

# 西瓜表現序列標幟衍生微衛星標誌之開發與探討<sup>1</sup>

陳哲仁<sup>2</sup> 古新梅<sup>3</sup> 王昭月<sup>2</sup> 吳明哲<sup>2,4</sup>

## 摘 要

陳哲仁、古新梅、王昭月、吳明哲。2009。西瓜表現序列標幟衍生微衛星標誌的開發與探討。台灣農業研究 58:310–315。

微衛星標誌或稱為簡單重複序列是廣泛使用的一種分子遺傳標誌，目前利用 cDNA 和表現序列標幟開發簡單重複序列標誌已使用在許多植物物種，這些標誌可作為基因定位及品種鑑定等重要用途。本試驗自 NCBI dbEST 資料庫取下 8584 筆西瓜 EST 序列，經分析結果已鑑定出 546 筆 EST 序列攜帶簡單重複序列，共含有 585 個表現序列標幟衍生重複序列，其中以三鹼基重複序列為最大宗。本試驗中，從 283 筆西瓜 EST 序列成功設計重複序列標誌引子，並以市售 F1 雜交品種測試重複序列引子偵測能力及評估多型性。試驗結果大約 95% 的引子可增幅 DNA 片段，並且有 24 個引子對在 22 個測試品種中偵測出多型性。本研究結果將可應用於建立更完善的西瓜簡單重複序列遺傳連鎖圖譜。

**關鍵詞：**西瓜、簡單重複序列、表現序列標幟、分子標誌。

微衛星標誌 (microsatellite marker) 或稱為簡單重複序列 (simple sequence repeat, SSR) 是由長 1–6 個鹼基重複排列組成，散佈在整個基因組中，可用於遺傳圖譜建立、品種純度鑑定、遺傳歧異性分析以及分子標誌輔助育種等用途 (Wang *et al.* 2006)。簡單重複序列是從基因組 DNA 或 cDNA 序列中鑑定發現 (Fernandez-Silva *et al.* 2008)，過去以傳統方法若要將基因組簡單重複序列鑑定分離，需要建構細菌人工染色體基因庫 (bacterial artificial chromosome, BAC library)，與放射性物質標定特定重複序列組成的核酸探針進行雜合，篩選

及解序呈陽性反應殖系，這些過程需要投入大量的成本、時間與人力進行開發，而且鑑定出來的 SSR 分子標誌也侷限於使用的探針種類。近年來許多 cDNA 解序計畫已釋出許多表現序列標幟 (expressed sequence tag, EST) 序列片段至公眾資料庫 (Ok *et al.* 2000; Levi *et al.* 2006)，因此，一個替代方式是利用公眾資料庫的 cDNA 序列資料，利用簡單重複序列搜索程式 (simple sequence repeat identification tool) 從中發掘簡單重複序列，並接續引子設計程式如 Primer3 開發 SSR 標誌引子，目前這項技術已實際應用在穀類作物及棉花的 SSR 標誌開發，

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2376 號。接受日期：98 年 11 月 16 日。
2. 本所生物技術組聘用助理研究員、助理研究員及研究員兼組長。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 國立中興大學農藝系助理教授。台灣 台中市。
4. 通訊作者，電子郵件：wu@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

大幅增進可利用 SSR 標誌數量 (Wang *et al.* 2006; Swarup *et al.* 2006)。

西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai]，英名 Watermelon，為一年生蔓性草本植物，屬於葫蘆科 (Cucurbitaceae) 西瓜屬 (*Citrullus*)。依據 2007 年農業統計年報資料，台灣西瓜栽培面積 14,198 ha，位居蔬果類第一位 (COA 2007)，年產值約 44 億元。以往西瓜分子遺傳相似性與歧異度評估主要是根據隨機擴增多型性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 及 inter simple sequence repeat (ISSR) 分子標誌分析結果 (Levi *et al.* 2002; Hashizum *et al.* 2003; Wang *et al.* 2005)。為了豐富西瓜分子標誌研究基礎資料，與協助國內種苗業者發展品種及種子純度 DNA 檢測方法，本試驗由 NCBI dbEST 資料庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>) 下載西瓜表現序列標幟，調查重複序列分布情形和設計 EST-derived SSRs 分子標誌，並且以市售栽培品種評估此開發的 SSR 標誌可利用性與品種純度檢測應用潛力。

本試驗自農友種苗公司購得 22 個西瓜一代雜交商業品種。在 2008 年 12 月 5 日從 NCBI dbEST 資料庫，以 '*Citrullus lanatus*' 為關鍵字取下 8584 筆 EST 序列，參考 Wang *et al.* (2006) 自 EST 分離及設計 SSR 引子的方法，利用 Gramene 網站的工具軟體 SSRIT (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) 篩選簡單重複序列 (圖 1)，在 546 筆 EST 序列中一共發現 585 個簡單重複序列 (表 1)，佔西瓜全部 EST 序列的 6.36%，介於咖啡 16.6% (Aggarwal *et al.* 2006) 和棉花 4.4% (Wang *et al.* 2006) 之間。其中以 tri-nucleotide repeat 有 316 個 (佔 54%) 最多，相似於水稻、小麥、玉米、高粱、大麥、棉花、柑橘以及阿拉伯芥等物種之結果 (Chen *et al.* 2006; Swarup *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006)；其次依序為 190 個 di-nucleotide repeat、36 個 tetra-nucleotide

repeat、31 個 penta-nucleotide repeat 以及 12 個 hexa-nucleotide repeat (表 1)，Wang *et al.* (2006) 指出 tri-nucleotide repeat 最多可能與 mRNA 轉譯的三聯碼特性有關，而在 3' 端及 5' 端非轉譯區間 (untranslated regions, UTR) 則常有 di-nucleotide repeat 序列。西瓜 EST 序列個別的 SSR motif 出現頻率以 70 個 AG/TC 最高 (11.97%)，相同於柑橘和咖啡 (Aggarwal *et al.* 2006; Chen *et al.* 2006)，也是植物界中最豐富的 SSR motif 類型 (Wang *et al.* 2006)，其他長度的 SSR motif 出現頻率最高者依序為 54 個 CCA/GGT、5 個 AAAT/TTTA、7 個 TTTTA/AAAAT 以及 2 個 CTTTTT/GAAAAA。

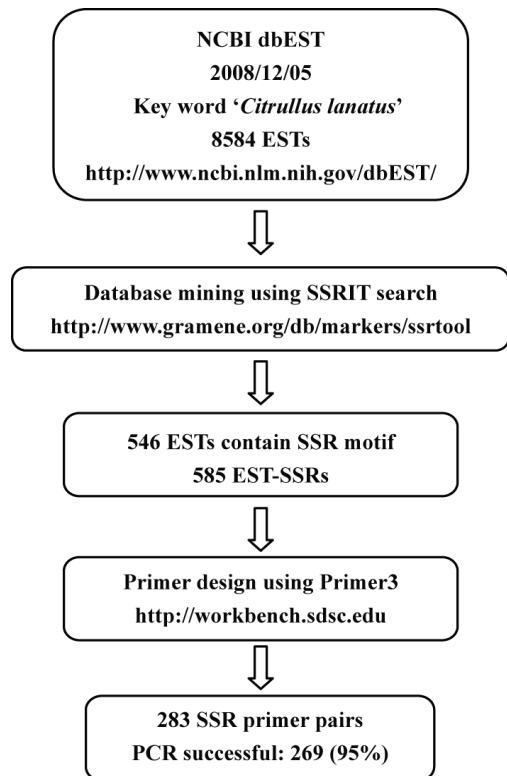


圖 1. 西瓜自表現序列標幟開發 SSR 分子標誌流程圖。

Fig. 1. Flow chart of the SSR mining procedure by using public *Citrullus lanatus* ESTs.

利用工具軟體 PRIMER3 設計 283 個 SSR 標誌引子對，以 3 個一代雜交品種‘新蘭’、‘甜美人’以及‘慧玲’進行測試，結果有 244 個 (86.2%) 可以增幅符合預期的條帶，另有 14 個因沒有產物或呈現複雜條帶分布無法利用，此外，有 25 個產生之 PCR 產物比預期大出數十至超過 1000 bp 的條帶，顯示可能是有 intron 插入，整體上新設計的分分子標誌成功率超過 95%。較前人自西瓜基因組序列設計 107 個 SSR

引子對僅 45 個可獲得條帶之成功率較高，也明顯優於小麥及甘蔗約 60% 成功率平均值 (Thiel *et al.* 2003; Hawkins *et al.* 2001)，但多型性 SSR 標誌比例 8.9% 略低於前人西瓜 SSR 標誌分析之結果 5/45 (11.1%)，初步推論可能是因為 EST-derived SSR 分布在基因體中高度保留性區間所導致的差異 (Hawkins *et al.* 2001; Aggarwal *et al.* 2006)，但是本試驗所建立的具有多型性的 SSR 標誌比前人發表的總數量多。

表 1. 西瓜表現序列標幟中主要的簡單重複序列類型與數量

Table 1. Types and numbers of di- and tri-nucleotide SSR motifs obtained from *Citrullus lanatus* ESTs

SSR motif	No. of repeats																Total		
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		≥20	
AG/TC				11	8	28	3	3	1	2	1	1			9		3	70	
AT/TA				19	13	5	4	3	7	2		1	1		1	1		57	
CT/GA				17	9	7	1	2	1			3		1		3	2	46	
CA/GT				1	1			1	6									9	
AC/TG				1	3	1	1	1					1					8	
CCA/GGT		3	51															54	
CTT/GAA		18	5	7	2	2	2	1		2	1					1	1	42	
AAG/TTC		16	2	3	5		4		1		1							32	
ATT/TAA		16	3		2		1											22	
AGA/TCT		7	2	1	2	6		1		2								21	
AAT/TTA		7	2	1	1	1	1	3		1								17	
GCA/CGT		1	2	2				10										15	
CAG/GTC		7		5														12	
ATC/TAG		3	3	1	3				1									11	
TCC/AGG		1	9		1													11	
GCC/CGG		9	2															11	
ATA/TAT		1		2			1	1		2								7	
CTC/GAG		6																6	
CCT/GGA		4	2															6	
other NNN		27	10	11				1										49	
NN <sup>z</sup>				49	34	41	10	15	9	4	1	5	2	1	10	4	5	190	
NNN		126	93	33	16	9	9	17	2	7	2					1	1	316	
NNNN	16	12	5	2			1											36	
NNNNN	26	5																31	
NNNNNN	8	2	1	1														12	
																		total	585

<sup>z</sup> The total numbers of SSRs with more than 4 repeats were presented.

擴大分析全部 22 個一代雜交品種，發現其中有 24 個標誌呈現多型性，並且‘金蘭’、‘紅鈴’、‘華光’以及‘壽山’有品種專一性標誌可供品種鑑定參考 (圖 2)。本試驗顯示西瓜開發 EST-derived SSRs 是可行的，可擴充有用的 SSR 標誌，可提供品種鑑定和純度檢測之應用，提昇鑑定效率與精確度。

自 1997 年 Jarret *et al.* 首次發表西瓜簡單重複序列，和 2006 年 Joobeur *et al.* 建置西瓜 BAC

基因庫以來，僅公布 43 個 SSR 標誌引子序列，相較同屬於葫蘆科的洋香瓜有超過 1000 個 SSR 基因座 (Fernandez-Silva *et al.* 2008)，數量還是相對少數。本試驗成功自西瓜 EST 資料庫獲取簡單重複序列，大幅擴充可利用的 SSR 標誌數量。後續將利用西瓜基因組引用文獻配合生物資訊軟體，設計不同類型分子標誌，利用雜交分離族群建構西瓜遺傳圖譜，進行重要性狀基因定位並發展西瓜分子標誌輔助育種系統。

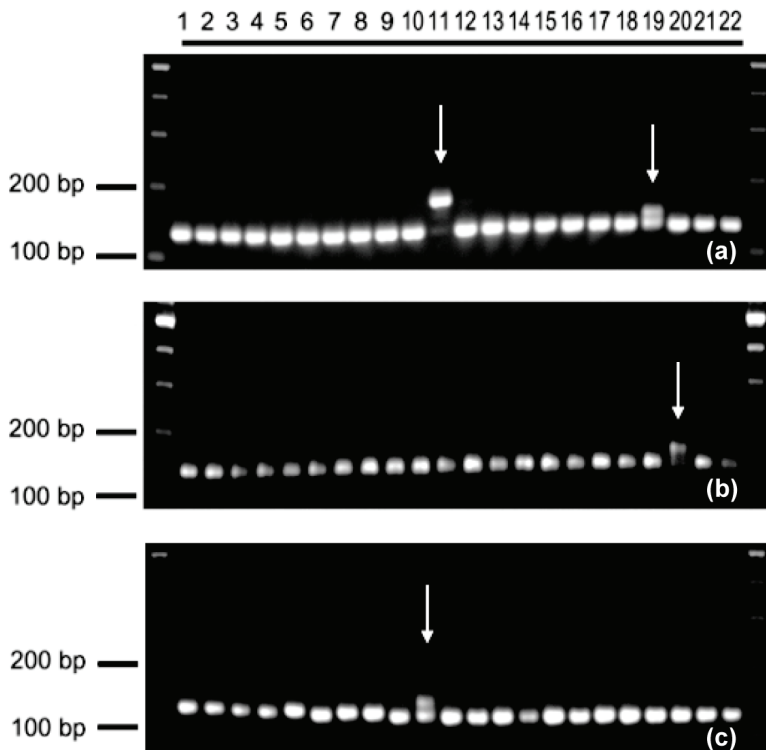


圖 2. 22 個 F1 雜交品種 SSR 基因座擴增產物，箭頭處顯示品種專一性樣式。Lane 1：寶冠；2：新冠；3：秀玲；4：抗病 610；5：新蘭；6：秀蓮；7：鳳蘭；8：澄蘭；9：新龍；10：金蘭；11：紅玲；12：蘭寶；13：花姑娘；14：甜美人；15：大朱蘭；16：華龍；17：慧玲；18：國光；19：華光；20：壽山；21：黛安娜；22：黑姑娘。

Fig. 2. Amplification fragments of SSR loci (a) WMM300, (b) WMM367, and (c) WMM373 in 22 cultivars. Arrow-heads indicated cultivar-specific patterns within twenty-two watermelon F1 cultivars. Lane 1: Golden Crown; 2: New Crown; 3: Showing; 4: Framers Giant; 5: New Orchid; 6: Xiu Lian; 7: New Queen; 8: Orange Orchid; 9: New Dragon; 10: Yellow Baby; 11: Red Delicious; 12: Grand Baby; 13: Famed Lady; 14: Sweet Beauty; 15: Big Orchid; 16: China Dragon; 17: Felling; 18: Kou Guang; 19: Hua Guang; 20: Shou Shan; 21: Diana; 22: La Belle.

### 引用文獻 (Literature cited)

- Aggarwal, R. K., P. S. Hendre, R. K. Varshney, P. R. Bhat, V. Krishnakumar, and L. Singh. 2006. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theor. Appl. Genet.* 114:359–372.
- Chen, C. X., P. Zhou, Y. A. Choi, S. Huang, and F. G. Gmitter Jr. 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theor. Appl. Genet.* 112:1248–1257.
- Council of Agriculture (COA). 2007. Yearly Report of Taiwan's Agriculture. COA, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 339 pp.
- Fernandez-Silva, I., I. Eduardo, J. Blanca, C. Esteras, B. Picó, F. Nuez, P. Arús, J. Garcia-Mas, and A. J. Monforte. 2008. Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 118:139–150.
- Hashizume, T., I. Shimamoto, and M. Hirai. 2003. Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon [*Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM & NAKAI] using RAPD, RFLP and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 106:779–785.
- Hawkins, L. K., F. Dane, T. L. Kubisiak, B. B. Rhodes, and R. L. Jarret. 2001. Linkage mapping in a watermelon population segregating for fusarium wilt resistance. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126:344–350.
- Jarret, R. L., L. C. Merrick, T. Holms, J. Evans, and M. K. Aradhya. 1997. Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai]. *Genome* 40:433–441.
- Joobeur, T., G. Gusmini, X. Zhang, A. Levi, Y. Xu, T. C. Wehner, M. Oliver, and R. A. Dean. 2006. Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or *Arabidopsis* genomes. *Theor. Appl. Genet.* 112:1553–1562.
- Levi, A., C. E. Thomas, T. Joobeur, X. Zhang, and A. Davis. 2002. A genetic linkage map for watermelon derived from a testcross population: (*Citrullus lanatus* var. *citroides* × *C. lanatus* var. *lanatus*) × *Citrullus colocynthis*. *Theor. Appl. Genet.* 105:555–563.
- Levi, A., A. Davis, A. Hernandez, P. Wechter, T. Trebitsh, J. Thimmapuram, T. Trebitsh, Y. Tadmor, N. Katzir, V. Portnoy, and S. King. 2006. Genes expressed during the development and ripening of watermelon fruit. *Plant Cell Rep.* 25:1233–1245.
- Ok, S., Y. S. Chung, B. Y. Um, M. S. Oark, J. M. Bae, S. J. Lee, and J. S. Shin. 2000. Identification of expressed sequence tags of watermelon (*Citrullus lanatus*) leaf at the vegetative stage. *Plant Cell Rep.* 19:932–937.
- Swarup, K. P., R. K. Anand, D. Vivek, K. S. Nagendra, and M. Trilochan. 2006. Unigene derived microsatellite markers for the cereal genomes. *Theor. Appl. Genet.* 112:808–817.
- Thiel, T., W. Michalek, R. K. Varshney, and A. Graner. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106:411–422.
- Wang, C. B., W. Z. Guo, C. P. Cai, and T. Z. Zhang. 2006. Characterization, development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Gossypium raimondii* Ulbrich. *Chinese Sci. Bull.* 51:557–561.
- Wang, J. Y., Y. M. Chang, B. K. Shen, Y. H. Wang, and P. C. Liou. 2005. Molecular markers derived from RAPD and ISSR analysis for identification of watermelon. *J. Taiwan Agric. Res.* 54:257–269. (in Chinese with English abstract)

# Exploitation and Characterization of EST-Derived Microsatellite Markers in Watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai]<sup>1</sup>

Jen-Ren Chen<sup>2</sup>, Hsin-Mei Ku<sup>3</sup>, Jau-Yeuh Wang<sup>2</sup>, and Min-Tze Wu<sup>2,4</sup>

## Abstract

Chen, J. R., H. M. Ku, J. Y. Wang, and M. T. Wu. 2009. Exploitation and characterization of EST-Derived Microsatellite Markers in Watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai]. J. Taiwan Agric. Res. 58:310–315.

Microsatellite or simple sequence repeats (SSRs) are molecular markers of choice for many genetic studies. The exploitation of SSR markers from cDNA and expressed sequence tag (EST) has been described for many plant species. These markers are important for genome mapping as well as variety identification. In this study, 546 SSR-containing sequences were identified from 8,584 *Citrullus lanatus* ESTs, retrieved from the NCBI dbEST database. A total of 585 EST-derived SSRs, with tri-nucleotide motifs most abundant among them, were obtained. Primer sequences flanking SSR motifs were successfully designed from 283 *C. lanatus* ESTs. Primers were tested for their ability to amplify SSR loci and polymorphism evaluated among commercial F1 cultivars. Approximately, 95% designed SSR primers were successfully used to amplify PCR products and 24 out of 269 SSR markers revealed polymorphisms among twenty-two watermelon cultivars. These EST-derived SSR markers could be a valuable resource for expanding *C. lanatus* SSR markers and may contribute to establishment of *C. lanatus* SSR genetic linkage map.

**Key words:** *Citrullus lanatus*, Watermelon, Microsatellite, Simple sequence repeat, Expressed sequence tag, Molecular marker.

---

1. Contribution No.2376 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: November 16, 2009.

2. Respectively, Assistant Agronomist, Assistant Horticulturist, and Senior Horticulturist and Director, Biotechnology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3. Assistant Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsin University, Taichung, Taiwan, ROC.

4. Corresponding author, e-mail: wu@tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.