

利用 SSR 標誌進行西瓜雜交種之檢測

王昭月¹ 吳明哲^{2,*}

摘要

王昭月、吳明哲。2015。利用 SSR 標誌進行西瓜雜交種之檢測。台灣農業研究 64(1):45–52。

一代雜交種檢測是商業種子生產的重要品管工作，以生育特性 (grow out test; GOT) 作為檢定模式，是目前種苗業界經常使用的方法，但此方式容易受制於氣候環境而呈現較大的變化與誤差；又利用外觀特性的檢定方式，既耗時且需要較大的栽培空間與人力。本研究目的為開發專一性與共顯性分子標誌，應用於西瓜雜交種親本和雜交種之檢測。試驗結果，自 22 個西瓜商業品種篩選組成 24 個核心簡單序列重複 (simple sequence repeat; SSR) 標誌，其中 3 個關鍵性 SSR 標誌，經測試可適用於 2 個外銷採種的西瓜雜交種之檢測。相較於傳統 GOT 檢定需要 2 個月以上的時程，SSR 標誌較方便於早期進行雜交種子遺傳純度檢測之應用。

關鍵詞：西瓜、簡單序列重複、雜交種檢測。

前言

作物品種純度檢測是種子生產流程中品質管控與信譽維護的重要工作。台灣外銷蔬菜一代雜交種子生產種類以葫蘆科作物：西瓜、甜瓜；茄科作物：番茄、番椒；十字花科蔬菜：花椰菜等為最大宗，目前業者主要採用傳統 grow-out test (GOT) 方式，進行品種純度之檢定。此依據外觀性狀的檢查方式，需要較大的栽培空間和人力，檢測時程較長且成本花費相對也較高；又易受季節氣候和環境限制，造成判讀困難或準確性不穩定。近 30 年間，分子生物分析技術進步神速，已建立多種分子標誌，包含蛋白質分子標誌與核酸層次的 DNA 分子標誌等，在農業上可應用分子標誌 (markers) 作為品種鑑定 (Gong & Deng 2010)、種原遺傳歧異度分析 (Mujaju *et al.* 2010)、遺傳純度分析 (Ballester & Vicente 1998; Crockett *et al.* 2000; Liu *et al.* 2007) 以及建構連鎖圖譜輔助選種 (Hashizume *et al.* 1996; McCouch *et al.* 2002)。以 DNA 分子標誌進行遺傳分

析具有以下特質：(1) 直接以核酸作為分析樣品，在各個組織、各個發育時期均可檢測，不受季節、環境限制。(2) 分子標誌種類眾多，可提供多標誌之鑑定比對 (Jang *et al.* 2004; Mujaju *et al.* 2010)。(3) 高度多型性的分子標誌，可延伸作為種間或種內種原鑑定之應用 (Wöhrmann & Weising 2011)。(4) 透過共顯性分子標誌 (co-dominance marker)，可鑑別出同質基因型或雜合基因型，特別適合雜交種之鑑定；尤其以 PCR (polymerase chain reaction) 技術為基礎的簡單重複序列 (simple sequence repeat; SSR) 標誌 (Condit & Hubbell 1991; Wang *et al.* 1994; Kumpatla & Mukhopadhyay 2005)，僅需微量 DNA 且分析方法簡便，目前已應用於花椰菜 (Ida *et al.* 2008) 及水稻 (Komori & Nitta 2004) 等作物的 F₁ 純度之快速鑑定。

本研究目的係針對台灣重要外銷採種作物西瓜一代雜交種之檢測，期望建立精確、簡便的 DNA 檢測平台，篩選可實務應用且兼具穩定性的分子標誌，提供國內種苗業界進行親本

投稿日期：2014 年 7 月 31 日；接受日期：2014 年 11 月 28 日。

* 通訊作者：wu@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

純度檢定，或 F_1 品種純度之快速檢測。藉此開發完成的分子標誌與 DNA 檢定流程，亦可進一步透過產學合作或將相關技術直接轉移至種苗業者，提升台灣蔬菜種苗產業在國際市場之競爭力。

材料與方法

植物材料與 DNA 萃取

22 個西瓜 (*Citrullus lanatus*) 重要商業品種：涵蓋 8 個紅肉大西瓜 (果重 ≥ 7 kg) 品種；14 個中小型西瓜 (果重 3–6 kg) 品種，包含 9 個紅肉品種和 5 個黃肉品種。22 個供試材料的果實特性詳見表 1。上述 22 個樣品分別取葉片 0.2 g，參考 Iqbal *et al.* (1995) 方法進行 genomic DNA 萃取，提取的 DNA 量

以 NANODROP 1000 (Thermo Scientific) 測定，選定 OD260/OD280 值 1.7–1.9 者為分析用樣品；DNA 濃度定量為 $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ，提供作為 SSR 分析用模板 DNA。另取得 3 家西瓜採種業界 3 個待測試的雜交組合，包括父母本 (DM、DP；YM、YP；MM、MP) 及一代雜交種 (DF、YF、MF) 標準品之 DNA，進行核心 SSR 分子標誌之測試，並建立關鍵性多型性分子標誌。

EST (expressed sequence tag) 之 SSR 序列與引子設計

利用 NCBI GenBank 之西瓜屬 (*Citrullus*) EST 序列資訊庫，以 Simple Sequence Repeat Identification Tool (Temnykh *et al.* 2001) 搜尋完全 SSRs 序列 (perfect simple sequence re-

表 1. 提供 SSR 分析的 22 個西瓜樣品及其果實特性。

Table 1. The samples of watermelon and their fruit characteristics used in the simple sequence repeats (SSRs) analysis.

Variety	Fruit weight (kg)	Fruit shape	Fruit color	Flesh color
Golden crown	2.5	Oblong	Yellow	Red
New crown	3	Globe	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Showing	2–3	Oblong	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Farmers Giant	10–15	Elongated	Light-green rind with netted stripes	Red
New Baby	3–4	Globe	Green rind with bluish black stripes	Orange
iu-Lian	5	Globe	Dark green rind with bluish black stripes	Yellow
Feng-Lan	2.5	Oblong	Light-green rind with bluish black stripes	Orange
Cheng-Lan	3	Oblong	Light-green rind with bluish black stripes	Orange
New Dragon	9–12	Elongated	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Yellow Baby	4–5.5	Globe	Green rind with bluish black stripes	Yellow
Charming Belle	2–3	Oblong	Light-green rind with indistinct stripes	Red
Lan-Bao	7	Globe	Dark green rind with bluish black stripes	Red
Hua-Gu-Niang	3–5	Oblong	Light-green rind with indistinct stripes	Red
Tian-Mei-Ren	3–4	Elongated	Green rind with bluish black stripes	Red
Giant Pink Orchind	3–5	Oblong	Light-green rind with indistinct stripes	Red
China Dragon	10–12	Oblong	Green rind with bluish black stripes	Red
Hui-Ling	5	Oblong	Green rind with bluish black stripes	Red
Flower Dragon	10	Globe	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Hua-Guang	12–15	Oblong	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Shou-Shan	12	Oblong	Dark green rind with bluish black stripes	Red
Diana	3	Elongated	Yellow	Red
La Belle	10	Elongated	Dark-green rind with indistinct stripes	Red

peats)，篩選條件為 2 個核苷酸以上的基序 (motif) 且重複次數 5 個以上，取得候選 SSR 序列後涵蓋側翼序列 (flanking sequence)，再利用 primer 3 (Rozen & Skaletsky 2000) 進行引子設計。primer 3 引子設計條件設定為長度 18–20 bp， T_m $60^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ ，GC% 為 60% \pm 20%；預期 PCR 產物範圍 100–400 bp。

PCR (polymerase chain reaction) 與電泳分析

PCR 反應液體積為 25 μL ：包含 DNA 50 ng、1U *Taq* polymerase (Hot Fire, Solis Biodyne)、1 \times PCR buffer、2.0 mM MgCl_2 、200 μM dNTP 及引子 0.4 μM ，反應引子則利用上述 NCBI 核酸資料庫序列所設計的 SSR 引子組進行之。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9700，反應溫度設定為：95 $^\circ\text{C}$ 、12 min；接續 95 $^\circ\text{C}$ 、1 min，55 $^\circ\text{C}$ 、1 min，72 $^\circ\text{C}$ 、1 min 30 s，35 個循環；最後 72 $^\circ\text{C}$ 、8 min。反應完成後保持於 4 $^\circ\text{C}$ 。

取 PCR 產物 10 μL 加入 6 \times 電泳追蹤染劑 (6 \times loading buffer: 0.25% bromophenol blue 及 xylene cyanol, 40% w/v sucrose)，以 3% Agarose SFR 或 Metaphor Agarose 高解析膠體，置於 0.5 \times TBE buffer (40 mM Tris acetate, pH 8.0; 1 mM EDTA) 進行 DNA 電泳；或以 6% 聚丙醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)。電泳槽為 BIO-RAD SUB CEL；於 UV 下檢視膠體上多型性之等位基因 (alleles) 片段，並照相、貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, CA, USA) 系統，反應產物以 Gen 100 DNA ladder marker (GeneMark Technology Co., Taiwan) 計算等位基因片段大小。

核心 SSR 標誌與西瓜雜交種 F_1 之鑑定

22 個西瓜材料，利用已設計的 SSR 引子進行 PCR 擴增與多型性篩檢，選取 PCR 產物範圍與預期大小符合，具多型性且易於判讀之 SSR 基因座，分別紀錄等位基因數量與產物大小。經篩選出的多型性引子組，組成後續雜交種鑑定用核心 SSR 標誌。

以核心 SSR 標誌，進行採種業界提供的 3 個商業雜交種與親本等 DNA 樣品之測試，搜尋在父、母本與 F_1 間具有共顯性表現的特定分子標誌；或只出現於 F_1 而不存在母本之差異性標誌，亦可作為 F_1 品種純度檢定之標誌。綜合各商業雜交種兩次重複測試之結果，選取再現性穩定的標誌，作為共通利用的關鍵性 SSR 標誌。

結果

開發西瓜屬 EST-SSR 標誌

西瓜屬 EST 序列經 Simple Sequence Repeat Identification Tool (SSRIT) 搜尋結果，調整篩選條件為 2 至 6 個重複性核苷酸，且該基序重複次數達 4 個以上的完全 SSRs 序列，並涵蓋適當的側翼序列以設計 SSR 引子，合計取得 283 對候選引子，提供 22 個西瓜商業一代雜交品種之 PCR 分析。經 SSR-PCR 分析結果，篩選出其中 24 對 SSR 引子具有明顯多型性，在 SFR 膠體電泳具有清晰可判讀得多型性產物，組成品種鑑定用核心 SSR 引子組。24 對核心 SSR 引子組，進一步測試採種業界提供的 3 個商業雜交種與親本等 DNA 樣品，結果獲得 7 組適用於其中 2 家業界 2 個採種的雜交種之鑑別 (圖 1、表 2)，其 SSR-PCR 產物範圍為 113–260 bp，等位基因數量為 2–3 個。

進一步分析此 7 組 SSR 基因座之重複基序顯示，有 5 個基因座屬於 3 核苷酸重複基序型，其中 3 個基因座適用於 2 家業界 2 個 F_1 品種 (DF, MF) 之檢定，包含基序同為 $(\text{GCA})_n$ 的 WM224 和 WM227 基因座，以及基序為 $(\text{AGA})_n$ 的 WM330；其餘分別是基序 $(\text{CTT})_n$ 的 WM120，可用以檢測雜交種 MF；以及基序為 $(\text{AAG})_n$ 的 WM381 基因座，可檢測雜交種 DF。另 WM246 基因座為 2 個核苷酸重複基序型 $(\text{AT})_n$ ，可用以檢測雜交種 MF。而基因座 WM263 則是屬於 6 個核苷酸重複基序型 $(\text{TCGTCT})_4$ ，可檢測雜交種 DF (表 2)。

關鍵性 SSR 標誌與西瓜雜交種之鑑別

自西瓜屬 EST-SSR 24 對核心引子組，篩選 7 個 SSR 基因座，可延伸利用在 2 家業

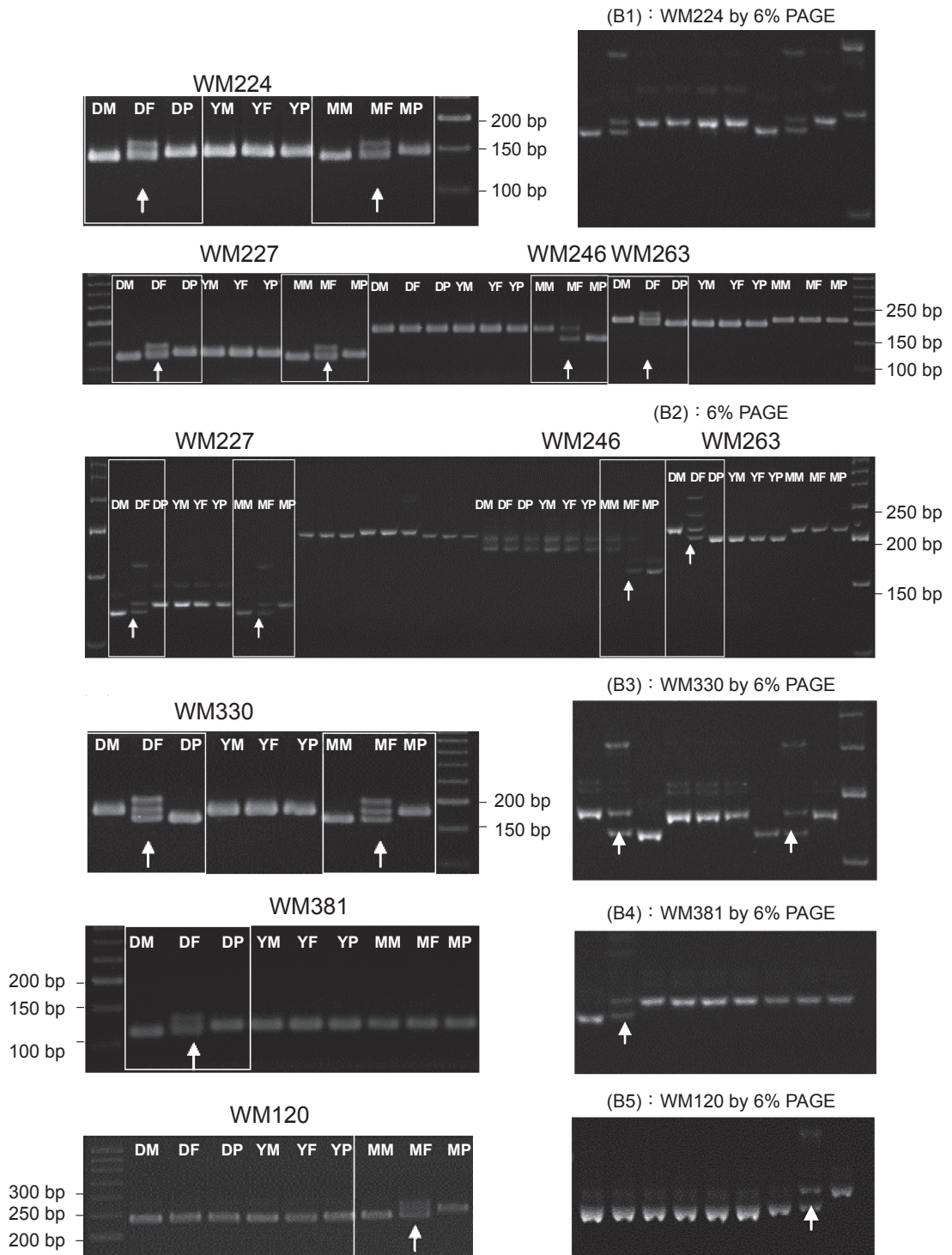


圖 1. 3 個西瓜雜交種和相關親本分別以 7 個 SSR 標誌分析之圖譜。

Fig. 1. SSR profiles of three watermelon hybrids (DF; YF; MF) and respective parental lines (DM, DP; YM, YP; MM, and MP) obtained from seven informative markers of WM224, WM227, WM246, WM263, WM330, WM381, and WM120.

表 2. 核心 SSR 基因座篩選出重要的微衛星標誌及其 PCR 產物特性。

Table 2. The informative microsatellite markers selected from a core set of SSR loci and their products characteristics.

Locus (GenBank accession no)	Repeat motif	Expected size (bp)	Product size (bp)	Allele no.
WM120 (AI563551)	(CTT) ₁₃	240	240–255	3
WM224 (GD175992)	(GCA) ₁₁	147	140–153	3
WM227 (GD176087)	(GCA) ₁₁	127	127–147	3
WM246 (GD176845)	(AT) ₉	158	158–180	2
WM263 (GD177425)	(TCGTCT) ₄	211	197–225	3
WM330 (GD179345)	(AGA) ₈	164	160–200	3
WM381 (GD180564)	(AAG) ₁₂	113	113–145	3

界 2 個商業採種之雜交種檢定 (圖 1)。依據解析能力較大的 6% PAGE 分析 (圖 1 : B1、B2、B3、B4、B5) 顯示, 其中 3 個基因座 (圖 1 : B1、B2、B3) 各有 2 個關鍵性的特定等位基因片段, 共通適用於 2 個雜交種 DF 與 MF 之鑑定, 分別為 WM224_(140 bp、147 bp)、WM227_(127 bp、137 bp)、WM330_(165 bp、184 bp) (表 3、圖 1)。基因座 WM224 反應產生 3 個等位基因片段 (140 bp、147 bp、190 bp), 其 147 bp 為 DP 與 MP 兩父本特有的片段, 兩母本 DM 與 MM 的等位基因片段為 140 bp, 2 個雜交種 DF 與 MF 有 3 個等位基因片段分別是 140 bp、147 bp、190 bp (表 3)。另基因座 WM227 產生 3 個等位基因片段 (127 bp、137 bp、165 bp), 其中 137 bp 為兩父本 (DP 與 MP) 特有的片段, 兩母本 (DM 與 MM) 的等位基因片段為 127 bp, 2 個雜交種 (DF 與 MF) 有 3 個等位基因片段分別是 127 bp、137 bp、165 bp (表 3)。基因座 WM330 可產生 3 個等位基因片段 (165 bp、184 bp、255

bp), 其 165 bp 為 DP 與 MM 父、母本共有的片段, 184 bp 為 MP 與 DM 父、母本共有的片段, 而 2 個雜交種 (DF 與 MF) 有 3 個等位基因片段分別是 165 bp、184 bp、255 bp (表 3)。

討論

栽培種西瓜之染色體組 $2n = 2x = 22$, 基因組大小約 8.5×10^8 bp (Guo *et al.* 2013)。早期 Levi *et al.* (2001) 曾以 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 標誌建構其遺傳連鎖圖譜, 篩選出與 Fusarium wilt 抗病性相關之特定 RAPD 片段, 進而轉換成輔助選種的 SCAR (sequence characterized amplified region) 標誌。Hashizume *et al.* (2003) 則利用西瓜 BC₁ 與 F₂ 族群, 以 RAPD、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 與 ISSR (inter-simple sequence repeat) 等標誌, 建構遺傳連鎖圖譜並進行 QTL 分析, 進而發現與

表 3. 篩選出 3 個 SSR 基因座用以鑑別 2 個雜交種與親本及其擴增的等位基因片段。

Table 3. Allelic sizes of amplification with three selected SSR loci for two hybrids identification and their corresponding parental lines in watermelon.

Hybrids and their parents	Specific alleles (bp) in the selected SSR locus		
	WM224 (GD175992)	WM227 (GD176087)	WM330 (GD179345)
DM	140	127	184
DF	140, 147, 190	127, 137, 165	165, 184, 255
DP	147	137	165
MM	140	127	165
MF	140, 147, 190	127, 137, 165	165, 184, 255
MP	147	137	184

西瓜果皮顏色、果皮硬度、果肉色與糖度等相關連之分子標誌。至 2010 年以後，高訊息的 SSR 標誌陸續應用於西瓜品種鑑定與種原之遺傳分析 (Nantoume *et al.* 2013)。

鑑於 SSR 存在植物基因組的豐富性與多型性，對於已經解序或尚未完成解序的作物而言，均可利用此標誌進行遺傳分析，或作為指紋分析之利器。本研究自 NCBI GenBank 之西瓜屬，取得近 2,000 個 EST 核酸序列，進行 microsatellite repeats 搜尋及 SSR 引子設計，初步取得 283 對 SSR 候選引子，其 EST-SSR 引子可設計率約 14% (數據未附於本文)，此相近於 Wöhrmann & Weising (2011) 前人研究結果，唯番茄作物上 EST-SSR 引子之可設計率為 28% (He *et al.* 2003)，故推測 EST-SSR 引子的可設計率，可能依作物基因組而異，但利用 EST 開發可利用的 SSR 標誌，仍是可行的途徑。

又依據前人對植物基因組的 SSR 基序分析結果，以 2 或 3 個核苷酸序列重複較為普遍，但不同物種間重複性基序種類有所差異 (Condit & Hubbell 1991; Wang *et al.* 1994; Kalia *et al.* 2011)，如番茄作物上以 AT/TA repeat 頻度最高 (He *et al.* 2003)；西瓜、非洲菊 (*Gerbera hybrida*) 或鳳梨作物則以 (GA)_n 出現頻度最高 (Levi *et al.* 2002; Gong & Deng 2010; Wöhrmann & Weising 2011)。歸納本研究中，針對西瓜雜交種鑑別而篩選出 10 個重要 SSR 標誌發現，以 3 個核苷酸序列重複比率較高，約占 6 成之多，其中又以 (GCA)_n 出現的頻度最高 (表 2)，可符合前人基因組研究與分析結果。唯 3 個核苷酸序列重複基序，其 PCR 產生的多型性片段差異性較大於 2 個核苷酸序列重複基序的產物，故可判讀性也較高；若搭配電泳解析能力較大的 PAGE 系統，較方便於分子量差距為 7–10 bp 的共顯性等位基因片段之判讀 (圖 1)。另本研究中 Y 公司提供的 3 個測試品 (YM, YF, YP)，經兩次重複測試結果，均未取得該雜交種與兩親本間的多型性片段；經洽詢提供者是否可再次予以取樣，業者表示已停止該項目之採種，故未能再進一步之測試。

綜合 22 個西瓜商業一代雜交種之 SSR-PCR 分析結果，以及後續應用於 2 個 F₁ 採種的雜交種檢測之結果顯示，關鍵性微衛星 (microsatellite) DNA 標誌之開發，可有效應用於品種遺傳純度之快速檢測。而未來透過已解序的西瓜基因組之核酸資料庫，將可開發出更多有用的 SSR 標誌，除利用於種原材料之遺傳歧異度評估外，亦可藉此分子標誌輔助育種選拔 (marker-assisted selection; MAS)，加速優良新品種之選育，以延續台灣西瓜品種在國際市場之領先地位。

誌謝

本研究承蒙農委會農糧領域科技計畫 (99 農科 -1.1.1- 農 -C5；100 農科 -1.1.1- 農 -C2 & C5) 經費補助，謹此致謝。

引用文獻

- Ballester, J. and M. C. de Vicente. 1998. Determination of F₁ hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. *Euphytica* 103:223–226.
- Condit, R. and S. P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34:66–71.
- Crockett, P. A., P. L. Bhalla, C. K. Lee, and M. B. Singh. 2000. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*) cultivar. *Genome* 43:317–321.
- Gong, L. and Z. Deng. 2010. EST-SSR markers for gerbera (*Gerbera hybrida*). *Mol. Breed.* 26:125–132.
- Guo, S., J. Zhang, H. Sun, J. Salse, W. J. Lucas, H. Zhang, Y. Zheng, L. Mao, Y. Ren, Z. Wang, J. Min, X. Guo, F. Murat, B. K. Ham, Z. Zhang, S. Gao, M. Huang, Y. Xu, S. Zhong, A. Bombarely, L. A. Mueller, H. Zhao, H. He, Y. Zhang, Z. Zhang, S. Huang, T. Tan, E. Pang, K. Lin, Q. Hu, H. Kuang, P. Ni, B. Wang, J. Liu, Q. Kou, W. Hou, X. Zou, J. Jiang, G. Gong, K. Klee, H. Schoof, Y. Huang, X. Hu, S. Dong, D. Liang, J. Wang, K. Wu, Y. Xia, X. Zhao, Z. Zheng, M. Xing, X. Liang, B. Huang, T. Lv, J. Wang, Y. Yin, H. Yi, R. Li, M. Wu, A. Levi, X. Zhang, J. J. Giovannoni, J. Wang, Y. Li, Z. Fei, and Y. Xu. 2013. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nature Genet.* 45:51–58.
- 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.
- Hashizume, T., I. Shimamoto, 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.
- He, C., V. Poysa, and K. Yu. 2003. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 106:363–373.
- Ida, A. A., J. A. Plummer, R. A. Lancaster, and G. Yan. 2008. Identification of ‘Sib’ plants in hybrid cauliflower flowers using microsatellite markers. *Euphytica* 164:309–316.
- Iqbal, M. J., D. W. Paden, and A. L. Rayburn. 1995. Assessment of genetic relationships among rhododendron species, varieties and hybrids by RAPD analysis. *Sci. Hort.* 63:215–223.
- Jang, I., J. H. Moon, J. B. Yoon, J. H. Yoo, T. J. Yang, Y. J. Kim, and H. G. Park. 2004. Application of RAPD and SCAR markers for purity testing of F₁ hybrid seed in chili pepper (*Capsicum annuum*). *Mol. Cells* 18:295–299.
- Kalia, R. K., M. K. Rai, S. Kalia, R. Singh, and A. K. Dhawan. 2011. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309–334.
- Komori, T. and N. Nitta. 2004. A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR-based markers. *Plant Breed.* 123:549–553.
- Kumapatla, S. P. and S. Mukhopadhyay. 2005. Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species. *Genome* 48:985–998.
- 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., C. E. Thomas, X. 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 (RAPD) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:730–737.
- Liu, L. W., Y. Wang, Y. Q. Gong, T. M. Zhao, G. Liu, X. Y. Li, and F. M. Yu. 2007. Assessment of genetic purity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) hybrid using molecular markers. *Sci. Hort.* 115:7–12.
- McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9:199–207.
- Mujaju, C., J. Sehic, G. Werlemark, L. Garkava-Gustavsson, M. Fatih, and H. Nybom. 2010. Genetic diversity in watermelon (*Citrullus lanatus*) landraces from Zimbabwe revealed by RAPD and SSR markers. *Hereditas* 147:142–153.
- Nantoume, A. D., S. B. Andersen, and B. D. Jensen. 2013. Genetic differentiation of watermelon landrace types in Mali revealed by microsatellite (SSR) markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60:2129–2141.
- Rozen, S. and H. J. Skaletsky. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. p.365–386. *in: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* (Krawetz, S. and S. Misener, eds.) Humana Press. Totowa. 500 pp.
- Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour, and S. 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.
- 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.
- Wöhrmann, T. and K. Weising. 2011. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across *Bromeliaceae*. *Theor. Appl. Genet.* 123:635–647.

Identification of F₁ Hybrids in Watermelon Using SSR Markers

Jau-Yueh Wang¹ and Min-Tze Wu^{2,*}

Abstract

Wang, J. Y. and M. T. Wu. 2015. Identification of F₁ hybrids in watermelon using SSR markers. *J. Taiwan Agric. Res.* 64(1):45–52.

Determination of F₁ hybrids and their corresponding parental lines is an important quality control in the production of hybrid vegetable seeds. The grow-out trial (or grow out test; GOT) is a commonly used method for genetic purity test by seed enterprise. The trial consists of a number of morphological characters that can vary according to environmental conditions. Furthermore, checking these types of trials are time consuming, space demanding, and often do not allow the unequivocal identification of the genotypes. The objectives of this study were to generate the specific and co-dominant markers for discrimination parental lines and the subsequent assessment of hybrids in watermelon. Genomic DNA from the three F₁ hybrid cultivars and their parental lines were screened with 24 polymorphic core SSR (simple sequence repeat) primer pairs that developed from 22 commercial varieties. Based on the results, a key set of three SSR markers were selected for hybrid identification. As the validation time of GOT's method could be more than two months, SSR analysis would be a useful tool for early testing the genetic purity in commercial hybrid seeds production.

Key words: *Citrullus lanatus*, Simple sequence repeat, Hybrids identification.

Received: July 31, 2014; Accepted: November 28, 2014.

* Corresponding author, e-mail: wu@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Fellow and Director, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.