

糯性高粱‘兩糯一號’之糯性遺傳研究¹

劉宗華²、廖宜倫²

摘 要

為加速育成糯性高粱品種進程，縮短育種年限，本試驗將利用現有已發表的高粱糯性基因(wx^a , wx^b , wx^c)之分子標誌，透過聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)與限制酵素處理，對糯性高粱‘兩糯一號’，與其後代分離自交系族群進行糯性遺傳背景分析，以利未來分子輔助育種選拔參考依據。結果顯示高粱‘兩糯一號’在糯性基因上僅帶有 wx^a 基因，而在其後代分離自交系分析中也獲得一致的結果。本研究確立少量DNA迅速有效的萃取方法，僅需配置簡單的藥品，透過鋼珠研磨、水浴萃取與離心沉降，便可於短時間萃取大量樣品數，可用於中等品質DNA試驗，以及大量族群篩選使用。在糯性遺傳分析方面，已完成3個分子標誌(wx^a , wx^b , wx^c)的最佳分析方法。當DNA稀釋濃度在100 ng/ μ l，且 wx^b 與 wx^c 分子標誌的黏合溫度提高至60°C時，分子標誌的PCR結果的再現性與專一性最為穩定。此有助於將來糯性高粱分子育種篩選的有效性與準確性之提升。

關鍵詞：高粱、兩糯一號、糯性基因

前 言

高粱(*Sorghum*, *Sorghum bicolor* L. Moench)，為世界上僅次於小麥、水稻與玉米的糧食作物，不但可作為乾旱地區人們的主食，亦可作為牲畜飼料原料之一。近年來新興能源開發研究顯示，富含糯性品種之高粱具有較高的生質酒精產率，亦可提升澱粉與蛋白質的消化能力^(7,8)，故糯性品種之穀類作物，日益受到重視。

在臺灣，高粱大多做為飼料與釀酒使用，不論是飼料或釀酒高粱都仍需仰賴進口來維持生產運作；其中釀酒高粱需要較高的澱粉含量，故僅有限定適合品種方可做為原料來源使用。目前金門酒廠以大陸品種‘兩糯一號’作為釀酒原料，不過近年來金門酒廠發現‘兩糯一號’品質參差不如以往，有鑑於此希望臺灣能夠育成屬於自己的糯性高粱品種，不但可以維持製酒品質，更可在臺灣大量栽培推廣，讓原料在地化，以提升產品價值。

穀類作物之糯性研究指出，在籽粒充實期間，因為破壞了澱粉生合成酵素(granule-bound starch synthase, GBSS)，導致支鏈澱粉(amylopectin)轉換成直鏈澱粉(amylose)的過程受阻而產生糯性⁽²⁾。目前的研究報告指出，高粱已找到四種糯性基因座(Wax gene, *Waxy*; wx)，都是在

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0882 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場計畫助理、副研究員。

澱粉生合成酵素基因(*GBSS*)上發生DNA的片段插入(wx^a)、點突變(wx^b , wx^d)與點缺失(wx^c)^(2,6)，而每個基因座所以對應的正常型態等位基因(allele)，皆為野生型(wild-type)分別以 WX^a 、 WX^b 、 WX^c 與 WX^d 區別表示。

本研究是利用目前已知的高粱糯性基因(wx^a , wx^b , wx^c)的分子標誌，對本試驗糯性高粱‘兩糯1號’後代分離族群之自交系進行育種選拔。希望藉此確切選到目標糯性基因組合，以縮短育種年限。

材料方法

一、高粱試驗品種與植株栽培

本試驗使用的高粱，除了栽培‘兩糯1號’與後代分離族群自交系族群外，並引進美國高粱品種進行後代分離族群選拔。為了進一步尋求糯性對照品種，2015年秋作將臺灣現有市售高粱栽培品種‘豐糯2號’、‘豐糯3號’、‘豐糯4號’、‘兩糯1號’、‘台中5號’，以及‘B Tx623’ (高粱基因組解序品種)與‘Kao-liang’ (臺灣在地品種)等，作為高粱糯性分析對照品種用。

本試驗高粱植株栽培，以行距60 cm，株距10 cm，單畦雙行，行長4 m栽種。田間施肥用量，每0.1 ha施用臺肥39號有機質複合肥料40 kg作為基肥，於株高達30 cm進行追肥及中耕，追肥每0.1 ha施用臺肥特1號有機質複合肥料40 kg。其餘田間管理與病蟲害防治，參照農家要覽進行。於孕穗期選優良植株性狀進行套袋自交，作為品系選拔後代。

二、高粱葉片取樣與葉片DNA萃取

以葉片圓孔片取樣器(打孔鉗)，對套袋植株之劍葉(或是嫩葉、分蘗葉片)進行葉片取樣。每棵植株取10個葉圓孔片於離心管中，每管置入研磨鋼珠與萃取液進行葉片研磨。研磨混合均勻於65°C水浴15分鐘，水浴後離心取上清液與5M KOAc混合，於冰上靜置20分鐘。再離心取上清液與3M NaOAc、異丙醇混合均勻，置入-20°C進行DNA沈降數小時。沈降後離心移上清液，以70%酒精淋洗、離心、乾燥，最後溶於TE液中保存備用。

2014年秋作，田間共栽培116個自交系族群，每系挑選編號1與2的套袋植株進行葉片取樣，共萃取232個高粱植株葉片DNA。2015年春作，田間栽培81個自交系族群，各系所有套袋植株皆進行葉片採樣，共萃取了403個高粱植株葉片DNA。

三、分子標誌多型性分析

根據Sattler (2009)與Lu (2013)的研究報告合成高粱糯性基因相關引子，各引子序列與PCR產物大小等相關資訊之彙整詳見表一。 wx^a 分子標誌分析，取2 μ l稀釋過的DNA，0.15 μ l及0.3 μ l的引子，及0.2 μ l pro-*Taq*酵素，最終總體積為20 μ l進行PCR反應。

wx^b 、 wx^c 分子標誌分析，取2 μ l稀釋過的DNA，0.3 μ l的引子，及0.2 μ l pro-*Taq*酵素，最終總體積為20 μ l進行PCR反應。 wx^b 的PCR產物，再以限制酵素*Nco*I進行截切； wx^c 的PCR產物，再以限制酵素*Hph*I進行截切。所有PCR產物與限制酵素截切產物，皆以1.5% TBE瓊脂洋菜膠進行電泳分析。

四、直鏈澱粉與總澱粉測定

將高粱籽粒於70℃下烘乾後，秤取等重籽粒，並將其研磨成粉末狀備用。

直鏈澱粉分析，秤取樣品粉末0.1 g，加入1 ml 95%酒精溶解混合均勻，再加入9 ml 1N NaOH混勻於沸水中煮10分鐘，冷卻後以去離子水定量體積至100 ml，於室溫下靜置半日，離心取上清液，以直鏈澱粉自動化學分析儀(ASTORIA · PACIFIC A2)進行分析。

總澱粉分析，秤取樣品粉末0.1 g，加入10 ml去離子水，於30℃水浴槽中震盪3小時，接著離心移除上清液(4,000 rpm, 10 min)。將離心乾燥後的粉末加入2 ml的去離子水，於沸水中加熱15分鐘，並迅速取出於冰上冷卻；再加入2 ml 9.2 N HClO₄ (過氯酸)於水浴機中震盪15分鐘。震盪後加入6 ml的去離子水混合均勻，以低溫下離心後，取離心上清液進行分析。取0.01 ml總澱粉離心上清液混入0.19 ml的去離子水及0.1 ml 90%石碳酸中，再迅速加入0.6 ml濃硫酸混合均勻，於室溫下靜置30分鐘，再以分光光度計分析490 nm吸光值。

結 果

一、waxy基因座的wx^a allele分子標誌多型性分析

2014年秋作，進行相關預備試驗。從田間116個自交系，每自交系選定2個自交套袋植株進行葉片採樣與DNA萃取，共232個樣品。以DNA原始液進行高粱糯性基因wx^a的分子標誌PCR分析(wx^a分子標誌為三引子組合，wx-f & wx-r、wx^a-f & wx-r，表一)。經電泳膠分析顯示，‘兩糯1號’後代分離族群之自交系，在wx-f與wx-r的引子組合下，能獲得預期的523 bp的PCR產物大小；而在wxa-f與wx-r的引子組合下，亦可獲得預期的PCR產物大小，約為615 bp (圖一)。在電泳圖上，每兩個代碼為同一自交品系，顯示數個品系在wx^a基因座上帶有糯性的wx^a allele，或為不具糯性的野生型WX^a個體。

表一、高粱糯性基因分子標誌資訊整理

Table 1. The compiling the information of sorghum waxy gene makers

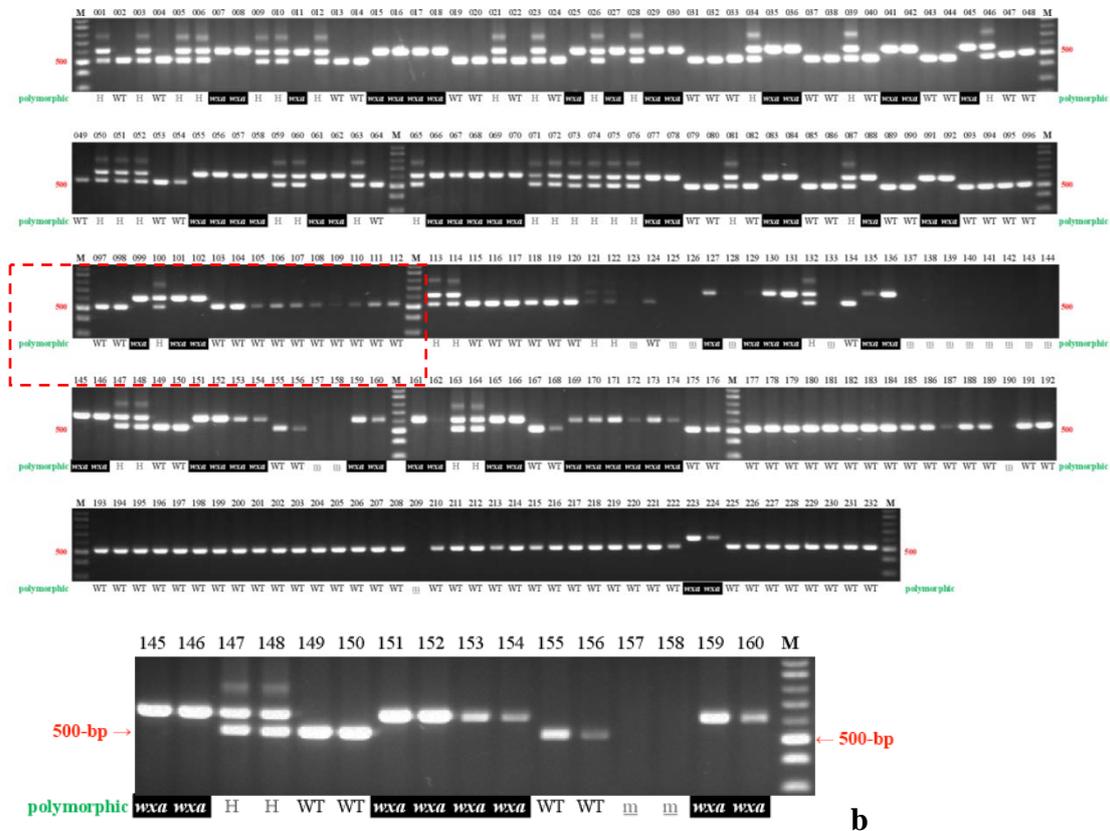
wx gene type	Mutation type	Primer sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Allele type	Reference
wx ^a	insertion	wx-f: GGCCTGGATTCAATGTTCTT	615 ¹	wx ^a	Sattler <i>et al.</i> , 2009
		wx ^a -f: CGTGCGAGATCAAACCTCTA	523 ¹	WX ^a (wild-type)	
		wx-r: CTGGTTGTCCTTGTAGTCCGTT			
wx ^b	point mutations	GBSSF ₁ : GACCGTGTGTTTCATTGACCA	1281	WX ^b (wild-type)	Sattler <i>et al.</i> , 2009
		GBSSR ₁ : TGGACATTGTTGCACTCAGAA	745 & 537 ²	wx ^b	
wx ^c	Point deletion	GBSSF ₂ : AGGACATACAGATCGTTCTGCTG	520	wx ^c	Lu <i>et al.</i> , 2013
		GBSSR ₂ : CCATGATGTGGTGTGCCAG	435 & 86 ³	WX ^c (wild-type)	

¹. The primers wx^a-f and wx-r are amplified 615 bp size of PCR product, and wx-f and wx-r are amplified 523 bp size of PCR product.

². The PCR product is digested by restriction enzyme *Nco*I.

³. The PCR product is digested by restriction enzyme *Hph*I.

⁴. The WX^a, WX^b and WX^c are meant the wild-type alleles of each waxy gene in sorghum.



圖一、2014 年秋作高粱自交系 wx^a 基因 PCR 電泳分析膠圖。 a：2014 年秋作 232 個自交系 wx^a 基因電泳分析結果。 b：為圖一之 a 局部放大圖(虛線框區)

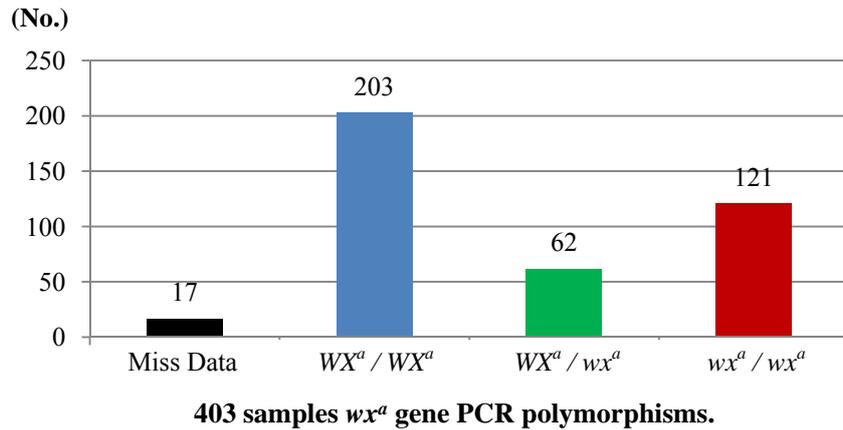
在 wx^a 分子標誌 PCR 會有兩種多型性條帶，三種排列組合結果。條帶較大者為 wx^a allele 片段，其大小約 600 bp 上下。較小者為 WX^a allele 片段，其大小約為 500 bp。只有大片段為 wx^a/wx^a 基因型具糯性，於圖中以 *wxa* 表示(如圖中代號 145、146、151~154 等)。僅帶小片段為 WX^a/WX^a 基因型不具糯性，以 WT 表示(如代號 149、150、155、156 等)。同時帶有兩種片段者，為異質結合體(WX^a/wx^a)，以 H 表示(代碼 147 & 148)。無條帶者，為 PCR 失敗，以 *m* 表示(代碼 157 & 158)。每兩個代碼為同一品系，顯示出部分品系具有 wx^a 基因、部分品系仍在分離，或是不具有 wx^a 基因。

Fig. 1. The inbred lines planted in fall season, 2014, were tested wx^a PCR product by agarose gel. a: Total numbers of 232 inbred lines tested wx^a gene. b: There were two polymorphic bands of the wx^a PCR. The band of 615 bp was wx^a (#145, 146, 151~154 etc.), and the band of 523 bp was wild-type WX^a (#149, 150, 155, 156 etc.). The bands with two types were heterozygous (#147 & 148)

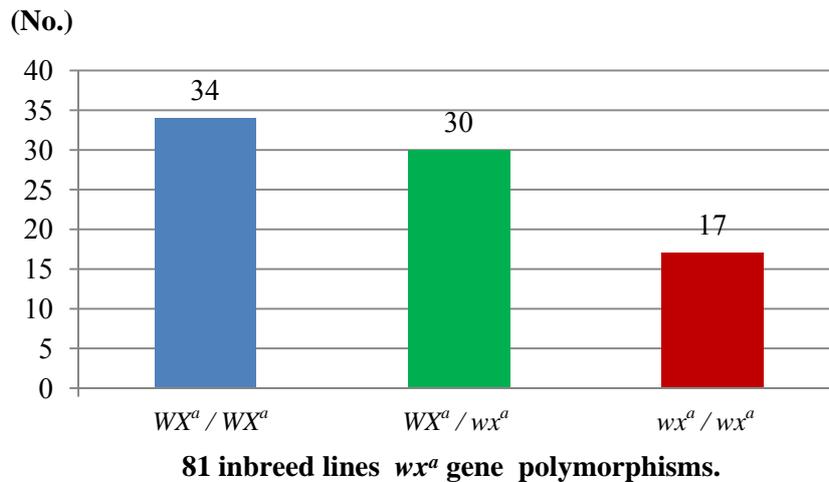
2015 年春作，總共分析了 81 個自交系共 403 個自交系後代套袋且萃取 DNA。根據 wx^a 的分子標誌 PCR 分析，403 個自交系後代，其中 121 個帶有同質結合 wx^a/wx^a ，203 個為同質結合 WX^a

$/WX^a$ ，其餘62個為異質結合 WX^a/wx^a 、17個為PCR失敗個體(圖二a)。從整體自交(品)系來看，81個自交系中有17個品系其套袋後代皆為同質 wx^a/wx^a ，而34個品系套袋後代都為 WX^a/WX^a ，顯示這些品系於 wx^a 基因座上趨於穩定；其餘30個品系為 WX^a/wx^a ，故仍在分離(圖二b)。

a.



b.



圖二、2015年春作糯性高粱自交系 wx^a 基因分析統計圖

a: wx^a 基因分析403株自交系後代，17個PCR失敗，121個帶有同質 wx^a 基因型個體(wx^a/wx^a)，異質結合型個體共62個(WX^a/wx^a)，而同質野生型(WX^a/WX^a)有203個。

b: 田間81個自交品系，統計 wx^a 基因座的一致性，有17個品系其選拔後代皆為同質 wx^a 基因型，而34個品系選拔後代都為野生型，顯示這些品系於 wx^a 基因座上趨於穩定；其餘30個品系之 wx^a 基因座仍在分離。

Fig. 2. The inbred lines planted in spring season, 2015, were analyzed wx^a gene and counted their polymorphisms

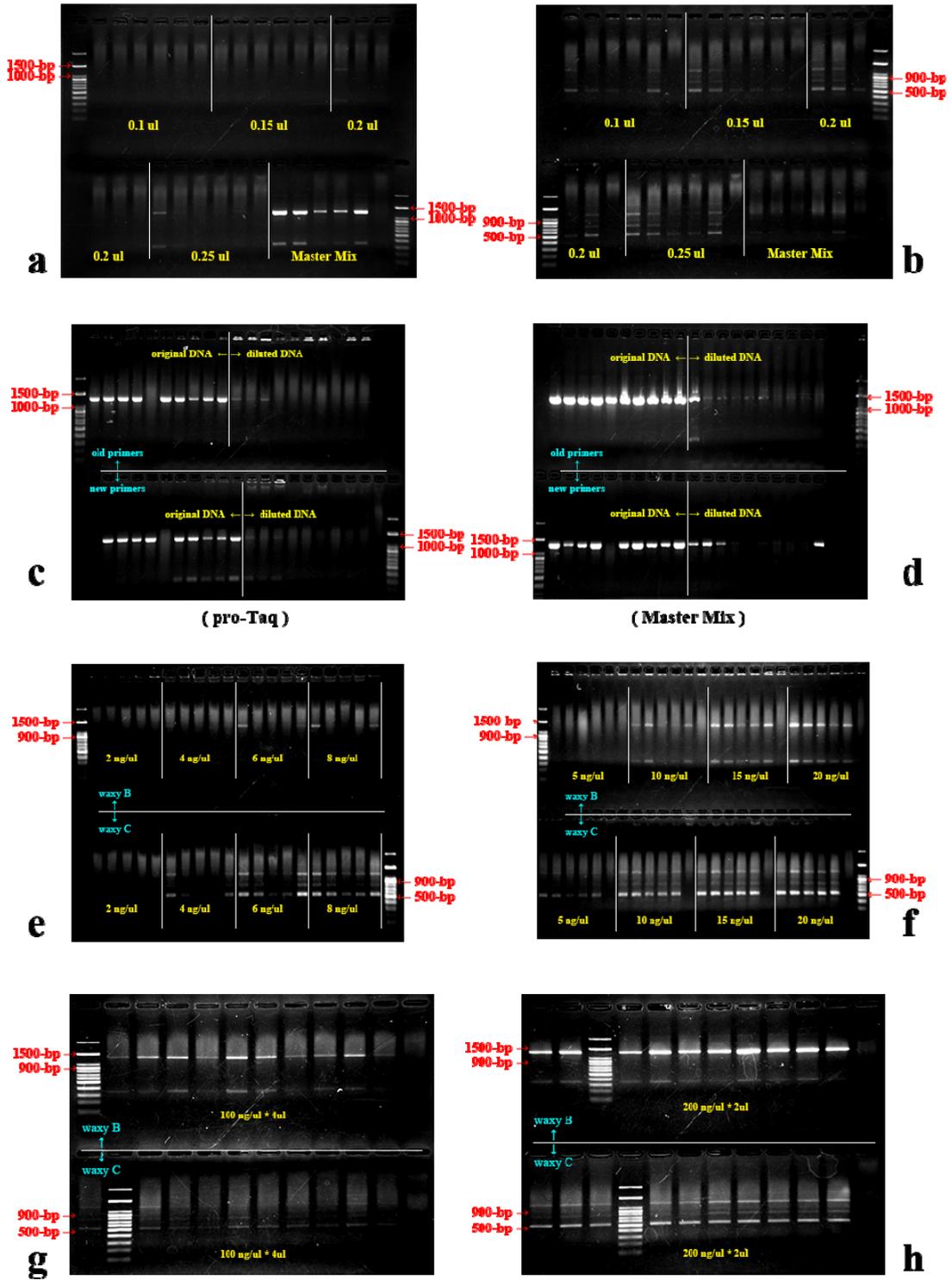
二、*waxy*基因座其他alleles分子標誌的PCR條件確立

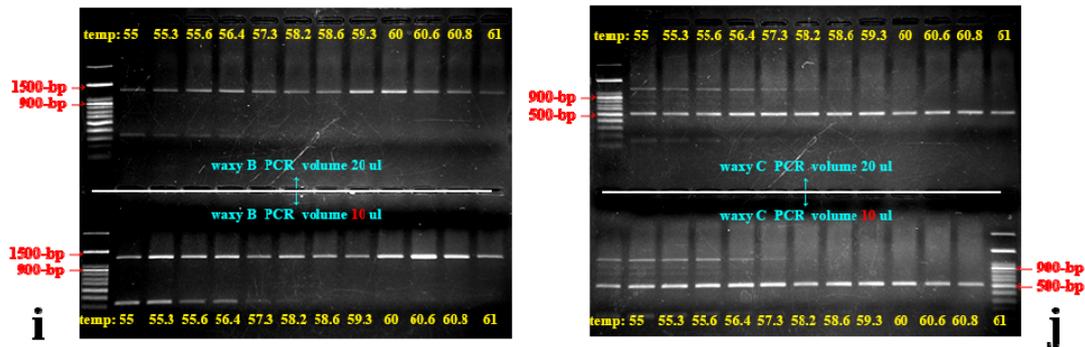
2014年底，測試 wx^b 與 wx^c alleles分析，以DNA原液進行PCR，皆能獲得預期的PCR產物大小(wx^b : 1281 bp, wx^c : 520 bp)。進一步將 wx^b 與 wx^c 的PCR產物，分別以限制酵素*NcoI* (wx^b)、*HphI* (wx^c)截切， wx^b PCR未切出新的片段，而 wx^c PCR切失敗，條帶於電泳膠圖呈現降解。以稀釋後的DNA再次重複上述等試驗，都無法獲得預期一致的結果(PCR產物出現非預期條帶、再現性不佳、酵素截切失敗，上述結果資料未顯示)。

2015年，樣品DNA濃度為20 ng/ μ l時進行PCR，雖 wx^b 與 wx^c 的PCR產物雖如預期大小，但條帶亮度弱、再現性差，甚至出現多條帶的情形。為了找到 wx^b 、 wx^c 基因分子標誌最穩定的分析條件，針對此二分子標誌進行一連串的條件測試。在PCR酵素濃度測試，相同的DNA濃度，分別在0.1 μ l、0.15 μ l、0.2 μ l、0.25 μ l不同濃度的pro-*Taq*酵素與Master Mix(PCR Kit)進行PCR反應，電泳圖結果顯示 wx^b 分子標誌在pro-*Taq*酵素濃度高於0.2 μ l始有PCR產物生成(圖三a)，而 wx^c 分子標誌在所有pro-*Taq*酵素濃度下皆有PCR產物(圖三b)。但在相同PCR酵素濃度組合下，並非所有DNA皆有PCR產物生成，與先前以DNA原液進行PCR的結果不同。進一步針對 wx^b 分子標誌，以相同的樣品DNA進行稀釋前後濃度、新舊稀釋引子(恐舊稀釋的引子保存不當造成PCR失敗)、0.2 μ l pro-*Taq*與Master Mix等交叉組合進PCR測定〔圖三c (以pro-*Taq*酵素PCR)與d (以Master Mix PCR)電泳膠圖PCR組合解釋，左：DNA原液(original DNA)、右：DNA稀釋(diluted DNA)、上：舊稀釋的引子(old primers)、下：新稀釋的引子(new primers)〕。PCR組合測試膠圖顯示相同樣品在DNA原液的部分，不論是新舊稀釋的引子、pro-*Taq*酵素或是Master Mix，皆獲得預期一致的PCR條帶(1280 bp)，但在稀釋的DNA組合無法獲得有效的再現性。故推測此二分子標誌PCR再現性不穩，並非PCR酵素濃度影響造成，而是DNA濃度所致。

在DNA濃度與 wx^b 、 wx^c 基因分子標誌測試，分別以濃度20 ng/ μ l與100 ng/ μ l的DNA，調整DNA與水體積配比，最終DNA濃度20 ng/ μ l調配成2 ng/ μ l、4 ng/ μ l、6 ng/ μ l與8 ng/ μ l (圖三e)，100 ng/ μ l調配成5 ng/ μ l、10 ng/ μ l、15 ng/ μ l與20 ng/ μ l(圖三f)，進行不同DNA濃度PCR。結果顯示 wx^b 分子標誌在DNA最終濃度為15 ng/ μ l以上有較佳PCR結果(圖三e與f電泳圖上排)，而 wx^c 分子標誌也獲得相同的結果(圖三e與f電泳圖下排)。

隨著DNA濃度提升，兩分子標誌的PCR穩定性也隨之提高。最後以濃度200 ng/ μ l的稀釋DNA，與水調配成最終DNA濃度為20 ng/ μ l進行PCR，獲得最佳的結果(圖三g與h)。雖 wx^b 與 wx^c 基因分子標誌的PCR產物雖如預期大小，而條帶亮度與再現性有明顯改善，但仍出現多條帶的情形(圖三e~h)。進一步進行兩引子黏合溫度梯度PCR試驗，結果顯示 wx^b 與 wx^c 基因分子標誌在60°C黏合溫度下，非專一的條帶消失，且再現性也未受影響，比原先55°C黏合溫度效果更好(圖三i~j)。





圖三、高粱糯性基因 wx^b 與 wx^c 基因座之 PCR 擴增最適條件測定

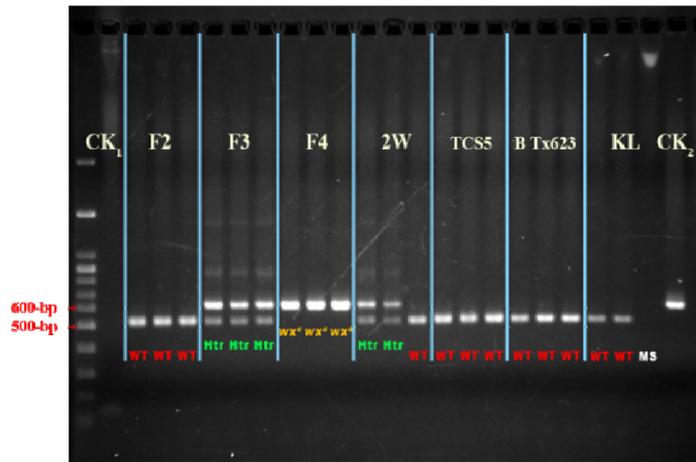
- a、b：在 DNA 濃度為 20 ng/μl，不同濃度的 *Taq* 酵素對 wx^b (fig 1-a.)與 wx^c (fig 1-b.)基因座擴增的影響。
- c、d：以 DNA 原液(左半)、稀釋濃度 20 ng/μl(右半)、新舊引子(上舊下新)，以及 *Taq* 酵素(fig 1-c.)與 Matrer Mix (fig 1-d.)等不同組合測試對 wx^b 標誌 PCR 反應的再現性影響。
- e、f：以 DNA 稀釋液 20 ng/μl (左半)與 100 ng/μl (右半)調配濃度變化不同組合測試對 wx^b 、 wx^c 標誌 PCR 反應的再現性影響。
- g、h：以 DNA 稀釋液 100 ng/μl (左半)與 200 ng/μl (右半)調配成相同濃度，測試對 wx^b 、 wx^c 標誌 PCR 反應的再現性影響。
- i、j：不同濃度的 PCR 黏合溫度與不同 PCR 體積組合(上 20 μl，下 10 μl)對 wx^b 與 wx^c 分子標誌 PCR 反應的再現性影響。

Fig. 3. The suitable PCR condition of sorghum *waxy* genes, wx^b and wx^c . The concentration of *Taq* (a & b), DNA concentration (c-h), and the annealing temperature of primers (i & j)

三、對照品種 wx^a allele 分析

臺灣現有市售高粱栽培品種，‘豐糯2號’、‘豐糯3號’、‘豐糯4號’、‘兩糯1號’、‘台中5號’，並以‘B Tx623’ (高粱基因組解序品種)與‘Kao-liang’ (臺灣在地品種)，取其DNA以作為高粱糯性分析對照品種用。

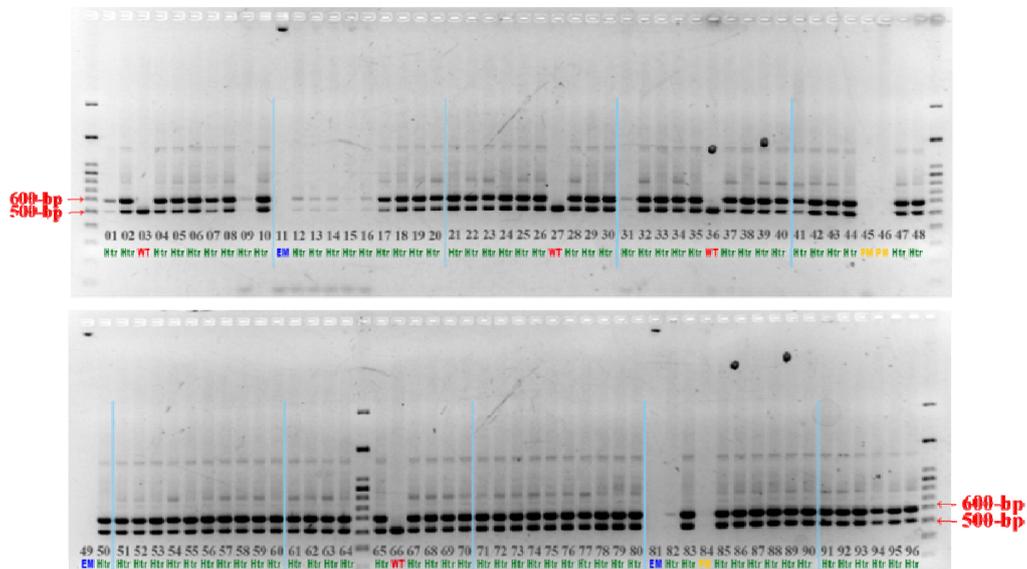
七個市售栽培品種在 wx^a 基因分析下，結果如圖四所示。‘豐糯2號’為野生型的 WX^a / WX^a 同質體，‘豐糯3號’為異質結合體 (WX^a / wx^a)，‘豐糯4號’為糯性的 wx^a / wx^a 同質體。而‘兩糯1號’在前幾次不同個體分析皆為異質結合體，但這次卻意外發現有只帶有野生基因型個體存在。為了進一步驗證，於2015年秋作，從田間逢機挑選96株‘兩糯1號’ F_1 個體萃取DNA進行 wx^a 基因分析(圖五)，90個成功PCR個體中(3個DNA萃取失敗，3個PCR失敗)，竟有4個個體為野生型的 WX^a / WX^a ，再次證實了‘兩糯1號’種源中混雜 WX^a / WX^a 個體存在。



圖四、市售與研究品種進行高粱糯性 wx^d 基因分析

CK₁: 以水取代 DNA 進行 PCR。CK₂: 具有 wx^d 基因的自交系品系。F2: 豐糯 2 號。F3: 豐糯 3 號。F4: 豐糯 4 號。2W: 兩糯 1 號。TCS5: 台中 5 號。B Tx623: 高粱基因組解序之研究品種。KL: Kao-liang, 臺灣在地高粱品種。結果顯示僅有豐糯 4 號具有同質的 wx^d 基因，兩糯 1 號與豐糯 3 號為異質體，其餘四個品種為不具糯性的 WX^d 基因型。

Fig. 4. The comparison of the wx^d gene in the cultivars of sorghum



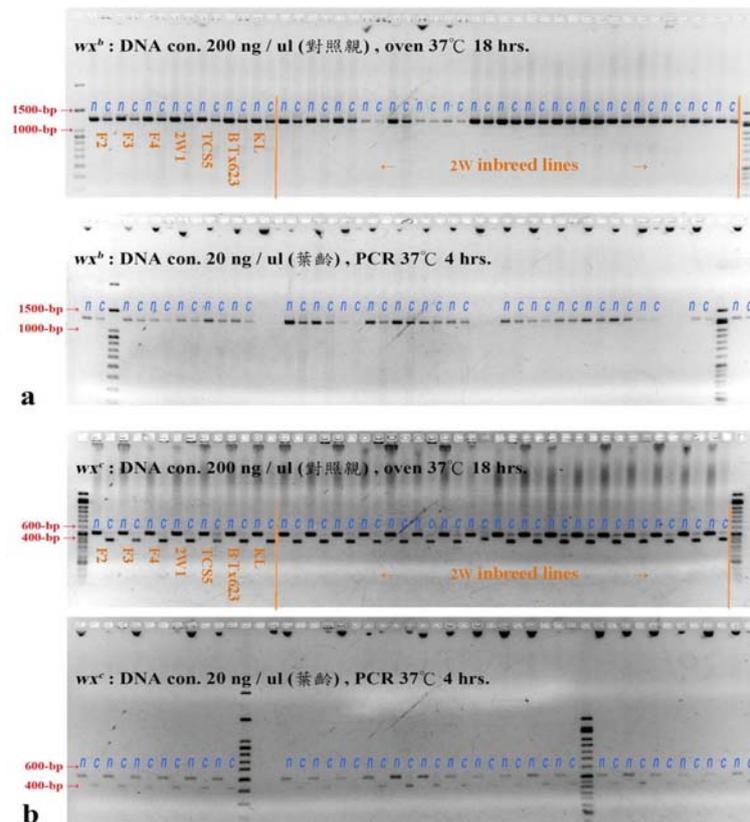
圖五、隨機挑選 96 株兩糯 1 號個體萃取 DNA 進行 wx^d 基因分析之電泳圖

90 個成功 PCR 個體中，發現 4 個個體不帶有 wx^d 基因型，證實了兩糯 1 號具有野生基因型個體存在(WT: 為 WX^d / WX^d 的基因型、Htr: 異質結合體、EM: DNA 萃取失敗、PM: PCR 失敗)。

Fig. 5. PCR analyzed of wx^d allele from the randomly selected 96 plants of Liangnuo NO. 1 population

四、對照品種 wx^b 與 wx^c 基因限制酵素多型性分析

為了找出其他高粱糯性基因座的多型性，進而針對上述七個商業與試驗品種進行分析；並藉此找出最佳限制酵素截切配方，以提高差異條帶之穩定性、再現性。經過多次測試終於找到最適的限制酵素截切配方。並進一步測試以PCR機器37°C截切4小時，與烘箱37°C處理18小時是否能獲得一致的結果(圖六)。結果顯示，不論是用PCR機器處理4小時，或是以烘箱處理18小時，都能獲得一致的結果。不論是‘兩糯1號’後代分離自交系或對照品種，在 wx^b 限制酵素 *Nco*I 處理，切與未切的條帶大小無任何改變，顯示出‘兩糯1號’與七個對照品種都不具 wx^b 基因型，皆為 WX^b/WX^b 基因型(WX^b : 1281 bp, wx^b : 745 bp & 537 bp, 圖六a)。而在 wx^c 限制酵素 *Hph*I 處理，所有品種皆有切出一條新條帶，約400 bp大小(WX^c : 435 bp & 86 bp, wx^c : 520 bp)，表示這些品種也不具有 wx^c 基因型(皆為 WX^c 基因型，圖六b)。



圖六、使用限制酵素，於不同設備來截切 wx^b 與 wx^c 的 PCR 產物看使否能獲得一致結果
 a. 為 wx^b 以限制酵素 *Nco*I 截切的結果；b. 為 wx^c 以限制酵素 *Hph*I 截切的結果。各上半圖於烘箱 37°C 處理 18 小時，各下半圖為 PCR 機器 37°C 處理 4 小時。
 (對照品種代碼編號，F2:豐糯 2 號、F3:豐糯 3 號、F4:豐糯 4 號、2W:兩糯 1 號、TCS5: 台中 5 號、B Tx623:高粱基因組解序之研究品種，與 KL: Kao-liang, 臺灣在地高粱品種。)

Fig. 6. Restriction enzymes analysis of wx^b and wx^c alleles by two different methods

五、直鏈澱粉與總澱粉測定

直鏈澱粉與總澱粉測定，根據2014年秋作田間性狀調查與產量結果，選取72個優異的自交系收穫種子進行預備試驗。進一步將18個從兩糯一號分離出的自交系，與兩糯一號作為對照，以總澱粉含量(%)、直鏈澱粉含量(%)、支鏈澱粉含量(%)、直鏈/總澱粉比(%)、支鏈/總澱粉比(%)與 wx^a 多型性等性狀進行統計分析(表二)。透過皮爾森相關分析表結果顯示(表二)，總澱粉含量與支鏈澱粉含量呈現完全正相關(P-Value < 0.01)，且與直鏈/總澱粉比為高度負相關、支鏈/總澱粉比為高度正相關。而在 wx^a 多型性顯示出與這些測試的相關性狀均不顯著。

表二、2015年春作糯性高粱自交系 wx^a 基因多型性條帶與澱粉含量之相關係數分析。

Table 2. The Pearson correlation coefficient for analyzing the wx^a gene polymorphism of inbred lines with traits of starch in spring season, 2015.

Characters		Total Starch (%)	Amylose (%)	Amylopectin (%)	Rate of amylose (%)	Rate of amylopectin (%)	wx^a gene Polymorphism
Total Starch (%)	Pearson Correlation	1					
	Significance test (two-tailed)						
Amylose (%)	Pearson Correlation	0.108	1				
	Significance test (two-tailed)	0.659					
Amylopectin (%)	Pearson Correlation	1.000(**)	0.095	1			
	Significance test (two-tailed)	0.000	0.700				
Rate of amylose (%)	Pearson Correlation	-0.863(**)	0.293	-0.868(**)	1		
	Significance test (two-tailed)	0.000	0.224	0.000			
Rate of amylopectin (%)	Pearson Correlation	0.863(**)	-0.293	0.868(**)	-1.000(**)	1	
	Significance test (two-tailed)	0.000	0.224	0.000	0.000		
wx^a gene Polymorphism	Pearson Correlation	0.294	-0.335	0.299	-0.294	0.294	1
	Significance test (two-tailed)	0.223	0.161	0.214	0.221	0.221	

** The value of significance is at the significance test of two-tailed, when the P-Value is 0.01.

討 論

藉由已知能用的高粱 $waxy$ 基因分子標誌分析，顯示‘兩糯1號’帶有 wx^a 基因型，但為異質結合體。此外，‘兩糯1號’不帶有糯性的 wx^b 與 wx^c 基因型(帶有野生型的 WX^b 與 WX^c 基因型)，因此可以推論‘兩糯1號’的糯性可能是受到 wx^a 基因調控影響。進一步將由‘兩糯1號’分離選拔出來的自交系，進行 wx^a 基因與各澱粉含量相關性分析，結果顯示 wx^a 基因與各澱粉性狀呈現相關性不顯著(表二)，因此推測高粱‘兩糯1號’之糯性受到 wx^a 基因影響直、支鏈澱粉的轉換有限。惟本次試驗樣品僅有19個，是否足以達到其準確度，仍需於下次試驗時加大樣本數，獲得結果後再討論之。

在瞭解‘兩糯1號’糯性遺傳背景時，偶然發現‘兩糯1號’ F_1 族群裡出現了完全不帶有 wx^a 基因型的個體存在。顯示出‘兩糯1號’於 wx^a 基因座上不單只有異質結合基因型(WX^a / wx^a)存在，尚有同質結合野生基因型(WX^a / WX^a)的個體存在。

為了讓高粱糯性基因分析更為可信確切，透過市售高粱品種研究以作為對照使用。‘豐糯2號’、‘豐糯3號’、‘豐糯4號’、‘台中5號’與‘兩糯1號’，透過 wx^a 基因分析，具有糯性的豐糯品種中，‘豐糯2號’與‘台中5號’相同，皆為野生型 WX^a 基因；‘豐糯3號’與‘兩糯1號’相同，雖帶有 wx^a 基因型，但為異質結合體，唯獨豐糯4號帶有同質 wx^a 基因型之品種(圖四)。再透過 wx^b 與 wx^c 基因分析，顯示皆無 wx^b 與 wx^c 基因型存在(皆為野生型的 WX^b 與 WX^c 基因型，圖六)。豐糯2號不具三種 $waxy$ 基因仍具高糯性，推測可能帶有其他 $waxy$ 基因，或者其本身為具有高支鏈澱粉含量之品種。而僅具異質結合體 wx^a 基因型糯性的‘豐糯3號’與‘兩糯1號’品種，似乎與 WX^a 基因型(不具 wx^a 糯性)對 wx^a 基因型是顯性的論點有所不一致⁽⁶⁾，或許高粱糯性調控表現並非單純的顯隱性關係。

Sattler於2009年發表的研究指出，高粱 $waxy$ 基因存在有無，會改變高粱胚乳中澱粉核結構。帶有 wx^a 基因型的高粱籽粒其澱粉核較大，核間的孔隙多，因此籽粒會比一般非糯性品種來的大，但相對胚乳容易產生皺縮，進而影響產量；或許正因為如此，市售高粱糯性商業品種多育成異質結合體的原因。

本研究在公開資訊有限與實驗環境受限的情況下，花了許多試驗測試 wx^b 、 wx^c 兩分子標誌的PCR條件與限制酵素截切的方法。測試過程發現此兩分子標誌需在較高的DNA濃度條件下，其PCR的再現性較佳(DNA濃度在100~200 ng/ μ l，圖三a~h)，且提高引子黏合溫度達60°C時，可減少不專一條帶之生成(圖三i~j)。限制酵素處理在PCR產物10 μ l，酵素濃度0.2 unit/ μ l，於總體積15 μ l的條件下處理獲得最佳的截切結果。在相同溫度37°C下，不論是PCR機器處理4小時或是烘箱處理18小時，都能獲得相同的結果(圖六)。在多方測試後，目前確立 wx^b 與 wx^c 兩分子標誌的有效分析方法。未來將DNA濃度定為100 ng/ μ l，以利現有的分子標誌進行分析。

結 論

本研究透過現有已知的高粱 $waxy$ 專一分子標誌，進行高粱‘兩糯1號’自交系糯性分子輔助育種。在現有參考文獻資訊有限的情況下，目前確立了有效、迅速地小量DNA萃取方法，其有助應用於中量中等品質DNA試驗，以及大量族群篩選使用。在分子輔助育種方面，現有已知四個高粱糯性基因型分子標誌，目前已完成三個分子標誌(wx^a , wx^b , wx^c)的最佳分析方法，此有助於提高育種選拔的有效性與準確性，以利育種研究應用。

致 謝

本研究感謝特作與雜糧研究室和生物技術研究室，於田間栽培調查和分生實驗分析的支援，得以讓研究順利進行；以及感謝中興大學古新梅老師研究室在實驗上的協助。另外，感謝稻作與米質研究室前職代王子明先生，提供有效、迅速、大量的DNA萃取方法；以及植物

保護研究室黃冬青小姐，協助分生實驗的技術諮詢與指導。再次感謝各界的支持與協助，以利研究順利進行。

參考文獻

1. Kawahigashi, H., M. Oshima, T. Nishikawa, H. Okuizumi, S. Kasuga and J-i. Yonemaru. 2013. A novel waxy allele in sorghum landraces in East Asia. *Plant Breed.* 132: 305-10.
2. Lu, Y., G. Zhao, Y. Li, J. Fan, G. Ding, J. Zhao, X. Ni, Y. Xu and W. Wang. 2013. Identification of two novel waxy alleles and development of their molecular markers in sorghum. *Genome* 56: 283-288.
3. McIntyre, C. L., J. Drenth, N. Gonzalez, R. G. Henzell and D. R. Jordan. 2008. Molecular characterization of the waxy locus in sorghum. *Genome* 51: 524-533.
4. Pedersen, J. F., S. R. Bean, R. A. Graybosch, S. H. Park and M. Tilley. 2005. Characterization of waxy grain sorghum lines in relation to granule-bound starch synthase. *Euphytica* 144: 151-156.
5. Pedersen, J. F., R. A. Graybosch and D. L. Funnell. 2007. Occurrence of the waxy alleles wx^a and wx^b in waxy sorghum plant introductions and their effect on starch thermal properties. *Crop Sci.* 47: 1927-1933.
6. Sattler, S. E., J. Singh, E. J. Haas, L. Guo, G. Sarath and J. F. Pedersen. 2009. Two distinct waxy alleles impact the granule-bound starch synthase in sorghum. *Mol. Breed.* 24: 349-359.
7. Wang, D., S. Bean, J. McLaren, P. Seib, R. Madl, M. Tuinstra, Y. Shi, M. Lenz, X. Wu and R. Zhao. 2008. Grain sorghum is a viable feedstock for ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 313-320.
8. Wong, J. H., T. Lau, N. Cai, J. Singh, J. F. Pedersen, W. H. Vensel, W. J. Hurkman, J. D. Wilson, P. G. Lemaux and B. B. Buchanan. 2009. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J. Cereal Sci.* 49: 73-82.
9. Yerka, M. K., J. J. Toy, D. L. Funnell-Harris, S. E. Sattler and J. F. Pedersen. 2016. Evaluation of interallelic waxy, heterowaxy, and wild-type grain sorghum hybrids. *Crop Sci.* 56: 1-9.

Identification of Waxy Alleles in the Waxy Sorghum, Liangnuo No. 1¹

Tsung-Hua Liu² and Yi-Lun Liao²

ABSTRACT

In order to shorten the breeding process for glutinous sorghum varieties, in this study, the three of previous found waxy gene markers (wx^a , wx^b , wx^c) of sorghum were used to test the inbred lines of the known sorghum variety, Liangnuo NO. 1. Through PCR and restriction enzyme digestion treatment, it was identified that Liangnuo NO. 1 obtained wx^a gene only, and in its inbred lines has the same gene performance. A new methodology was developed for extracting DNA with simple chemicals, steel balls grinded, water bath extracted, supernatant subsided and centrifugation. It was a fast, stable and useful methodology in obtaining mid-quality DNA for large population selection. While increasing the DNA concentration to 100 ng/ μ l, and rising the annealing temperature upto 60°C (for markers wx^b and wx^c), high fidelity in the PCR result could be achieved. It found that the most suitable condition for the analysis in three sorghum waxy gene markers and improving the effectiveness of selection in molecular breeding.

Key words: sorghum, Liangnuo NO. 1, waxy gene (*waxy*)

¹ Contribution No. 0882 from Taichung DARES, COA.

² Research Assistant and Associate Agronomist of Taichung DARES, COA.