

# 利用 RAPD 與 ISSR 分子標誌鑑定西瓜品種<sup>1</sup>

王昭月<sup>2,3</sup> 張有明<sup>2</sup> 沈百奎<sup>2</sup> 王毓華<sup>2</sup> 劉邦基<sup>2</sup>

## 摘 要

王昭月、張有明、沈百奎、王毓華、劉邦基。2005。利用 RAPD 與 ISSR 分子標誌鑑定西瓜品種。台灣農業研究 54:257-269。

農業試驗所新育成之西瓜新品種：台農六號 (2003 年)、台農七號 (2004 年)，以及經濟栽培種合計八個品種 (系)，利用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 與 ISSR (inter simple sequence repeat) 兩種分子標誌，進行不同品種指紋分析與品種間遺傳相似性之評估。試驗結果可自 9 個具再現性的 RAPD 引子反應，產生 127 個 RAPD 條帶 (band)，其中 93 個標誌條帶具多型性，多型性百分率為 73.2%；在 ISSR 分析中，18 個引子可產生 198 個條帶，其中 120 個為多型性標誌條帶，多型性百分率為 60.6%。針對八個栽培種之指紋分析，共篩選獲得 24 個 RAPD 標誌條帶，以及 37 個 ISSR 標誌條帶，可將不同栽培品種 (系) 完全鑑別。進一步將兩種分子標誌進行 UPGMA (un-weighted pair-group mean arithmetic) 之遺傳相似性分析，結果顯示以 RAPD 或 ISSR 分子標誌計算之遺傳相似性樹狀圖具有相近之趨勢。據 ISSR 分子標誌的 Dice 相似性係數估算，3 個經濟栽培種同群，其遺傳相似性係數為 0.58；農業試驗所新育成之西瓜台農六號、台農七號及其親本，則明顯另成一類，其遺傳相似性係數為 0.44；連鎖此兩群之遺傳相似性係數為 0.34。綜合觀之，RAPD 或 ISSR 兩種分子標誌均可應用於西瓜品種鑑定，皆為有效之指紋分析工具。

**關鍵詞：**西瓜、指紋分析、隨機增殖多型性 DNA、間帶簡單序列重複。

## 前 言

西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf.]，英名 Watermelon，俗名“水瓜”、“夏瓜”，為一年生蔓性草本植物，屬於葫蘆科 (Cucurbitaceae) 西瓜屬 (*Citrullus*)。西瓜染色體數  $2n=22$ ，原產於熱帶非洲。西瓜在中國有千年的栽培歷史，據史籍記載，“西瓜”名稱首見於唐朝末年 (約 946~953 年) 『新五代史四夷附錄』一書，此植物係由西方國家經絲綢之路引入中國。台灣西瓜栽培則來自大陸引入，1917 年已有栽培記錄。鑒於西瓜合適台灣溫暖氣候生長，1956 年在『農復會』 (今『行政院農業委員會』最前身機構) 支助下，農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所，開始進行有系統的品種改良工作，並育成

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2245 號。接受日期：94 年 12 月 16 日。

2. 本所園藝組助理研究員、副研究員、副研究員、助理研究員、研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。

3. 通訊作者，電子郵件：jywang@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23338162。

“富光”大西瓜、“鳳山一號”無子西瓜等優良品種(杜等 1993)。1968 年農友種苗公司成立,其生產的種苗種類中尤以西瓜品種著稱;迄今近四十年已育成六十餘種馳名中外的西瓜品種,包含國內常見的紅肉小西瓜(如:“黑美人”、“秀鈴”等),黃肉中小型西瓜(如:“金蘭”、“特小鳳”等),其中“金蘭”與“寶冠”兩品種皆獲得美國園藝品種比賽優勝(杜等 1993;林等 1998)。2003 至 2004 年間,農業試驗所再相繼推出兩個西瓜優良新品種:“台農六號-紅蜜”、“台農七號-小甜甜”。綜合觀之,目前台灣的西瓜育種技術與推出的優良新品種,足以稱冠於國際。而依據 2003 年農業生產年報統計,近三年國內西瓜栽培總面積均穩定維持於 15,000 公頃左右,位居台灣第一位的瓜類作物。

植物新品種智慧財產權的保護,是植物育種家成果的保障,可加速作物優良新品種的開發與經濟利用。國際間現有相關規範組織『植物新品種保護國際聯盟-UPOV (The International Union for the Protection of New Varieties of Plant)』,台灣目前亦完成『植物種苗法』,可用以管制植物新品種之申請與利用之權益。鑒於品種保護的目標,新穎植物品種之鑑別,也成為保障育種者權益的基本資料之一。新品種鑑別除利用傳統的植物性狀區別外,核酸層次的分子標誌也是近代一種正確且有效率的品種鑑定工具。William 等人 (1990)及 Welsh & McClelland (1991)提出操作簡單的 RAPD (random amplified polymorphic DNA)核酸分子標誌技術;此後已廣泛利用於番茄 (Klein-Lankhorst *et al.* 1991)、十字花科蔬菜 (Kresovich *et al.* 1992; Mailer *et al.* 1994)、馬鈴薯 (Demoke *et al.* 1996)、桃 (Chaparro *et al.* 1994)、菊花 (Wolff *et al.* 1995)、康乃馨 (Scovel *et al.* 1998)、梨 (Sharifani *et al.* 2000)、杏仁 (Martins *et al.* 2003)與水稻 (Wu *et al.* 2004)等多數農園藝作物,作為種原鑑別或特定性狀基因分析之研究。此外 RAPD 分子標誌亦可用於杏仁組織培養繁殖苗的遺傳穩定性分析 (Martins *et al.* 2004),以及茶樹組織培養苗之多倍體植株指紋分析 (Devarnumath *et al.* 2002)。

Tautz 等人 (1984)在真核生物的基因組上發現 1~6 個核苷酸之短序列重覆 (short tandem repeat),在不同的『物種』間具有明顯多型性表現。Condit & Hubbell (1991)、Akkaya 等人 (1992)、Lagercrantz 等人 (1993)及 Wang 等人 (1994)亦相繼發現此簡單序列重複 (simple sequence repeat, SSR)或稱之為微衛星 DNA (microsatellite DNA),也存在植物的基因組,且不同『種間』亦具有明顯的多型性表現。1993 年迄今,SSR 標誌技術也廣泛利用於玉米的種原分析 (Taramino & Tingey 1996),梨基因組圖譜之研究 (Yamamoto *et al.* 2002),以及水稻遺傳歧異度評估 (Saini *et al.* 2004)等。應用此微衛星 DNA 在植物物種內多型性的表現,Zietkiewicz 等人 (1994)另提出 SSR-anchored PCR 技術,用於進行基因組之指紋分析。此方式係利用生物基因組 SSR 重複序列(一般為 2 至 5 個重複性核苷酸序列),另於 5' 或 3' 端再加上一至三個寡核苷酸序列;以此為引子進行 PCR 反應,可擴增出含基因組上 SSR 區域鄰近之基因片段,具有高度的多型性,可用以鑑別物種。唯此種分子標誌較原 SSR 分子標誌技術更具簡便性,無須遷就 SSR 分析前必要建立之特定基因組的微衛星基因庫。1995 年 Kantety 等人以此核酸分子標誌技術,進行玉米遺傳歧異度分析,並稱之為 inter simple sequence repeat (ISSR)技術。往後 Charterers 等人 (1996)藉 ISSR 標誌作為油菜栽培種之鑑別,Prevost & Wilkinson (1999)以 ISSR 指紋分析技術作為馬鈴薯栽培種鑑定,Arnau 等人 (2002)利用 ISSR 分子標誌進行草莓栽培種快速鑑定,Mondal (2002)以 ISSR 標誌用於茶樹遺傳歧異度之評估,Terzopoulos 等人 (2005)也以 ISSR 分子標誌作為橄欖栽培種鑑定之用。此外,Leroy 等人 (2001)利用 ISSR 作為花椰菜組織培養苗基因穩定性之偵測,Scarano 等人 (2002)則以 ISSR 進行柑桔營養系四倍體之鑑別。本研究參考 Hawkins 等人 (2001)之西瓜 RAPD 分析,Levi 等人 (2001)之西瓜 ISSR 分子標誌分析,以及 Monte 等人 (2001, 2002)之梨 ISSR 分析技術,期配合本省西瓜新品種育成之鑑別與指紋分析的需求,建立西瓜新品種 DNA 指紋資料庫,以作為新品種鑑定之遺傳參考資料。

## 材料與方法

### 試驗材料

以農業試驗所 2003 年與 2004 年選育命名的紅肉小型西瓜新品種：“台農六號-紅蜜”與“台農七號-小甜甜”及其育種親本材料：“TW 537”、“TW 701”、“TW 518”；另以目前台灣經濟栽培之紅肉小型西瓜品種：“紅鈴”(Red Delicious)與“黑美人”(Dark Belle)，紅肉大西瓜品種“華寶”(China Baby)等三個經濟栽培品種作為對照；以上合計八個試驗樣品(表 1)，進行 DNA 指紋分析與品種(系)間遺傳相似性之評估。

### DNA 萃取

取 50~80mg 之八個試驗品系(表 1)的西瓜幼苗葉片為樣品，利用 DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN)，進行 DNA 萃取。萃取得之 DNA 以光電比色計 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 測定其比值為 1.6~1.9，並以 OD<sub>260</sub> 值計算 DNA 濃度，分別稀釋其濃度為 10 ng/μL，提供作為以下 RAPD 與 ISSR 分子標誌分析之聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 用 DNA 模版。

### RAPD 分子標誌分析

參考 Hawkins 等人 (2001) 西瓜 RAPD 分析，自 Operon Kit (B、C、F、K、L、W、Y) 引子，篩選出具再現性與多型性明顯的引子 9 個 (OPB12、OPB15、OPC12、OPF04、OPK14、OPL11、OPW02、OPW04、OPY15)，進行 8 個品系的 PCR 反應。反應液總體積為 10 μL，內含 0.5 μ Taq polymerase (Roche-FastStart)、1×PCR buffer (50 Tris/HCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH8.3)、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTP、0.2 μM 引子及 25 ng 模版 DNA。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9700，反應溫度條件設定如下：95°C 5 min；再進行 42 次的 95°C 45 sec，40°C 45 sec，72°C 1 min 30 sec；最後 72°C 10 min；反應完成後貯放於 4°C，以接續進行 PCR 產物之電泳。

表 1. RAPD 與 ISSR 分析用之西瓜材料及其特性

Table 1. Characteristics of watermelon cultivars (lines) used in the RAPD and ISSR analyses

Sample no.	Cultivar /line	Fruit weight (kg)	Fruit shape	Fruit color	Flesh color	Remark
1	Tainung no.6	4.5~5.5	Globe	Light-green rind with bluish black stripes	Red	Hybrid by ARI <sup>z</sup>
2	Tainung no.7	2.5~3.5	Elongated	Dark-green rind with indistinct stripes	Red	Hybrid by ARI <sup>z</sup>
3	TW537	4.5~6.0	Globe	Light-green rind with bluish black stripes	Red	Female parent of Tainung no.6
4	TW701	3.0~4.0	Elongated	Green rind with indistinct stripes	Red	Male parent of Tainung no.6 & no.7
5	TW518	2.5~3.5	Elongated	Dark-green rind with indistinct stripes	Red	Female parent of Tainung no.7
6	Red Delicious	2.0~3.0	Oblong	Light-green rind with netted stripes	Red	Commercial cultivar
7	China Baby	12~17	Oblong	Light-green rind with netted stripes	Red	Commercial cultivar
8	Dark Belle	2.5~3.5	Elongated	Dark-green rind with indistinct stripes	Red	Commercial cultivar

<sup>z</sup> ARI: Agricultural Research Institute, Taiwan.

### ISSR 分子標誌分析

ISSR 分析之引子取自 UBC SSR Primer Oligonucleotide Set100/9 (John Hobbs, NAPs Unit, University of British Columbia, Vancouver, V6T1Z3, Canada), 共計 100 支。PCR 反應液總體積為 25  $\mu$ L, 內含 1.25 u *Taq* polymerase (Roche-FastStart)、1  $\times$  PCR buffer [50 Tris/HCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, pH8.3]、2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ M dNTP、0.2  $\mu$ M 引子及 50 ng 模板 DNA。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9700, ISSR 分析之聚合酵素連鎖反應的溫度則設定為: 95°C 5 min; 再進行 42 次的 94°C 1 min, 53°C~58°C (依引子 T<sub>m</sub> 值調整) 1 min, 72°C 1 min 30 sec; 最後 72°C 10 min; 反應完成後貯放在 4°C, 接續進行產物之 DNA 電泳。

### DNA 電泳

經 RAPD 或 ISSR 分析之 PCR 反應產物 10  $\mu$ L 加入 6 倍電泳追蹤染劑 (6  $\times$  loading buffer: 0.25% bromophenol blue 及 xylene cyanol, 40% w/v sucrose), 以 1.5% 的 agarose, 以 0.5X TBE buffer (40 mM Tris acetate, pH 8.0; 1 mM EDTA) 進行 DNA 電泳。電泳槽為 BIO-RAD SUB CELL GT, 電壓 100 V, 電泳時間約 100 min, 結束後置於 0.5 mg/ml 的 ethidium bromide 中染色 20 min, 並退染約 15 min; 再置於 UV 光箱中, 檢視膠體上 DNA 多型性片段, 並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation), 提供進行以下 DNA 條帶之資料分析。

### PCR 產物之群集(cluster)分析

群集分析是採用 Gel-Compar II, Version 3.5 軟體 (Applied Meth, Kortrijk, Belgium), 計算兩兩品系間所有分析的 RAPD 或 ISSR 條帶中相同條帶的比率。所有樣品兩兩分析後, 以 UPGMA 估算相似性程度。PCR 產物的 DNA 片段係以 Gen100 DNA Ladder (3,000 bp~100 bp) 作為估算分子量之標準。並以 Dice's 相似性係數進行分析, 相似性係數值 (simple matching coefficient) 的計算方式為  $F=2n_{xy}/n_x+n_y$ 。n<sub>x</sub> 及 n<sub>y</sub> 分別代表 X 及 Y 品系的所有多型性 DNA 片段, n<sub>xy</sub> 則表示 X 及 Y 品系間都共有的片段數 (simple matching coefficient, Nei & Li 1979), 以此於 Digital 個人電腦進行 UPGMA 群體分析, 並估算不同品種 (系) 間之遺傳相似程度 (similarity coefficient), 及品系間遺傳關連性之樹狀圖 (Dendrogram)。

## 結 果

### 西瓜之 RAPD 分子標誌分析

自 PCR 產物多型性表現明顯的 RAPD 引子: OPB12、OPB15、OPC12、OPF04、OPK14、OPL11、OPW02、OPW04 及 OPY15, 進行 8 個品系的指紋分析之結果, 顯示以 OPF04 產物最多, 有 18 個條帶 (band), 其中多型性條帶為 16 個。OPF04 對於八個品種 (系) 具有指紋分析效用, 藉 16 個多型性條帶可將八個品種 (系) 完全區分 (表 2、圖 1)。總計 9 個 RAPD 引子共可產生 127 個 RAPD 條帶, 其中 93 個條帶有多型性, 多型性百分率為 73.2%, 平均每個引子可產生 14 個 RAPD 條帶, 多型性產物平均為每引子 10 個條帶; 產物的 RAPD 條帶之分子量大小則介於 237 bp 至 3,863 bp (表 2)。另篩選品種 (系) 鑑定之特定 RAPD 標誌條帶顯示, 可提供作為西瓜 “台農七號” 鑑定用之標誌條帶最多, 合計有 6 個引子 8 個條帶可鑑別之; 其次為 “Dark Belle”, 計有 4 個引子 5 個條帶可鑑別之 (表 3)。除了 “TW 701” 外, 其餘 7 個品種 (系) 均有特定的 RAPD 標誌條帶, 以作為特定品種鑑定之用; 唯 “TW 701” 雖無品種獨有的條帶, 但以 OPF04 引子進行 PCR 之產物, 仍可藉著 16 個多型性的條帶, 與其他品種予以區別 (表 3)。

表 2. 西瓜 RAPD 分子標誌分析之引子及其 PCR 產物

Table 2. RAPD primers used in analysis of watermelon cultivars (lines), and the products of PCR amplification

Primer code	Products size (bp)	No. of bands	No. of polymorphic bands	Polymorphism (%)	No. of distinguishable patterns
OPB12	387~3,156	15	9	60.0	-
OPB15	237~3,298	12	6	50.0	3
OPC12	351~1,955	11	9	81.8	2
OPF04	379~2,867	18	16	88.9	8
OPK14	554~3,863	12	7	58.3	2
OPL11	475~3,257	17	15	88.2	4
OPW02	408~2,984	14	7	50.0	4
OPW04	436~2,755	16	15	93.8	3
OPY15	431~2,712	12	9	75.0	3
Total		127	93	73.2	
Mean		14	10		

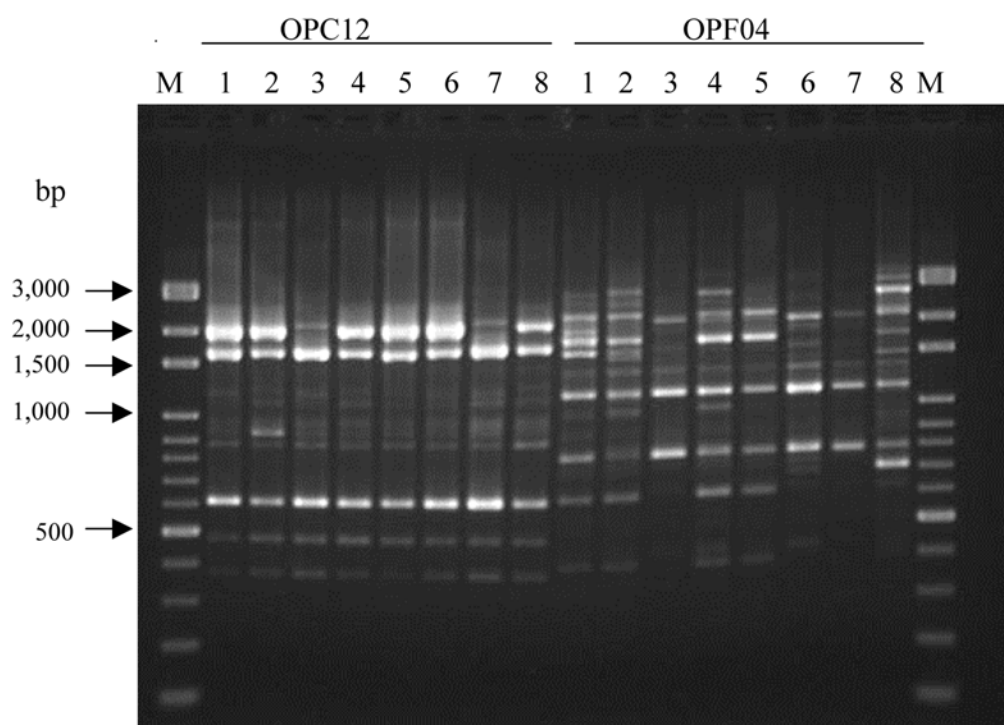


圖 1. 西瓜以 OPC12 及 OPF-04 引子擴增之 RAPD 分析圖譜。

Fig. 1. Amplification profile of 8 cultivars (lines) of watermelon using OPF04 and OPC12 as RAPD primers. The lane numbers are the same as the sample no. indicated in Table1. M: Gen100 DNA Ladder.

將 9 個 RAPD 引子的產物 127 個 RAPD 條帶，合併進行 Dice's UPGMA 群集分析，結果顯示供試的八個品種 (系) 分成兩群，兩群集間之遺傳相似性係數為 27.5% (圖 2)；第一群為農試所雜交新品種及其育種親本，其中農試所選育命名的台農六號、台農七號相似性係數為 64.8%，雜交育種親本 TW 537、“TW 701”、“TW 518”三品系相似性係數為 45.5%；連鎖親本與雜交品種 5 個樣品為同一群，其相似性係數為 38.0%。另外，三個經濟栽培種則聚集成另一群，其相似性係數為 45.4%，其中“Red Delicious”與“China Baby”較為相近，遺傳相似性係數為 77.5% (圖 2)。

### 西瓜之 ISSR 分子標誌分析

自 UBC ISSR Primer Oligo-nucleotide Set100/9 的 100 支引子中篩選有明顯多型性表現的 ISSR 引子 18 個，其中 di-nucleotide, 3' anchored 引子 10 個 (UBC807, 809, 810, 817, 818, 826, 827, 835, 845, 857)，tri-nucleotide motif 2 個 (UBC866, 868)，tetra-nucleotide motif 2 個 (UBC873, 874)，penta-nucleotide motif 2 個 (UBC880, 881)，以及 di-nucleotide, 5' anchored 引子 2 個 (UBC888, 889) (表 4)。八個西瓜品種指紋分析結果顯示，以 UBC826 引子的產物以及擴增的 DNA 多型性條帶最多，分別為產物 20 個條帶，以及 18 個多型性條帶；且具有指紋分析之效 (表 4、圖 3)。合計 18 個 ISSR 引

表 3. 鑑別西瓜栽培品種(系)之 RAPD 標誌

Table 3. RAPD markers for differentiating watermelon cultivars (lines)

Cultivar/line	Primer: <u>revealing specific band (bp)</u>
Tainung No.6	OPW02: <u>839</u>
Tainung No.7	OPC12: <u>926</u> ; OPF04: <u>2340</u> ; OPK14: <u>554</u> ; OPL11: <u>956, 2721</u> ; OPW04: <u>910</u> ; OPY15: <u>2010, 686</u>
TW537	OPL11: <u>2779</u> ; OPW04: <u>2755, 1304, 555</u> ; OPY15: <u>1525</u>
TW701	—
TW518	OPB15: <u>2050, 671</u> ; OPY15: <u>1143</u>
Red Delicious	OPF04: <u>1576</u>
China Baby	OPL11: <u>600</u>
Dark Belle	OPF04: <u>2867, 709</u> ; OPK14: <u>907</u> ; OPL11: <u>1056</u> ; OPW04: <u>1934</u>

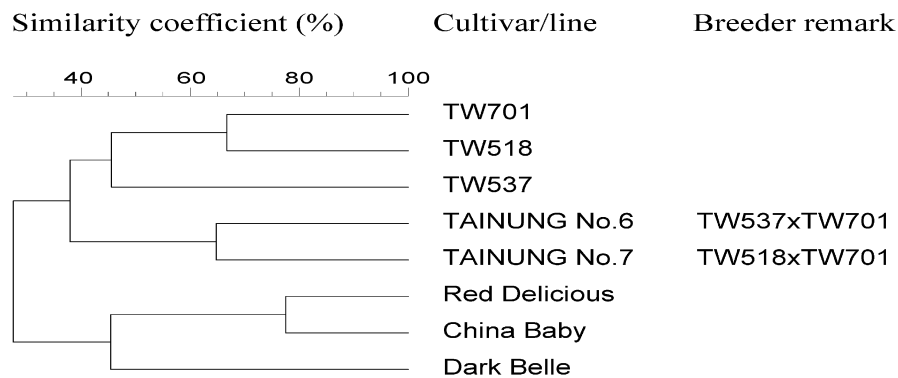


圖 2. 西瓜八個栽培品種(系)綜合 9 個 RAPD 引子，經 UPGMA Dice's 計算之相似性樹狀圖。

Fig. 2. Dendrogram of 8 cultivars (lines) of watermelon based on PCR products with 18 ISSR using UPGMA as the clustering method.

表 4. 西瓜 ISSR 分子標誌分析之引子及 PCR 產物

Table 4. List of ISSR primers used in 8 cultivars (lines) of watermelon, and the products of PCR amplification

Primer code	Sequence 5'→3'	Products size (bp)	No. of bands	No. of polymorphic bands	Polymorphism (%)	No. of distinguishable patterns
UBC807	(AG) <sub>8</sub> T	323~2,037	10	5	50.0	-
UBC809	(AG) <sub>8</sub> G	413~2,116	15	13	86.7	2
UBC810	(GA) <sub>8</sub> T	537~1,583	5	1	20.0	1
UBC817	(CA) <sub>8</sub> A	534~2,775	5	2	40.0	-
UBC818	(CA) <sub>8</sub> G	435~3,340	11	10	90.9	6
UBC826	(AC) <sub>8</sub> C	295~3,280	20	18	90.0	8
UBC827	(AC) <sub>8</sub> G	484~2,939	12	11	91.7	5
UBC835	(AG) <sub>8</sub> YC <sup>z</sup>	248~2,801	12	4	33.3	-
UBC845	(CT) <sub>8</sub> RG	460~3,487	6	3	50.0	2
UBC857	(AC) <sub>8</sub> YG	326~3,544	10	8	80.0	1
UBC866	(CTC) <sub>6</sub>	437~3,364	10	6	60.0	1
UBC868	(GAA) <sub>6</sub>	250~1,286	8	0	0.0	1
UBC873	(GACA) <sub>4</sub>	566~3,180	19	13	68.4	5
UBC874	(CCCT) <sub>4</sub>	949~3,372	10	3	32.0	1
UBC880	(GGAGA) <sub>3</sub>	237~2,439	14	10	71.4	3
UBC881	(GGGTG) <sub>3</sub>	460~3,587	12	10	83.3	4
UBC888	BDB(CA) <sub>7</sub>	332~2,787	9	1	11.1	1
UBC889	DBD(AC) <sub>7</sub>	309~2,738	10	2	20.0	2
Total			198	120	60.6	
Mean			11	6.7		

<sup>z</sup> Y:(C,T); B:(C,G,T); D:(A,G,T).

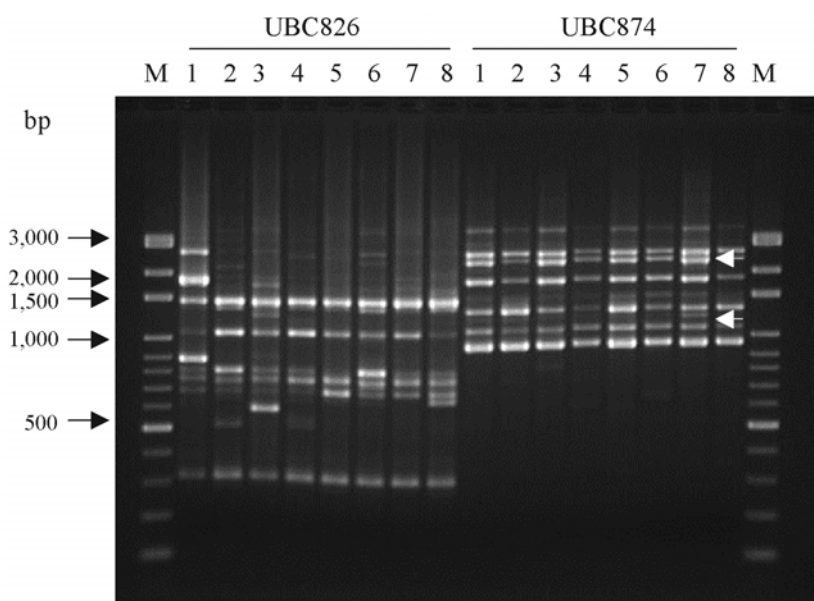


圖 3. 西瓜以 UBC826 及 UBC874 引子擴增之 ISSR 分析圖譜。

Fig. 3. Amplification profile of 8 cultivars (lines) of watermelon using UBC826 and UBC874 as ISSR primers. The lane numbers are the same as the sample no. indicated in Table1. M: Gen100 DNA Ladder.

子，可產生 198 個條帶，其中 120 個條帶有多型性，多型性比率為 60.6%；平均每個 ISSR 引子，可產生 11 個條帶，多型性條帶為 7 個；產物（條帶）的分子量大小則介於 348 bp 至 3,587 bp 之間（表 4）。進一步篩選品種（系）鑑定專用的特定 ISSR 標誌條帶結果顯示，可提供作為西瓜“台農六號”鑑定用之標誌條帶最多，合計有七個引子 10 個條帶可鑑別之；其次為“China Baby”，計有六個引子 8 個條帶可鑑別之（表 5）。ISSR 標誌分析結果，供試的八個品種（系）均可獲得特定的 ISSR 標誌條帶，可作為特定品種鑑定之用，合計有 37 個 ISSR 的標誌條帶可供作品種鑑定之用（表 5）。

將 18 個 ISSR 引子進行 PCR 產生的 198 個條帶，合併以 Dice's UPGMA 群集分析之結果，其樹狀圖（dendrogram）與 RAPD markers 結果相近（圖 2、圖 4）。ISSR markers 分析下，供試的八個品種（系）亦可分成兩群，其遺傳相似性係數為 37.7%（圖 4），其中第一群為農試所選育的“台農六號”、“台農七號”，以及其雜交育種親本“TW 537”、“TW 701”、“TW 518” 5 個樣品，遺傳相似性係數為 44.5%；另外，三個經濟栽培種則集聚成另一群，三樣品間遺傳相似性係數為 57.7%，其中“Red Delicious”與“China Baby”較為相近，相似性係數為 68.4%（圖 4）。

表 5. 鑑別西瓜栽培品種(系)之 ISSR 標誌

Table 5. ISSR markers for differentiating watermelon cultivars (lines)

Cultivar/line	Primers: revealing specific band (bp)
Tainung No.6	UBC826: 896, 1815; UBC827: 1288, 2939; UBC835: 1033; UBC857: 968, 1817; UBC866: 1122; UBC873: 752; UBC880: 938
Tainung No.7	UBC826: 2133; UBC873: 672; UBC880: 899
TW537	UBC809: 503; UBC818: 435; UBC826: 591, 1237, 1728; UBC827: 742, 1238; UBC889: 309
TW701	UBC866: 437, 555
TW518	UBC866: 886
Red Delicious	UBC880: 1591
China Baby	UBC807: 357; UBC818: 1296; UBC873: 1378 ; UBC874: 2791, 1196; UBC881: 460, 1018; UBC888: 367
Dark Belle	UBC818: 1017, 2665; UBC826: 616; UBC881: 560

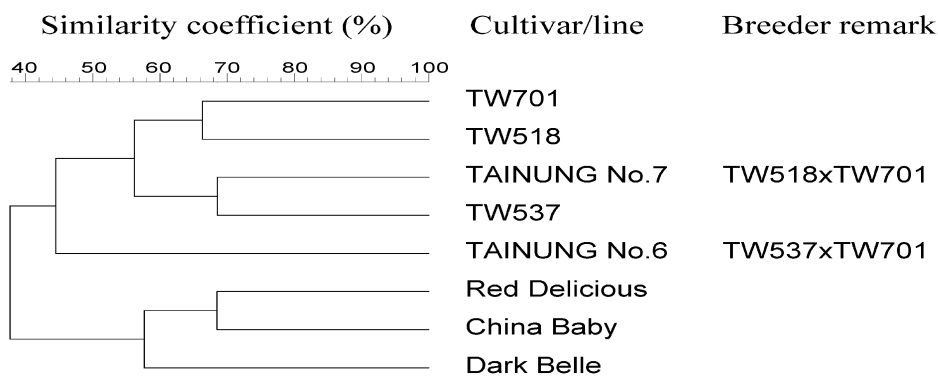


圖 4. 西瓜八個栽培品種(系)綜合 18 個 ISSR 引子，經 UPGMA Dice's 計算之相似性樹狀圖。

Fig. 4. Dendrogram of 8 cultivars (lines) of watermelon based on PCR products with 18 ISSR using UPGMA as the clustering method.



## 討 論

近代 PCR 分析技術快速發展，對於植物品種的指紋分析或遺傳特性篩檢，具有極大的幫助。Hashizume 等人 (1996) 以 RAPD 分子標誌構築西瓜基因組連鎖圖譜，並發現部分 RAPD 標誌可用於鑑定外果皮顏色性狀。Hawkins 等人 (2001) 亦利用 RAPD 分子標誌，進行西瓜雜交後代 F3 世代的果實性狀遺傳分析，找出與西瓜果形、果重、果肉色、種子大小、種子顏色等相關連之 RAPD 標誌。本研究結果亦證實，以 RAPD 分子標誌可應用於西瓜栽培種之鑑定，且具指紋分析之效 (圖 1)。綜合所有 RAPD 分子標誌，經 Dice's UPGMA 運算所構築之樹狀圖，則發現具有育種譜系關聯的 5 個樣品，呈現連鎖於同一群之趨勢；而對照之經濟栽培種則另集聚為一群。故 RAPD 分子標誌除用於品種或特定遺傳性狀鑑別外，亦可用於育種之親緣關係分析，以及種原遺傳相似性之評估。

Wang 等人 (1994) 在微衛星 DNA 分子標誌分析研究上，發現植物基因組的簡單序列重複 (simple sequence repeat, SSR) 中，以兩個核苷酸序列重複 (di-nucleotide motif) 較為普遍，其他一個、三個、四個核苷酸序列重複 (mono-nucleotide motif; tri-nucleotide motif; tetra-nucleotide motif)，發生頻度則偏低，此與本研究的 ISSR 分子標誌分析結果相吻合。本研究中，自 100 支 ISSR 引子中篩選得 18 支具多型性產物的引子，其中 di-nucleotide motif 的引子就佔有 7 支 (表 4)，故未來 ISSR 引子設計，可參考植物基因組以 di-nucleotide motif 為主，提供品種及遺傳特性分析之用。

比較 RAPD 與 ISSR 兩種 DNA 分子標誌在西瓜品種鑑定上的效率，發現兩者可獲相近的結果。儘管 RAPD 標誌較易發生『再現性』低的問題，但只要留意操作流程條件的一致性，嚴格控管 PCR 反應步驟，即可提高產物的再現性，故仍不失為一種理想的品種鑑定工具 (Micheli *et al.* 1994)。早期利用微衛星 DNA 進行作物基因組分析前，必須對該作物的 SSR 基因序列詳知，再以此設計兩端一組的專一引子對，以確保可正確地擴增此重覆序列增殖；故應用於植物育種時，較費事且鑑定成本相對提高。目前利用 ISSR (inter-simple-sequence-repeat) 分析，可用於快速鑑別遺傳上極相似的種原，且無須知道該基因組的 SSR 序列；故近十年間，ISSR 分析技術已被視為一種簡便、低成本且有效率的分子標誌，可直接利用於大量樣品的指紋鑑定或特定基因之研究 (Fang & Roose, 1997)。唯分子遺傳研究人員普遍性認為 ISSR 標誌較優於 RAPD 的再現性，可能由於 ISSR 分析的引子序列多為 16 至 22 個核苷酸，RAPD 的引子則為 10 至 12 個核苷酸；故一般而言 ISSR 進行 PCR 的鍊合溫度 (annealing temperature) 為 50°C 至 60°C，明顯高於 RAPD 的 35°C 至 40°C，因此 ISSR 產物的嚴格性與再現性表現較佳 (Pasqualone *et al.* 2001)。綜合觀之，RAPD 與 ISSR 兩種分子標誌除可作為育種材料親緣關係之估算，以助於提升育種效率；並可應用於西瓜品種鑑定，保護作物育種者之權益。

## 誌 謝

本研究經費承農委會 94 農科-5.1.4-農-C6 計畫補助，並感謝計畫雇用人員陳小萍小姐與林美君小姐協助試驗分析，謹致謝忱。

## 引用文獻

- 杜金池、蕭吉雄、楊偉正。1993。台灣蔬菜產業演進四十年專集。台灣省農業試驗所專刊第 36 號。418 pp.
- 林俊義、蕭吉雄、楊偉正。1998。蔬菜育種技術研習會專刊。台灣省農業試驗所特刊第 73 號。400 pp.

- Akkaya, M. S., A. A. Bhagwat, and P. B. Cregan. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genet.* 132:1131-1139.
- Arnau, G., J. Lanllemand, and M. Bourgoïn. 2002. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica* 129:69-79.
- Chaparro, J. X., D. J. Werner, D. O'Malley, and R. R. Sederoff. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.* 87: 805-815.
- Charterers, Y. M., A. Robertson, M. J. Wilkinson, and G. Ramsay. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor. Appl. Genet.* 92:442-447.
- Condit, R. and S. P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34:66-71.
- Demoke, T., D. R. Lynch, L. M. Kawchuk, G. C. Kozub, and J. D. Armstrong. 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Cell Rep.* 15:662-667.
- Devarnumath, R. M., S. Nandy, V. Rani, S. Marimuthu, N. muraleedharan, and S. N. Raina. 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* spp. Assamica (Assam-India type). *Plant Cell Rep.* 21:166-173.
- Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:408-417.
- Hashizume, T., I. Shimamoto, I. Y. Harushima, M. Yui, T. Sato, T. Imai, and M. Hirai. 1996. Construction of a linkage map for watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica* 90:265-273.
- Hawkins, L. K., F. Dane, and T. L. Kubisiak. 2001. Molecular markers associated with morphological traits in watermelon. *HortScience* 36(7):1318-1322.
- Kantety, R. V., X. Zeng, J. L. Bennetzen, and B. E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breeding* 1:365-373.
- Klein-Lankhorst, R. M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, and P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83:108-114.
- Kresovich, S., J. G. K. Williams, J. R. McFerson, E. J. Routman, and B. A. Schaal. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85:190-196.
- Lagercrantz, U., H. Ellegren, and L. Andersson. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plant and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21:1111-1115.
- Leory, X. J., K. Leon, J. M. Hily, and P. Chaumeil. 2001. Detection of in vitro culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. *Theor. Appl. Genet.* 102:885-891.

- Levi, A., C. E. Thomas, X. P. Zhang, T. Joobeur, R. A. Dean, T. C. Wehner, and B. R. Carle. 2001. A genetic linkage map for watermelon based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126(6):730-737.
- Mailer, R. J., R. Scarth, and B. Fristensky. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 697-704.
- Martins, M., R. Tenreiro, and M. M. Oliveira. 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep.* 22:71-78.
- Martins, M., D. Sarmento, and M. M. Oliveira. 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep.* 23:492-496.
- Micheli, M. R., R. Bova, E. Pascale, and E. D'Ambrosio. 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res.* 22:1921-1922.
- Mondal, T. K. 2002. Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by inter simple sequence repeat polymerase chain reaction. *Euphytica* 128:307-315.
- Monte Corvo, L., L. Goulao, and C. Oliveira. 2001. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126(5):517-522.
- Monte Corvo, L., L. Goulao, C. Oliveira, and L. Corelli Grapadeli. 2002. Discrimination of pear cultivars with RAPD, AFLP and ISSR. *Acta Hortic.* 596:187-191.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A.* 76:5269-5273.
- Pasqualone, A., F. Caponio, and A. Blanco. 2001. Inter simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* 213:240-243.
- Prevost, A. and M. J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.
- Saini, N., N. Jain, S. Jain, and R. K. Jain. 2004. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. *Euphytica* 140:133-146.
- Scarano, M. T., L. Abbate, S. Ferrante, and S. Lucretti. 2002. ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Rep.* 20:1162-1166.
- Scovel G., H. Ben-Meir, M. Ocadis, H. Itzhaki, and A. Vainsein. 1998. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. *Theor. Appl. Genet.* 96:117-122.
- Sharifani, M. N., J. F. Jackson, M. Geible, M. Fischer, and C. Fischer. 2000. Characterization of pear species and cultivars using RAPD primers. *Acta Hortic.* 538(2):499-504.
- Taramino, T. and S. Tingey. 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39:227-287.
- Tautz, D. and M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12:4127-4138.

- Terzopoulos, P. J., B. Kolano, P. J. Bebeli, P. J. Kaltsikes, and I. Metzidakis. 2005. Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Sci. Hortic.* 105:45-51.
- Wang, Z., J. L. Weber, G. Zhong, and S. D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88:1-6.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Res.* 19:5275-5279.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Wolff K., E. Zeitkiewicz, and H. Hofstra. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor. Appl. Genet.* 91:439-447.
- Wu C. J., Z. Q. Cheng, X. Q. Hung, S. H. Yin, K. M. Cao, and C. R. Sun. 2004. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunun of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of the endangered species. *Plant Sci.* 167:35-42.
- Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, T. Imai, T. Saito, Y. Sawamura, K. Kotobuki, T. Hayashi, and N. Matsuta. 2002. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theor. Appl. Genet.* 106:9-18.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

# Molecular Markers Derived from RAPD and ISSR Analysis for Identification of Watermelon<sup>1</sup>

Jau-Yeuh Wang<sup>2,3</sup>, You-Ming Chang<sup>2</sup>, Bor-Kwei Shen<sup>2</sup>,  
Yu-Hua Wang<sup>2</sup> and Pan-Chi Liou<sup>2</sup>

## Summary

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.

RAPD and ISSR markers were obtained for eight watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf.] cultivars (lines) including two hybrids [Tainung No. 6 and Tainung No. 7 bred at Agricultural Research Institute (ARI)] for fingerprinting and assessment of their genetic relationship. Nine reproducible RAPD primers generated 127 fragments, among which 93 were polymorphic bands (polymorphism 73.2%). Eighteen ISSR primers yielded 198 ISSR fragments, of which 120 were polymorphic bands (polymorphism 60.6%). Fingerprinting analysis showed that 24 genotype specific RAPD markers and 37 specific ISSR markers were sufficient to differentiate these cultivars (lines). The genetic relationship and genetic similarity between cultivars (lines) were estimated using Dice coefficient of similarity of all of the ISSR or RAPD markers. Based on UPGMA (un-weighted pair-group mean arithmetic), the pedigree information and the dendrogram of these two markers were similar. Analysis of the similarity coefficient of ISSR markers revealed that three commercial cultivars with a genetic similarity of 0.58 belonged to a cluster different from the cluster of two hybrids with genetic similarity 0.44. These two groups had genetic similarity coefficient value of 0.34. It is suggested that both RAPD and ISSR could be utilized as a reliable tool for the fingerprinting and assessment of the genetic relationship of watermelon cultivars.

**Key words:** Watermelon, Fingerprinting, RAPD (random amplified polymorphic DNA), ISSR (inter simple sequence repeat).

- 
1. Contribution No.2245 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 16, 2005.
  2. Assistant Horticulturist, Associate Horticulturist, Associate Horticulturist, Assistant Horticulturist and Senior Horticulturist, respectively Horticultural Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
  3. Corresponding author, e-mail: jywang@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23331720.