

cDNA 文库在棉花基因发掘中的应用

甄军波 迟吉娜 张建宏 杜海英 李伟明 刘琳琳 张香云*

(河北省农林科学院 棉花研究所/农业部黄淮海半干旱区棉花生物学与遗传育种重点实验室,石家庄 050051)

摘要 构建 cDNA 文库是发掘基因和研究基因功能的重要工具,也是基因组学研究的重要技术手段。棉花作为世界上重要的经济作物之一,研究人员已经构建了大量的棉花 cDNA 文库,为棉花基因发掘和功能研究积累了丰富的 Expressed Sequence Tags(ESTs)资源。本文对近几年来 cDNA 文库在棉花基因发掘中的应用进行了总结。

关键词 棉花;cDNA 文库;基因发掘

中图分类号 S 567

文章编号 1007-4333(2014)05-0275-08

文献标志码 A

Application of cDNA libraries on cotton gene discovery

ZHEN Jun-bo, CHI Ji-na, ZHANG Jian-hong, DU Hai-ying,

LI Wei-ming, LIU Lin-lin, ZHANG Xiang-yun*

(Institute of Cotton/Key Laboratory of Cotton Biology and Genetic Breeding in Huanghuaihai Semiarid Area of Ministry of Agriculture, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Science, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract cDNA library is a classic tool to discover new genes and explore their function. Cotton is one of the most important economic crops in the world, many cDNA libraries have been constructed, a large number of expressed sequence tags (ESTs) resources of cotton have been generated and played important roles in gene discovery and function exploring. This paper focus on the application of cDNA libraries on cotton gene discovery.

Key words cotton; cDNA library; gene discovery

棉花是世界上重要的经济作物之一^[1],包括 4 个栽培种,分别为陆地棉、海岛棉、亚洲棉和草棉,其中陆地棉和海岛棉占世界棉花产量的 98%^[2]。随着分子生物学技术的不断发展,人们利用构建 cDNA 文库、分析基因表达谱以及转录组测序等得到了一些与棉花纤维发育、胁迫应答等相关的基因^[3]。

cDNA 文库构建是分子生物学研究的重要技术手段,可以在特定的组织、生长发育时期以及处理条件下在基因组水平上研究某种生物基因表达水平,在发掘基因、研究基因功能、开发分子标记和构建遗传图谱等方面发挥着重要的作用。同时,cDNA 文库结合高通量测序技术对于已经测序完成的物种同样是非常重要的资源,可以发现新基因,不断完善基因组的信息^[4-5]。

常见的 cDNA 文库有全长 cDNA 文库(Full-length cDNA library)、均一化 cDNA 文库(Normalized cDNA library)、抑制差减 cDNA 文库(Suppressive subtractive hybridization cDNA library,SSH)等,这几种文库各有优点。1)全长 cDNA 文库。全长文库的构建一般按照美国 Clontech 公司的 SMART cDNA library construction kit 方法或 GeneRacer 试剂盒(Invitrogen, USA)使用说明进行^[6]。相对于普通 cDNA 文库,全长 cDNA 文库能够提供基因完整的 mRNA 反转录序列,可以极大的提高人们得到基因全长的效率,对于研究基因的功能和产物具有十分重要的作用;对于基因组测序完成的物种,如拟南芥、玉米、水稻等,全长 cDNA 对于正确注释基因序列同样十分重要^[4,7-8];2)均一化 cDNA 文库。构建

收稿日期:2013-11-28

基金项目:国家科技重大专项(2013ZX08005-001-004);河北省财政项目(2011055003,2012055004);河北省自然科学基金项目(C2013301069)

第一作者:甄军波,研究实习员,硕士,主要从事棉花功能基因组研究,E-mail:zjb210@126.com

通讯作者:张香云,研究员,主要从事棉花遗传育种与基因组研究,E-mail:jmzhang@live.cn

均一化文库有两种原理:一是基于复性动力学原理,利用不同丰度 cDNA 复性时间差异构建;二是在 cDNA 与基因组 DNA 饱和杂交的基础上构建文库。均一化 cDNA 文库可以有效发掘低丰度的 mRNA 和组织特异表达的基因,克服由于基因转录水平的差异对文库的筛选和鉴定带来的障碍,可以节约试验成本;3)抑制差减杂交文库。该文库是在差减杂交和抑制 PCR 的基础上进行构建。SSH 文库能够特异地富集并高效、快捷地克隆差异表达的基因,通常用于生长发育、胁迫应答基因的克隆,但是由于其克隆的片段比较短,常需要借助于 RACE (Rapid amplification of cDNA ends, RACE)等方法克隆得到基因全长^[6]。

1 cDNA 文库与棉花基因的发掘概览

由于陆地棉、海岛棉等基因组测序尚未完成,近年来,研究人员已经构建了大量的棉花 cDNA 文库,通过大规模测序为棉花重要性状功能基因的发掘和调控机理研究提供了丰富的资源,同时也为基因组研究积累了 ESTs 资源(表 1)。本研究通过对近年来有文献报道的棉花 cDNA 文库进行总结,希望能对棉花基因分离克隆和基因组研究提供一定的帮助。从表 1 可以看出,棉花 cDNA 文库的应用主要集中在以下几个方面:纤维发育相关基因的发掘、生长发育和再生相关基因的发掘、胁迫应答相关基因的发掘。根据研究目的不同,会采取不同的文库构建策略。

表 1 棉花 cDNA 文库汇总

Table 1 Summary of cotton cDNA libraries

种属 Species	品种 variety	文库描述 Library description	文库类型 Type of libraries	Unigenes/EST 数目 unigenes/EST number	文献 Citation
海岛棉 <i>G. barbadense</i>	海 7124 Hai7124	纤维发育 Fiber development	普通文库 Non-normalized cDNA library	8 653	[2]
海岛棉 <i>G. barbadense</i>	3-79 3-79	纤维发育 Fiber development	均一化文库 Normalized cDNA library	5 852	[1]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	TM-1 TM-1	纤维发育 Fiber development	抑制差减 cDNA 文库 SSH	36	[9]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	DES119 DES119	纤维发育 Fiber development	均一化文库/普通文库 Normalized/non-normalized cDNA library	66 000	[10]
海岛棉 <i>G. barbadense</i>	Pima 3-79 Pima 3-79	纤维发育 Fiber development	均一化文库 Normalized cDNA library	645	[11]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	TM-1 TM-1	纤维发育 Fiber development	全长文库 Full-length cDNA library	8 540	[12]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	徐州 142 Xuzhou 142	纤维发育 Fiber development	普通文库 Non-normalized cDNA library	11 719	[13]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	7235/徐州 142 7235 /Xuzhou 142	纤维发育 Fiber development	普通文库 Non-normalized cDNA library	13 505	[14]
海岛棉 <i>G. barbadense</i>	海 7124 Hai 7124	纤维发育 Fiber development	普通文库 Non-normalized cDNA library	3 505	[15]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	TM-1 TM-1	纤维发育 Fiber development	抑制差减 cDNA 文库 SSH	292	[16]

表 1(续)

种属 Species	品种 variety	文库描述 Library description	文库类型 Type of libraries	Unigenes/EST 数目 unigenes/EST number	文献 Citation
亚洲棉 <i>G. arboreum</i>	AKA 8401	纤维发育 Fiber development	普通文库 Non-normalized cDNA library	14 000	[17]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	徐州 142 Xuzhou 142	纤维发育 Fiber development	抑制差减 cDNA 文库 SSH	280	[18]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 36 CCRI 36	叶发育 Leave development	均一化全长文库 Normalized and full-length cDNA library	5 191	[19]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 36 CCRI 36	花发育 Flower development	均一化全长文库 Normalized and full-length cDNA library	14 373	[20]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 36 CCRI36	花发育 Flower development	均一化全长文库 Normalized and full-length cDNA library	2 906	[21]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 36 CCRI 36	花药发育 Anther development	均一化全长文库 Normalized and full-length cDNA library	6 643	[22]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	Shannong No. 6 Shannong No. 6	子叶早衰 Cotyledon senescence	抑制差减 cDNA 文库 SSH	216	[23]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	恢复系 Restore Line	雄性不育 Male sterile	普通文库 Non-normalized cDNA library		[24]
亚洲棉 <i>G. arboreum</i>	石系亚 1 号 Shixiya 1	全生育期 Whole-life cycle	均一化全长文库 Normalized and full-length cDNA library		[25]
海岛棉 <i>G. barbadense</i>	海 7124 Hai 7124	油脂形成 Lipid	全长文库 Full-length cDNA library	148	[26]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 12 CCRI 12	腺体形成 Gland formation	抑制差减 cDNA 文库 SSH	147	[27]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	湘棉 18 Xiangmian-18	花色素腺体 Gland formation	均一化文库 Normalized cDNA library		[28]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	CNPA 8H CNPA 8H	棉蕾 Buds	抑制差减 cDNA 文库 SSH	168	[29]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	Surabhi Surabhi	棉铃发育 Cotton boll	抑制差减 cDNA 文库 SSH	64	[30]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	珂 201 Coker 201	原生质体再生 Protoplast	抑制差减 cDNA 文库 SSH	210	[31]

表1(续)

种属 Species	品种 variety	文库描述 Library description	文库类型 Type of libraries	Unigenes/EST 数目 unigenes/EST number	文献 Citation
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 24 CCR124	体细胞胚胎发生 Somatic embryogenesis	抑制差减 cDNA 文库 SSH	241	[32]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	珂 201 Coker 201	体细胞胚胎发生 Somatic embryogenesis	抑制差减 cDNA 文库 SSH	242	[33]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中 G5 Zhong G5	盐胁迫 Salt stress	抑制差减 cDNA 文库 SSH	468	[34]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 35 ZMS35	盐胁迫 Salt stress	抑制差减 cDNA 文库 SSH	160	[35]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 19 ZMS19	盐胁迫 Salt stress	普通文库 Non-normalized cDNA library		[36]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 19 ZMS19	盐胁迫 Salt stress	普通文库 Non-normalized cDNA library		[37]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 19 ZMS19	盐胁迫 Salt stress	普通文库 Non-normalized cDNA library		[38]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中棉所 19 ZMS19	盐胁迫 Salt stress	普通文库 Non-normalized cDNA library		[39]
亚洲棉 <i>G. arboreum</i>	FDH786 FDH786	干旱诱导 Drought-related	普通文库 Non-normalized cDNA library	778	[40]
亚洲棉 <i>G. arboreum</i>		干旱诱导 Drought-related	抑制差减 cDNA 文库 SSH	265	[41]
海岛棉 <i>G. barbadense</i>	Pima90-53 Pima90-53	黄萎病诱导 <i>Verticillium dahliae</i> inoculated	全长文库 Full-length cDNA library	23 126	[42]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>	中植棉 KV1 Zhongzhimian KV1	黄萎病诱导 <i>Verticillium dahliae</i> inoculated	抑制差减 cDNA 文库 SSH	99	[43]
海岛棉 <i>G. barbadense</i>	海 7124 Hai 7124	黄萎病诱导 <i>Verticillium dahliae</i> inoculated	抑制差减 cDNA 文库 SSH	211	[44]
陆地棉 <i>G. hirsutum</i>		黄萎病诱导 <i>Verticillium dahliae</i> inoculated	抑制差减 cDNA 文库 SSH		[45]
海岛棉 <i>G. barbadense</i>	Pima 90 Pima 90	黄萎病诱导 <i>Verticillium dahliae</i> inoculated	抑制差减 cDNA 文库 SSH	78	[46]
海岛棉 <i>G. barbadense</i>	海 7124 Hai7124	黄萎病诱导 <i>Verticillium dahliae</i> inoculated	全长文库 full-length cDNA library		[47]

2 纤维发育相关基因的发掘

棉花是世界上重要的经济作物之一,棉纤维作为其重要的产品,具有十分广泛的用途,同时棉花也是研究细胞伸长和细胞壁合成的模式植物^[2,48],构建 cDNA 文库作为一项非常重要的技术手段,在棉花纤维发育基因的挖掘和功能研究中发挥了非常重要的作用。

研究人员相继以陆地棉为材料构建了一系列的棉花纤维/胚珠 cDNA 文库, Ji 等^[18] 构建了陆地棉纤维 SSH 文库, 研究发现钙调素结合蛋白、长链脂肪酸代谢相关基因在纤维早期发育过程中优势表达, 生长素信号转导、MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 等代谢过程也可能发挥重要的作用。Liu 等^[16] 分别以 10 和 20 dpa 材料构建 SSH 文库, 筛选得到赤霉素调控相关蛋白、质膜蛋白、糖基水解酶蛋白等在纤维不同发育阶段特异表达的基因。Shi 等^[13] 通过构建文库以及后续的芯片研究表明, 乙烯的合成在棉花纤维发育过程中发挥重要的作用。在 Samuel Yang 等^[12] 构建的棉花胚珠文库中, 一些编码转录因子、激素调控因子的基因得到了富集, 同时一些 AA 亚组的基因也得到了富集, 这些基因组特异的序列在不同时空的表达特性影响了棉纤维的发育。Taliencio 等^[10] 对构建的棉纤维、根系和其他组织的文库进行分析之后, 发现 GTP 信号途径表达量上升, 同时 Ca^{2+} 介导的信号途径也可能在棉纤维的发育过程中发挥作用。Wu 等^[9] 首次利用棉花染色体代换系构建的棉纤维 SSH 文库, 筛选得到了 36 个差异表达的基因, 这些基因大都涉及信号转导、蛋白质、核酸和脂类代谢等过程。

与陆地棉相比,海岛棉虽然产量较低,但是其纤维品质更好,是不可缺少的纺织原料,因此有越来越多的研究以海岛棉为材料,发掘棉纤维发育相关的基因。从这些研究得出的结论可以看出,测序得到的大部分基因都具有催化和结合功能,主要参与碳水化合物、氨基酸、能量和脂类代谢等代谢过程,激素和 Ca^{2+} 介导的信号途径、转录因子、扩展蛋白、细胞骨架、ROS 相关的基因和与次生壁合成相关的基因都可能参与棉花纤维的发育。同时,一些海岛棉特异的基因序列也得到了挖掘,在一定程度上揭示了棉花不同亚种之间纤维品质差异的原因^[1-2,11,15]。Arpat 等^[17] 以亚洲棉为材料构建文库,获得了 14 000 个 unigenes, 研究发现,细胞壁合成、细胞骨

架和碳水化合物等代谢过程可能在纤维细胞快速伸长的过程中发挥作用,同时,该研究还发掘了从纤维伸长到次级细胞壁加厚期转换过程中差异表达的基因,为研究棉纤维发育机理奠定了基础。

通过构建棉花 cDNA 文库,已经积累了大量棉花纤维发育相关的 ESTs,结合 ESTs 的功能分类,笔者发现,棉纤维发育是一个新陈代谢非常旺盛的过程,期间有很多代谢过程相关的基因得到优势表达,同时,植物激素、 Ca^{2+} 介导的信号转导路径,都可能在棉花纤维的发育过程中发挥不可或缺的作用。

3 生长发育和再生相关基因的发掘

早熟棉花品种的培育是棉花育种的重要目标之一,人们相继构建了开花发育时期的均一化全长文库,分离得到了大量与开花相关的 ESTs,并克隆了 *GhSEP* 和 *GhMADS* 等基因,这些基因在幼芽、雄蕊和花瓣等组织中优势表达,对深入解析棉花早熟机理提供了资源^[20-22]。同时,棉花早衰机理的研究对于棉花高产品种的选育也十分关键。Shen 等^[23] 研究表明,大分子降解、营养物质的循环和一些胁迫应答基因可能在叶片早衰过程中发挥作用。Lin 等^[19] 以陆地棉叶片为材料构建均一化全长 cDNA 文库,得到了 5 191 个 unigenes,发掘得到 1 339 个与叶片早衰相关的基因,MYB 等转录因子在叶片早衰的过程中差异表达,为研究棉花叶片的早衰和相关基因的克隆提供了帮助。

研究棉花不育机理,对于充分发挥棉花的杂种优势,提高棉花产量至关重要。Ma 等^[22] 构建了棉花花药均一化全长 cDNA 文库,分离得到了与花药发育相关的基因,发现脂肪酸合成相关基因在花药发育前期优势表达,可能与棉花花药的正常发育有关。宋洋等^[24] 构建了棉花恢复系 cDNA 文库,分离得到一个与番茄转座酶高度同源的基因,认为棉花的育性可能与基因的转座有关。

棉花植株再生和原生质体培养是棉花转基因技术应用及种质资源创新的重要限制因素,因此发掘棉花再生相关的基因,对于提高棉花转基因效率具有重要的作用^[32]。Zeng 等^[33] 通过构建 SSH 文库,发现了一些参与体细胞胚胎发生的新基因。Wu 等^[32] 构建了棉花体细胞胚胎再生的 SSH 文库,研究发现乙烯代谢途径的基因可能在棉花再生过程中发挥重要作用。原生质体非常适合研究细胞壁合成, Yang

等^[31]构建了原生质体培养过程中的 SSH 文库,明确了 NAC、WRKY、MYB 等转录因子和 Ca^{2+} 介导的信号分子在原生质体细胞壁再生过程中的作用,同时,蔗糖合成酶在其中也发挥比较重要的作用。

除此之外,还有棉花腺体形成、油脂形成和全生育期等不同类型的 cDNA 文库的报道。Xie 等^[28]构建了棉花花色素腺体的均一化 cDNA 文库,为棉花腺体发育提供了帮助。朱秀兰等^[27]以显性无腺体中棉所 12 为材料构建了 SSH 文库,得到了 147 个 unigenes,为显性无腺体形成相关基因的克隆和功能研究提供了资源。棉籽油是重要的生物柴油,棉花油脂合成相关基因的挖掘对于高油棉花新品种的选育具有十分重要的作用。王德龙等^[26]以海岛棉海 7124 为材料构建了棉花种子全长 cDNA 文库,得到了 148 个 unigenes,筛选得到了 13 条可能与油脂合成相关的 EST。王玉荣等^[25]以亚洲棉石系亚 1 号为材料构建了棉花子叶期、苗期、蕾期、花铃期的均一化全长 cDNA 文库,为棉花 EST 测序、新基因发掘的良好平台。Raghavendra 等^[30]以早期的棉铃为材料构建了 SSH 文库,研究发现,物质运输、核苷酸结合以及细胞骨架相关的基因得到了富集。Pinheiro 等^[29]以棉蕾为材料构建了 SSH 文库,得到了大量与花粉管发育、纤维发育相关的基因。

综上所述,在棉花基因组测序尚未完成的情况下,通过构建文库,能够获得大量的生长发育等方面的基因,为棉花功能基因的发掘和开展基因组学研究奠定了基础。

4 胁迫应答相关基因的发掘

棉花 cDNA 文库构建的另一个主要研究方向就是棉花非生物胁迫和抗病相关基因的挖掘。高盐、干旱等非生物胁迫、黄萎病等病害都在严重影响棉花的纤维品质和产量^[34,41],因此,研究棉花抗逆相关基因就显得至关重要。SSH 文库在棉花中应用较多,其优势在于能够比较快速地富集差异表达基因。Zhang 等^[34]构建了棉花盐胁迫根系 SSH 文库,得到了 468 个 unigenes,研究表明激酶、转录因子可能在棉花盐胁迫早期应答中发挥作用,在 CDPK (Calcium-dependent protein kinases)、SOS (Salt Overly Sensitive)、MAPK 三条路径中, Ca^{2+} 介导的信号转导途径可能发挥比较重要的作用。叶武威等^[35]构建了陆地棉盐胁迫抑制差减文库,该研究认为 MAPK 信号转导路径是棉花盐胁迫信号转

导的主要路径。两篇文章的结果差异可能与取样时间点有关,叶武威等^[35]取样时间较晚,主要集中在 1~7 d 之间,而 Zhang 等^[34]取样时间则集中在前 24 h 之内,笔者推测棉花在盐胁迫应答早期和其他阶段的信号转导路径是有所不同的。还有研究者构建了一系列棉花盐胁迫下普通的 cDNA 文库,并从中克隆了 *GhZFP1*、*GhNHX1*、*GhMT3a* 等转录因子和功能基因,初步验证了这些基因在盐胁迫应答中的作用^[36-39],为棉花耐盐机理的研究和耐盐品种选育提供了基因资源。Zhang 等^[41]等构建了亚洲棉干旱诱导 SSH 文库,筛选得到 392 个克隆,进一步测序得到 265 个 unigenes,同时还得到了 57 个功能未知的基因。Barozai 等^[40]通过构建亚洲棉干旱胁迫诱导的 cDNA 文库,挑选了 778 个克隆进行测序,进一步分析得到了 39 个受非生物胁迫和生物胁迫诱导的基因。棉花抗旱是一个非常复杂的性状,有许多基因和多个代谢途径参与其中。

黄萎病是由大丽轮枝菌引起的一种土传病害,严重影响棉花的生产,抗病基因的挖掘是选育抗病品种的重要基础,研究者已经利用海岛棉和抗黄萎病的陆地棉品种构建了一系列的 SSH 文库和全长文库,并从中分离得到了大量抗病相关的 ESTs,研究表明,通过构建文库获得了可能与棉花黄萎病应答相关的 ESTs 资源,棉花病程相关蛋白家族 10、拟南芥抗病反应家族蛋白、拟南芥的 P450 单加氧酶、病程相关蛋白、类甜蛋白以及几丁质酶等基因可能在棉花抗病应答中发挥着比较重要的作用^[44-47]。Xu 等^[44]以海 7124 构建黄萎病诱导 SSH 文库,获得了大量的功能未知的基因,同时发现过氧化氢、茉莉酸、水杨酸等信号分子以及 WRKY 等转录因子都可能发挥重要的作用。Zhang 等^[43]的研究结果表明,*Bet v 1* 和 *Ubl* 两个基因家族的基因可能在棉花黄萎病应答中发挥作用。随着测序成本的不断降低,大规模的 EST 开发已经成为可能。Zhang 等^[42]构建了海岛棉黄萎病诱导全长文库,得到了 46 192 条高质量 ESTs,拼接得到 23 126 个 unigenes,并发现了一条新的植物激素信号转导途径。通过上述的研究,可以发现,棉花抗病是一个非常复杂的过程,大量的基因在整个应答过程中发挥非常重要的作用。

由于能够快速分离和富集差异表达基因,SSH 文库在胁迫应答基因的发掘中得到了比较广泛的应用,但是 SSH 文库同样存在着一定的问题,

如获得的克隆数量较少、插入片段较短、不易得到基因全长等,如何更好的发挥 SSH 文库的作用,需要进一步的研究。综上所述,cDNA 文库在棉花抗逆相关基因研究中发挥了比较重要的作用,如何更好地发挥 cDNA 文库在棉花抗逆相关基因功能研究中的作用值得深入探讨。

5 棉花 cDNA 文库的其他应用

随着测序成本的不断降低,构建 cDNA 文库结合高通量测序,能够以较低的成本获得大量的棉花 ESTs 和 SNP、InDel 等标记,并可以开发 SNP 芯片等,不断完善棉花基因组的物理图谱和遗传图谱^[14],结合棉花主要农艺性状的全基因组扫描和关联分析,对于深入解析棉花关键农艺性状的遗传机理,加速棉花分子标记辅助选择育种,提高育种效率都具有十分重要的作用^[2-3]。此外,如何与代谢组学、蛋白组学等技术相结合,不断完善棉花的遗传调控网络,为棉花基因组学的研究提供帮助,也是值得深入研究的方向。

6 小结

构建 cDNA 文库在棉花基因挖掘和基因组研究中发挥了非常重要的作用,由于四倍体棉花基因组测序尚未完成,大量的 ESTs 资源不仅是功能基因发掘的有效途径,而且是开发分子标记、进行分子标记辅助选择的重要途径,随着生物及信息技术的不断发展和棉花基因组测序计划的进行,大规模发掘基因,进而研究基因功能已经成为棉花功能基因组学中一项非常重要的工作。近年随着表达谱、转录组和小 RNA 等技术的快速发展,cDNA 文库的作用有所降低,但是由于文库本身构建成本较低,用途较广,在未来一段时间内,仍将是棉花基因发掘和基因组研究中一项非常重要的研究手段,仍将在棉花基因组研究中发挥作用。

参 考 文 献

- [1] Yuan D, Tu L, Zhang X. Generation, annotation and analysis of first large-scale expressed sequence tags from developing fiber of *Gossypium barbadense* L[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22758
- [2] Lv Y, Zhao L, Xu X, et al. Characterization of expressed sequence tags from developing fibers of *Gossypium barbadense* and evaluation of insertion-deletion variation in tetraploid cultivated cotton species[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 170
- [3] Chen X, Guo W, Zhang T. Cotton omics in China[J]. Plant Omics, 2011, 4(6): 278-287
- [4] Soderlund C, Descour A, Kudrna D, et al. Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs[J]. PLoS Genet, 2009, 5(11): e1000740
- [5] 肖景华, 吴昌银, 韩斌, 等. 中国水稻功能基因组研究进展[J]. 中国科学: C 辑, 2009, 39(10): 909-924
- [6] 晏慧君, 黄兴奇, 程在全. cDNA 文库构建策略及其分析研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(1): 1-6
- [7] Seki M, Narusaka M, Kamiya A, et al. Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection[J]. Science, 2002, 296(5565): 141-145
- [8] Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J]. Plant J, 2002, 31(3): 279-292
- [9] Wu Z, Soliman K M, Bolton J J, et al. Identification of differentially expressed genes associated with cotton fiber development in a chromosomal substitution line (CS-B22sh) [J]. Funct Integr Genomics, 2008, 8(2): 165-174
- [10] Taliercio E W, Boykin D. Analysis of gene expression in cotton fiber initials[J]. BMC Plant Biol, 2007, 7: 22
- [11] Tu L L, Zhang X L, Liang S G, et al. Genes expression analyses of sea-island cotton (*Gossypium barbadense* L) during fiber development[J]. Plant Cell Rep, 2007, 26(8): 1309-1320
- [12] Samuel Yang S, Cheung F, Lee J J, et al. Accumulation of genome-specific transcripts, transcription factors and phytohormonal regulators during early stages of fiber cell development in allotetraploid cotton[J]. Plant J, 2006, 47(5): 761-775
- [13] Shi Y H, Zhu S W, Mao X Z, et al. Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation[J]. Plant Cell, 2006, 18(3): 651-664
- [14] Han Z, Wang C, Song X, et al. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton[J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(3): 430-439
- [15] 林绍艳. 海 7124 纤维胚珠 cDNA 文库的构建测序及 EST 分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2008
- [16] Liu D, Zhang X, Tu L, et al. Isolation by suppression-subtractive hybridization of genes preferentially expressed during early and late fiber development stages in cotton[J]. Mol Biol (Mosk), 2006, 40(5): 825-834
- [17] Arpat A B, Waugh M, Sullivan J P, et al. Functional genomics of cell elongation in developing cotton fibers[J]. Plant Mol Biol, 2004, 54(6): 911-929
- [18] Ji S J, Lu Y C, Feng J X, et al. Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(10): 2534-2543

- [19] Lin M, Lai D, Pang C, et al. Generation and analysis of a large-scale expressed sequence tag database from a full-length enriched cDNA library of developing leaves of *Gossypium hirsutum* L[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76443
- [20] Lai D, Li H, Fan S, et al. Generation of ESTs for flowering gene discovery and SSR marker development in upland cotton [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28676
- [21] Wang L N, Wu D, Yu S X, et al. Construction of a full-length cDNA library of *Gossypium hirsutum* L and identification of two MADS-box genes[J]. Agr Sci China, 2011, 10(1): 28-40
- [22] Ma J, Wei H, Song M, et al. Transcriptome profiling analysis reveals that flavonoid and ascorbate-glutathione cycle are important during anther development in upland cotton [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49244
- [23] Shen F, Yu S, Xie Q, et al. Identification of genes associated with cotyledon senescence in upland cotton[J]. China Sci Bull, 2006, 51(9): 1085-1094
- [24] 宋洋. 棉花恢复系幼蕾 cDNA 文库构建及发育相关基因的克隆[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007
- [25] 王玉荣, 张雪妍, 刘传亮, 等. 亚洲棉 (*Gossypium arboreum* L) 全生育期均一化全长 cDNA 文库的构建和鉴定[J]. 中国农业科学, 2009, 42(4): 1158-1164
- [26] 王德龙, 干霁雯, 喻树迅, 等. 油脂形成期棉花种子全长 cDNA 文库的构建[J]. 棉花学报, 2009, 21(5): 351-355
- [27] 朱秀兰, 宋国立, 王坤波. 陆地棉显性无腺体近等基因系 SSH 文库的构建[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(26): 1243-1243
- [28] Xie Y F, Wang B C, Li B, et al. Construction of cDNA library of cotton mutant (Xiangmian-18) library during gland forming stage[J]. Colloid Surface B, 2007, 60(2): 258-263
- [29] Pinheiro M P, Batista V G, Martins N F, et al. Genes expressed in cotton (*Gossypium hirsutum*) buds isolated with a subtractive library[J]. Genet Mol Res, 2013, 12(1): 37-43
- [30] Raghavendra K, Phanindra M, Kumar B K, et al. Identification of differentially expressed genes during bud stage of cotton boll development using suppression subtractive hybridization and cDNA macroarray[J]. J Plant Biochem Biot, 2011, 20(1): 12-19
- [31] Yang X, Tu L, Zhu L, et al. Expression profile analysis of genes involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and macroarray [J]. J Exp Bot, 2008, 59(13): 3661-3674
- [32] Wu X, Li F, Zhang C, et al. Differential gene expression of cotton cultivar CCRI24 during somatic embryogenesis[J]. J Plant Physiol, 2009, 166(12): 1275-1283
- [33] Zeng F, Zhang X, Zhu L, et al. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray[J]. Plant Mol Biol, 2006, 60(2): 167-183
- [34] Zhang X, Zhen J, Li Z, et al. Expression profile of early responsive genes under salt stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L)[J]. Plant Mol Biol Rep, 2011, 29(3): 626-637
- [35] 叶武威, 赵云雷, 王俊娟, 等. 盐胁迫下陆地棉耐盐品种根系的抑制消减文库构建[J]. 棉花学报, 2009, 21(5): 339-345
- [36] Wu C A, Yang G D, Meng Q W, et al. The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress[J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(5): 600-607
- [37] Guo Y H, Yu Y P, Wang D, et al. GhZFP1, a novel CCCH-type zinc finger protein from cotton, enhances salt stress tolerance and fungal disease resistance in transgenic tobacco by interacting with GZIRD21A and GZIPR5 [J]. New Phytol, 2009, 183(1): 62-75
- [38] 李新征. 棉花盐胁迫诱导 cDNA 文库的构建及耐盐基因的筛选与鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008
- [39] Xue T, Li X, Zhu W, et al. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast[J]. J Exp Bot, 2009, 60(1): 339-349
- [40] Barozai M Y K, Husnain T. Identification of biotic and abiotic stress up-regulated ESTs in *Gossypium arboreum* [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2): 1011-1018
- [41] Zhang L, Li F G, Liu C L, et al. Construction and analysis of cotton (*Gossypium arboreum* L) drought-related cDNA library [J]. BMC Res Notes, 2009, 2(1): 120
- [42] Zhang Y, Wang X F, Ding Z G, et al. Transcriptome profiling of *Gossypium barbadense* inoculated with *Verticillium dahliae* provides a resource for cotton improvement [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 637
- [43] Zhang W W, Jian G L, Jiang T F, et al. Cotton gene expression profiles in resistant *Gossypium hirsutum* cv Zhongzhimian KV1 responding to *Verticillium dahliae* strain V991 infection [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(10): 9765-9774
- [44] Xu L, Zhu L, Tu L, et al. Differential gene expression in cotton defence response to *Verticillium dahliae* by SSH [J]. J Phytopathol, 2011, 159(9): 606-615
- [45] 张映霞, 杨郁文, 倪万潮, 等. 陆地棉黄萎病菌诱导抑制消减杂交 cDNA 文库的构建与分析[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(1): 17-21
- [46] 朱龙付, 涂礼莉, 张献龙, 等. 黄萎病菌诱导的海岛棉抗病反应的 SSH 文库构建及分析[J]. 遗传学报, 2005, 32(5): 528-532
- [47] 左开井, 吴非, 唐克轩, 等. 海岛棉品种根部黄萎病菌诱导表达全长 cDNA 文库的构建[J]. 棉花学报, 2002, 14(5): 291-294
- [48] Wang K, Wang Z, Li F, et al. The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii* [J]. Nat Genet, 2012, 44(10): 1098-1103