

文章编号: 1674-7054(2017)03-0284-08

木薯中性/碱性转化酶基因家族 11 个成员 在染色体上的定位

朱利广^{1,2}, 刘平平¹, 欧祥梅¹, 王 英¹, 高和琼¹, 庄南生¹

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737)

摘 要: 中性/碱性转化酶(Alkaline or neutral invertase, N/A-Inv) 是木薯淀粉合成过程中的一种关键酶。笔者以木薯华南 6 号古铜期嫩叶为材料制备染色体标本, 利用荧光原位杂交和原位 PCR 技术对 N/A-Inv 基因家族的 11 个成员进行了物理定位。结果表明, 基因 *MeNINV5*, *MeNINV9* 和 *MeNINV10* 均位于第 4 号染色体上, 其中基因 *MeNINV9* 和 *MeNINV10* 位于短臂上, 到信号点的百分距离分别为 68.52 和 95.35, 基因 *MeNINV5* 位于长臂上, 到着丝粒的百分距离为 22.71; 基因 *MeNINV4* 和 *nINV1* 均位于第 6 号染色体长臂上, 到着丝粒的百分距离分别为 43.16 和 80.71; 基因 *MeNINV6* 和 *MeNINV7* 分别位于第 7 号和第 17 号染色体的长臂上, 信号点到着丝粒的百分距离分别是 15.38 和 57.97; 基因 *MeNINV1*, *MeNINV2*, *MeNINV3* 和 *MeNINV8* 分别位于第 11 号、第 9 号、第 5 号和第 16 号染色体的短臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离分别是 40.10, 51.88, 91.75 和 76.33。中性/碱性转化酶基因家族内部部分成员之间存在连锁关系。研究结果可为木薯淀粉的高效积累机制及木薯种质遗传改良提供分子细胞遗传学依据。

关键词: 木薯; 中性/碱性转化酶基因家族; 荧光原位杂交; 原位 PCR; 物理定位

中图分类号: Q 789

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.03.006

中性/碱性转化酶(Alkaline or neutral invertase, N/A-Inv) 是高等植物中决定糖类库组织分配的一种关键酶^[1], 其功能是将蔗糖不可逆地分解为葡萄糖和果糖^[2]。研究人员已从枳、橡胶树、欧柑等多种植物中克隆分离出了 N/A-Inv 基因^[3-5], 并对其功能进行了大量的研究: 在枳中, N/A-Inv 基因在非生物胁迫耐受性中起积极作用^[6]; 在橡胶树中, 基因 *HbNINa* 参与了蔗糖的利用, 在橡胶树叶片发育过程中具有重要作用^[4]; 在‘丰蜜二号’甜瓜中, 叶片中 N/A-Inv 含量的提高可以促进蔗糖的积累^[7]; 在胡萝卜中, N/A-Inv 基因参与了植株的生长发育^[8]; 在白脉根中, 1 个 N/A-Inv 基因的缺失会严重影响其生长和花器官发育^[9]。木薯(*Manihot esculenta* Crantz) 是热带地区重要的能源植物和粮食作物。Yao 等已从木薯中克隆出了 N/A-Inv 基因家族的 11 个成员(*MeNINV1* ~ *10* 和 *nINV1*) 并对其表达情况进行了分析, 发现基因 *MeNINV1*, *MeNINV6*, *MeNINV10*, *nINV1* 均在叶片中高度表达, 而且基因 *MeNINV1* 和 *nINV1* 还在块茎中表达, 推测这些基因在蔗糖水解过程中起重要作用, 并参与了淀粉积累的过程; 该研究还发现, 在低温胁迫下, N/A-Inv 基因会增强表达, 从而提高可溶性糖、蔗糖、还原糖的含量, 增强木薯抗逆性^[10]。但是, 这些基因在染色体上的位置尚未见报道。荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH) 是一种在染色体或 DNA 纤维上对已知 DNA 序列进行定位的细胞遗传学技术^[11], 其原理是在适当的外部条件下, 以碱基互补配对为原则, 将被荧光标记过的探针与染色体上的目标 DNA 序列杂交, 然后通过荧光显微镜来检测荧光信号, 从而完成对目的片段的定位、定量等工作^[12]。原位 PCR 技术是一种进行目的核酸片段细胞内检测和定位的分子技术, 其工作原理是通过改变细胞通透性等手段, 达到在细胞内对目的序列进行 PCR 扩

收稿日期: 2017-04-17

修回日期: 2017-05-10

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(1630032016008)

作者简介: 朱利广(1990-), 男, 海南大学热带农林学院 2014 级硕士生, E-mail: 770219387@qq.com

通信作者: 庄南生(1962-), 男, 教授, 研究方向: 热带作物遗传育种, E-mail: zhuangns@163.com

增的目的,然后结合原位杂交或免疫反应、荧光检测等手段使目的序列带上荧光信号,从而完成对目的序列的检测。目前,FISH和原位PCR技术是进行植物功能基因物理定位的主要手段。笔者利用FISH和原位PCR技术对木薯N/A-Inv基因家族11个成员进行了物理定位分析,明确了淀粉合成与代谢相关基因在染色体上的分布特征及相互之间的位置关系,本研究结果可为木薯淀粉的高效积累机制及木薯种质遗传改良提供分子细胞遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 采样及预处理 材料来自海南大学热带农林学院基地种植的木薯华南6号(*Manihot esculenta* Crantz. cv. M. SC6)。连续晴天时,于上午8:30~10:00取木薯古铜期嫩叶,置于预冷的对二氯苯饱和溶液中,预处理1.5 h,卡诺氏固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)4℃固定过夜。75%、90%、100%酒精脱水各5 min,最后置于70%酒精中-20℃保存备用。

1.2 木薯SC6染色体标本的制备 借鉴木薯根尖制片方法和橡胶叶片制片方法进行^[13-14]。采用酶解去壁低渗法制片,经预处理过的古铜期嫩叶37℃条件下混合酶液(5%纤维素酶和4%果胶酶)中酶解4.5 h,低渗固定后涂片,5% Giemsa 染液染色12 min,镜检。

1.3 特异引物及目的片段的获得 Yao等已完成对木薯N/A-Inv基因家族11个成员的克隆,并将其连接到质粒上进行了保存^[10]。笔者在此基础上对这些基因进行PCR扩增以获得目的片段,所用特异引物序列均来自中国热带农业科学院热带生物技术研究所郭建春课题组,基因MeNINV1、2、3、4、7、8、10扩增所用模板来自该课题组的含目的片段的质粒,基因MeNINV5、6、9和nINV1扩增所用模板是木薯SC6的基因组DNA。

1.4 荧光原位杂交 将PCR扩增产物用乙醇沉淀法纯化后,用DIG/BIO-Nick Translation Mix for in situ probes(Roche)试剂盒制成探针,参照刘平平^[15]的方法进行FISH。取染色体标本在70℃烘片老化2 h,置于70℃水浴预热的70%甲酰胺中变性5 min后依次用-20℃预冷的75%、90%、100%酒精脱水5 min;风干后滴加30 μL变性过的杂交液,放入杂交仪中启动程序:90℃,10 min;37℃,20 h。待程序进行结束后,将玻片于42℃下依次用2×SSC、20%去离子甲酰胺、1×PBS各洗脱10 min后加荧光染料(所加染料抗体成分与杂交液中探针的类型相对应)染色并进行两步信号级联放大;用1×PBS 5 min,1×PBS(含0.1%吐温100)5 min,1×PBS 8 min洗脱,最后加30 μL 10 μg·mL⁻¹的DAPI(含抗淬灭剂DABCO)复染。

1.5 原位PCR 参照叶光燕^[16]的木薯原位PCR技术流程,在经预处理、脱水后的玻片上滴加50 μL PCR反应液,在原位PCR仪中进行原位扩增;扩增完成后玻片置于37℃ 0.1×PBS溶液中洗脱5 min;然后用5% BSA 37℃孵育20 min,再用20 μg·mL⁻¹的Anti-DIG-Fluorescein在同样的温度下孵育1 h;最后用40 μL的DAPI(含抗淬灭剂DABCO)复染。

1.6 镜检及分析 用荧光显微镜BX51TR-32FA1-A03镜检并拍照,Photoshop处理后根据Song等^[17]的信号位置计算方法,参照冯耀文等^[18]的木薯SC6的核型数据确定信号位点在染色体上的位置,计算公式为

$$\text{扩增信号位点的百分距离} = \frac{\text{扩增信号位点到着丝点的距离}(\mu\text{m})}{\text{扩增信号位点所在染色体臂的长度}(\mu\text{m})} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 MeNINV5和nINV1基因的原位PCR检测及定位分析 以基因MeNINV5和nINV1的特异引物在用木薯SC6嫩叶制成的染色体标本上进行原位PCR检测,结果如图1、2。图1、2可见:在细胞有丝分裂的间期、前期和中期,基因MeNINV5和nINV1均能检测到1到2个信号点(图1A~C,图2A~B),阴性对照中则检测不到信号点(图1D,图2C)。说明这2个基因在木薯SC6基因组中为单拷贝基因。对含有信号点的中期细胞进行核型分析,结果表明,基因MeNINV5和nINV1分别位于第4、6号染色体的长臂上,基因位点到着丝粒的百分距离分别是22.71和80.71(图1E,图2D)。

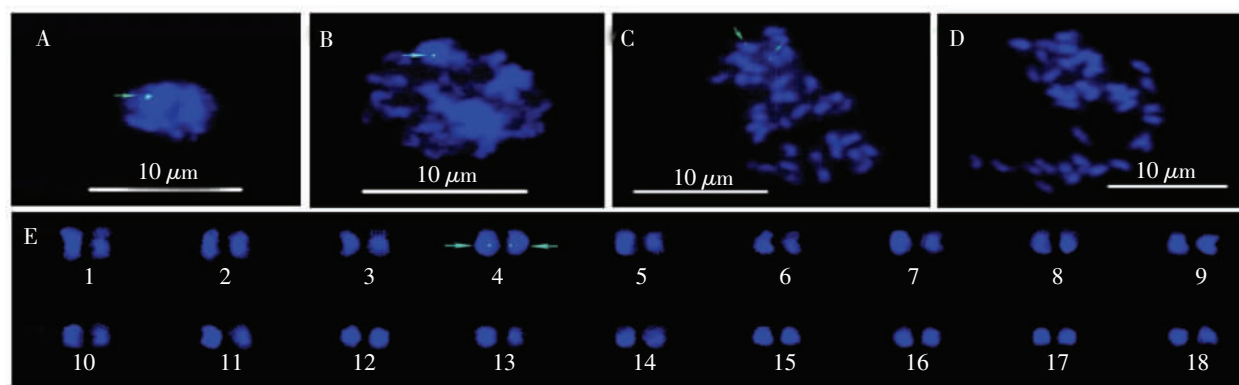


图1 *MeNINV5* 基因原位 PCR 结果图及核型

绿色箭头所示为 *MeNINV5* 的信号位点

A: 间期; B: 前期; C: 中期; D: 阴性对照; E: 中期细胞核型图

Fig.1 The results of *in situ* PCR and karyotype of *MeNINV5* gene

Green arrows indicated the signal of *MeNINV5*

A: Interphase; B: Prophase; C: Metaphase; D: Negative control; E: Karyogram of metaphase cell (C)

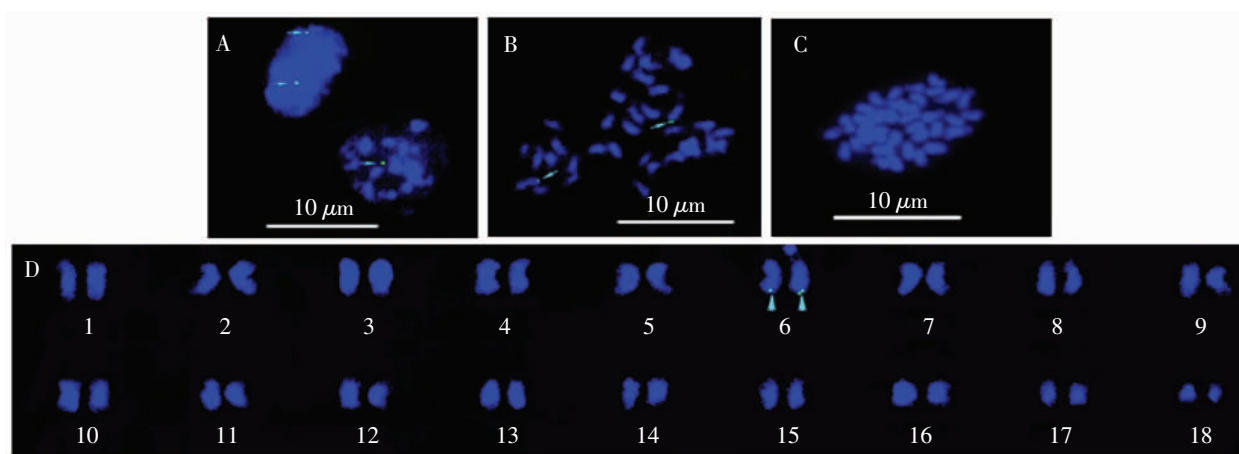


图2 *nINV1* 基因原位 PCR 结果图及核型

绿色箭头所示为 *nINV1* 的信号位点

A: 间期和前期; B: 中期; C: 阴性对照; D: 中期细胞核型

Fig.2 The results of *in situ* PCR and karyotype of *nINV1* gene

Green arrows indicated the signal of *nINV1*

A: Interphase and Prophase; B: Metaphase; C: Negative control; D: Karyogram of metaphase cell (B)

2.2 *MeNINV2* 和 *MeNINV3* 基因的 FISH 检测与物理定位分析 以 DIG 标记的 *MeNINV2* 和以 BIO 标记的 *MeNINV3* 为双探针,对用木薯 SC6 嫩叶制成的染色体标本进行双色 FISH 检测的定位分析,结果(图 3)表明,在细胞有丝分裂的间期、前期和中期,两个基因都能检测到 2 个信号点(图 3A~C),阴性对照的细胞中则检测不到信号点(图 3D),说明基因 *MeNINV2* 和 *MeNINV3* 在木薯 SC6 基因组中均为单拷贝基因。对含有信号点的中期细胞进行核型分析,结果表明,基因 *MeNINV2* 和 *MeNINV3* 分别位于木薯 SC6 第 9 号和第 5 号染色体短臂上,信号位点到着丝粒的百分距离分别是 51.88 和 91.75(图 3E)。

2.3 *MeNINV4* 和 *MeNINV8* 基因的 FISH 检测与物理定位分析 以 DIG 标记的 *MeNINV4* 和以 BIO 标记的 *MeNINV8* 为双探针,对用木薯 SC6 嫩叶制成的染色体标本进行双色 FISH 检测的定位分析,结果(图 4)表明,在细胞有丝分裂的间期、前期和中期,2 个基因都能检测到 2 个信号点(图 4A~C),阴性对照的细胞中则检测不到信号点(图 4D),说明基因 *MeNINV4* 和 *MeNINV8* 在木薯 SC6 基因组中均为单拷贝基因。对含有信号点的中期细胞进行核型分析,结果表明,基因 *MeNINV4* 和 *MeNINV8* 分别位于木薯 SC6 第 6 号染色体长臂和第 16 号染色体短臂上,信号位点到着丝粒的百分距离分别是 43.16 和 76.33(图 4E)。

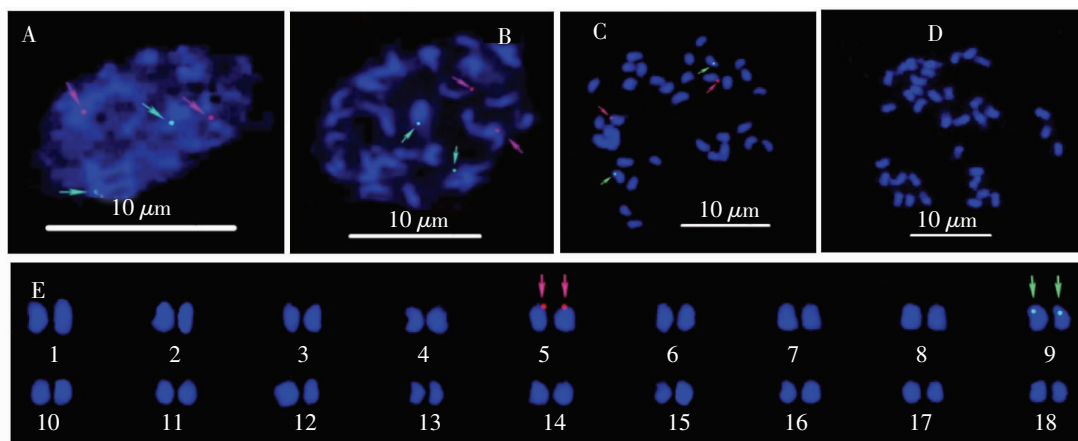


图3 *MeNINV2* 和 *MeNINV3* 基因的 FISH 结果图及核型

红色箭头所示为 *MeNINV3* 的信号位点;绿色箭头所示为 *MeNINV2* 的信号位点

A: 间期;B: 前期;C: 中期;D: 阴性对照;E: 中期细胞核型图

Fig.3 The result of *MeNINV2* and *MeNINV3* gene detected by FISH

Red arrows indicated the signal of *MeNINV3*; Green arrows indicated the signal of *MeNINV2*

A: Interphase; B: Prophase; C: Metaphase; D: Negative control; E: Karyogram of metaphase cell

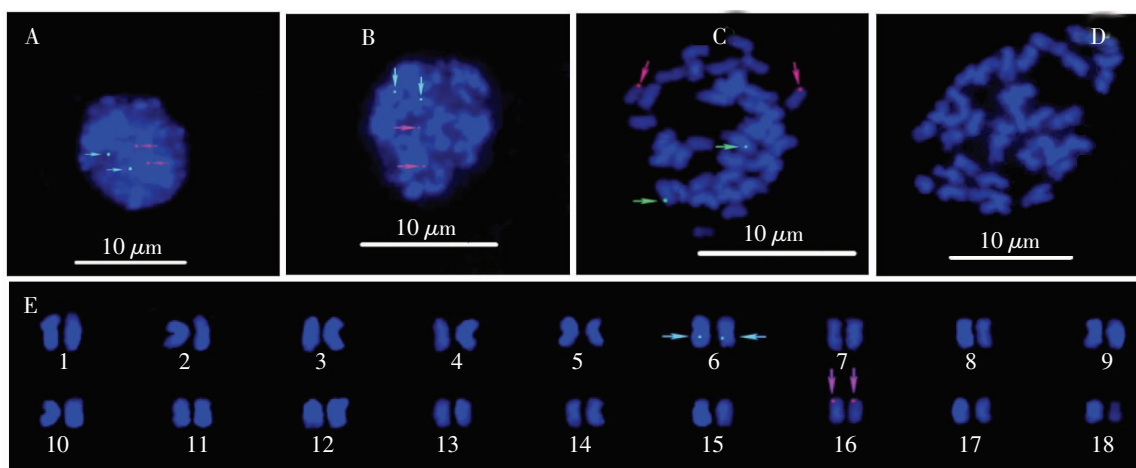


图4 *MeNINV4* 和 *MeNINV8* 基因的 FISH 结果图及核型

红色箭头所示为 *MeNINV8* 的信号位点;绿色箭头所示为 *MeNINV4* 的信号位点

A: 间期;B: 前期;C: 中期;D: 阴性对照;E: 中期细胞核型图

Fig.4 The result of *MeNINV4* and *MeNINV8* gene detected by FISH

Red arrows indicated the signal of *MeNINV8*; Green arrows indicated the signal of *MeNINV4*

A: Interphase; B: Prophase; C: Metaphase; D: Negative control; E: Karyogram of metaphase cell

2.4 *MeNINV9* 和 *MeNINV10* 基因的 FISH 检测与物理定位分析 以 DIG 标记的 *MeNINV9* 和以 BIO 标记的 *MeNINV10* 为双探针,对用木薯 SC6 嫩叶制成的染色体标本进行双色 FISH 检测的定位分析,结果(图5)表明,在细胞有丝分裂的间期、前期和中期 2 个基因都能检测到 1~2 个信号点(图5A~C),阴性对照的细胞中则检测不到信号点(图5D),说明基因 *MeNINV9* 和 *MeNINV10* 在木薯 SC6 基因组中均为单拷贝基因。对含有信号点的中期细胞进行核型分析,结果表明,基因 *MeNINV9* 和 *MeNINV10* 均位于木薯 SC6 第 4 号染色体的短臂上,所以二者互为连锁基因,其信号位点到着丝粒的百分距离分别是 68.52 和 95.35(图5E)。

2.5 *MeNINV1*, *MeNINV6* 和 *MeNINV7* 基因的 FISH 检测与物理定位分析 基因 *MeNINV1*, *MeNINV6* 和 *MeNINV7* 分别用 DIG 标记为探针,然后分别进行单色 FISH 检测和定位分析。结果(图6~8)表明,在细胞有丝分裂的间

期、前期和中期,基因 *MeNINV1*、*MeNINV6* 和 *MeNINV7* 均能检测到 2 个信号点(图 6A~C,图 7A~C,图 8A~C)。阴性对照中则检测不到信号点(图 6D,7D,8D)。说明这 3 个基因在木薯 SC6 基因组中为单拷贝基因。对含有信号点的中期细胞进行核型分析,结果表明,基因 *MeNINV1* 位于木薯 SC6 第 11 号染色体的短臂上(图 6E),基因 *MeNINV6*、7 分别位于木薯 SC6 第 7 号和第 17 号染色体的长臂上(图 7E,8E),3 者到着丝粒的百分距离分别是 40.10、15.38 和 57.97。

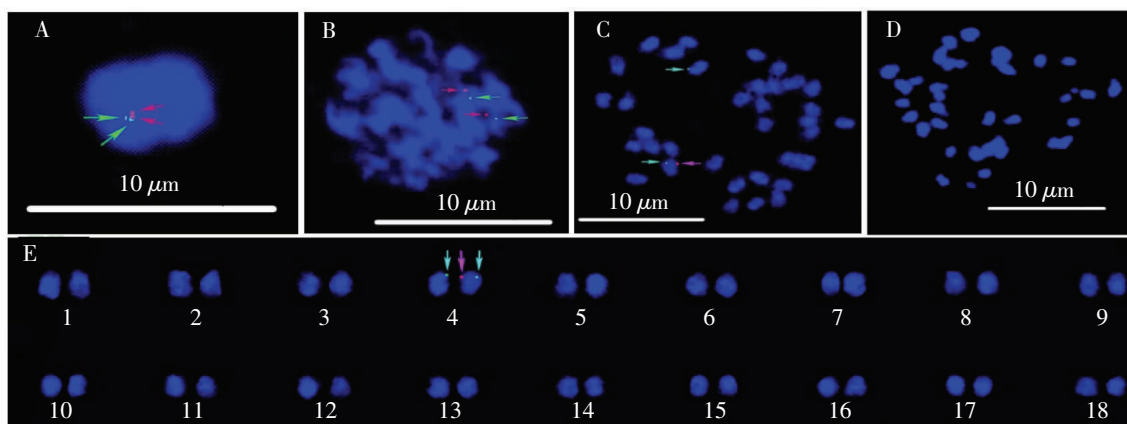


图 5 *MeNINV9* 和 *MeNINV10* 基因的 FISH 结果图及核型

红色箭头所示为 *MeNINV10* 的信号位点;绿色箭头所示为 *MeNINV9* 的信号位点

A: 间期;B: 前期;C: 中期;D: 阴性对照;E: 中期细胞核型图

Fig.5 The result of *MeNINV9* and *MeNINV10* gene detected by FISH

Red arrows indicated the signal of *MeNINV10*; Green arrows indicated the signal of *MeNINV9*

A: Interphase; B: Prophase; C: Metaphase; D: Negative control; E: Karyogram of metaphase cell

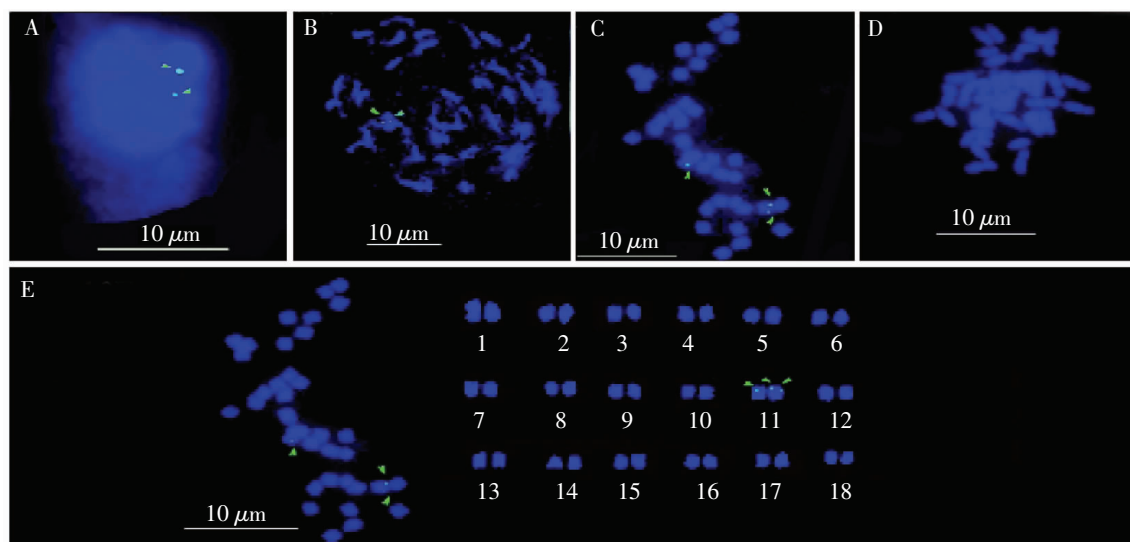


图 6 *MeNINV1* 基因的 FISH 结果图及核型

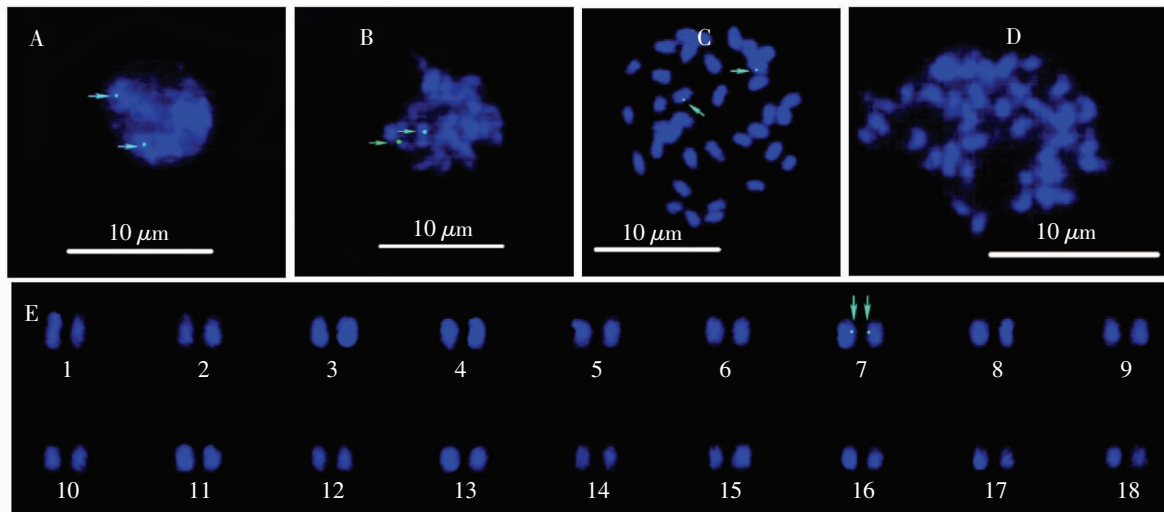
绿色箭头所示为 *MeNINV1* 的信号位点

A: 间期;B: 前期;C: 中期;D: 阴性;E: 中期细胞的核型图

Fig.6 The result of *MeNINV1* gene detected by FISH

Green arrows indicated the signal of *MeNINV1*

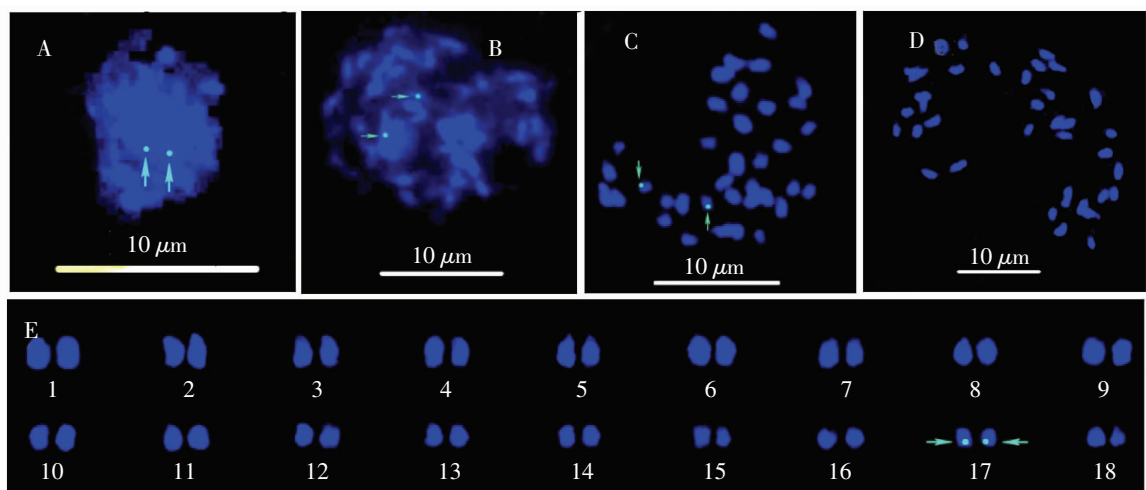
A: Interphase; B: Prophase; C: Metaphase; D: Negative control; E: Karyogram of metaphase cell

图 7 *MeNINV6* 基因的 FISH 结果图及核型绿色箭头所示为 *MeNINV6* 的信号位点

A: 间期; B: 前期; C: 中期; D: 阴性对照; E: 中期细胞核型图

Fig.7 The result of *MeNINV6* gene detected by FISHGreen arrows indicated the signal of *MeNINV6*

A: Interphase; B: Prophase; C: Metaphase; D: Negative control; E: Karyogram of metaphase cell

图 8 *MeNINV7* 基因的 FISH 结果图及核型绿色箭头所示为 *MeNINV7* 的信号位点

A: 间期; B: 前期; C: 中期; D: 阴性对照; E: 中期细胞核型图

Fig.8 The result of *MeNINV7* gene detected by FISHGreen arrows indicated the signal of *MeNINV7*

A: Interphase; B: Prophase; C: Metaphase; D: Negative control; E: Karyogram of metaphase cell

2.6 N/A-Inv 基因家族各成员在核型中的位置关系分析 根据木薯 SC6 的核型数据^[18],以及对 N/A-Inv 基因家族 11 个成员物理定位的结果,绘制出了含有各基因位点的核型模式图(图 9)。从图 9 可见基因 *MeNINV5*, *MeNINV9*, *MeNINV10* 均位于第 4 号染色体上,互为连锁基因;基因 *MeNINV4* 和 *nINV1* 均位于第 6 号染色体上,互为连锁基因;基因 *MeNINV1*、*MeNINV2*、*MeNINV3*, *MeNINV6*, *MeNINV7* 和 *MeNINV8* 分别位于第 11, 9, 5, 7, 17 和 16 号染色体上,互为独立基因。由此说明,中性/碱性转化酶基因家族内部部分成员之间存在连锁关系。

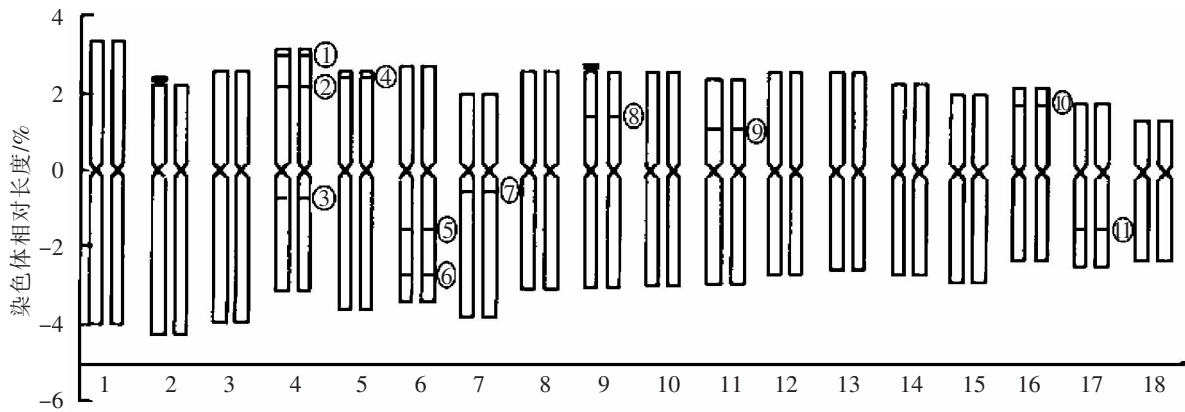


图9 木薯华南六号核型模式图

Fig.9 Karyotype idiogram of Cassava SC6

注 (Note): ①: *MeNINV10*; ②: *MeNINV9*; ③: *MeNINV5*; ④: *MeNINV3*; ⑤: *MeNINV4*; ⑥: *nINV1*; ⑦: *MeNINV6*; ⑧: *MeNINV2*; ⑨: *MeNINV1*; ⑩: *MeNINV8*; ⑪: *MeNINV7*

3 讨论

FISH 是进行功能基因物理定位的常用方法,但是如果基因组中存在与靶序列同源性较高的序列,进行 FISH 检测时可能会检测到非特异性信号。本研究进行物理定位的 11 个基因中,基因 *MeNINV7* 和 *MeNINV10* 同源性为 86.9%,基因 *nINV1* 和 *MeNINV4* 同源性为 76.9%,同源性都比较高,但笔者分别用 *MeNINV4*, *MeNINV7* 或 *MeNINV10* 的 DNA 序列为探针进行 FISH 检测时,并没有出现多信号点的问题。原因是 2 对基因片段之间同源性虽然比较高,但其同源区域都是断续的,在杂交时相似片段之间的结合并不紧密;另外,笔者在杂交液中添加了大量的鲑鱼精 DNA 作为封阻剂,并在杂交后进行了严格的洗脱。所以在检测时没有出现非特异性信号。此研究中,在对某些基因进行定位时,很多细胞中并不能同时检测到一对儿信号点,猜测原因是:在预处理的过程中,染色体标本变性不足,使得部分位置的核酸双链没有完全打开;在进行洗脱时,甲酰胺的浓度或洗脱的温度太高,将部分信号洗脱掉了,导致了假阴性。目前,尚未见到针对 N/A-InV 基因家族进行分子标记定位的报道。

研究人员已先后对木薯淀粉分支酶基因 (*SBEI*, *SBEII*)、颗粒结合型淀粉合成酶基因 (*GBSSI*, *GBSSII*)、延长因子 (*MeEF1*)、己糖激酶基因 (*MeHXK2*) 和蔗糖转运蛋白基因 (*SUT4.1*, *SUT1*, *SUT4.2*, *SUT2*) 等功能基因进行了物理定位^[15, 19-20],比较 N/A-InV 基因与这些已定位基因的位置关系, *MeNINV6* 基因与 *SBEII* 和 *SUT4.1* 基因均属于第 7 号染色体上的基因,三者存在连锁关系; *MeNINV1* 与 *GBSSII* 基因均位于 11 号染色体的短臂上,两者之间存在连锁关系; *MeNINV2* 和 *SBEI* 基因均位于第 12 号染色体上,属于连锁关系; *MeNINV7* 与基因 *SUT2* 均位于第 17 号染色体上,两者之间同样具有连锁关系。

参考文献:

- [1] 蓝基贤,唐朝荣. 高等植物中转化酶生理生化特性的研究进展[J]. 热带作物学报, 2012, 33(9): 1702-1707.
- [2] Winter H, Huber S C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19(1): 31-67.
- [3] 王菲. 枳中性转化酶基因 Training 克隆及其功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [4] 肖小虎, 戚继艳, 方永军, 等. 巴西橡胶树中碱性转化酶 Nina 基因的克隆和表达模式分析[J]. 热带作物学报, 2013, 34(7): 1264-1269.
- [5] 金微微, 陈功楷, 郝爱玲, 等. 瓯柑中性转化酶基因 (*CrInv1*) 克隆及序列特征分析[J]. 中国农学通报, 2015, 31(16): 105-110.
- [6] 巴沙尔 (BACHAR DAHRO). 枳碱性/中性转化酶基因 PtrA/NINV 功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.

- [7] 罗海玲, 黄玉辉, 张曼, 等. 转化酶与甜瓜果实膨大及糖分积累相关研究[J]. 南方农业学报, 2011, 42(4): 384–387.
- [8] Sturm A. Invertases: primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning[J]. Plant Physiol, 1999, 121(1): 1–7.
- [9] Welham T, Pike J, Horst I, et al. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus* [J]. J Exp Bot, 2009, 60: 3353–3365.
- [10] Yao Y, Geng M T, Guo J C, et al. Genome-wide identification, expression and activity analysis of alkaline/neutral invertase gene family from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. Plant Mol Biol, 2015, 3: 304–315.
- [11] 何世斌, 柴连琴, 谭珺隽, 等. 荧光原位杂交技术的研究进展[J]. 植物科学学报, 2014, 32(2): 199–204.
- [12] 李鹏昊, 曲婷, 黄继华, 等. 一种稳定的人卵母细胞染色体荧光原位杂交技术[J]. 癌变. 畸变. 突变, 2016, 28(2): 131–133.
- [13] 王超, 庄南生, 王英, 等. 木薯根尖染色体制片方法的优化[J]. 热带作物学报, 2012(4): 627–630.
- [14] 高和琼, 王英, 金鸽, 等. 橡胶树叶片染色体制片方法的优化[J]. 热带作物学报, 2009, 30(5): 565–569.
- [15] 刘平平, 王英, 高和琼, 等. 木薯淀粉合成相关基因 SBE 和 GBSS 的物理定位[J]. 分子植物育种, 2015(10): 2224–2229.
- [16] 叶光燕, 王英, 高和琼, 等. 木薯遗传图谱 9 号连锁群 NS701, NS272 标记的物理定位[J]. 分子植物育种, 2015(10): 2243–2249.
- [17] Song Y C, Gustafson J P. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 113–119.
- [18] 冯耀文, 王英, 高和琼, 等. 木薯 MeEF I 基因的原位 PCR 物理定位[J]. 热带生物学报, 2011, 2(2): 129–132.
- [19] 冯耀文. 木薯 SBE II 和 MeEF I 基因物理定位的研究[D]. 海口: 海南大学, 2011.
- [20] 李晶晶, 王英, 高和琼, 等. 木薯蔗糖转运蛋白(SUT) 家族基因的染色体物理定位[J]. 分子植物育种, 2016(4): 794–802.

Chromosome Physical Location of 11 Members of Alkaline or Neutral Invertase Gene Family in Cassava

ZHU Liguang^{1,2}, LIU Pingping¹, OU Xiangmei¹, WANG Ying¹, GAO Heqiong¹, ZHUANG Nansheng¹

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228;

2. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: Alkaline or neutral invertase (N/A-Inv) is a key enzyme for starch synthesis process in cassava. Chromosome specimens were prepared from the bronze-coloured tender leaves of cassava variety SC6, and 11 members of the cassava neutral or alkaline invertase gene family were physically localized by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and *in situ* PCR. The results showed that genes *MeNINV5*, *MeNINV9* and *MeNINV10* were located on the chromosome 4. *MeNINV9* and *MeNINV10* had percentage distances of 68.52 and 95.35 from the signal locus to the centromere on the short arm, respectively, and *MeNINV5* had a percentage distance of 22.71 from the signal locus to the centromere on the long arm. *MeNINV4* and *nINV1* genes were located on the long arm of chromosome 6, and their percentage distances from the signal locus to the centromere are 43.16 and 80.71, respectively; *MeNINV6* and *MeNINV7* genes were located on the long arms of chromosome 7 and 17, respectively, and their percentage distances from the signal locus to the centromere are 15.38 and 57.97, respectively; *MeNINV1*, *MeNINV2*, *MeNINV3* and *MeNINV8* genes were located on the short arms of chromosome 11, 9, 5 and 16, respectively, and their percentage distances from the signal locus to the centromere were 40.10, 51.88, 91.75 and 76.33, respectively. The linkage relationship was discussed between the N/A-Inv gene family and other genes located on cassava chromosomes.

Keywords: Cassava; N/A-Inv gene family; FISH; *in situ* PCR; physical localization