

# 火龙果 *hAT*-MITE 转座子插入多态性分子标记开发与品种鉴别

胡文斌<sup>1,3,4</sup>, 王 好<sup>1,3,4</sup>, 周新城<sup>2</sup>, 濮文辉<sup>1,3,4</sup>, 冯艳丽<sup>1,3,4</sup>, 李洪立<sup>1,3,4\*</sup>, 李 琼<sup>1,3,4\*</sup>

1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 3. 农业农村部华南作物基因资源与种质创制重点实验室, 海南海口 571101; 4. 海南省热带作物资源遗传改良与创新重点实验室, 海南海口 571101

**摘要:** 微型反向重复转座子 (MITE) 作为真核基因组中活跃的可移动元件, 其插入多态性为种质遗传多样性分析提供了新型分子标记。本研究基于火龙果品种莞华白全基因组数据, 通过生物信息学方法系统鉴定 *hAT* 家族 MITE 转座子, 共筛选出 2350 个具有完整末端反向重复 (TIR) 和靶位点重复 (TSD) 特征的候选元件, 平均每对染色体 213 个。基于序列特异性及多态性分析, 从中选出 110 个 (每对染色体 10 个) 高差异位点设计引物, 经 PCR 扩增验证后成功开发出 41 个稳定多态性 *hAT*-MITE 标记。进一步利用 41 对引物对 48 份火龙果种质进行全基因组扫描, 通过琼脂糖凝胶电泳共检测到 81 个多态性位点 (多态率为 97.59%); UPGMA 聚类分析表明, 48 份材料存在着丰富的变异和遗传多样性 (遗传相似系数在 0.57–0.91 之间), 在遗传相似系数为 0.63 时, 将品种资源划分为 4 个遗传结构显著差异的类群。基于引物-带型组合法, 精选 4 对核心引物 (HU-MIT-02/06/26/75) 构建覆盖全部种质资源的数字化指纹图谱, 其品种鉴别准确率达 100%。本研究首次建立火龙果 *hAT*-MITE 分子标记技术体系, 所开发的标记库及标准化鉴定流程为火龙果种质资源精准分类、品种鉴定和品种权保护提供了高效工具, 对火龙果种业知识产权保护具有重要应用价值。

**关键词:** 火龙果; *hAT*-MITE 转座子; 指纹图谱; 品种鉴定; 遗传多样性

中图分类号: S667.9 文献标志码: A

## Development of *hAT*-MITE Transposon Insertion Polymorphism Molecular Markers and Cultivars Identification in Pitaya

HU Wenbin<sup>1,3,4</sup>, WANG Hao<sup>1,3,4</sup>, ZHOU Xincheng<sup>2</sup>, PU Wenhui<sup>1,3,4</sup>, FENG Yanli<sup>1,3,4</sup>, LI Hongli<sup>1,3,4\*</sup>, LI Qiong<sup>1,3,4\*</sup>

1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Innovation in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Key Laboratory of Genetic Improvement and Innovation of Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China

**Abstract:** Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs), as active mobile elements in eukaryotic genomes, provide novel molecular markers for germplasm genetic diversity analysis through the insertion polymorphisms. This study systematically identified *hAT* family MITE transposons in pitaya using bioinformatics approaches based on the whole-genome data of the Guanhua Bai cultivar. A total of 2350 candidate elements with complete terminal inverted repeats (TIRs) and target site duplications (TSDs) were screened, with an average of 213 elements per chromosome pair.

收稿日期 2025-05-08; 接受日期 2025-05-26

基金项目 海南省自然科学基金面上项目 (No. 323MS080); 热带作物生物育种全国重点实验室创新团队项目 (No. NKLTCBCX-TD14)。

作者简介 胡文斌 (1986—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 种质资源学。\*通信作者 (Corresponding author): 李洪立 (LI Hongli), E-mail: lihongli29@163.com; 李 琼 (LI Qiong), E-mail: liqiong4416@126.com。

Through sequence specificity and polymorphism analysis, 110 highly divergent *loci* (10 per chromosome pair) were selected for primer design, ultimately yielding 41 stable polymorphic *hAT*-MITE markers after PCR validation. Genome-wide scanning of 48 pitaya germplasms using the 41 primer pairs detected 81 polymorphic *loci* (polymorphism rate: 97.59%) via agarose gel electrophoresis. UPGMA cluster analysis revealed substantial genetic variation and diversity among the 48 accessions, with genetic similarity coefficients ranging from 0.57 to 0.91. At a genetic similarity threshold of 0.63, the germplasm resources were categorized into four genetically distinct groups. A digital fingerprinting system covering all germplasm resources was constructed using four core primer pairs (HU-MIT-02/06/26/75) based on the primer-band pattern combination method, achieving 100% cultivar identification accuracy. This study established the first *hAT*-MITE molecular marker system for pitaya, providing an efficient toolkit including a marker library and standardized identification protocols for precise germplasm classification, cultivar identification and varieties property protection of pitaya. The advancements is of significant application value for intellectual property protection in the pitaya seed industry.

**Keywords:** pitaya; *hAT*-MITE transposon; fingerprint; variety identification; genetic diversity

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.09.005

火龙果是新兴的重要的热带果树, 在中国、越南、哥伦比亚、厄瓜多尔、澳大利亚等国家有大规模种植。目前中国是全球最大的火龙果生产国, 种植面积约 6.8 万  $\text{hm}^2$ , 主要分布在广东、广西、海南、贵州、云南、福建等省(区), 在我国脱贫攻坚、农业产业结构调整中发挥重要作用。火龙果在长期的自然演化、突变和人工选育过程中形成了丰富的种质资源, 但种质资源缺乏系统研究, 存在遗传基础不清问题。火龙果现有主栽品种外形特征极为相似, 传统形态学分类手段难以有效鉴定, 存在品种混淆问题。利用分子标记技术可为火龙果种质资源准确鉴定提供依据, 而转座子标记是开展种质资源遗传多样性分析、品种鉴别的重要标记之一。

转座子的转座是植物基因组进化的重要动力, 是植物遗传多样性的重要来源, 在植物基因组进化、基因表达调控、系统发育和遗传多样性评价方面具有重要作用<sup>[1]</sup>。基于转座子的分子标记可以用于品种及物种鉴定、遗传多样性分析和功能标记。在植物中, 数量较多的 DNA 类型转座子包括 *hAT* (*hobo*, *Activator and Tam3*)、*CACTA* 以及 *Mutator* 超家族, 基因组上常见的 MITE (*miniature inverted-repeat transposon element*, 微型倒置重复转座元件) 是属于非自主型 DNA 类型的转座子家族。一些 MITE 元件在基因组上可达几千到上万个拷贝<sup>[2]</sup>。同一作物不同品种间在相同位点常有 MITE 插入与缺失形成的多态性, 即有的品种在某位点有 MITE 转座元件, 有的品种则没有<sup>[3]</sup>。插入缺失标记 (*InDel*) 可以用于作物的指纹图谱<sup>[4]</sup>, MITE 转座元件是否插入基因组

上某位点, 本质上也属于 *InDel* 标记, 因此其也可以作为指纹图谱用于鉴别作物品种<sup>[5-6]</sup>。另外, 在物种演化方面, MITE 的这种多态性也可以用于种质资源遗传多样性分析, 常被用于属内不同物种亲缘关系的研究<sup>[7-9]</sup>。与单核苷酸多态性 (*SNP*)、简单序列重复 (*SSR*) 等分子标记一样, MITE 等转座子在植物基因组中数量大、分布广, 但是相比于 *SNP*、*SSR* 等标记, MITE 产生的插入缺失标记多态性明确、易识别、开发方便、试验成本低且操作简单 (琼脂糖电泳足以分辨), 是种质资源遗传多样性分析、构建品种指纹图谱的良好标记之一。MITE 标记在花生<sup>[10-11]</sup>、油菜<sup>[12]</sup>、水稻<sup>[13]</sup>等农作物品种鉴定、杂交种真伪鉴定上得到应用, 目前 *ISSR*<sup>[14-15]</sup>、*SSR*<sup>[16-18]</sup>等标记在火龙果种质资源遗传多样性分析、指纹图谱构建中已得到应用。陶金等<sup>[19]</sup>开发了基于反转录转座子的 *IRAP* 分子标记, 用于火龙果遗传多样性分析, 但尚未有基于 MITE 标记的分子身份证构建相关报道。

前人研究表明, 在火龙果等仙人掌科植物基因组中, DNA 转座子的占比均大幅高于反转录转座子, 且绝大多数 DNA 转座子属于 *TIR* 类型, 在 *TIR* 类型的 DNA 转座子中, *hAT* 超家族在转座子代表性数据集中占比最大<sup>[20]</sup>。本研究从火龙果基因组中发掘出 *hAT*-MITE 转座子序列, 基于转座子插入多态性开发适于火龙果品种分子标记, 并以 48 份火龙果主要商业品种为材料, 开展遗传多样性分析和分子身份证构建研究, 以期为火龙果种质分类、品种鉴定和品种权保护提供重要的理论依据与技术支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

供试的 48 份火龙果品种资源 (表 1) 主要包括国内主要审认定品种、地方品种和特色资源。

其中 H5、H18、H31、H37、H40、H41、H45、H46 作为核心引物筛选的材料。以上材料均保存于海南儋州中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所省级火龙果种质资源圃。

表 1 48 份火龙果种质的名称和来源

Tab. 1 Names and origins of 48 pitaya germplasm resources

编号 No.	名称 Name	来源 Origin	编号 No.	名称 Name	来源 Origin	编号 No.	名称 Name	来源 Origin
H1	大翼水晶	中国广东	H17	粤红 3 号	中国广东	H33	美白	美国
H2	桂红龙 1 号	中国广西	H18	康尼梅椰	美国	H34	富贵红	中国台湾
H3	蜜宝	中国台湾	H19	越南白肉	越南	H35	EL	美国
H4	紫龙	中国海南	H20	莞华红	中国广东	H36	无刺黄龙	中国海南
H5	桂族双色	中国广西	H21	大红	中国台湾	H37	红皮燕窝	中国海南
H6	紫蜜龙	中国海南	H22	莞华白	中国广东	H38	巴西白肉 1	巴西
H7	柠檬	中国云南	H23	双色 1 号	中国广东	H39	黄麒麟-G	哥伦比亚
H8	49-3	中国云南	H24	莞华粉红	中国广东	H40	白花双色	中国海南
H9	红花青龙	中国海南	H25	BNM	巴拿马	H41	金燕窝	中国海南
H10	双色锦	中国海南	H26	大花蛇鞭柱	中国海南	H42	双色球	中国海南
H11	白水晶	中国广东	H27	BM	中国海南	H43	红麒麟	中国广西
H12	无刺红龙	中国海南	H28	巴西粉肉	巴西	H44	丰景双色	中国海南
H13	红水晶	中国广东	H29	黄锦	中国海南	H45	黄麒麟	中国广西
H14	红冠 2 号	中国广东	H30	秘鲁燕窝	秘鲁	H46	S2	中国海南
H15	粤红	中国广东	H31	糖龙	美国	H47	沙漠国王	以色列
H16	翠西亚	美国	H32	红宝龙	中国广西	H48	S3	中国海南

### 1.2 方法

1.2.1 火龙果 hAT 类 MITEs 的鉴定 从火龙果基因组数据库 (<http://www.pitayagenomic.com/>)<sup>[21]</sup> 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA691451>) 数据库中下载火龙果基因组序列和基因注释信息, 利用 MITE-Hunter 等软件对火龙果基因组进行分析, 主要是查找适合做分子标记的 hAT 家族 MITE 等 DNA 类型转座元件, 对其类型、分布、偏好性进行分析。利用 primer 3 软件在位于基因间隔区、基因区和启动子区转座子外侧设计引物。

1.2.2 DNA 提取 使用天根生化科技 (北京) 有限公司的多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP360) 提取 48 份火龙果品种资源嫩茎的总 DNA, 操作参照产品说明书进行。样品统一稀释至 20 ng/ $\mu$ L 后,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.3 核心引物筛选 每条染色体分别选 10 个以上的多态性位点, 在其两端一定位置处分别设计 PCR 引物。如果因为序列不合适等原因无法设计引物, 可选择一端引物位于转座子内部, 另一端在转座子外。合成引物后, 对 8 个代表性火龙果

种质进行扩增, 明确引物扩增片段大小、PCR 退火温度等信息。每条染色体上至少获得 2 个在群体内呈现多态性的标记。

1.2.4 hAT-MITE 程序及 PCR 产物检测 引物委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。MITE-PCR 反应体系总体积为 20  $\mu$ L, 含 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10.0  $\mu$ L, F-primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, R-primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, 模板 DNA (20 ng/ $\mu$ L) 3.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 5.4  $\mu$ L。扩增程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 复性 30 s (根据引物 T<sub>m</sub> 值设计退火温度),  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。 $4^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 扩增结束后用 2% 琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳检测。

1.2.5 数据处理与遗传多样性分析 根据电泳结果, 选择条带清晰、多态性高的进行统计, 将同一位点的所有等位基因从小到大排列, 有条带记为“1”, 空白记为“0”, 统计所得的数据利用 Excel 软件转换成 NTSYS 2.10 所需要的格式, 利用软件 NTSYSpc 2.10 计算遗传相似系数, 采用非加权组平均法 (UPGMA), 利用筛选出的

*hAT*-MITE 核心引物对 48 份火龙果种质资源进行聚类分析。

1.2.6 指纹图谱构建 从上述结果中选择鉴定力强的 *hAT*-MITE 引物构建火龙果品种资源的指纹图谱, 以所分析的 *hAT*-MITE 引物名称为前缀, 该标记在某样品上扩增带的分子量为后缀, 得到每个品种在某个标记的带型编号, 按照固定的引物排序结合不同引物分析结果, 串联各带型编号, 形成该品种的 *hAT*-MITE 指纹图谱。根据指纹图谱出现的概率公式  $P = 1/2^n$  ( $n$  为多态位点数,  $2^n$  则为检测  $n$  个位点涉及的所有可能的试验材料个数), 统计图谱的置信概率。

## 2 结果与分析

### 2.1 *hAT*-MITEs 的鉴定与特征分析

利用 MITE-Hunter 软件对栽培种莞华白火龙果基因组进行分析, 鉴定和筛选出 *hAT* 家族的 MITE 转座子, 同时统计 *hAT*-MITE 元件在基因区、基因间隔区和启动子区的数量, 并对其插入偏好性进行分析。根据火龙果基因组基因结构注释结果计算基因区的总长度 (基因区包括内含子区、外显子区), 启动子区为基因区上游 2000 bp, 基因组上其他区域则为非基因区, 统计分析结果见表 2。栽培种莞华白的基因组存在 2350 个完整结构的 *hAT*-MITE 转座子, 其中 243 个位于基因启动子区, 1882 个位于基因间隔区, 225 个位于基因区, 207 个位于内含子区, 18 个位于外显子区和 UTR 区。基因区平均每兆碱基 (平均拷贝数) 有 1.459 个, 略低于基因间隔区 1.527 个。而启动子区每兆碱基含 4.381 个转座元件, 表明 *hAT*-MITE 转座子更倾向于分布在基因启动子区。

表 2 火龙果基因组 *hAT*-MITE 在基因区、间隔区和启动子区的分布

Tab. 2 Distribution of *hAT*-MITE elements in genic regions, intergenic regions, and promoter regions of pitaya genome

区域 Region	拷贝数 Copies	长度 Length/bp	平均拷贝数 Average copies
基因区	225	154 187 015	1.459
启动子区	243	55 470 000	4.381
基因间隔区	1882	1 232 580 632	1.527

根据火龙果基因组序列信息和基因结构注释结果信息分析 *hAT*-MITE 元件在栽培种莞华白火龙果基因组各染色体上的数量, 以及在每一条染

色体基因区、基因间隔区和启动子区的数量, 结果见表 3。*hAT*-MITE 在染色体上分布最多的是 1 号染色体, 为 239 个; 最少的是 10 号染色体, 有 178 个; 平均每对染色体有 213 个。大部分转座子分布在基因间区、启动子区, 而基因区主要存在于内含子区, 外显子区很少。

表 3 火龙果基因组 *hAT*-MITE 在不同染色体基因区、基因间隔区和启动子区的分布

Tab. 3 Chromosomal distribution of *hAT*-MITE elements in genic regions, intergenic regions, and promoter regions of pitaya genome

类型 Types	启动子 Promoter	外显子 Exon	内含子 Intron	基因间隔区 Intergenic region	总数 Total
chr01	13	1	15	210	239
chr02	21	1	17	165	204
chr03	28	1	15	175	219
chr04	15	1	18	194	228
chr05	24	0	18	191	233
chr06	23	5	27	134	189
chr07	22	2	19	168	211
chr08	19	5	35	161	220
chr09	22	0	17	152	191
chr10	29	1	13	135	178
chr11	26	1	13	188	228
scaffold858	1	0	0	9	10

### 2.2 *hAT*-MITE 引物多态性的筛选

从每条染色体基因区、基因间隔区和启动子区选取代表性位点, 每条染色体选 10 个多态性位点, 共 110 个, 设计引物。用形态、遗传背景差异较大的 8 份火龙果种质资源对 110 对 *hAT*-MITE 引物进行引物初步筛选。利用这 110 对 *hAT*-MITE 引物在 8 份火龙果种质资源中共检测出 193 个条带, 平均每对引物扩增出 1.7 个, 多态性条带数为 121 个, 多态位点百分率达 62.69%, 条带大小在 250~2000 bp 之间。经 2 轮筛选后, 选出 41 对具有明显多态性、条带清晰、带型稳定引物 (表 4)。

### 2.3 *hAT*-MITE 标记多态性引物在不同火龙果品种资源间的遗传多样性分析

利用筛选出来的 41 对火龙果 *hAT*-MITE 标记核心引物, 对 48 份样品进行遗传多样性分析 (部分检测结果见图 1)。琼脂糖凝胶电泳结果显示 41 对 *hAT*-MITE 引物在 48 份火龙果种质资源中共检测出 83 个等位变异, 多态性条带数为 81 个, 多态位点百分率达 97.59%, 等位基因数变化范围为 2~5。

表 4 *hAT*-MITE 引物信息  
Tab. 4 Information of *hAT*-MITE primers

引物名称 Primer name	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')	目标片段长度 Target fragment length/bp
HU-MIT1	CCTCCAATTTCTGACGCCCT	ACTCGTGGAGGAGACAGGAA	740
HU-MIT2	TTGACCTGGTCTTTTTGGCC	TGGGAAGTCACACGGAGTTG	622
HU-MIT6	ACCGTGCAAGGTAGTTCCAG	GTTGTGGGCCTTTCGTCAAC	700
HU-MIT10	GGTCCACATGCAAAAACATCCA	AGAGTGACAGTTACAGCGGC	964
HU-MIT12	CGGGAGTTGATCGGAGGATG	CGTAATACACCTAGGCTGGCA	762
HU-MIT16	ATTCTTCGCCCAAGCCTACC	ACCGAATCACACCCAATCCA	1098
HU-MIT17	TCCTGATCCTCCCTGCGTIA	GAGAGAGAGAGATGCACCGC	885
HU-MIT18	GGCAAGGCACTGACATGTTT	TGCACTGAAGACAGCCTCTG	971
HU-MIT22	ATGCTTGTGCGCCCTCTATG	TATGTTCCGGGCTCGGCATTT	640
HU-MIT26	CACCGACCTGAATCCAAGCT	CGGGATCAGCAAACCAGACT	761
HU-MIT27	GGTTTGGTGGAAATTGGGCC	GTTACAGCAATGGAGCCCCT	928
HU-MIT30	GAATCTGGGGTTCGCTAAGG	CCACGCAAACCTGACTCGAAC	635
HU-MIT33	CAAACCGCCCCATCCAGTT	ATACGTCTGCTGGTTGCCTC	558
HU-MIT36	AGCATCCCATTGTCGTCACA	TCAACTCAGTGGCAATCCCC	975
HU-MIT38	CCCACCGGAAAAGAACTCGA	GCTTTTGGGGTTTCTGCAGG	575
HU-MIT40	TCTCCTGTGCGATCTGGGTT	ATCAGCCATGTTGCGTCTGA	673
HU-MIT45	TGAAGCACGGGATTCACATT	AGTTTGCCTACCTTCACCGT	869
HU-MIT46	TGAGGGGGTGTGGAGGTA	AACCCAAAACCCACCTACGG	1004
HU-MIT48	CGAAGTCAACCGGAACCAGA	AACAAAACAACAGGCCAGCC	772
HU-MIT50	TGCTACAATCGAAGGGCGTT	ACTTGCACGCTGACTGAGAA	771
HU-MIT52	TGGAAGGAAGAGAGTGGGGT	CACACCCCATAGTCACGAC	590
HU-MIT53	CCAGTGCTCAGCTCATCAA	AATCTCTCCGCCACTAGT	541
HU-MIT60	TACTCTGCCCTTTTCTGCCG	TCTCGGTCGTGGTTCAGTTTG	781
HU-MIT67	CTGCACCAGTCAACAAGGC	AACCACTACGGAAGCATGGG	606
HU-MIT68	TGCACATGTTTGGGTTTGGC	GCAGCAGCTTCTTTGTCAGT	1008
HU-MIT70	ACTCCAACAAGAATCAAGCCA	ATGGCGAGGAAGGACACAAG	738
HU-MIT72	TGCAGATTCGCACATTGAGG	TTCCGCCATCATCGTGGAA	724
HU-MIT75	AGATGCGCTTGTCTGCTCT	ACATGGTGGAAAGTGAGCCAG	997
HU-MIT76	AGTGTGGCATTCCATCCCTG	TGAGCAGGTTCTTACCCATCT	632
HU-MIT77	GCAAGACTCGAATCCAAGGC	CACGTGCTTTGGGATGCAA	909
HU-MIT84	AGGACTCTCATGCGGGTAGT	ACATGGAGGGAAGCTTGTCTG	672
HU-MIT86	AAGAAGTTCGGCCCAACCAA	GAGGCCAAAGTGCAAGGTAT	829
HU-MIT88	TCCTCGCAAAGCCTCACATT	AAGACATGTCGGTGCTTCGT	771
HU-MIT91	GCACTGAAAGGAGGCAGGAA	CAGGAGCTGTTGGGGGAAAA	1065
HU-MIT94	CTGAAGCGTTCATGGACCT	AATGCGGGAGACAGAAAGGG	1197
HU-MIT97	AGTCACACCACCACTTTACA	AGCGGCATCTACCATACTG	938
HU-MIT99	CATGTAGCTCCGCCCATGAT	ATTCGCACTTAGCCAAGCCT	679
HU-MIT107	TCCATGTGTGTGCCCTTTT	CACCACCCACAAATGCATG	638
HU-MIT108	GGGTGTAGTACTTGCTCCC	ACATCCACCAGAGGATTGGC	968
HU-MIT109	AGGTGCAAGTTGACGTTGGT	ATCAAGCCTTTGGACCTGGG	604
HU-MIT110	ACAGAGCAAGCCGACGTAA	TTCCTTGCTACTGCTGCTCC	613

根据 41 对核心引物扩增数据, 利用 NTSYS-pc 2.1 软件, 依据遗传相似系数采用 UPGMA 算

法对 48 个火龙果品种资源进行聚类分析(图 2)。结果表明, 48 份材料遗传相似系数在 0.57~0.91

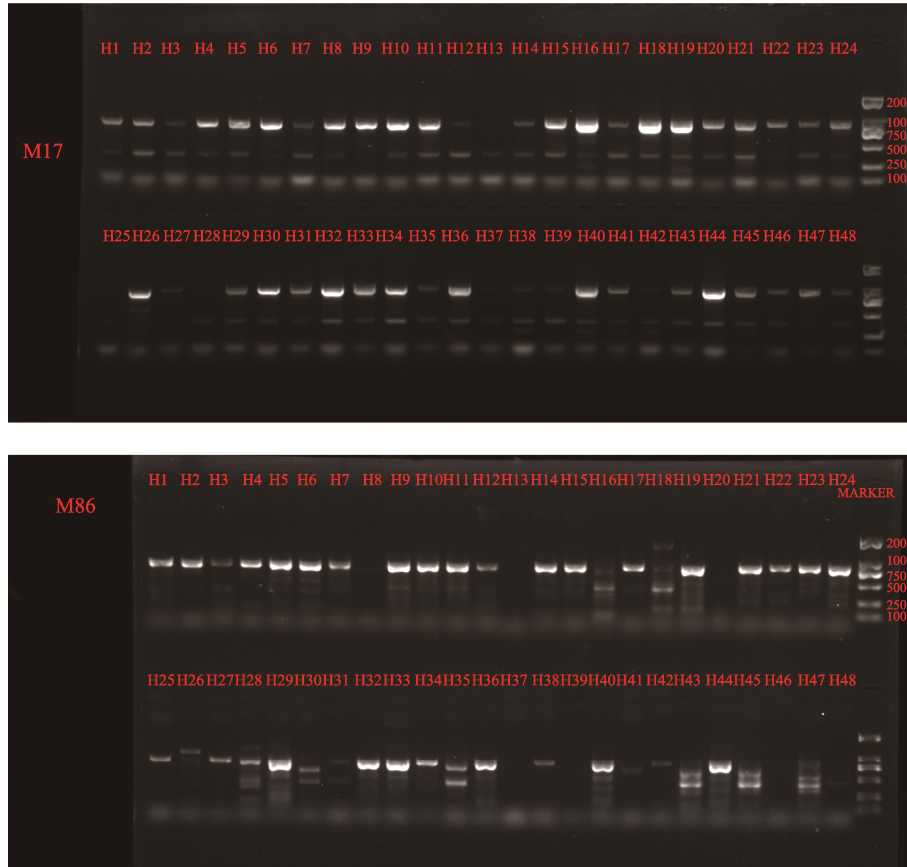


图 1 火龙果品种资源 HU-MIT17、HU-MIT86 引物扩增产物的电泳检测图

Fig. 1 Image of electrophoresis detection results of amplified products of pitaya germplasm resources with HU-MIT17 HU-MIT86 primer

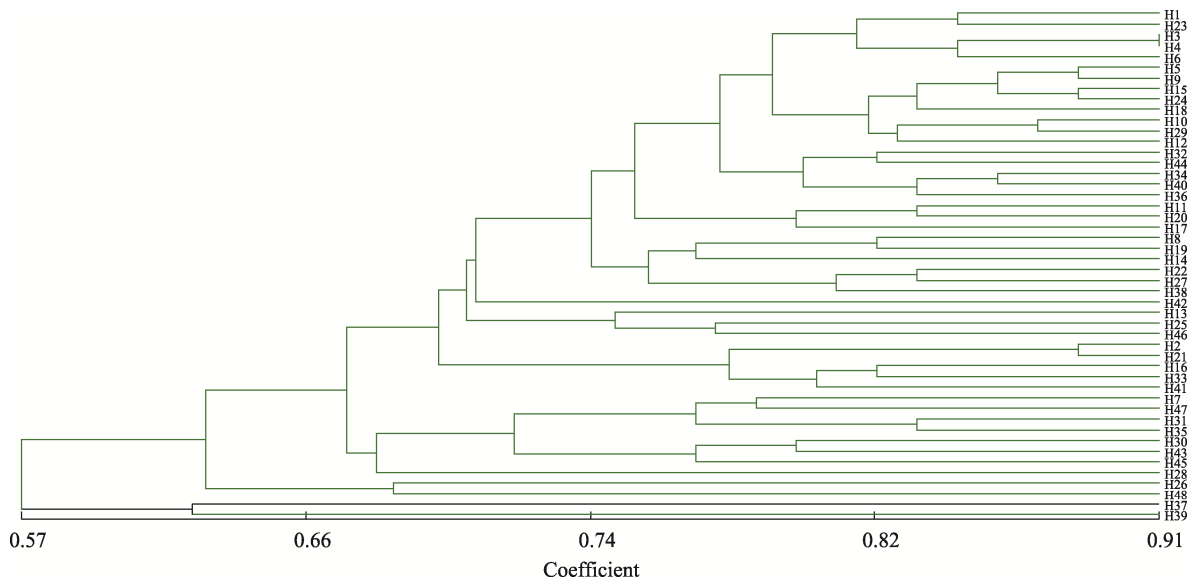


图 2 基于 41 对核心引物的火龙果品种资源聚类分析

Fig. 2 Cluster dendrogram of tested pitaya germplasm resources based on alleles amplified by 41 pair of core primers

之间，说明这些火龙果品种资源之间存在着丰富的变异和遗传多样性。在遗传相似系数为 0.63 时，48 份火龙果材料总体上被分为 4 个类群，其中第

I 类只包含了 H39(黄麒麟-G)；第 II 类包括 H37(红皮燕窝)；第 III 类 H26(大花蛇鞭柱)、H48(S3)蛇鞭柱属野生资源；第 IV 类为常见的火龙

果主栽品种和地方品种, 共计 44 份, 包括桂红龙 1 号、莞华粉红、莞华红、粤红、粤红 3 号、双色 1 号、红冠 2 号、紫龙等广东、广西、海南审定品种, 也包括大翼水晶、白水晶、红水晶、紫蜜龙、红花青龙、柠檬、黄锦、桂族双色、红宝龙等地方特色品种, 还包括巴西粉肉、康尼梅椰、越南白肉、翠西亚、EL、秘鲁燕窝、BNM 等来自越南、澳大利亚、巴西等国的栽培品种。这些品种的遗传相似系数基本在 0.80 以上, 说明现有火龙果品种资源多样性较好, 但是现有栽培品种差异较小, 遗传背景较狭窄, 其中 H3(蜜宝)与 H4(紫龙)之间的相似系数接近 0.91, 说明其亲缘关系较近。

#### 2.4 指纹图谱构建

根据 41 对核心引物扩增结果可以将所有品种区分开, 但从 41 对核心引物中选取最优的 4 对引物组合 (HU-MIT2、HU-MIT6、HU-MIT26、HU-MIT75) 可以将 48 份品种资源完全区分。

HU-MIT2、HU-MIT6、HU-MIT26、HU-MIT75 的多态性好, 分别有 3、5、3、5 个等位变异, 对应的基因型有 6、12、8、16 个, 有很高的鉴别能力, 可以将 48 份材料鉴别出来, 可以作为指纹图谱构建的优选引物。将代表每个样品等位基因位点按顺序组成数字指纹, 构建了 48 份火龙果品种资源的指纹图谱 (表 5)。这些引物的多态性位点有 16 个, 根据概率公式  $1/2^n$  可知, 理论上在  $2^{16}$  (65536) 份品种中才有可能存在 2 个品种的电泳图谱完全相同, 置信概率几乎为 100%, 该指纹图谱可准确检测其中任何品种。

### 3 讨论

前人研究表明, 在火龙果等 8 个仙人掌科植物基因组 TIR 类型的转座子中, hAT 超家族在转座子代表性数据集中占比最大, 其比例为 21.07%~31.86%<sup>[20]</sup>。因此 hAT 类 MITE 是分析火龙果遗传多样性和构建指纹图谱最适合的转座子标记。而

表 5 48 个火龙果品种资源的指纹图谱  
Tab. 5 Fingerprint of 48 pitaya germplasm resources

编号 No.	HU-MIT2	HU-MIT6	HU-MIT26	HU-MIT75	编号 No.	HU-MIT2	HU-MIT6	HU-MIT26	HU-MIT75
H1	011	01101	111	00111	H25	010	00100	000	00111
H2	001	00100	111	00000	H26	001	01101	010	11101
H3	011	01111	100	00111	H27	010	01100	110	00110
H4	011	01111	111	00101	H28	001	00110	001	10111
H5	010	01100	110	10111	H29	011	01100	101	00011
H6	011	11111	111	10111	H30	011	00100	001	11011
H7	100	00110	010	10011	H31	001	00100	010	01010
H8	011	00100	111	00111	H32	000	11100	110	10111
H9	001	10100	110	10111	H33	011	00101	100	00000
H10	011	01101	101	00011	H34	011	10100	110	10111
H11	011	10100	101	00100	H35	001	00100	001	00011
H12	010	01101	111	10111	H36	011	01100	110	00111
H13	010	01100	001	00100	H37	011	00010	001	01011
H14	011	01100	110	00000	H38	000	00100	100	00111
H15	011	11100	111	10111	H39	111	11100	001	00111
H16	011	00100	000	00000	H40	011	11100	110	10111
H17	001	01100	100	00110	H41	011	00100	001	00000
H18	011	01101	000	11111	H42	000	00101	110	00010
H19	011	00000	111	00000	H43	011	00000	001	10111
H20	001	00100	111	00110	H44	011	11110	010	10111
H21	010	00000	101	00000	H45	001	00101	001	11001
H22	011	00100	100	00111	H46	011	00100	010	00111
H23	011	00101	101	00111	H47	001	00110	001	11011
H24	001	01100	010	10111	H48	011	00100	011	11110

本课题组前期开展火龙果栽培种 David Bowie 的基因组 *hAT* 类 MITE 转座子分析发现, 2191 个完整结构的 *hAT* 类 MITE 转座子, 其中 1714 个位于基因间隔区, 231 个位于基因启动子区, 基因区则为 246 个, 平均每对染色体 199 个; 而栽培种莞华白的基因组有 2350 个完整结构的 *hAT* 类 MITE 转座子, 其中基因间隔区含有 1882 个, 243 个位于基因启动子区, 基因区共含 225 个, 平均每对染色体 213 个, 高于栽培种 David Bowie 火龙果基因组。本研究中选择从莞华白火龙果的基因组上开发转座子标记, 每条染色体分别选 10 个多态性位点, 从 110 个位点中筛选出 41 个核心多态性位点, 平均每条染色体 3.7 个, 每个染色体至少有 3 个, 既有多态性, 又有代表性。

本研究鉴定开发的 41 个 *hAT*-MITE 标记, 对 48 份样品进行遗传多样性分析结果中, 共检测出 83 个等位变异, 多态性条带数为 81 个, 多态位点百分率达 97.59%。等位基因数变化范围为 2~5, 平均每个位点等位基因数 2.2 个, 多态性较好。能有效揭示 48 份火龙果种质资源的遗传多样性, 也能很好地鉴别现有主要商业品种。聚类分析结果表明, 除了其中第 I 类只包含了 H39 (黄麒麟-G); 第 II 类包括 H37 (红皮燕窝); 第 III 类 H26 (大花蛇鞭柱)、H48 (S3) 蛇鞭柱属野生资源; 其他的大部分材料遗传相似系数基本在 0.80 以上, 说明现有品种资源遗传背景较狭窄, 相似度较高, 但也存在明显的多样性。本研究对 *hAT*-MITE 转座子在国内外火龙果品种资源中的多态性分布情况做出了初步的判断, 为后期的火龙果种质资源收集、分类以及品种选育提供一定的理论参考依据。

目前品种鉴定主要使用 SSR、SNP 标记。前期本课题组利用 SSR 标记构建了现有主要商业品种的分子身份证, 对完成现有主要商业品种分类、品种鉴定和品种权保护提供了技术支撑<sup>[16-17]</sup>。而利用 SNP (单核苷酸序列多态性) 标记进行品种鉴定在玉米<sup>[22]</sup>、大豆<sup>[23]</sup>等主要农作物均得到广泛利用。但是 SSR 标记法存在 SSR 位点差异小、检测方法成本高、容易出现错误基因型等问题; SNP 标记法存在单个 SNP 位点鉴定能力有限、SNP 位点多、检测成本高等。而 MITE 标记产生的插入缺失标记多态性明确、易识别、开发方便、试验成本低且操作简单利用, 实验条件简单, 能满足大部分研究人员开展种质资源遗传多样性分析、

构建品种指纹图谱研究。有研究表明, MITE 转座子分子标记揭示栽培种花生的 DNA 多态性要明显高于 SSR 分子标记, 展示了其潜在的应用前景<sup>[24]</sup>。另外, MITE 较高的转座活性和转座倾向于插入基因或基因附近区域的特性, 常分布在基因的启动子区或内含子区, 对基因的表达起到调控作用<sup>[1]</sup>, 可以用于 QTL 和功能基因定位和功能标记开发。*hAT* 超家族的 MITE 转座子非常适合开发为新一代的分子标记。

本课题组将结合 MITE 与 SSR、SNP、MNP 标记法开展火龙果种质资源鉴定与遗传多样性研究, 建立品种鉴定技术规程, 开发功能标记, 更系统更准确地对火龙果种质资源鉴定评价, 提高火龙果育种的效率, 为火龙果分类、育种、品种鉴定、品种权保护提供重要的技术支撑和理论依据, 加快培育具有自主知识产权的优异品种, 推动我国火龙果产业健康可持续发展。

## 参考文献

- [1] HAN Y, QIN S, WESSLER S R. Comparison of class 2 transposable elements at superfamily resolution reveals conserved and distinct features in cereal grass genomes[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 71.
- [2] CHARRIER B, FOUCHER F, KONDOROSI E, D' AUBENTON-CARAFAY, THERMES C, KONDOROSI A, RATET P. Bigfoot: a new family of MITEs elements characterized from the *Medicago* genus[J]. The Plant Journal, 1999, 18(4): 431-441.
- [3] BENJAK A, BOUÉ S, FORNECK CASACUBERTA J M. Recent amplification and impact of MITEs on the genome of grapevine (*Vitis vinifera* L.)[J]. Genome Biology and Evolution, 2009, 20: 75-84.
- [4] 李群三, 陈景斌, 顾和平, 袁星星, 陈新, 崔瑾. 基于 InDel 标记的国内绿豆品种遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(1): 122-128.  
LI Q S, CHEN J B, GU H P, YUAN X X, CHEN X, CUI J. Genetic diversity and fingerprint analysis of mungbean varieties from China based on InDel markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(1): 122-128. (in Chinese)
- [5] VENKATESH, NANDINI B. Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs), derived insertional polymorphism as a tool of marker systems for molecular plant breeding[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(4): 3155-3167.
- [6] JIANG N, FESCHOTTE C, ZHANG X Y, WESSLER S R. Using rice to understand the origin and amplification of

- miniature inverted repeat transposable elements (MITEs)[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(2): 115-119
- [7] KEIDAR-FRIEDMAN D, BARIAH I, KASHKUSH K. Genome-wide analyses of miniature inverted-repeat transposable elements reveals new insights into the evolution of the *Triticum-Aegilops* group[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0204972.
- [8] YAAKOV B, CEYLAN E, DOMB K, KASHKUSH K. Marker utility of miniature inverted-repeat transposable elements for wheat biodiversity and evolution[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 124: 1365-1373.
- [9] LU C, CHEN J, ZHANG Y, HU Q, SU W Q, KUANG H H. Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) have been accumulated through amplification bursts and play important roles in gene expression and species diversity in *Oryza sativa*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29(3): 1005-1017.
- [10] 王洁, 李双铃, 王辉, 石延茂, 任艳, 何国浩, 袁美. 利用 AhMITE1 转座子分子标记鉴定花生 F<sub>1</sub> 代杂种[J]. *花生学报*, 2012, 41(2): 8-12.  
WANG J, LI S L, WANG H, SHI Y M, REN Y, HE G H, YUAN M. Identification of Peanut F<sub>1</sub> hybrid using AhMITE1 transposable element marker[J]. *Journal of Peanut Science*, 2012, 41(2): 8-12. (in Chinese)
- [11] 尹亮, 任艳, 石延茂, 李双铃, 王辉, 袁美. 利用 AhMITE1 转座子分子标记鉴定栽培花生杂交 F<sub>1</sub> 代种子真伪[J]. *山东农业科学*, 2015, 47(12): 1-5.  
YIN L, REN Y, SHI Y M, LI S L, WANG H, YUAN M. Identification of true F<sub>1</sub> hybrid using AhMITE1 markers in cultivated Peanut[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2015, 47(12): 1-5. (in Chinese)
- [12] 安素妨, 李保全, 鲁丹丹, 李高原, 侯锦娜. MITE 转座子在不同甘蓝型油菜品种中的多态性研究[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(8): 1389-1399.  
AN S F, LI B Q, LU D D, LI G Y, HOU J N. Polymorphism of MITE in different *Brassica napus* L. varieties[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39(8): 1389-1399. (in Chinese)
- [13] 马忠友, 苏京平, 孙林静, 刘学军, 王春敏, 王胜军, 曾斌, 梁永书, 闫双勇. 微型反向重复转座元件 (MITE) 靶区域扩增多态性: 一种基于 MITE 的分子标记方法在水稻及其他植物上的应用[J]. *中国水稻科学*, 2007, 21(5): 459-463.  
MA Z Y, SU J P, SUN L J, LIU X J, WANG C M, WANG S J, ZENG B, LIANG Y S, YAN S Y. MITE-TRAP: a marker technique based on miniature inverted repeat transposable element and target region amplification polymorphism for Rice and other plants[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2007, 21(5): 459-463. (in Chinese)
- [14] 王彬, 郑伟, 宋莎, 李兴忠, 蔡永强. 紫红火龙果及其大果型芽变系的 ISSR 分析[J]. *西南农业学报*, 2013, 26(4): 1614-1617.  
WANG B, ZHENG W, SONG S, LI X Z, CAI Y Q. Identification of Zihonglong pitaya and its big-fruit sport line by ISSR[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 26(4): 1614-1617. (in Chinese)
- [15] 张冰雪, 范付华, 乔光, 宋莎, 文晓鹏, 刘涛. 贵州地方火龙果芽变种质 DNA 指纹图谱及遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *果树学报*, 2013, 30(4): 573-577.  
ZHANG B X, FAN F H, QIAO G, SONG S, WEN X P, LIU T. DNA fingerprint construction and genetic relationship analysis of dragon fruit germplasm in guizhou by ISSR markers[J]. *Journal of Fruit Science*, 2013, 30(4): 573-577. (in Chinese)
- [16] 胡文斌, 林家年, 洪青梅, 李婧, 濮文辉, 何云, 李洪立, 李琼. 火龙果 SSR 分子标记核心引物的筛选[J]. *热带农业科学*, 2020, 40(12): 35-42.  
HU W B, LIN J N, HONG Q M, LI J, PU W H, HE Y, LI H L, LI Q. Screening of SSR core primers for pitaya[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2020, 40(12): 35-42. (in Chinese)
- [17] 胡文斌, 洪青梅, 李婧, 濮文辉, 何云, 李洪立, 李琼. 火龙果主要商业品种 SSR 指纹图谱构建和遗传多样性分析[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(5): 1310-1317.  
HU W B, HONG Q M, LI J, PU W H, HE Y, LI H L, LI Q. Genetic diversity analysis and SSR fingerprint construction of pitaya cultivars[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(5): 1310-1317. (in Chinese)
- [18] 武志江, 邓海燕, 梁桂东, 陆贵锋, 黄凤珠, 刘朝安, 李祯英, 黄黎芳. 利用荧光标记 SSR 构建火龙果种质资源分子身份证[J]. *中国南方果树*, 2020, 49(4): 20-28.  
WU Z J, DENG H Y, LIANG G D, LU G F, HUANG F Z, LIU C A, LI Z Y, HUANG L F. Construction of molecular ID for pitaya germplasm resources using Fluorescent-labeled SSR[J]. *South China Fruits*, 2020, 49(4): 20-28. (in Chinese)
- [19] 陶金, 乔光, 文晓鹏, 刘涛, 彭志军. 火龙果 IRAP 分子标记反应体系的建立与优化[J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(4): 33-38.  
TAO J, QIAO G, WEN X P, LIU T, PENG Z J. Establishment and optimization of IRAP marker methodology in dragon fruit[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(4): 33-38. (in Chinese)
- [20] 石天慧, 徐军桂, 舒庆尧, 徐建红, 刘振. 仙人掌科植物基因组中重复序列的鉴定与分析[J/OL]. *分子植物育种*. (2025-05-05)[2025-05-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46>

- 1068.S.20240925.1522.003.html.
- SHI T H, XU J G, SHU Q Y, XU J H, LIU Z. Identification and analysis of repeat sequences in the genome of cactaceae family plants[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, (2025-05-05)[2025-05-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240925.1522.003.html>. (in Chinese)
- [21] CHEN J Y, XIE F F, CUI Y Z, CHEN C B, LU W J, HU X D, HUA Q Z, ZHAO J, WU Z J, GAO D, ZHANG Z K, JIANG W K, SUN Q M, HU G B, QIN Y H. A chromosome-scale genome sequence of pitaya (*Hylocereus undatus*) provides novel insights into the genome evolution and regulation of betalain biosynthesis[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8: 164.
- [22] 赵久然, 王凤格, 易红梅, 田红丽, 杨扬. 我国玉米品种标准 DNA 指纹库构建研究及应用进展[J]. *作物杂志*, 2015(2): 1-6.
- ZHAO J R, WANG F G, YI H M, TIAN H L, YANG Y. Progress of construction of Chinese maize varieties standard DNA fingerprint database[J]. *Crops*, 2015(2): 1-6. (in Chinese)
- [23] 魏中艳, 李慧慧, 李骏, GAMAR Y A, 马岩松, 邱丽娟. 应用 SNP 精准鉴定大豆种质及构建可扫描身份证[J]. *作物学报*, 2018, 44(3): 315-323.
- WEI Z Y, LI H H, LI J, GAMAR Y A, MA Y S, QIU L J. Accurate identification of varieties by nucleotide polymorphisms and establishment of scannable variety IDs for Soybean germplasm[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(3): 315-323. (in Chinese)
- [24] 熊发前, 刘俊仙, 贺梁琼, 韩柱强, 黄志鹏, 唐秀梅, 蒋菁, 钟瑞春, 吴海宁, 李忠, 罗赛云, 唐荣华, 何新华. 花生 LTR 和 MITE 转座子及其分子标记开发利用研究进展[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(2): 640-647.
- XIONG F Q, LIU J X, HE L Q, HAN Z Q, HUANG Z P, TANG X M, JIANG J, ZHONG R C, WU H N, LI Z, LUO S Y, TANG R H, HE X H. Recent advances on the development and utilization of molecular markers based on LTR Retrotransposons and MITE transposons from peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(2): 640-647. (in Chinese)