

分子標誌應用於高粱臺中 5 號 母本異型株之檢測

Application of molecular marker for testing the off-type of female parent of sorghum cv. 'Taichung No.5'

龔美玲¹、許鏞云²、張惠如³

一、前言

說到高粱 (*Sorghum bicolor* L. Moench)，可能大家第一個冒出的印象就是「金門高粱酒」，可謂是金門的最佳代表。高粱的澱粉含量高，適合釀造中式白酒（或稱作白乾、燒酒、火酒），優質的中式白酒品牌幾乎都是以高粱為主要的釀造原料，這是因為以高粱釀造的酒最為香醇，糧食作物中只有高粱的種皮含有單寧，微量的單寧在發酵過程中會形成酚類化合物，可賦予白酒特殊的香味。高粱的抗旱性強，原產於非洲，能適應缺乏灌溉設施的土地，也可搭配一貫化機械栽培作業，為全球第五大重要糧食作物，僅次於玉米、小麥、水稻及大麥，高粱除了是乾旱地區的人類主食，也能作飼料使用。

1977 年育成的臺灣本土品種「臺中 5 號」具有生育日數短、豐產、矮生、抗蚜蟲及紋枯病等特性，屬於單寧成分較低的性高粱，適合作飼料，但亦可兼釀酒使用。本場負責生產「臺中 5 號」種子，供應金門地區栽種本土高粱品種。2017 年農

業統計年報統計臺灣高粱栽培地區有 1,969 公頃，其中金門就占 1,933 公頃，產量為 1,941 公噸，其所生產的高粱專供釀酒之用，「臺中 5 號」近年的栽培面積占金門地區的三成（許，2018），其它則有來自中國湖南的「兩糯一號」、美國的「豐糯」系列等糯性高粱品種。

「臺中 5 號」為雜交高粱品種，利用雜種優勢可使 F1 品種在產量上、病蟲害或環境逆境的耐受性上都能優於父母親本。根據聯合國糧食及農業組織（FAO）1960-1996 年的統計，自 1960 年代起開始大量推廣商業 F1 品種後，使全球高粱的單位面積產量提升了 40%-50%。高粱屬常異交作物，雜交率約 5-15%（House, 1985），為圓錐花序、雌雄同花，去雄操作複雜且不符合雜糧種子生產的成本效益，因此勢必朝向育成雄不稔系統，其中又以細胞質核互作雄不稔（Cytoplasmic-nuclear male sterility, CMS 或 CGMS）系統的應用最為廣泛。CMS 是由細胞質基因與細胞核基因間的交互作用，共同控制稔性表現，只有

¹ 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

² 種苗改良繁殖場種苗經營課 助理研究員

³ 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員兼課長

研究成果

當雄不稔細胞質 (S) 配上細胞核內隱性同質結合的稔性恢復基因型 (*rfrf*) 時，才能表現雄不稔，但只要有雄可稔細胞質 (N) 或一個顯性稔性恢復基因 (*Rf*) 其中一個存在的情況下 (即 *N/rfrf*、*N/Rf₋*、*S/Rf₋*)，則皆為雄可稔。CMS 的應用需要建立三系親本，包含雄不稔親 (A-line, *S/rfrf*)、維持親 (B-line, *N/rfrf*) 及恢復親 (R-line, *N/RfRf* 或 *S/RfRf*)，A-line 與 B-line 為核內遺傳組成相近的近似同源系，僅差在細胞質，透過 B-line 提供花粉繁殖 A-line，而 A-line 與 R-line 的雜交後代則為雄可稔的商業 F1 雜交品種 (*S/Rf₋*)。「臺中 5 號」即是由自美國引進的高粱雄不稔母本 80A 品系，與帶有 *Rf* 基因、抗紋枯病及蚜蟲抗性基因之父本 2R 品系進行雜交育種而得。

利用試交 (test cross) 後代的稔性恢復表現，可將高粱雄不稔細胞質分成 A₁ (milo)、A₂、A₃、A₄、A₅、A₆ 及 9E 等類型，目前 A₁ 型是全球應用最廣泛的高粱 CMS 系統 (Reddy *et al.*, 2005)。不穩

定的 A-line 會有花粉脫落，造成自交種子混入，影響種子生產的成本與降低雜交種子的品質。有研究指出當開花後，夜溫低於 10°C 時會誘導雄不稔並干擾高粱稔性恢復，當溫度高於 42°C 時高粱雄不稔品系的雄不稔表現會變得不穩定而有花粉產生 (Reddy and Stenhouse, 1994)。本場於 2018 年雜交高粱採種試驗田之田間檢查，發現母本行中出現雄可稔性植株，此現象也曾於 1974 年被提出討論，而後有研究以套袋及接近法 (Approach method) 進行不同環境下之稔實性評估試驗，確認自美國引進之高粱 A、B-line 在臺灣本島環境下均可安定地表現原本的遺傳性與稔性特性 (林, 1976)。林氏 (1976) 對於當時高粱採種圃母本中不斷出現雄可稔植株的問題提出兩點推測，一、有 A-line 繁殖時有 B-line 以外的花粉汙染，二、收穫與調製過程中發生種子混雜 (例如 B-line)，並認為由於有田間檢查把關隔離距離，以第二原因可能性較大。本研究擬以分子標誌檢測母本行中雄可稔異型株，進一步確認可能發生之原因。

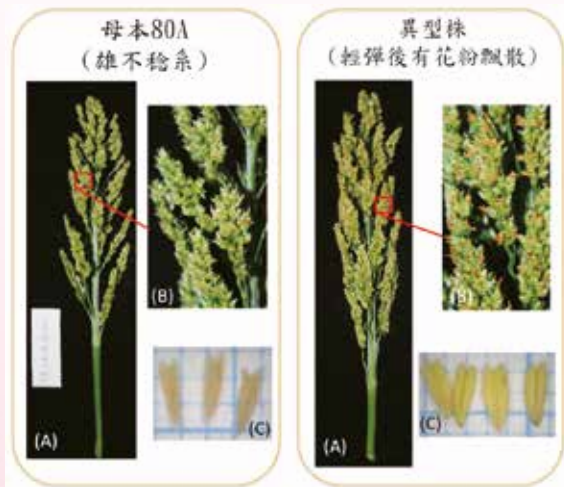


圖 1. 雄可稔異型株與母本 80A 之外觀。(A) 穗外觀圖；(B) 穗之局部放大圖；(C) 花藥外觀

二、材料與方法

自種苗場二農場 108 年 1 期作高粱採種試驗田蒐集 5 株異型株，其中第 1-4 株的花藥呈金黃色 (圖 1)，輕彈後有花粉飄散，不同於雄不稔母本 (80A) 之淡黃色花藥且無花粉抖落，但整體株型與穗型近似 80A；第 5 株異型株經輕彈無花粉，花藥呈淡黃色，但株高明顯高於 80A；以 1/15 M 磷酸緩衝液 (pH 6.5) 配置 0.5% TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 溶

液進行花粉活力檢定。

本研究使用高粱細胞質葉綠體上的 *rpoC2* 標誌 (Chen *et al.*, 1995) 檢測異型株是否有與 80B (B-line) 及 2R (R-line) 相同之雄可稔細胞質，以及利用 10 組與細胞核內 *Rf* 基因 (*Rf1*、*Rf2*、*Rf5* 及 *Rf6*) 連鎖之分子標誌 (Klein *et al.*, 2005 ; Jordan *et al.*, 2010 ; Praveen *et al.*, 2015 ; Jordan *et al.*, 2015) (表一)，檢測異型株是否可能帶有 *Rf* 基因，上述標誌在 80A 及 2R 間皆具有多型性。進行聚合酶連鎖反應 (PCR) 後，依標誌類型採用膠體水平電泳或毛細管電泳分析。

三、結果與討論

第 1-4 株異型株花粉經過 0.5% TTC 處理染成紅色，代表花粉具有活性 (圖 2)，而第 5 株異型株於顯微鏡下並未觀察到任

何花粉。高粱小花藥型 (A₁、A₂、A₅ 及 A₆) 雄不稔在細胞質葉綠體的 *rpoC2* 基因上具有 165 bp 的序列缺失，因此該分子標誌可區分小花藥型與大花藥型 (A₃、A₄、9E 及部分高粱 B-line、R-line) 品系 (Chen *et al.*, 1995)，5 株異型株的 *rpoC2* 標誌之條帶結果與 80A 及 F₁ 相同，但與 80B 及 2R 不同 (圖 3，表一)。以 *Rf* 基因連鎖分子標誌進行細胞核內的遺傳分析 (圖 3B、2C，表 1)，4 株雄可稔異型株在 SB_Xtxsn11、SB2388、Xtxp65、SB05-3693459 及 Sb05QGM273 等標誌的基因型與 80A 相同，但在 Xtxp304、Xtxp211、Xtxp616 與 Xtxp654 等標誌的結果則為異質結合同型，且在 Xtxp50 標誌有 1 株呈現與 2R 相同的同質結合基因型，另外 3 株為異質結合同型，因此可以判定這 4 株雄可稔異型株並非 80B、2R 與臺中 5 號 (F₁)，

表一、11 組高粱分子標誌之基因型分析結果

標註	樣品 基因型	檢測標的	80A	2R	異型株 1	異型株 2	異型株 3	異型株 4	異型株 5
	<i>rpoC2</i>	葉綠體 <i>rpoC2</i> 基因 (Chen <i>et al.</i> , 1995)	A	B	A	A	A	A	A
	Xtxsn11	連鎖 <i>Rf1</i> (Klein <i>et al.</i> , 2005)	A	B	A	A	A	A	A
	Xtxp304	連鎖 <i>Rf2</i> (Jordan <i>et al.</i> , 2010)	A	B	H	H	H	H	A
	Xtxp211		A	B	H	H	H	H	A
	Xtxp50		A	B	H	H	B	H	A
	Xtxp616		A	B	H	H	H	H	A
	Xtxp654		A	B	H	H	H	H	A
	Xtxp65		A	B	A	A	A	A	A
	SB05-3693459	連鎖 <i>Rf5</i> (Praveen <i>et al.</i> , 2015)	A	B	A	A	A	A	A
	Sb05QGM273		A	B	A	A	A	A	A
	SB2388	連鎖 <i>Rf6</i> (Jordan <i>et al.</i> , 2015)	A	B	A	A	A	A	A

*A 代表母本 80A 的同質結合同型，B 為父本 2R 的同質結合同型，H 為異質結合同型。

研究成果

且依連鎖標誌推測其可能帶有 *Rf2* 基因，導致稔性恢復而產生花粉。第 5 株雄不稔異型株在 10 組標誌的基因型皆與母本 80A 相同（圖 3，表一），遺傳分析結果與雄不稔外表型一致，推測可能屬於 80A 的高突變型（tall mutant），除了株高較高，並不影響穗型與產量（許，2018）。

就本次所蒐集到的具活性花粉之異型株並非屬於 80B、2R 與 F₁ 的混入，而比較有可能是林氏（1976）的第一點推測，屬於繁殖 80A 時的外來花粉污染，該花粉親帶有 *Rf2* 基因，導致收成的種子中混有雜交種子，當這批種子再次用於繁殖 80A 且未被從田間去除時，該基因就會繼續存在於 80A 的種子批之中，持續的繁殖也會讓異型株的株型與穗型趨近 80A。維持雜交親本種子的純度是非常重要的工作，親本繁殖的過程中，有可能會因為機械混雜其他品種、花粉污染，或者突變導致稔性恢復之反突變體（revertant）等因素造成 A-line 純度下降，若可藉由 A-line 與 B-line

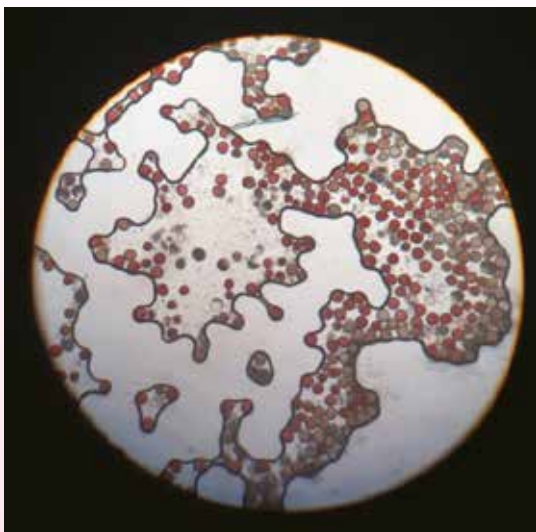


圖 2. 有花粉之異型株其活力檢測結果，呈紅色者為正常花粉

雜交兩個世代（Reddy *et al.*, 2005），並配合田間的去偽去雜，將可剔除有花粉之植株，進而提升 A-line 種子純度。

四、結語

目前臺灣每年所生產的高粱種子其實並不足以滿足金門酒廠的需求量，但為何仍要自己種高粱？為何希望有本土的高粱品種？站在行銷的角度，使用在地原料，能營造產品的獨特性，提升產品的價值與競爭力；站在生產的角度，現行栽培的糯性高粱品種主要來自美國與中國，代表每年種子的供應與品質掌控在進口國手中，也代表有可能因為種子量與質的不穩定，而讓金門的高粱美酒缺席數個年份。本場肩負生產種植用高粱種子之任務，搭配田間檢查與分子標誌技術來確保種子純度，釐清可能的種子混雜來源，讓臺灣能生產優良的在地高粱品種，也讓金門高粱酒能持續為臺灣爭光。

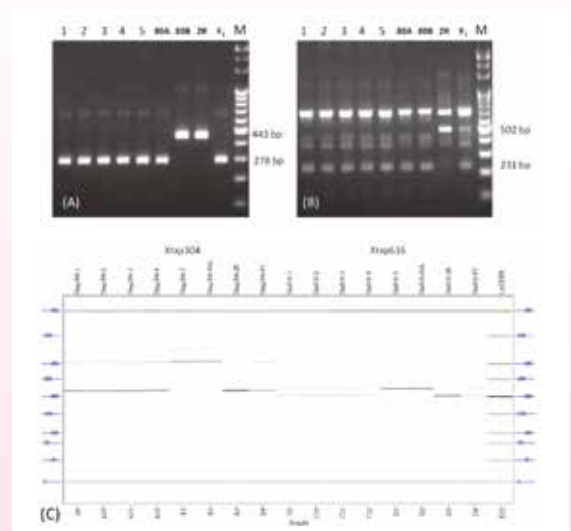


圖 3. 分子標誌檢測結果。M: Ladder; 1~4: 花藥呈金黃色、輕彈後有花粉飄散之異型株; 5: 花藥無花粉、呈淡黃色，但株高明顯高於 80A 之異型株。(A) *rpoC2*; (B) SB_Xtxsn11(連鎖 *Rf1*); (C) Xtxp304 及 Xtxp616(連鎖 *Rf2*)。