

市售臺梗9號包裝米之品種分子鑑定¹

張瑞炘、鄭佳綺、楊嘉凌、許志聖²

摘 要

臺梗9號為國內包裝米市場接受度最高的品種之一，標示臺梗9號的包裝米商品通常售價較優，市場上偶有業者混合其他品種之米粒以降低成本，因此需發展品種鑑定技術以檢視產品純度。國內多數粳稻栽培品種的親緣關係相近，難以從米粒外觀鑑定品種，近年來作物品種的DNA鑑定技術已逐漸成熟，可提供明確、客觀的科學證據鑑別各水稻品種。本研究是利用2組SSR分子標誌(RM333及RM567)鑑定市售臺梗9號包裝米，抽樣調查的對象為16包不同廠牌包裝的臺梗9號米，試驗結果顯示16包樣品之米粒純度皆未達到95%。16個樣品的平均純度為69.27%，純度超過90%的樣品有2個，純度介於80%至90%之間的樣品有6個，純度低於80%的包裝米有8個，其中一樣品未含臺梗9號米粒。本研究結果證實，SSR分子標誌的應用對於作物的品種鑑定可發揮重要的功能，可保障消費者與育種者之權益。

關鍵字：臺梗9號、品種鑑定、簡單重複序列。

前 言

水稻臺梗9號素有「最好吃的米」之美譽，為國內市場接受度最高的水稻品種之一，因此市售包裝米標示臺梗9號者通常售價較高，然而市場上偶有業者以其他品種充當臺梗9號，進行混米以降低成本，導致消費者的權益受損。水稻穀粒經碾米過程後產生的精白米，已失去大部分的外表特徵，加上國內水稻之粳稻栽培品種親緣關係較為接近^(5,6)，從米粒外觀鑑定品種十分困難，因此需要發展分子鑑定技術，以提供客觀明確的依據⁽⁶⁾。

我國為確保優良水稻品種的遺傳特性，從民國48年起採用良種三級繁殖檢查制度，以育成機關設置原原種田生產原原種種子，再由縣(市)農會生產原種種子，接著由鄉鎮農會以原種子生產採種種子，政府並對以上三方進行檢查作業⁽³⁾。包裝米生產的過程中，可能造成混米的步驟有：一、原原種田、原種田或採種田在育苗時，育苗土中的米糠含有其他品種種子，造成秧苗混雜；二、收穫後在烘穀與碾米的過程中與其他品種共用機具，導致其他品種種子混入；三、業者有意降低成本，碾米後以其他品種白米混入。以上原因都可能會造成市售包裝米品種純度之差異。

¹行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第0773號。

²行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員、助理研究員、副研究員、研究員。

分子標誌技術在植物的應用已逐漸成熟，包括從早期的同功異構酵素，到後期以聚合酵素連鎖反應為基礎的技術，例如RFLP (restricted fragment length polymorphism)、AFLP (amplified fragment length polymorphism)、ISSR (inter simple sequence repeat)、SSR (simple sequence repeat)、SNP (single nucleotide polymorphism)，在品種鑑定、遺傳分析及輔助育種方面皆扮演重要的角色^(1,4,16,17)。微衛星序列(microsatellite)又稱作簡單重複序列(simple sequence repeat, SSR)是目前主流的分子標誌，其優點為再現性高、具有共顯性、多型性豐富、普遍分布於整個基因組^(7,9,10)。在臺灣已有利用SSR分子標誌進行水稻品種鑑定之研究^(2,5)，本研究希望採用具有高度多型性的SSR標誌，鑑別包裝米樣品是否為臺梗9號，進而計算其品種純度。

自從2002年我國加入世界貿易組織(WTO)之後，每年限量進口144,720公噸的稻米，進口米通常成本較低，業者亦有可能混入國內的良質米品種。因此為確保國內良質米育成者及消費者之權益，發展米粒品種分子鑑定技術是重要的措施。本研究主要分兩個部分：第一部分是利用2組前人發表的SSR分子標誌(RM333及RM567)進行國內主要水稻栽培品種的測試，並且加入3個進口米的品種，測試RM333與RM567是否能有效鑑別臺梗9號之白米；第二部分是抽樣檢測國內市售的臺梗9號包裝米，採用RM333與RM567進行檢測，以瞭解國內市面流通的臺梗9號包裝米之品種純度。

材料與方法

一、SSR標誌鑑別效力之確認

採用29個品種測試RM333與RM567分子標誌的鑑別效力，包括臺梗9號、臺東30號、臺中192號、臺梗2號、臺中194號、臺南11號、越光、臺農71號、臺梗8號、臺梗14號、桃園3號、高雄139號、臺中191號、臺南13號、臺東32號、臺農84號、臺農74號、臺中秈10號、高雄145號、臺中65號、臺南1號、花蓮21號、臺農67號、高雄146號、臺梗16號、高雄147號、澳洲Su7、美國M401及美國M402等品種。本試驗採用的SSR引子序列，RM333的為F:5'-GATGTACTTGCCAACATGCTCTCC-3' R:5'-AGCACACGCGAGTG ATGTAACG-3'，RM567的引子序列為F:5'-GCATACCGTAATGTTGGTGAAGC-3'；R:5'-AATAGCAACTGGG AGGAGGTAAGG-3'。為進行毛細管電泳，兩個SSR引子的順向序列的5'端必須經過螢光標定，RM333-F螢光種類為FAM，RM567-F為HEX，由源資公司(Tri-I biotech, Taiwan)代為合成引子與標定螢光標記。

二、市售包裝米取樣及核酸萃取

臺梗9號包裝米樣品共16包，分別來自不同廠牌，每包裝隨機取樣24粒米，總共384粒米。取樣後採用TANBead Rice DNA Auto Kit試劑(圓點奈米科技公司，臺灣)萃取核酸，將每粒米分別放入試劑盤的各個孔洞中，將試劑盤連同樣品放入核酸自動萃取儀器(Smart LabAssist 32，圓點奈米科技公司，臺灣)中，之後按照產品使用說明書進行萃取，萃取後之核酸保存於-20℃冰箱備用。

三、聚合酵素連鎖反應

RM333與RM567的聚合酵素連鎖反應(PCR)條件相同，使用的試劑為Fast-Run Taq Master Kit (Protech Technology, Taiwan)，總反應體積為25 μ L，內含10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、0.01% Gelatin、1.5 mM MgCl₂、0.1% Triton X-100、3.75 U Taq DNA polymerase、1 μ L DNA、0.4 μ M引子。反應儀器為GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)。反應時的程序為94 $^{\circ}$ C 5分鐘，之後循環35次94 $^{\circ}$ C，30秒；55 $^{\circ}$ C，30秒；72 $^{\circ}$ C，60秒，最後72 $^{\circ}$ C，10分鐘，PCR之產物保存於-20 $^{\circ}$ C冰箱或進行電泳分析。

四、毛細管電泳分析

毛細管電泳之分析委託源資公司(Tri-i Biotech, Taiwan)與基龍米克斯公司(Genomics, Taiwan)進行，使用的儀器為ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)。電泳分析後根據片段大小計算各分子標誌的對偶基因數目及PIC值(polymorphic information content) (Botsein *et al.*, 1980)，PIC值之計算方法如下：

$$PIC_i = \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

其中 p_{ij} 是第 i 個基因座上第 j 個對偶基因的頻度。基因座 i 的PIC $_i$ 即為1減去基因座上所有對偶基因頻度平方和。

結 果

29個水稻品種的DNA經PCR反應增幅RM333及RM567片段之後，經毛細管電泳後產生的結果如表一及表二所示，其中RM333增幅的片段共有11種對偶基因型，大小從178.7 bp到268.7 bp，以A到K等字母表示，PIC值為0.85。RM567有5種對偶基因型，大小從244.7 bp 到256.7 bp，以A到E等字母表示，PIC值為0.59。在表一、表二中，同一基因座各種大小的PCR產物可分為不同型，以英文字母代表分型的結果。在表三中，直接以英文字母套用至各品種，可以清楚顯示各品種的分型結果，29個品種共可分成20個小組，其中有15個品種可獨立鑑定，包括臺中194號、臺梗16號、臺南13號、澳洲Su7、臺梗9號、臺東30號、臺南11號、臺農67號、臺中65號、臺梗14號、高雄146號、臺中秈10號、高雄145號、高雄139號以及臺南1號。其他品種雖然有2個以上的品種在同一組，但本試驗的目的僅針對臺梗9號，試驗結果顯示RM333及RM567這兩種SSR分子標誌確實可勝任鑑別臺梗9號之目標。

市售臺梗9號包裝米樣品的抽查結果：本次抽樣調查的16包臺梗9號包裝米樣品檢測結果如表四所示，每個樣品各抽樣24粒米，總計384粒米，依照表一及表二的編碼方式，共可分成11種基因型，其中DD為臺梗9號的基因型，表四中16包樣品的臺梗9號純度範圍從0%至91.7%，平均純度為69.27%。純度超過90%的為樣品1號及10號共2個，純度介於80%至90%之間的樣品

為2號、5號、8號、10號、14號及15號共6個，純度未達80%的樣品為3號、4號、6號、7號、9號、11號、12號及13號共8個，其中樣品11號之純度為0%，表示完全不含臺梗9號之米粒。

表一、RM333 標誌在 29 個品種的 PCR 產物毛細管電泳結果

Table 1. PCR products amplified with a RM333 primer pair and separated by capillary electrophoresis for 29 varieties

	Allelic type										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Size (bp)	178.7	181.7	184.5	190.4	193.3	196.1	207.8	213.3	219	224.8	268.7
Frequency	9/29	2/29	3/29	1/29	3/29	2/29	2/29	2/29	3/29	1/29	1/29

表二、RM567 標誌在 29 個品種的 PCR 產物毛細管電泳結果

Table 2. PCR products amplified with a RM567 primer pair and separated by capillary electrophoresis for 29 varieties.

	Allelic type				
	A	B	C	D	E
Size (bp)	244.7	250.7	252.7	254.6	256.7
Frequency	2/29	9/29	1/29	16/29	1/29

表三、利用 RM333 及 RM567 對 29 種水稻品種進行分型之結果

Table 3. Combined genotypes of RM333 and RM567 among 29 rice varieties.

Genotype	Variety
AB	TT32, TC192
AC	TC194
AD	TNG71, TK8, TY3, TK2, TNG74, HL21
BB	TK16
BE	TN13
CB	Australia-Su7
CD	USA-M401, USA-M202
DD	TK9
ED	TT30
EB	TN11
EE	TNG67
FD	TC65
FB	TK14
GD	KH146
GA	TCS10
HB	Hoshihikari, TC191
IB	KH145
ID	TNG84, KH147
JD	KH139
KA	TN1

表四、16包市售臺梗9號包裝米樣品各基因型米粒數及品種純度

Table 4. Grain number of respective genotypes and variety purity of Tai-Ken 9 tested among 16 rice products sampled from market

Genotype	Sample number															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
AB	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
AD	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	3	7	0	1	0
BB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
BD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
DB	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
DD¹	22	20	16	11	21	19	15	21	13	21	0	12	12	21	20	22
EB	1	3	0	3	0	5	0	0	1	0	0	4	3	1	0	0
ED	1	1	5	9	3	0	4	1	9	3	0	4	0	2	1	2
FD	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0
IB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TK9 purity (%)	91.7	83.3	66.7	45.8	87.5	79.2	62.5	87.5	54.2	87.5	0	50	50	87.5	83.3	91.7

¹The genotype “DD” is the specific genotype of Tai-Ken 9.

討 論

以往作物品種之鑑定是根據外表形態與生理特性，然而這些性狀容易受到栽培環境或是採後處理的影響，以米粒而言，碾米過程中已除去大部分外表型性狀，植株生理特性亦無從追溯，只能依賴米粒外觀的少量資訊進行判別，不易鑑定品種。植物的DNA序列在各個生育期維持一致性，不會受環境影響，利用DNA的分子標誌進行稻米品種鑑定，可鑑定的範圍包括稻穀種子、秧苗、田間植株、糙米、精白米，甚至米粉，可掌握水稻繁殖與生產過程中的每一個步驟，因此分子標誌的技術對於維持優良品種純度可發揮關鍵的功效。本試驗中所採樣的包裝米皆為碾製後的商品，雖然從肉眼難以分辨純度，但是試驗結果顯示透過DNA的萃取與PCR分析，仍然可以檢測其品種純度。

SSR是目前被廣泛利用的分子標誌，已經被應用在許多作物的遺傳分析與品種鑑定之研究，例如水稻⁽¹⁵⁾、橄欖⁽¹¹⁾、豌豆⁽¹²⁾、葡萄⁽¹³⁾及蕃茄⁽¹⁴⁾，在國內水稻品種鑑定方面也有學者發表許多研究論文^(2,5)，本研究是參考文獻中最具有多型性的RM333與RM567此二個SSR標誌進行品種鑑定試驗，從表一與表二的測試結果顯示此2標誌確實具有良好的判別效果。然而在分析PCR產物時若是核酸片段大小差異太接近，例如只差2 bp或3 bp者，使用瓊脂膠電泳難以辨別⁽⁸⁾，例如本研究採用的RM333每個對偶基因的差異最小只有3 bp，而RM567每個對偶基因最小只差2 bp，因此目前較準確的做法是採用毛細管電泳的方式提高解析度⁽⁸⁾。本研究的結果再度證實，SSR引子序列搭配毛細管電泳分析是進行作物品種鑑定非常有效的方式。

目前臺灣限量開放稻米進口，本次試驗結果顯示RM333及RM567同樣具有鑑別進口米的功能，在表三中澳洲進口米的基因型為CB，而美國進口米的基因型為CD，在16包臺梗9號包裝米的樣品中皆無發現CB及CD的基因型，顯示各樣品皆無使用外國米進行混米的情形。近年來臺灣農產品外銷中國大陸與世界各國的比例逐年增加，國內重要作物品種外銷時，勢必會面臨當地業者摻雜或仿冒的情況，為了保護臺灣農民與業者的權益，發展作物品種鑑定技術是必要之措施。另一方面，近年來保護作物品種權的觀念已經建立，水稻臺梗9號並有境外技術移轉的成功案例，未來品種鑑定技術將扮演日漸重要的角色，可維護育種者及合法業者之權益。

極端氣候會造成作物的生物性逆境(病、蟲害)與非生物逆境(乾旱、土壤鹽化、淹水)風險逐年提高，育種人員若採用分子標誌可標定抗逆境基因以增進育種效率，同時可增加育種材料之遺傳歧異度以增進組合力，另一方面，採用分子標誌技術進行監測可確實掌握品種之純度。由以上可知分子標誌技術對作物品種研發、品種保護、維持品種純度皆扮演不可或缺的角色。

參考文獻

1. 林順福 2001 分子標誌在作物育種上之應用 p.21-30 生物技術在農業上之應用 楊盛行編 國立臺灣大學農業陳列館。
2. 謝廉一、吳岱融、胡凱康 2007 利用簡單重複序列標記建立臺灣主要梗稻品種的鑑別技術 植物種苗 9(2): 25-38。
3. 吳東鴻、胡凱康 2010 水稻於良種繁殖制度下之遺傳變異 臺灣農業研究 59: 275-288。
4. Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
5. Chuang, H. Y., H. S. Lur, K. K. Hwu and M. C. Chang. 2011. Authentication of domestic Taiwan rice varieties based on fingerprinting analysis of microsatellite DNA markers. *Bot. Stud.* 52: 393-405. (in press)
6. Lin, M. S. 1991. Genetic base of Japonica rice varieties released in Taiwan. *Euphytica* 56:43-46.
7. McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. B. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Y. Fu, R. Maghirang, Z. K. Li, Y. Z. Xing, Q. F. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2,240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9: 199-207.
8. Hayden, M. J., T. M. Nguyen, A. Waterman and K. J. Chalmers. 2008. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9: 80.

9. Temnykh, S., W. D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y. G. Cho, T. Ishii and S. R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 697-712.
10. Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour, S. R. McCouch. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in Rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.* 11: 1441-1452.
11. Poljuha, D., B. Setic, A. Milotic, D. Bandelj, J. Jakse and B. Javornik. 2008. DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. *Sci. Hortic.* 115: 223-230.
12. Loridon, K., K. McPhee, J. Morin, P. Dubreuil, M. L. Pilet-Nayel, G. Aubert, C. Rameau, A. Baranger, C. Coyne, I. Lejeune-Henaut and J. Burstin. 2005. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 111: 1022-1031.
13. Cipriani G., M. T. Marrazzo, G. D. Gaspero, A. Pfeiffer, M. Morgante and R. Testolin. 2008. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. *BMC Plant Biol.* 8: 127-139.
14. Bredemeijer, G., M. M., R. J. Cooke, M. W. Ganal, R. Peeters, P. Isaac, Y. Noordijk, S. Rendell, J. Jackson, M. S. Roder, K. Wendehake, M. Dijcks, M. Amelanine, V. Wickaert, L. Bertrand and B. Vosman. 2002. Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1019-1026.
15. Singh, R. K. , R. K. Sharma, A. K. Singh, V. P. Singh, N. K. Singh, S. P. Tiwari and T. Mohapatra. 2004. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica* 135: 135-143.
16. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, V. D. Lee and M. Hornes. 1995. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
17. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

Molecular Identification of Packaged Rice Grains Labeled Variety Tai-Keng 9 in the Markets¹

Ray-Shin Chang, Chia-Chi Cheng, Jia-Ling Yang and Chi-Sheng Sheu²

ABSTRACT

Tai-Keng 9 (TK9) is one of the most popular rice varieties and its price is higher than other varieties in the markets in Taiwan. To avoid adulteration of TK9 rice products, it is important to develop an effective variety identification method. However, it is uneasy to identify the varieties by morphological traits of the grains since TK9 is genetically close-related to Taiwanese japonica rice. DNA markers have been shown to provide clear and objective evidences for variety identification in the recent decades. In this study, two microsatellite markers, RM567 and RM333, were performed in variety identification against sixteen TK9 sampled from markets. The results showed that the purity ranged from 0% to 91.67% and was lower than 95% (69.27% on average). Only two samples showed the purities higher than 90%, and seven samples showed between 80% and 90%. The purities of the rest seven samples showed lower than 80%. This study has provide the evidence of SSR markers as an effective molecular tool for variety identification, and could protect the rights of consumers and breeders.

Key words: Tai-Keng 9, variety identification, simple sequence repeat.

¹ Contribution No. 0773 from Taichung DARES, COA.

² Assistant Researcher, Associate Researcher, Associate Researcher, Assistant Researcher of Taichung DARES, COA.