

利用簡單重覆性序列及多重單一核苷酸基因定型 技術鑑別國、內外食米品種

莊雪玉¹、張靜華¹、胡凱康¹、蔡孟勳²、盧虎生¹、張孟基^{1*}

¹國立臺灣大學農藝系所; ²國立臺灣大學生物科技研究所

*通訊作者信箱：menchi@ntu.edu.tw

摘 要

為保持稻種純度，追溯、偵測市售混米，提昇國產稻米之競爭力及區隔性，除了以外觀、生理或生化特性進行稻種鑑定外，以不同DNA分子標記產生之DNA指紋進行稻米品種鑑定已成為目前常用之分析技術。本研究室利用簡單重覆性序列(SSR)分子標誌及過去建立之國內外稻米品種單一核苷酸多型性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)資料庫，篩選解析度最大之核心單一核苷酸多型性組，發展不同基因定型(multiplex SNP genotyping)技術平臺來鑑別臺灣常見市售國產米及國外進口食米品種。首先以32組SSR標誌進行36個國內外食米品種多型性之DNA指紋分析。結果於32個基因座上共得到306個不同之等位基因。經由主座標 principle component analysis (PCA)及集群分析(clustering analysis)，發現來自不同國家之食米品種可分為2群。另外以12-plex之多重單一核苷酸基因定型(multiplex SNP genotyping)技術平臺，可進一步提高稻種檢測之靈敏度及準確性，有效建立臺灣市售常見食米品種之DNA指紋圖譜及混米檢定。此技術亦已應用於國、內外水稻品種DNA資料庫之建立，市售稻米生產過程中容易產生品種混雜階段之檢出，並檢測不同生產階段的稻米混雜比率。最後本研究室亦發展多功能核酸質譜分析之快速檢測稻米品種及定量方法，尋找出最適合20-plex的multiplex PCR排列組合，可有效分析71個臺灣品種及33個國外品種。此些技術基本上可進一步推廣為國、內外米之檢測，促進稻米產業之健全發展。

關鍵詞：簡單重複性序列、多重單一核苷酸基因定型、食米品種鑑定。

前 言

近年來因開放食米國際貿易市場、國內履歷認證制度之建立，市售食米標示及水稻良種繁殖制度(稻米純度之維持)等需求，稻米品種檢測技術之開發及推廣應用特別重要。食米市場價格常隨食米品種及品質差異而有所變動，尤其如何因應外國稻米進口之衝擊以及有效管理臺灣國產米市場，需建立不同國產及國外進口米之DNA指紋資料庫及指紋鑑定之有效技術。其中如何檢測不同食米品種之純度、防止混雜乃維持食米市場價格及產業之首要議題(Blight 2000)。由於形態外觀及酵素之檢測易受環境影響，而DNA分子標記則具有極佳的穩定性，是以近年來在水稻品種之鑑定已被吾人廣泛應用。簡單重複性序列(simple sequence repeats, SSR)又稱微衛星(microsatellite)由Moore等學者於1991年結合PCR技術所創立(Moore *et al.* 1991)。SSR分布於整個基因組的不同位點，因重複單位的大小和序列不同及重複數不同從而構成豐富的多態性。SSR法亦被使用在分析日本酒米及食米品種(Hashimoto *et al.* 2004)、美國水稻品種(Lu *et al.* 2005)、阿根廷水稻之遺傳多樣性(Giarrocco *et al.* 2007)以及印度水稻品種鑑定(Jain *et al.* 2004)等。單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)分子標記因數量豐富、歧異度大、穩定性高、共顯性、以核苷酸支變異而非DNA片斷之長度故易於區分等優點，應用相當多元(Alves *et al.* 2008; Ayres *et al.* 1997; Gupta *et al.* 2001; Twyman and Primrose, 2003)。SNP亦被應用在分析日本糯米品種間waxy基因變異(Yamanaka *et al.* 2004) 以及將功能性SNP運用於高直鏈性澱粉含量且低GI值之水稻育種(Fitzgerald *et al.* 2011)。

國內外食米品種鑑定現況

國外食米品種鑑定現況來看，韓國國立農產物品質管理院授權44家公民營公司或單位進行稻米檢驗工作，此外科學技術分析中心(Scientec Lab center, http://sclab.co.kr/ko/menu2/r1_2.htm)以及SolGent公司(http://solgent.com/pro2_4)使

用韓國國立農產物品質管理院開發之SNP資料庫為基礎(圖1)，分別開發出使用13plex SNP PCR之檢定試劑組，可用以檢測36個白米品種(ScLab)，韓國11個糯米品種及66個白米品種(Solgent)。根據日本獨立行政法人種苗管理中心網頁公告(<http://www.ncss.go.jp/main/DNA/DNAkatsuyou.html#RANGE!A1>)，於日本共有9家公司提供稻米品種檢測服務，例如Satake公司提供包括白米、糯米、造酒米、飼料米、米飯共246品種之鑑定服務；此外亦有4家公司販售稻米品種檢驗試劑組。印度Labindia公司亦有針對Basmati香米開發Basmati Verifiler™ Kit利用8-plex SSR方法用以檢測九種basmati香米品種。臺灣目前僅有新竹食品工業研究所餘數年前自本實驗室技轉SSR技術擔任驗米工作。

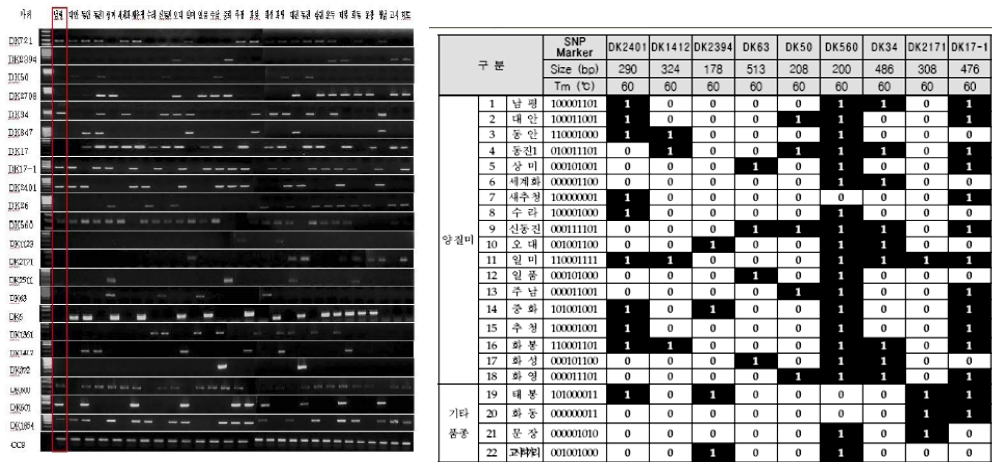


圖 1. 2006 年韓國國立農產物品質管理院以 SNP 為基礎開發 22 組 CAPS markers 鑑別 126 種中 112 種(約 90%)的韓國稻米原原種(<http://www.naqs.go.kr/>)

利用微衛星標誌鑑別臺灣市售米常見品種

為追溯、偵測並防止混米之目的，本實驗室利用微衛星標誌(SSR)來鑑別臺灣常見市售國產米及國外進口食米品種(Chuang *et al.* 2011)。共使用23個國內及13個國外食米品種(表1)及32組微衛星標誌進行水稻多型性之DNA指紋分析。

表 1. 本研究使用稻米品種

Country of origin	Total numbers	Cultivar name
Taiwan	23	<i>Japonica</i> : TaiKen 2 (TK 2), TaiKen 4 (TK 4), TaiKen 5 (TK 5), TaiKen 6 (TK 6), TaiKen 8 (TK 8), TaiKen 9 (TK 9), TaiKen 11 (TK 11), TaiKen 12 (TK 12), TaiKen 14 (TK 14), TaiKen 16 (TK 16), Tainung 67 (TNG 67), Tainung 71 (TNG 71), Kaohsiung 139 (KH 139), Kaohsiung 145 (KH 145), Tainan 11 (TN 11), Taichung 191 (TC 191), Taoyuan 3 (TY 3), Taitung 30 (TD 30), Hualian 19 (HL 19) <i>Indica</i> : Taichung Sen 2 (TS 2), Taichung Sen 10 (TCS 10), Tainung 1 (TN 1), Tainung 22 (TN 22)
Thailand	6	<i>Indica</i> : Jasmine 85 (J 85), Pathumithani (Path), Hom Mali (Hom), K 17032, K 17050, KDML 105
Japan	3	<i>Japonica</i> : Koshihikari (Koshi), Koshiibuki (Ibuki), Akitakomachi (Aki)
USA	3	<i>Japonica</i> : M 202, M 401 <i>Indica</i> : Southern Long Grain (SL)
Australia	1	<i>Japonica</i> : SunWhite (Sun)

結果顯示於32個基因座上共得到306個不同之等位基因。每個基因座可有3至21個片段，平均每個基因座為9.6個片段。多態性訊息含量Polymorphic information value (PIC)，介於0.205 (RM7023)至0.926 (RM333)，平均為0.75(表2)。

表 2. 32 個微衛星標誌所在染色體、PIC 值、等位基因數及產物大小

SSR marker	Chr. location	SSR motifs	PIC value	Allele number	Size range (bps)	SSR marker	Chr. location	SSR motifs	PIC value	Allele number	Size range (bps)
RM21	11	(GA) ₁₈	0.809	10	123–169	RM3412	1	(CT) ₁₇	0.495	7	205–242
RM22	3	(GA) ₂₂	0.574	5	163–199	RM3501	2	(CT) ₂₅	0.778	9	181–216
RM72	8	(TAT) ₃ C(ATT) ₁₅	0.762	8	157–209	RM3892	4	(TG) ₁₄	0.901	19	184–359
RM101	12	(CT) ₃₇	0.875	13	134–309	RM3912	9	(GT) ₂₂	0.728	9	190–218
RM276	6	(AG) ₈ A ₃ (GA) ₃₃	0.725	7	88–137	RM5428	8	(TC) ₁₆	0.656	6	90–396
RM333	10	(TAT) ₁₃ (CTT) ₁₉	0.926	21	160–287	RM5704	11	(AAT) ₂₀	0.873	15	160–215
RM475	4	(TATC) ₈	0.856	12	175–230	RM5755	3	(ACT) ₂₆	0.752	11	203–261
RM496	10	(TC) ₁₄	0.724	6	268–297	RM5862	2	(ATA) ₂₈	0.869	12	144–237
RM580	1	(CTT) ₁₉	0.77	8	205–266	RM6515	1	(GCG) ₈	0.329	3	220–227
RM1089	5	(AC) ₃₃	0.741	11	200–249	RM6971	9	(TTC) ₁₃	0.775	6	193–232
RM1353	7	(AG) ₂₃	0.807	9	169–276	RM7023	6	(AAAG) ₁₁	0.205	4	209–232
RM1359	4	(AG) ₂₅	0.847	10	114–151	RM7180	1	(ATAG) ₆	0.662	4	175–219
RM1387	1	(AG) ₄₄	0.801	8	114–151	RM7271	5	(ATCT) ₈	0.716	6	197–222
RM1388	4	(AG) ₄₆	0.889	14	165–240	RM7545	10	(TATG) ₁₈	0.829	14	167–256
RM2835	3	(AT) ₃₆	0.781	10	173–267	RM7565	3	(TCGA) ₆	0.526	3	203–212
RM3152	10	(CA) ₂₃	0.83	12	232–334	RM8006	7	(AT) ₆₄	0.9	14	131–310

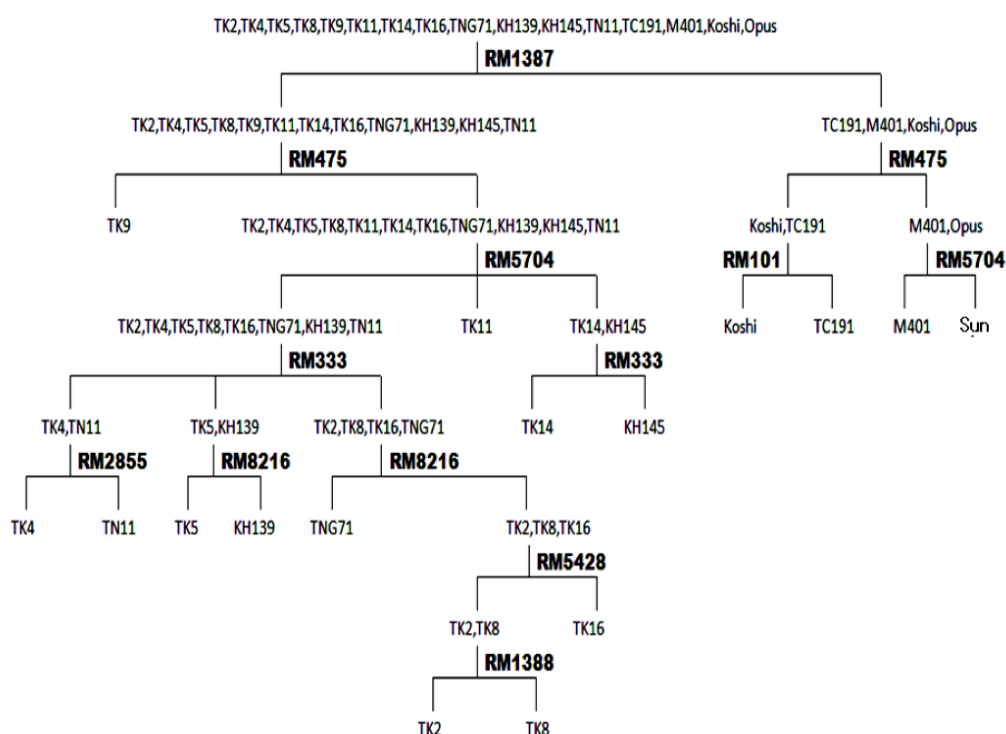


圖 3.食米品種檢索流程表

利用多重單一核苷酸多型性基因定型平臺鑑定臺灣稻米品種

本實驗室以過去建立之國內外稻米品種SNP資料庫(中華民國專利發明第I 365925號),先行開發Tetra primer ARMS PCR技術(中華民國專利發明第I 349104號),並從其衍生出以15或10個專一SNP位點之引子對於單一反應中進行多個PCR產物的增幅,再以毛細管電泳或電泳膠片分析產物大小,以確認該些SNP位點之多型性之15-plex SNP PCR及改良版10-plex SNP PCR兩種方法。

此技術應用於國內水稻品種DNA資料庫之建立、市售米生產過程中易產生品種混雜階段之檢出,以及檢測不同階段的稻米混雜比率(張, 2012)。材料來自各改良場及農試所,以及大米廠代表A公司及區域性代表B碾米場(圖4)。

利用簡單重覆性序列及多重單一核苷酸基因定型技術鑑別國、內外食米品種



圖 4.本試驗合作之各農試單位與碾米廠位置分布圖

本試驗分析了50個品種225個姊妹系，其中21個品種具有一致性的DNA指紋表現、19個品種有一主要表現型、10個品種則具有2-3種主要表現型，顯示來自不同農試單位育種者同一稻種之不同姊妹系間仍有差異(圖5)。

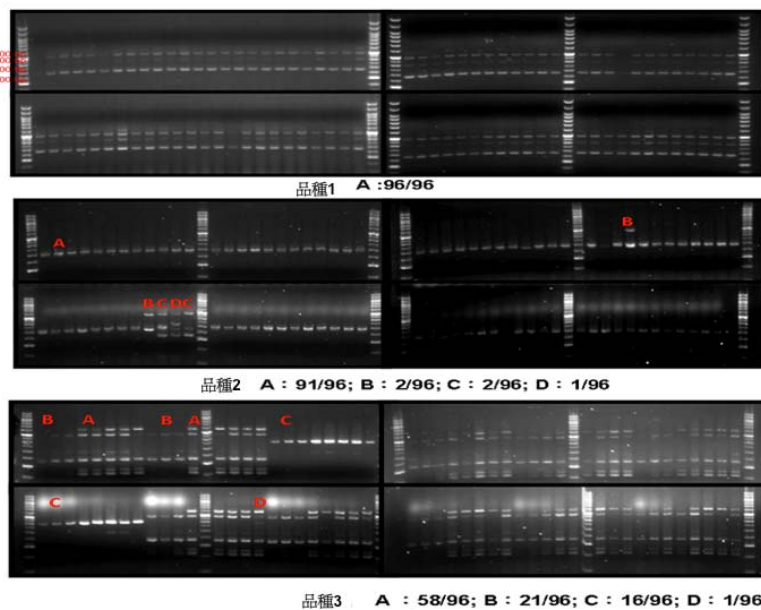


圖 5.品種內之 DNA 指紋變異

市售米生產過程混米階段之檢出使用稻種主要來自A公司及B碾米廠。A公司參試品種為竹塘農戶契作之臺稈9號及向二崙農民收購之臺農71號；B碾米廠參試品種為契作之臺農71號與非契作之高雄145號。分析結果(表3)得知，A公司提供11批試樣僅有一件易品種比例為13.04%，其餘樣本混雜率皆小於10%，更有4批異品種率0%。B碾米廠樣本5批，其餘樣本混雜率皆小於10%。

表 3.A 公司及 B 碾米廠穀粒與白米取樣之 DNA 指紋分析結果

樣本	粒數	分型	異品種比率	樣本	粒數	分型	異品種比率
B碾米廠台農71號白米_20110415	48	A : 48/48	0%	A公司台農71號白米_霧峰b007	48	A : 45/48 B : 2/48 C : 1/48	6.25%
B碾米廠台農71號白米_20110430	48	A : 44/47 B : 1/47 C : 1/47 D : 1/47	6.38%	A公司台稈9號白米_20110719	24	A : 21/22 B : 1/22	4.55%
B碾米廠台農71號白米_20110509	48	A : 43/46 B : 1/46 C : 1/46 D : 1/46	6.52%	A公司台稈9號白米_20110730	24	A : 20/23 B : 1/23 C : 1/23 D : 1/23	13.04%
B碾米廠台農71號白米_20110529	48	A : 44/48 B : 2/48 C : 1/48 D : 1/48	8.33%	A公司台稈9號白米_20110803	24	A : 21/23 B : 2/23	8.70%
B碾米廠高雄145號白米_20110429	24	A : 21/22 B : 1/22	4.55%	A公司台稈9號白米_20110812	24	A : 24/24	0%
A公司台農71號穀粒_二崙採種田	48	A : 44/47 B : 2/47 C : 1/47	6.38%	A公司台稈9號白米_20110817	24	A : 20/20	0%
A公司台農71號穀粒_乾燥b007	48	A : 44/45 B : 1/45	2.22%	A公司台稈9號白米_20110824	24	A : 22/22	0%
A公司台農71號白米_後壁b007	48	A : 46/47 B : 1/47	2.13%	A公司台稈9號白米_20110901	24	A : 20/20	0%

結 論

本實驗室已建立近90多個臺灣及國外稻米品種之DNA指紋分析資料庫，目前已可運用單粒米法及多粒米法，以SSR或multiplex-SNP genotyping技術平臺鑑別臺灣常見市售國產米及國外進口食米品種，有效達成追溯、偵測並防止混米之目的。

各品種姊妹系之間的DNA指紋表現大部分非為單一種條帶表現；由於各農事單位慣行的育種方式不同，造成種子DNA指紋的表現也有所差異。品種內的指紋表現型還是過於複雜，不易建立標準DNA資料庫做為比對之用。各水稻育成單位可實施進一步之種子純化工作，讓品種內的表現型趨於單一。

白米生產過程中過後一階段「包裝」的步驟，由結果發現大部分樣本均維持小於10%的異品種混雜率，顯示水稻正常生產過程中發生混雜的比率不高。國產水稻生產過程中，異品種檢出之最大容許量可 $\leq 10\%$ 。

誌 謝

感謝農委會農糧署之經費支持。

參考文獻

1. 張靜華 (2012) 以多重單一核苷酸多型性基因定型技術建立臺灣稻米品種DNA指紋資料庫及其用於品種純度檢測之可行性研究. 國立臺灣大學農藝學系碩士論文. 64pp.
2. Alves DMT, RW Pereira, SCM Leal-Bertioli, MC Moretzsohn, M Guimarares, DJ Bertioli (2008) Development and use of single nucleotide polymorphism markers for candidate resistance genes in wild peanuts (*Arachis spp*) genetics and Molecular Research 7 (3) : 633-642.
3. Ayres NM, AM McClung, PD Larkin, HFJ Bligh, CA Jones, WD Park (1997) Microsatellites and single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylase classes in and extended pedigree of US rice germ plasm. Theor. Appl. Genet. 94 : 773-781.
4. Blight HFJ (2000) Detection of adulteration of Basmati rice with non-premium long-grain rice. International ournal of Food Sciences and Technology 35 : 257-265.

5. Chuang HY, HS Lur, KK Hwu, MC Chang (2011) Authentication of domestic Taiwan rice varieties based on fingerprinting analysis of microsatellite DNA markers. *Botanical Studies* 52 : 393-405.
6. Fitzgerald M, S Rahman, A Resurreccion, J Concepcion, V Daygon, S Dipti, K Kabir, B Klingner, M Morell, A Bird. (2011) Identification of a major genetic determinant of glycaemic index in rice. *Rice* 4 :66-74.
7. Giarrocco LE, MA Marassi, GL Salerno (2007) Assessment of the genetic diversity in argentine rice cultivars with SSR markers. *Crop Science* 47 : 835-858.
8. Gupta PK, JK Roy, M Prasad (2001) Single nucleotide polymorphisms : a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science* 80(4) : 524-535.
9. Hashimoto Z, N Mori, M Nawamura, T Ishii, S Yoshida, M Ikegami, S Takumi, C Nakamura (2004) Genetic diversity and phylogeny of Japanese sake-brewing rice as revealed by AFLP and nuclear and chloroplast SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 109 : 1586-1596.
10. Jain S, R Jian, SR McCouch (2004) Genetic analysis of India aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 109 : 965-977.
11. Lu H, MA Redus, JR Coburn, JN Rutger, SR McCouch, TH Tai (2005) Population structure and breeding patterns of 145 U.S. rice cultivars based on SSR marker analysis. *Crop Science* 45 : 66-76.
12. Moore SS, LL Sargeant, TJ King, JS Mattick, M Georges, DJS Hetzel (1991) The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10 : 645-660.
13. Twyman RM and SB Primrose. (2003) Techniques patents for SNP genotyping. *Pharmacogenomics* 4(1) : 67-79.

14. Yamanaka S, I Nakamura, KN Watanabe, YI Sato (2004) Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice. *Theor. Appl. Genet.* 108 : 1200-1204.

ABSTRACT

In order to maintain genetic purity of rice seeds, detect and trace admixture rice that sold in market, and increase the competitiveness and marketing segment of Taiwan's domestic rice, the DNA fingerprinting technique based on DNA molecular markers for rice varieties identification has become a commonly used platform. In this study, we took advantage of SSRs and a core SNP marker set from previously established rice SNP database to develop different genotyping analysis platforms for domestic and foreign rice varieties characterization. First, a panel of 32 SSR DNA markers and 36 rice varieties from different countries were used for comparative polymorphism analysis. A total of 306 alleles were observed in 32 loci. The number of alleles per locus ranged from 3 to 21, with an average of 9.6. Polymorphic information content (PIC) values varied from 0.205 (RM7023) to 0.926 (RM333), with an average of 0.75. Principle component analysis (PCA) score plot and clustering analysis were sufficient to discriminate between two different groups of rice varieties based on geographic origins. In addition, using 12 sets of allelic-specific SNP primer pairs in the same PCR reaction and analysis PCR amplicons by capillary or regular gel electrophoresis, we were able to distinguish specific SNP loci among various rice cultivars. The DNA fingerprinting generated by multiplex-SNP genotyping analysis from rice grain sample can be further compared with available database to confirm specific rice identity. The multiplex SNP genotyping technique can further increase the sensitivity and accuracy of rice varieties identification. This genotyping platform has also been applied to establish an up-dated DNA fingerprinting database of domestic and foreign rice, to access the admixture ratio along production processes and set up a standard for tolerance of mixed-rice ratio in rice market. Finally, a mass array-based rice cultivars identification platform was also built up. With 20-plex suitable

利用簡單重覆性序列及多重單一核苷酸基因定型技術鑑別國、內外食米品種

combination of primer designs, totally 71 domestic Taiwan and 33 foreign rice samples can be effectively separated. These techniques can be practically and routinely used in identification of rice authenticity and benefit the development of progress of rice industry.

Keywords: Simple sequence repeat (SSR), multiplex single nucleotide polymorphism (SNP) PCR, rice varieties identification.