



利用基因特異性擴增法

檢測 稻米香氣基因技術

文 / 圖 侯雅玲

前言

香米有別於一般水稻，在米飯烹煮時會產生獨特的香氣，廣受國際市場歡迎，且具有價格優勢。國際上香米以印度及泰國出口為最大宗，皆屬於長粒形、米飯鬆散且黏性低的秈稻品種，與一般臺灣消費者對米飯的偏好不同。臺灣所育成的香米多屬於粳稻品種，包含臺農72號、臺粳4號、臺農71號、桃園3號、臺農74號、高雄147號、臺中194號、臺東35號、臺南13號等，其適口性較符合國人的飲食喜好。隨著臺灣香米品種在每年的全國稻米品質評鑑比賽屢屢獲得佳績，聲名大噪，大幅提升消費者對香米的認識與喜愛，更帶動農友栽種的意願與栽培面積。有鑑於許多農友反映香米收穫後香氣不明顯，進而對秧苗來源產生疑義，本場建立稻米香氣基因檢測技術，可快速準確地釐清香米與非香米之特性。

香米的香氣成分

香米經固相微萃取(SPME) 其揮發的香氣，再藉由氣相層析儀器(GC-MS)分析，可以分析出香氣是由100多種揮發性化合物所組成，香氣成分複雜，但其中最主要的芳香化合物是2-

acetyl-1-pyrroline (2AP)。

2AP的生合成歸因於香米的Badh2酵素蛋白的DNA序列發生變異，影響蛋白質構造及酵素功能，無法順利將 γ -aminobutyraldehyde (AB-ald)氧化分解，讓AB-ald累積在植株內。AB-ald正好是2AP香氣化合物合成所需要的原料，因此AB-ald累積促使了2AP的生合成途徑，使得香米具有香氣。

儘管稻米具有香氣是單一隱性基因控制的遺傳特性，但香米的2AP是植株的二次代謝產物，所以容易受到生長條件、栽培管理及採後儲存方式等外在環境因素影響香氣的表現。如穀粒充實期的高溫環境、氮肥使用過量、稻穀成熟度過熟，儲藏溫度高或儲藏時間延長都會使2AP含量降低，香氣變淡。

香米除了根部以外，植株的葉片、穀粒等器官都能夠生合成2AP。GC-MS儀器可以對2AP進行定性及定量的分析，但此分析設備及技術門檻高，一般是藉由人為聞評的方式來判斷香氣的有無及濃淡，在田間可以藉由搓揉水稻葉片、或直接咀嚼稻穀方式；若是在實驗室可以利用氫氧化鉀加熱萃取聞香，若樣品量足夠，亦可直接烹煮米飯來進



圖1. 香氣基因*badh2.10* 序列上的SNP位點示意圖，黑色及白色方塊分別為序列外顯子及非轉譯區。

行聞香檢測。用人為判讀香氣方式的缺點是隨著樣品數量多，會有嗅覺疲勞，人為誤判等問題，較為耗費時間與人力。

香氣基因的檢測技術與原理

依據*Badh2*基因座上序列發生變異的位置不同，目前可以區分出至少10個等位對偶基因，Basmati等印度香米的香氣基因為*badh2.1*，而臺灣香米則是帶有*badh2.10*。*badh2.10*此隱性對偶基因是在*Badh2*第13個外顯子發生一個鹼基變異，由C變成T(圖1)。利用此單一

核苷酸多態性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)，設計SNP對應的基因特異性(AAllele Specific, AS)分子標誌或是CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)分子標誌，即可應用於區分水稻是否帶有*badh2.10*香氣基因。

本技術不論是水稻葉片或是稻殼檢體皆可分析，檢體經由試劑完成DNA萃取(圖2)後，採用AS分子標誌檢測，一個檢體需要用2組引子對分別進行聚合酵素鏈鎖反應 (Polymerase Chain



圖2. 葉片(a)及稻殼(b)樣品，皆可用DNA萃取試劑(c,d)萃取DNA，並進行後續香氣基因分析。



Reaction, PCR), 使用的引子對分別是(1)前置引子5212_F:ACCCCATGGCAC TTTAATGA+反置引子5212_G:CGGAA AGCACAGCACAAG; (2)前置引子5212_F:ACCCCATGGCACTTTAATGA+反置引子5212_A:CGGAAAGCACAG CACAAGa。2個反置引子5212_G及5212_A只有1個鹼基序列的差異, G對應的是不帶*badh2.10*基因, A對應的是帶有*badh2.10*香氣基因。分析結果如圖3及圖4, 非香米品種使用第1組引子對(F/G)能夠擴增出條帶, 而用第2組引子對(F/A)無法擴增出條帶, 如臺東30號及臺梗9號; 反之, 使用第1組引子對

(F/G)無擴增出條帶, 而第2組引子對(F/A)有擴增出條帶的樣品屬於帶有*badh2.10*的香米品種。AS分子標誌方法結果判別容易, 並且只需進行PCR一個步驟, 省去PCR產物處理限制酶切反應的流程, 較CAPS分子標誌更省時間。

結語

利用AS分子標誌檢測*badh2.10*香氣基因, 可釐清水稻是否為香米品種的疑義, 也可以做為香氣基因的育種選拔工具。此技術所需的樣品量少, 操作簡單、準確、耗費時間少, 且不受栽培環境等人為因素的干擾, 是相當有效率的檢測工具。

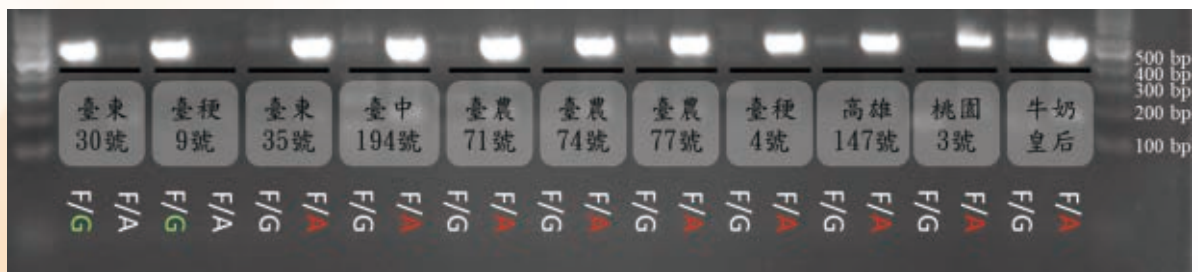


圖3. 水稻葉片利用AS分子標誌進行*badh2.10*香氣基因檢測, 擴增條帶為560 bp。



圖4. 水稻稻殼利用AS分子標誌進行*badh2.10*香氣基因檢測, 擴增條帶為560 bp。