

高粱雄不稔細胞質 SCAR 分子標誌之開發

龔美玲¹⁾、詹詩禎¹⁾、張惠如¹⁾

¹⁾ 行政院農業委員會種苗改良繁殖場 助理研究員(通訊作者)、計畫助理、
副研究員兼課長

地址：42644 台中市新社區大南里興中街 6 號

電話：04-25825535

傳真：04-25814687

電子信箱：melinda@tss.gov.tw

摘要：高粱普遍利用雄不稔特性生產一代雜交品種，但沒有相關的連鎖標誌可應用於雄不稔細胞質的鑑別，因此本研究以本土高粱雜交品種‘臺中 5 號’及其親本品系雄不稔親‘80A’與維持親‘80B’為材料，設計與雄不稔有關的粒線體 *atp6*、*coxII*、*atp1-1* 及 *atp9* 基因專一性引子對進行序列多型性分析，試驗結果發現‘80A’與‘80B’在 *atp1-1* 之 3’端具有多型性，進而設計 SCAR 標誌(SB-*atp1-1_indel_F2/R2*)可在雄不稔親‘80A’擴增 401 bp 大小的條帶，在維持親‘80B’則可擴增 701 bp 的條帶。比較兩者 PCR 產物序列差異，發現‘80A’品系在 *atp1-1* 3’端 UTR 缺失(deletion)的部分序列中含有短片段的重複序列。綜合上述本研究獲得之分子標誌可區分近似同源系的‘80A’與‘80B’，並可應用於確認高粱育種之細胞質稔性遺傳背景及快速鑑別品系之種子純度。

關鍵詞：高粱、雄不稔、分子標誌

前 言

高粱(*Sorghum bicolor* L. Moench) (2n=20) 為全球第五大糧食作物，2020年全
球高粱栽培面積為4,025萬公頃，產量達5,870萬公噸(FAO, 2022)。高粱適合釀造中
式白酒，其種皮的單寧成分在發酵過程形成酚類化合物，賦予中式白酒特殊的香
味，臺灣即以‘金門高粱’富有盛名。2020年臺灣高粱栽培面積達1,778公頃，年產量
約2,017公噸，其中金門縣就高達1,744公頃及1,903公噸(農情報告資源網，2022)。
作物可利用雜種優勢提升產量或對病蟲害及環境逆境的耐受性，全球高粱自1960
年代開始大量推廣商業F₁品種後，單位面積產量提升40%~50%(Reddy *et al.*, 2005)。

接受日期：111年7月

1977年臺灣育成本土雜交品種‘臺中5號’，係自美國引進改良的高粱雄不稔母本‘80A’，與帶有*Rf*基因、抗紋枯病及抗蚜蟲基因之父本‘2R’雜交而得，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稈性高粱，飼料及釀酒兩者兼用(張與黃，1995)。

高粱屬常異交作物，雜交率約 18% (Barnaud *et al.*, 2008)，圓錐花序、雌雄同花，因此現行高粱育種透過雄不稔特性生產 F₁ 種子。普遍使用之雄不稔系統為細胞質核互作雄不稔(cytoplasmic-genetic male sterility, CGMS 或 CMS)，需要父本(恢復親，R-line)貢獻細胞核內的稔性恢復基因(fertility restoration gene, *Rf*)使帶有來自雄不稔母本細胞質(S)的 F₁ (S/*Rrf*)能夠正常產生花粉與結實，而雄不稔系(S/*rfrf*) (A-line)需藉由具有正常雄可稔細胞質(N)的近似同源系作為維持系(N/*rfrf*) (B-line)提供花粉進行繁殖。前人根據試交(test cross)結果將高粱雄不稔細胞質分成 A₁ (milo)、A₂、A₃、A₄、A₅、A₆ 及 9E 等類型，其中 A₁ 型為最廣為使用的雄不稔系 (Reddy *et al.*, 2005)。曾有學者利用 RFLP 標誌分辨 A₃、A₄、9E 與其他類型的雄不稔細胞質(Xu *et al.*, 1995)，並有研究指出 A₄/9E 與 milo 型的 *coxI* 序列不同(Bailey-Serres *et al.*, 1986a; b; Pring *et al.*, 1995)。其他研究發現小花藥型(A₁、A₂、A₅ 及 A₆)高粱雄不稔系的葉綠體 *rpoC2* 基因序列缺失(deletion) 165 bp，利用此 InDel 標誌可區分小花藥型與其他大花藥型(A₃、A₄ 及 9E)之雄不稔系及部分高粱維持系(B-line)與恢復系(R-line) (Chen *et al.*, 1993; 1995)。據報告指出大部分植物的細胞質雄不稔與粒線體相關，由於粒線體基因體的變異而產生不同類型的雄不稔細胞質，例如玉米 CMS-T、CMS-S 及 CMS-C 細胞質等(Schnable and Wise, 1998; Kubo *et al.*, 2011)。目前已知高粱 A₃ 型雄不稔與粒線體 *orf107* 相關，源自高粱 *atp9* 基因序列發生重組(Tang *et al.*, 1996, 1999; Pring *et al.*, 1998)。至於 A₁ 型細胞質雄不稔，Keough 等人(2016)定序組裝分析 A₁-CMS 品系 Tx623A₁ 的粒線體基因體，找出獨特嵌合的 ORFs (open reading frame)，可比對到類似維持系 Tx623B 之 *atp1-1*、*atp1-2* 及 *atp6-1/rps4 like* 序列；王等(2019)也透過定序 Tx623A 及維持系 Tx623B 的粒線體基因體，發現兩者間具有一段 57 kb 基因體片段易位(translocation)的差異。

高粱稔性表現的穩定性可能受到環境溫度的影響，當抽穗開花後的夜溫低於 10°C 時稔性恢復會受到抑制而變成雄不可稔，但當溫度高於 42°C 時，部分雄不稔品系反而會恢復稔性(Reddy and Stenhouse, 1994; 王等，2000)。雜交種子生產過程中倘若母本的雄不稔性不穩定或純度不足，恐降低雜交種子的純度品質。1974 年

農業委員會種苗改良繁殖場的雜交高粱採種圃曾發現母本行中出現雄可稔植株，而後透過不同環境下稔實性的評估試驗，確認自美國引進之高粱 A、B-line 在臺灣本島的環境下均可穩定表現原本的遺傳性與稔性；當時學者對於高粱採種圃的母本不斷出現雄可稔植株的原因提出兩點推測，一為 A-line 繁殖時被帶有 *Rf* 基因的花粉污染，二為收穫與調製過程中混入其他雄可稔品系的種子，例如 B-line (林，1976)。

由於雄不稔系及恢復系的育成相當耗費人力與時間(Rakshit and Bellundagi, 2019)，因此育種者需要清楚知道育種材料的稔性基因型，才能有效地進行育種工作；此外，在種子生產過程中倘若母本雄不稔表現發生異常，需要判定是否為花粉污染或其他品系種子混雜所導致，方能決定後續的改善措施；使用分子標誌可比試交方法更快速確認基因型，進而提升育種效率，以及釐清種子繁殖過程中純度降低的原因。目前尚未有針對高粱細胞質雄不稔的粒腺體專一性引子文章發表，因此本試驗將參考高粱細胞質稔性相關文獻開發專一性分子標誌，藉以提升臺灣高粱育種及採種產業的優勢。

材料與方法

一、參試材料及核酸萃取

本試驗以高粱‘臺中 5 號’雄不稔親(母本)‘80A’(S/*rfrf*)、維持親‘80B’(N/*rfrf*)及恢復親(父本)‘2R’(R/*Rf*)為材料，取幼苗葉片以組織均質機(SH-100, Kurabo Industries Ltd., Japan)均質後，以改良之 CTAB 法(Doyle and Doyle, 1990)萃取 DNA。DNA 經分光光度計(NanoPhotometer[®] P330, Implen Inc., USA)定量後，以去離子水稀釋至 10 ng/μl 的工作溶液(working solution)備用。

二、分子標誌的設計

針對前人研究中與 CMS 相關之粒線體基因：*atp6* 及 *coxII* (Schnable and Wise, 1998)，以及高粱 A₁ 型雄不稔相關之 *atp1-1* (Keough *et al.*, 2016; 王等, 2019)、A₃ 型相關之 *atp9* (Tang *et al.*, 1996, 1999; Pring *et al.*, 1998) 等，從 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜尋高粱粒線體基因體(NC_008360.1)中的上述基因，擷取包含側翼之序列，將其送入 BatchPrimer3 網站(<http://probes.pw.usda.gov/>)

batchprimer3/) (You *et al.*, 2008)設計專一性引子，同時一併測試文獻高粱葉綠體 *rpoC2* 引子(Chen *et al.*, 1993; 1995)，相關引子資訊詳如表一。

表一、本研究使用之引子組

Table 1. List of primers used in this study

No.	Primer name	Sequence	Ta (°C)	Expected product size (bp)
1	SB-atp6-F	TGAAAATAAAACCCACTCGT	55	1080
	SB-atp6-R	TTTGATGGAGATTTGTAGCA		
2	SB-atp6-F2	GTCTTGTTCATGGAAGTTCGT	55	650
	SB-atp6-R2	TCCAGTTCTCGTTTTTATGC		
3	SB-apt9-F	AATGTGTATACGCACCATGA	55	496
	SB-apt9-R	TTCATTGAAGCAACTCCTTT		
4	SB-apt9-F2	AAGTTCGTACCAGTCGTCAG	55	1275
	SB-apt9-R2	ATCCTTGCTAGACCCATCAT		
5	SB-CoxII-p1-F	AGACAACCTAGCGAACTGAA	55	804
	SB-CoxII-p1-R	GGTCTAACCACCTCAACTCC		
6	SB-CoxII-p2-F	GGTTCATTCTTGTTATTGC	55	773
	SB-CoxII-p2-R	GCGAATTCGATCCTTTAGTA		
7	SB-CoxII-p3-F	GTCCCCTCTTGCCTATTAGT	55	793
	SB-CoxII-p3-R	AAGCAAGCAAGATGATGAAG		
8	SB-atp1-1-F	GTGTCTATGTTGCGATTGG	55	1000
	SB-atp1-1-R	TTTGCTACTCTTGGGAGTGT		
9	SB-atp1-1-F2	GGTACACCTGAAGATCGAG	55	700
	SB-atp1-1-R2	CAATCGCAACATAGACACAA		
10	SB-atp1-1_indel_F	ATCCTGAATTACTCAAATCC	50	279
	SB-atp1-1_indel_R	AGCTTAGACAGCCAAGAG		
11	SB-atp1-1_indel_F2	GCCACTAGACAGAATTTCTCAAT	55	universal forward
	SB-atp1-1_indel_R2	AGCAAATTCATACATATCCCTTA		401/701
12	SB-atp1-1_indel_R3	AAAGTTTTTCTAGTTAGCTGCAC		999
13	SB-atp1-1_indel_R4	GTACAGTTGGAAGTGAAGGAATA		1199
	SB-atp1-1_indel_F3	GGATATGTATGAATTTGCTTTCT		universal forward
14	SB-atp1-1_indel_R5	GTTGTTATTGCTTATAGCGATT	55	707
15	SB-atp1-1_indel_R6	TGAAGCTTCCATGTTCTCATA		989
16	<i>rpoC2</i> -F	TTCTCGAGGACGATCCACGA	50	248/443
	<i>rpoC2</i> -R (Chen <i>et al.</i> , 1993; 1995)	TGAGTCTTCCTCTGAGT		

三、聚合酶連鎖反應(PCR)

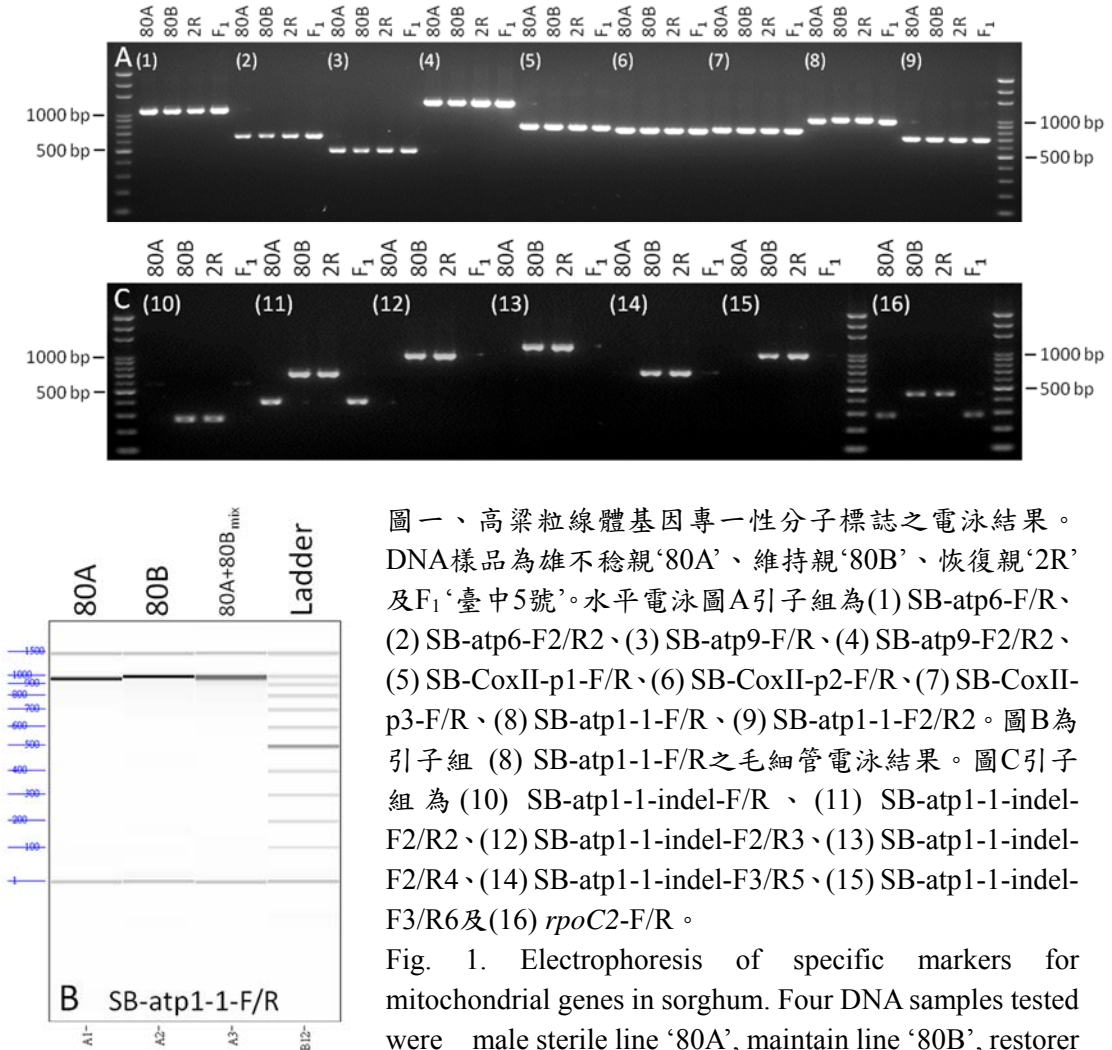
PCR 反應總體積為 10 μ l，包含 20 ng DNA 模板、0.2 μ M 引子、1X Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Ampliqon)；以 Veriti™ 96-well thermal cycler (Life technologies Co., USA)進行 PCR 反應，反應條件為 94°C 5 min；94°C 30 sec，Ta°C (請參考表一) 30 sec，72°C 1 min，35 cycles；72°C 5 min。

四、電泳分析

水平電泳分析以 0.5x TAE Buffer 加入 5 μ l SafeView DNA Stain (GeneMark)配置 200 ml 2.0%之瓊脂膠片，取 5 μ l PCR 增幅產物注入樣品孔，於 200 伏特供電下經過 45 分鐘的泳動分離，以照膠系統記錄後進行人工基因型判讀。毛細管電泳分析(Fragment Analyzer CE-12, Advanced Analytical)使用 Automated CE System 1-1500 bp 分析試劑組(DNF-935 Reagent Kit)，將增幅產物以 Dilution Buffer 1x TE 稀釋 20 倍後上機，電泳結果以軟體 PROSize 3.0 進行檢視與判讀。對於有多型性之 PCR 產物送交廠商進行定序，定序資料以 CLC Sequence Viewer 8 軟體(QIAGEN Aarhus A/S)進行 Alignment 並進一步比較序列差異。

結果與討論

本試驗參考相關文獻中常見之作物 CMS 關聯基因，設計高粱粒線體的 *atp6* 及 *coxII*、*atp1-1* 及 *atp9* 基因之專一性引子(表一之 No. 1~9)，對‘臺中 5 號’ (F₁)之 A-line (‘80A’)、B-line (‘80B’) 及 R-line (‘2R’)等材料進行擴增，雖然擴增產物在水平電泳分析下並沒有呈現差異(圖一(A))，但改以解析度較高的毛細管電泳觀察後，發現‘80A’及‘80B’的 *atp1-1* 之專一性引子(SB-*atp1-1*-F/R)產物間具有多型性(圖一(B))。將 PCR 產物進行定序，結果發現‘80A’的 *atp1-1* 在 3’端側翼序列缺少 27 bp。根據 Keough 等人(2016)發現並推測 A₁ 型 CMS 粒線體中的一個候選 ORF，係由 *atp1* 與 *rps4-like* 透過 2 個長度 42 bp 的反向重複序列(inverted repeat)形成嵌合序列；故本試驗進一步推測‘80A’的 *atp1-1* 之 3’端側翼可能存在特殊的 CMS 序列，但由於缺乏公開之 A₁ 型雄不稔之粒線體基因體序列資料，僅能參考 NCBI 的高粱粒線體基因體(NC_008360.1)進行 *atp1-1* 之 3’端側翼序列的專一性引子設計(表一之 No. 10~15)。



圖一、高粱粒線體基因專一性分子標誌之電泳結果。DNA 樣品為雄不稔親‘80A’、維持親‘80B’、恢復親‘2R’及 F_1 ‘臺中5號’。水平電泳圖A引子組為(1) SB-atp6-F/R、(2) SB-atp6-F2/R2、(3) SB-atp9-F/R、(4) SB-atp9-F2/R2、(5) SB-CoxII-p1-F/R、(6) SB-CoxII-p2-F/R、(7) SB-CoxII-p3-F/R、(8) SB-atp1-1-F/R、(9) SB-atp1-1-F2/R2。圖B為引子組 (8) SB-atp1-1-F/R之毛細管電泳結果。圖C引子組為(10) SB-atp1-1-indel-F/R、(11) SB-atp1-1-indel-F2/R2、(12) SB-atp1-1-indel-F2/R3、(13) SB-atp1-1-indel-F2/R4、(14) SB-atp1-1-indel-F3/R5、(15) SB-atp1-1-indel-F3/R6及(16) *rpoC2*-F/R。

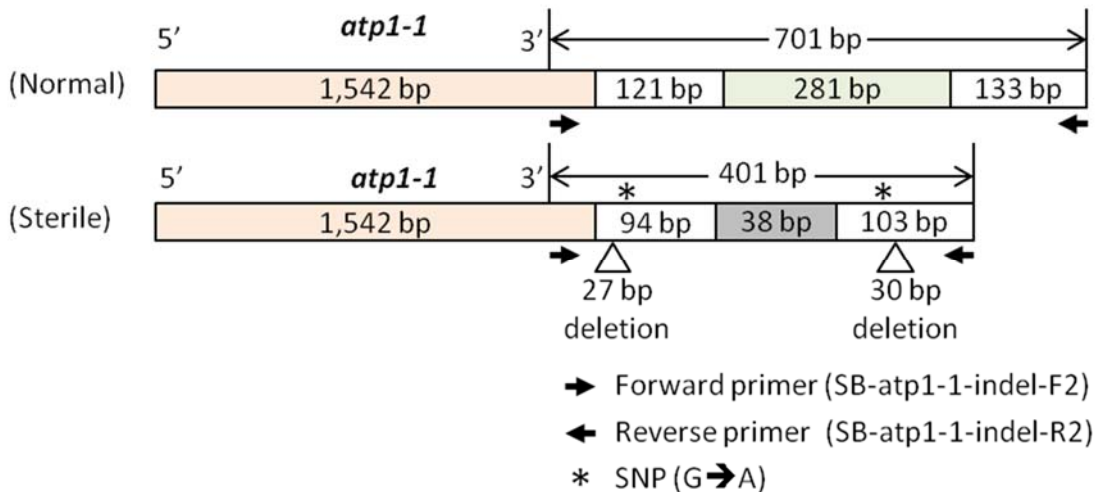
Fig. 1. Electrophoresis of specific markers for mitochondrial genes in sorghum. Four DNA samples tested were male sterile line ‘80A’, maintain line ‘80B’, restorer line ‘2R’, and F_1 ‘Taichung No. 5’.(A) Photo of an agarose gel showing PCR amplification of primer sets using (1) SB-atp6-F/R, (2) SB-atp6-F2/R2, (3) SB-atp9-F/R, (4) SB-atp9-F2/R2, (5) SB-CoxII-p1-F/R, (6) SB-CoxII-p2-F/R, (7) SB-CoxII-p3-F/R, (8) SB-atp1-1-F/R, (9) SB-atp1-1-F2/R2. Image (B) was the capillary electrophoresis result of primer set (8) SB-atp1-1-F/R. (C) Photo of an agarose gel showing PCR amplification of primer sets using (10) SB-atp1-1-indel-F/R, (11) SB-atp1-1-indel-F2/R2, (12) SB-atp1-1-indel-F2/R3, (13) SB-atp1-1-indel-F2/R4, (14) SB-atp1-1-indel-F3/R5, (15) SB-atp1-1-indel-F3/R6, and (16) *rpoC2*-F/R.

引子組(No. 10~15)的測試結果中，有一組引子對(No. 11) (SB-atp1-1_indel_F2 與 R2)成功在‘80A’及‘80B’分別增幅 401 bp 及 701 bp 條帶，其餘引子組則僅有‘80B’可成功增幅(圖一(C) (10)~(15))，故可得知‘80A’在 *atp1-1* 之 3’ UTR 區域在上述引子(No. 11)之後延伸的序列仍與‘80B’不同。將 PCR 產物送定序並比對‘80A’及‘80B’間的序列差異，發現‘80A’分別有 27 bp、281 bp 及 30 bp 的缺失，但具有一段 38 bp 的獨特序列及 2 個 SNP；*atp1-1* 之 3’端及鄰近側翼序列中存在重複序列(圖二)，在 *atp1-1* 參考序列(NC_008360.1)之終止密碼子(stop codon)前後，接連有兩個包含終止密碼子、重複單位長度為 27 bp 的重複序列，而‘80A’剛好缺少 1 個單位的重複序列，另外‘80A’在鄰近側翼所缺失的 30 bp 序列中也存在長度 12 bp 的重複序列(圖三)。被子植物的粒線體基因體中常見不同長度的重複序列，透過比較物種內及相近物種間的粒線體基因體，發現存在大量的短重複序列(<1 kbp)，與基因體重排(genome rearrangement)、插入/缺失(insertion/deletion)及基因體的大小有所關連(Kubo *et al.*, 2011)；鳳嘴葵屬(*Monsonia*)粒線體基因體的重排位點亦很接近重複序列(Cole *et al.*, 2018)；因此 *atp1-1* 3’端的重複序列可能是導致‘80A’與‘80B’間序列產生變異的原因。

CMS 關聯的 ORFs (簡稱 CMS-ORFs)一般出現在真正基因的 5’端或 3’端，雖非絕對但常與 ATPase subunits 有關(Kubo *et al.*, 2011)。基因 5’端及 3’端的未轉譯區(untranslated regions, UTR)長度，以阿拉伯芥粒線體基因為例，分別約為 21~645 bp 及 10~498 bp (Forner *et al.*, 2007)，然而 5’端或 3’端 UTR 的變異對基因表現的影響機制尚未被清楚了解，例如 *ccmC* 缺少 3’端 UTR 但仍有轉譯產物(Raczynska *et al.*, 2006; Forner *et al.*, 2007)。一般來說，被子植物的粒線體基因是高度保守，但仍有例外，其中一例為甜菜 *atp6*，其蛋白質 C 端對應的核心區域高度保守，但 N 端相對多變且延長(Onodera *et al.*, 1999)，N 端延長的作用不明，但延伸的部分在多肽前驅物時會被切除，而後形成成熟的 ATP6 多肽(Krishnasamy *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 2005)。本研究發現之‘80A’粒線體基因 *atp1-1* 之 3’端變異序列究竟有何影響，以及與 *Rf* 基因的交互作用尚待更多的研究。

本試驗也測試高粱文獻的葉綠體 *rpoC2* 引子(Chen *et al.*, 1993; 1995)在‘80A’、‘80B’及‘2R’間具有多型性，‘80A’的條帶大小約為 248 bp (圖一(C) (16))，與文獻中的小花藥型 CMS 品系(A₁、A₂、A₅ 及 A₆)一致，‘80B’及‘2R’則與大花藥型 CMS 品

系(A₃、A₄及9E)及部分B line、R line一致(443 bp)。綜合 *rpoC2* 的結果，以及‘80A’的 *atp1-1* 3’端出現獨特序列與 Keough 等人(2016)對 A₁ 型 CMS-ORF 之預測結果相似，推測‘臺中 5 號’有可能屬於 A₁ 型雄不稔細胞質。本試驗利用位於粒線體上的候選 A₁-CMS 基因之 InDel 差異設計 SCAR 標誌，可區分互為近似同源系的‘80A’與‘80B’，後續若能再測試其他小花藥型 CMS 品系之 A₂、A₅ 及 A₆，相較於葉綠體 *rpoC2* 引子，則有機會能更準確區別細胞質稔性遺傳背景，未來在高粱育種的 CMS 材料之基因型確認及種子純度檢查中可提供快速且可靠的鑑別。



圖二、高粱‘80A’與‘80B’之粒線體 *atp1-1* 基因3’端側翼序列差異示意圖。白色區域為相同序列，三角形為缺失片段，綠色區域為維持親‘80B’ (normal) 獨有序列，深灰色區域為雄不稔親‘80A’ (sterile) 專一序列。星號標示SNP的所在位置。

Fig. 2. Diagram of mitochondrial *atp1-1* 3’-flanking sequences of sorghum male sterile line ‘80A’, maintain line ‘80B’. White regions: identical sequences between line ‘80A’ and line ‘80B’; triangles: position of sequence deletion; green region: specific sequence of maintain line, ‘80B’ (normal cytoplasm); dark gray region: specific sequence of sterile line, ‘80A’ (sterile cytoplasm). Asterisk symbols represent the positions of SNPs.

80A 1 GCCACTAGACAGAATTTCTCAATATGAAAAAACATTCTAAGTACTATTAATCCTGAATTACTCAAATCCTT
 80B 1 GCCACTAGACAGAATTTCTCAATATGAAAAAACATTCTAAGTACTATTAATCCTGAATTACTCAAATCCTT
 NC_008360.1 1 GCCACTAGACAGAATTTCTCAATATGAAAAAACATTCTAAGTACTATTAATCCTGAATTACTCAAATCCTT

80A 73 CTTAGAAAAAGGTGGCTTAACTAACGAAAGAAAGATGGAACCAGATGCTTCTTTAAAAGAAAGCGCTTTAAA
 80B 73 CTTAGAAAAAGGTGGCTTAACTAACGAAAGAAAGATGGAACCAGATGCTTCTTTAAAAGAAAGCGCTTTAAA
 NC_008360.1 73 CTTAGAAAAAGGTGGCTTAACTAACGAAAGAAAGATGGAACCAGATGCTTCTTTAAAAGAAAGCGCTTTAAA

80A 145 TTTAGGAGAAGCAAAAATATGACT-----CTATTCTAAAAAAACTAC
 80B 145 TTTAGGAGAAGCAAAAATATGACTAAATTTAGGAGAAGCAAAAATATGACTCTATTCTAAAAAGAACTAC
 NC_008360.1 145 TTTAGGAGAAGCAAAAATATGACTAAATTTAGGAGAAGCAAAAATATGACTCTATTCTAAAAAGAACTAC
 ***** *****

80A 217 ACTCCCAAGAGTAGCAAACCTTATTGGCCAAATGTGCTATCATTGCTAGCGATCTCCCATCGATGGCAGGA-
 80B 217 ACTCCCAAGAGTAGCAAACCTTATTGGCCAAATGTGCTATCATTGCTAGCGATCTCCCATCGATGGCAGGAG
 NC_008360.1 217 ACTCCCAAGAGTAGCAAACCTTATTGGCCAAATGTGCTATCATTGCTAGCGATCTCCCATCGATGGCAGGAG

80A 289 -----
 80B 289 ATAACGGGAAACCCGACTCCAGCTCTTGGCTGTCTAAGCTGGGGAGACGCGCCGCCGAAACAATTGGACT
 NC_008360.1 289 ATAACGGGAAACCCGACTCCAGCTCTTGGCTGTCTAAGCTGGGGAGACGCGCCGCCGAAACAATTGGACT

80A 361 -----TAGCCACGACTCTTC----CGAAACATTCAG
 80B 361 ACGCCATTCGCCAAGTCAAGAATTTGCCCTTAAGGACGTAGCCAGCTGAAAAACCGGAAAAATCCAA
 NC_008360.1 361 ACGCCATTCGCCAAGTCAAGAATTTGCCCTTAAGGACGTAGCCAGCTGAAAAACCGGAAAAATCCAA
 ***** * ***** ** *

80A 433 ATATAGGAAA-----
 80B 433 ATAGAGGACATTTTCATGTTTGTACTAAGAAAGAAGAAAAACGAGCCGTTGCCCAATTTCTGACCCGCGAA
 NC_008360.1 433 ATAGAGGACATTTTCATGTTTGTACTAAGAAAGAAGAAAAACGAGCCGTTGCCCAATTTCTGACCCGCGAA
 *** ** * *

```

80A          505 -----AGCCAGAG
80B          505 GGAATCCCGGAGGATACCTTTCAACACTTTTTTCTCCGAGGTTCTGGCAAACCTGAATGAGGAGCCGGAG
NC_008360.1  505 GGAATCCCGGAGGATACCTTTCAACACTTTTTTCTCCGAGGTTCTGGCAAACCTGAATGAGGAGCCGGAG
                                                    **** **

80A          577 CCGGCGAGAGATTTA-----GATCTCAATCAAAGCCCTCCGCCAGAG
80B          577 CCGGCGAGAGATTTAGATCTCAATCAACGGCCTCCGCCGAGCTGGATCTCAATCAAAGCCCTCCGCCAGAG
NC_008360.1  577 CCGGCGAGAGATTTAGATCTCAATCAACGGCCTCCGCCGAGCTGGATCTCAATCAAAGCCCTCCGCCAGAG
                *****
                *****

80A          649 CTGGATGAAGCCGGAGACGACGGAGCGGAATAAGGGATATGTATGAATTTGCT
80B          649 CTGGATGAAGCCGGAGACGACGGAGCGGAATAAGGGATATGTATGAATTTGCT
NC_008360.1  649 CTGGATGAAGCCGGAGACGACGGAGCGGAATAAGGGATATGTATGAATTTGCT
                *****

```

圖三、高粱 *atp1-1* 之 3' 端多型性引子 (SB-*atp1-1_indel_F2/R2*) PCR 產物序列。'80A' 之產物長度為 401 bp，而 '80B' 長度為 701 bp，NC_008360.1 為 NCBI 參考序列，長度 701 bp；底線為 SB-*atp1-1_indel_F2* 與 R2 引子，灰底標示 SNP 位置，灰底粗體標示重複序列，方框標示 *atp1-1* 參考序列之終止密碼子位置。

Fig. 3. Sequences of PCR products derived from polymorphic primers 'SB-*atp1-1_indel_F2/R2*' for 3' terminal region of sorghum *atp1-1*. Product sizes were 401 bp in line '80A' and 701 bp in line '80B', respectively. NC_008360.1 is the reference sequence of NCBI. Under line: primers 'SB-*atp1-1_indel_F2*' and 'R2'; gray background: portions of SNP; bold letters with gray background: repeat sequence; box: stop codon of reference *atp1-1*.

引用文獻

- 王平、叢玲、王春語、朱振興、A.A. Kumar、張麗霞、陸曉春。2019。高粱 A₁ 型細胞質雄性不育係與保持系線粒體基因組分析比較。生物技術通報 35(5): 42-47。
- 王俐、祁新紅、劉根齊、章銀梅、陳建南。2000。高粱雄性不育系熱激前後線粒體的變化與育性的關係。遺傳學報 27(9): 834-838。
- 農情報告資源網。2022。行政院農業委員會農糧署 https://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp. (2022 年 5 月 12 日檢索)。
- 林薰生。1976。高粱細胞質雄不稔系統稔實性之研究。臺中區農業改良場研究彙報 01: 25-30。
- 張隆仁、黃勝忠。1995。臺灣高粱品種改良之成就與展望。雜糧作物生產技術改進研討會-臺灣省農業試驗所專刊 49: 125-133。
- Bailey-Serres, J., D. K. Hanson, T. D. Fox, and C. J. Leaver. 1986b. Mitochondrial genome rearrangement leads to extension and relocation of the cytochrome c oxidase subunit I gene in sorghum. *Cell* 47(4): 567-576.
- Bailey-Serres, J., L. K. Dixon, A. D. Liddell, and C. J. Leaver. 1986a. Nuclear-mitochondrial interactions in cytoplasmic male-sterile sorghum. *Theor. Appl. Genet.* 73(2): 252-260.
- Barnaud, A., G. Trigueros, D. McKey, and H. I. Joly. 2008. High outcrossing rates in fields with mixed sorghum landraces: how are landraces maintained? *Heredity* 101(5): 445-452.
- Chen, Z., K. F. Schertz, J. E. Mullet, A. DuBell, and G. E. Hart. 1995. Characterization and expression of *rpoC2* in CMS and fertile lines of sorghum. *Plant Mol. Biol.* 28(5): 799-809.
- Chen, Z., S. Muthukrishnan, G. H. Liang, K. F. Schertz, and G. E. Hart. 1993. A chloroplast DNA deletion located in RNA polymerase gene *rpoC2* in CMS lines of sorghum. *Mol. Gen. Genet.* MGG 236(2-3): 251-259.
- Cole, L.W., W. Guo, J. P. Mower, and J. D. Palmer. 2018. High and variable rates of repeat-mediated mitochondrial genome rearrangement in a genus of plants (M. Purugganan, editor). *Mol. Biol. Evol.* pp. 13.

- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- FAO. 2022. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (accessed 13 Apr 2022).
- Forner, J., B. Weber, S. Thuss, S. Wildum, and S. Binder. 2007. Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: t-elements contribute to 5' and 3' end formation. *Nucl. Acids Res.* 35: 3676-3692.
- Keough B., S. Monsma, J. Yang, M. Kianifariz, P. Klein, I. Small, J. Melonek, D. Jordan, E. Mace, and R. Klein. 2016. Assembly, closing and finishing of the *Sorghum Bicolor* A₁ cytoplasmic-male sterility (CMS) mitochondrial genome: identification of novel fusion ORFs resulting from genome rearrangement. <https://www.lucigen.com/docs/posters/Sorghum-Sequencing-Genome-2016.pdf>. (accessed 8 May 2018).
- Krishnasamy, S., R. A. Grant, and C. A. Makaroff. 1994. Subunit 6 of the F0ATP synthase complex from cytoplasmic male-sterile radish: RNA editing and NH₂-terminal protein sequencing. *Plant Mol. Biol.* 24: 129-141.
- Kubo, T., K. Kitazaki, M. Matsunaga, H. Kagami, and T. Mikami. 2011. Male sterility-inducing mitochondrial genomes: how do they differ? *Crit. Rev. Plant Sci.* 30(4): 378-400.
- Onodera, Y., M. P. Yamamoto, T. Kubo, and T. Mikami. 1999. Heterogeneity of the *atp6* presequences in normal and different sources of male-sterile cytoplasms of sugar beet. *J. Plant Physiol.* 155: 656-660.
- Pring, D. R., W. Chen, H. V. Tang, W. Howad, and F. Kempken. 1998. Interaction of mitochondrial RNA editing and nucleolytic processing in the restoration of male fertility in sorghum. *Curr. Genet.* 33(6): 429-436.
- Pring, D. R., H. Van Tang, and K. F. Schertz. 1995. Cytoplasmic male sterility and organelle DNAs of sorghum. *Mol. Biol. Plant Mitochondria*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301527059> (accessed 10 June 2019).
- Raczynska, K. D., M. Le Ret, M. Rurek, G. Bonnard, H. Augustyniak, and J. M. Gualberto. 2006. Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons. *FEBS Lett.* 580: 5641-5646.

- Rakshit, S., and A. Bellundagi. 2019. Chapter 5 - conventional breeding techniques in sorghum. In: Aruna, C., Visarada, K.B.R.S., Bhat, B.V., and Tonapi, V.A., editors, Breeding sorghum for diverse end uses. Woodhead Publishing. p. 77-91.
- Reddy, B. V. S. and J. W. Stenhouse. 1994. Sorghum improvement for the semi-arid tropic region: past, current and future research thrusts in Asia. P. K. V. Res. J. 18: 155-170.
- Reddy, B.V.S., S. Ramesh, and R. Ortiz. 2005. Genetic and cytoplasmic-nuclear male sterility in sorghum. Plant Breeding Reviews. John Wiley & Sons, Ltd. p. 139–172
- Schnable, P. S. and R. P. Wise. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends Plant Sci. 30(5): 175-180.
- Tang, H. V., D. R. Pring, L. C. Shaw, R. A. Salazar, F. R. Muza, B. Yan, and K. F. Schertz. 1996. Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum. Plant J. 10(1): 123-133.
- Tang, H. V., W. Chen, and D. R. Pring. 1999. Mitochondrial *orf107* transcription, editing, and nucleolytic cleavage conferred by the gene *Rf3* are expressed in sorghum pollen. Sex. Plant Reprod. 12(1): 53-59.
- Xu, G. W., Y. X. Cui, K. F. Schertz, and G. E. Hart. 1995. Isolation of mitochondrial DNA sequences that distinguish male-sterility-inducing cytoplasm in *Sorghum bicolor*. Theor. Appl. Genet. 90: 1180-1187.
- Yamamoto, M. P., T. Kubo, and T. Mikami. 2005. The 5'-leader sequence of sugar beet mitochondrial *atp6* encodes a novel polypeptide that is characteristic of Owen cytoplasmic male sterility. Mol. Genet. Genomics. 273: 342-349.
- You, F. M., N. Huo, Y. Q. Gu, M. C. Luo, Y. Ma, D. Hane, G. R. Lazo, J. Dvorak, and O. D. Anderson. 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. BMC Bioinform. 9(1): 253.

Development of a SCAR Marker for Male Sterile Cytoplasm in Sorghum

Mei-Ling Kung¹⁾、Shih-Yu Jhan¹⁾、Hui-Ju Chang¹⁾

¹⁾ Assistant Researcher (Corresponding Author), Assistant, Associate Researcher and Section Chief, Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, TSIPS, Taiwan, R.O.C.

TEL: 886-4-25825535

FAX: 886-4-25814687

E-mail: melinda@tss.gov.tw

Summary: Male sterile is widely used in hybrid seed production in sorghum. Domestic sorghum hybrid variety ‘Taichung No. 5’ and its parental lines were used as materials in this study. In order to quickly identify the cytoplasmic genetic background of fertility, specific markers were designed for CMS-associated mitochondrial genes, including *atp6*, *coxII*, *atp1-1* and *atp9*. PCR products derived from male sterile line ‘80A’, the sterile parental line of ‘Taichung No. 5’, and its maintain line ‘80B’ were polymorphic at the 3’ end of *atp1-1*. The SCAR marker (SB-*atp1-1*_indel_F2/R2) amplified the 401 bp band in line ‘80A’ and the 701 bp band in line ‘80B’, respectively. DNA sequencing of PCR products showed that the repeat sequences existed in the 3’UTR of *atp1-1* and the deletion region of ‘80A’ line. These results showed that the SCAR marker could distinguish the near-isogenic lines, ‘80A’ and ‘80B’, and be applied in rapid identification for cytoplasm types in breeding program and purity inspection of sorghum.

Key words: sorghum、male sterile、molecular marker