較於其他自交系具有最大程度的共同特徵，
- 具較少字母的自交系II14H、CML228**
兩者數值分布較極端，II14H (a)的平均值最大，高於其他自交系CML228的值顯著的小，且獨具HI，皆為相異程度較高的品系。

四、造成重組互換差異可能的遺傳因子



利用已經發表的全基因組序列，比較自交系與參考品系B73的基因傳歧異度，發現在II14H的第五條染色體上，和CML228 的第一條染色體上，各有一段獨特的區域，可能影響我們觀察到的減數分裂染色體互換的表型的差異。

柒、討論

- 在九個玉米自交系中，減數分裂的遺傳重組數目的確具有顯著差異。特別是II14H 顯示較高的重組數目，而CML228有較低的重組數目。這個可能說明玉米的種內的遺傳多樣性，具有特異的基因型，影響減數分裂時基因重組的表型。
- 在II14H的第5號染色體上，以及CML228的第1號染色體上，分別鑒定出了包含獨特基因等位基因的區域，這些等位基因可能與我們在II14H系和CML228系中觀察到的交叉數量差異有關。

捌、未來展望

- 目前做出免疫螢光染色的有2D 的品系8種(CML322、CML228、Oh 7B、NC358、Oh43、II14H、B97、CML228) 期望將NAM line 內共26種品系的HEI10蛋白數量與長度將玉米基因的減數分裂做螢光染色，以進行初步建模。
- 未來能採用免疫螢光染色2D與3D的方法，比較立體與平面兩種維度下之差異性。
- 依照型態鑒定第六對染色體，測量染色體長度並分析不同品系的重組位置分布。
- 利用gamaH2AX 標定偶絲期(zygotene)早期細胞中，同源重組起始時DSB的數目，分析不同品系之DSB數目是否有差異
- 進一步分析鑒定出來的獨特區域中，是否帶有參與減數分裂的相關基因。

捌、結論

- NAM line自交系減數分裂時，染色體互換位於染色軸且其數目有差異，可以根據同系各細胞的平均值建立模式。
- NAM line自交系有分群趨勢，極端值CML228自交系的染色體互換表現獨特，呼應前人研究。
- 統計學上不同的玉米品系可分群且各異，因以HEI10 數目各自有別。但HEI10 總數差異不大，表示演化過程中，不同玉米品系多多少少有受到重組數目的調控。

玖、參考文獻

- Buckler, E. S. (2009). *The Genetic Architecture of Maize Flowering Time*. Science.
- Wang, Y. (2018). Meiotic Recombination: Mixing It Up in Plants. *Annual Review of Plant Biology*
- Ertiro, B. (2017) Genetic Variation and Population Structure of Maize Inbred Lines Adapted to the Mid-Altitude Sub-Humid Maize Agro-Ecology of Ethiopia Using Single Nucleotide Polymorphic (SNP) Markers. *BMC Genomics*.
- Hufford, M. B. (2021) *De novo* Assembly, Annotation, and Comparative Analysis of 26 Diverse Maize Genomes. *Science*.