

cDNA-AFLP 技术在植物抗逆性相关基因表达研究中的应用

郭秀林^{1,2}, 张正斌¹, 李景娟¹, 李广敏²

(1 中国科学院 遗传与发育生物学研究所 农业资源研究中心, 河北 石家庄 050021;

2 河北省农林科学院 遗传生理研究所 抗逆中心, 河北 石家庄 050051)

[摘要] cDNA-AFLP 技术是以mRNA 反转录的cDNA 为模板进行AFLP 分析,在保留AFLP 多态性丰富、稳定性高、无需了解序列信息等优点的同时,集中显示了基因组表达序列的多态性差异,可对生物体转录组进行全面、系统的分析,并已成功用于基因差异显示、表达基因遗传连锁作图和基因克隆等方面。文章综述了cDNA-AFLP在植物抗逆性相关基因表达特性分析及基因分离方面的应用。

[关键词] cDNA-AFLP; mRNA; 抗逆性; 基因表达

[中图分类号] Q 946; S332

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0087-06

植物对环境的适应是通过基因互作和协调形成一定基因表达和调控系统来完成的。在植物生长的不同阶段和不同环境条件下,基因被诱导表达,形成了各种抗逆性,如植物抗病虫、抗盐胁迫、抗高温和低温以及抗干旱胁迫等。植物抗病虫害相关基因很多,但目前已经分离的相关基因甚少,且大多数基因是通过转座子标签或图谱定位克隆得到的,加上这2种方法不但每次只能得到1个基因,而且试验周期长,程序复杂,应用范围受到限制^[1]。1992年Liang和Pardee创立了一种鉴定克隆哺乳动物正常生理状态细胞与异常状态细胞之间差异表达的基因方法——mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR),之后许多学者对其进行了研究和改进^[2]。目前,该技术已成功应用于与植物胚胎发育、无融合生殖、形态发生、果实发育、信号传导、植物抗逆与抗病性及植物与真菌互作有关基因的比较鉴定与克隆^[3-6]。但由于DDRT-PCR采用的是随机引物和相对较低的退火温度,引物可在多个位点结合,扩增产物在很大程度上依赖于引物和模板的结合情况,而不是仅与cDNA的初始浓度有关,因此DDRT-PCR的重复性较差、假阳性高,应用受到限制。cDNA-AFLP技术是基于这一基础发展而来的,它是以mRNA 反转录

的cDNA 为模板进行AFLP 分析,在保留了AFLP 多态性丰富、稳定性高、无需了解序列信息等优点的同时,集中显示基因组表达序列的多态性差异,且重复性好、准确可靠、效率高,可对生物体转录组进行全面、系统的分析,已成功用于基因差异显示、表达基因遗传连锁作图和基因克隆^[7-9]。本文就该技术在植物抗逆性相关基因表达过程中的作用进行综述。

1 在抗旱性相关基因表达研究中的应用

干旱胁迫是限制作物生产的主要因子之一,影响包括生长发育在内的所有植物功能。植物通过激活控制细胞代谢的基因修复和保护机制,对干旱胁迫作出响应。为识别干旱胁迫主要响应基因,Costa等^[10]采用cDNA-AFLP 技术比较了缓慢干旱和快速干旱时马铃薯基因表达的差异,鉴定了60个表达片段,分离了14个克隆,并确定为上调基因;认为与典型干旱响应基因相匹配的多数AFLP 片段属于不同功能家族,其中编码假设或未知蛋白的6个克隆未在干旱胁迫诱导过程中被描述,3个cDNA 与马铃薯和番茄表达序列标签(Express Sequence Tag, EST)高度同源,1个cDNA 同源序列在拟南芥种子

· [收稿日期] 2005-10-31

[基金项目] 国家基础理论重大课题(2003CB114301); 国家“863”节水重大专项(2002AA 2Z4011); 国家自然科学基金项目(30270821); 中国科学创新工程重要方向项目(KSCXZ-SW-327); 河北省抗旱节水实验室对外开放基金项目(0508021-HBKLA-05)

[作者简介] 郭秀林(1971-),女,河北康保人,副研究员,博士,主要从事植物抗旱生理与分子遗传学研究。

[通讯作者] 张正斌(1962-),男,陕西合阳人,研究员,主要从事小麦遗传育种研究。

发育中表达。Farinha 等^[11]运用 cDNA-AFLP 技术, 分析抗、感两种基因型水稻对干旱胁迫及脱落酸(Abscissic Acid, ABA)处理的响应基因表达时发现, 在抗、感品种水稻成熟胚中, 旱、盐、冷胁迫之间无明显基因表达差异; 在所有检测水稻品种中可检测到同源序列, 包括在成熟胚和幼苗中被诱导的条带, 虽然水稻幼苗中DRE结合蛋白(DRE-Binding Protein 1, DBF1)也能被ABA诱导, 但与玉米对干旱胁迫的响应模式不同。Feng 等^[12]应用 cDNA-AFLP 技术对棉花干旱响应基因进行了识别和分离, 通过64个引物得到1 626个条带, 其中632个与水分亏缺相关; 水分胁迫条件下, 品种AD5中72个基因为下调基因, 125个基因为上调基因, 而品种AD1中下调和上调基因分别有86和90个, 其中44个下调基因和72个上调基因在AD5和AD1两个品种中保持一致, 149个克隆被建立; 同源调查发现, 38个克隆无同源性, 109个克隆与已知或假设蛋白有高度同源性, Northern杂交证明许多基因的表达与获得水分的水平相关。

cDNA-AFLP技术不仅在大田作物上得以应用, 而且在树木、草坪、芦苇等干旱响应基因表达研究方面也取得了成功。2001年, Catherine 等^[13]在识别两种表型差异较大但基因型差异很小橡树品种的干旱胁迫响应基因时, 主要采用 cDNA-AFLP 技术。Campalans 等^[14]用 cDNA-AFLP 技术对8个杏树品种在干旱条件下叶片基因表达情况进行了比较和鉴定。2003年, Dubos 等^[15-16]通过650个AFLP标记, 在海岸生松树杂交后代系谱中构建了基因图谱, 并对后选基因进行数量性状主座位(Quantitative Trait Loci, QTL)定位; 根据胁迫和非胁迫根系及针叶cDNA文库中的EST随机序列, 估计了mRNA的丰度。

干旱胁迫是草坪最主要且复杂的环境限制因子。但由于草坪干旱胁迫响应基因型的复杂性及缺乏快速选择抗旱种质的有力程序, 这方面的研究进展较缓慢。Wang 等^[17]以四倍体品种为试材, 通过 cDNA-AFLP 技术, 研究了草坪耐干旱胁迫响应的基因组表达模型, 鉴别出干旱胁迫的不同基因表达片段及转录片段。

程佑发等^[18]运用 cDNA-AFLP 分析了3种不同生态型芦苇之间基因表达的差异, 结果发现, 沙丘芦苇和盐生芦苇对干旱或盐胁迫逆境的适应可能只涉及较少的基因, 并克隆到沙丘芦苇胸腺嘧啶二磷酸葡萄糖脱水酶(*Phragmites communis* dTDP-D-

glucose dehydratase, PcTGD)的全长cDNA; 在3种不同生态型芦苇根茎中, PcTGD基因只在沙丘芦苇茎中高效表达, 且表达量远远高于其他两种生态型, 而在沙丘芦苇移栽植株中PcTGD基因的表达量明显下降, 推测PcTGD可能在沙丘芦苇适应水分胁迫的渗透调节机制中发挥重要作用。

根系是植物生长发育的重要器官之一, 但由于所处位置的限制性, 多年来有关作物根系调控方面的研究进展缓慢, 而cDNA-AFLP技术的创立, 为作物根系调控研究提供了新的手段。2003年, Zheng 等^[19]通过对旱稻和水稻杂交后代初生根和次生根根长和根数的研究, 找到5个QTL, 并将基因OsEXP2和endo-1, 4-beta-D-glucanase以及4个携带种子根和次生根根长的基因定位在图谱上。同年, Yang 等^[20]通过对旱稻品种在水分胁迫后不同时段种子根尖基因表达情况进行分析, 共发现106个上调基因, 包括60个已知功能基因和28个未知功能基因, 其中60个已知功能基因主要参与物质转运和代谢、胁迫、防卫相关蛋白合成、胞间和胞壁形成、信号转导和表达调控等, 表明种子根尖在干旱胁迫后进行复杂的适应性反应; 22个基因在水分胁迫后16h达到最大表达量, 这些基因包括P1P2a, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase和一个赤霉素信号转导负调节因子以及8个调控细胞壁松弛基因。

目前, cDNA-AFLP技术在小麦及其抗旱相关基因分离与克隆方面的研究报道较少。2000年, Kojima 等^[21]利用 cDNA-AFLP 技术在小麦上克隆了Q基因, 并证明该基因位于染色体5的长臂上, 控制麦穗形态和穗子脱粒农艺性状。2005年, Bruggmann 等^[22]在研究小麦感白粉病基因表达时也用到 cDNA-AFLP 技术, 说明 cDNA-AFLP 技术可以用于遗传背景比较复杂多倍体作物基因的鉴定与分离。2005年, 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心抗逆遗传实验室以不同小麦品种为材料, 运用该技术比较分析了PEG胁迫后基因表达差异, 共获得453条特异条带, 分离到11个基因片段, 其中1条与水稻染色体11上的转录因子具有高度同源性, 其他基因片段在GenBank中注册(注册号DQ341431~341441)。

2 在抗盐性相关基因表达研究中的应用

陈贵平等^[23]采用 cDNA-AFLP 技术, 分析了“一粒传”小麦后代耐盐突变体中耐盐性不同两个品

系受盐胁迫前后的基因表达差异, 获得了大量与耐盐相关的基因片段, 其中73号片段与人类转录因子基因有一定同源性(相应部分的同源性为32%), 命名为*SIR73* (Salt Inducible Inresistance), Northern杂交证明*SIR73* 是受盐胁迫诱导表达的基因, 并且在耐盐 (Salt Resistant, SR) 品系中的诱导表达更为明显, 推测此片段可能在小麦盐胁迫下的基因表达调控方面起作用; 同时, 采用该技术分析了盐胁迫和非盐胁迫条件下遗传背景相近小麦后代的突变体中, 耐盐性较强的 RH870649 和盐敏感 (Salt Sensitive, SS) 的 H870634 基因表达的差异, 结果表明, 88.1% 的条带在4个样品中是一致的, 只有11.9% 的条带在4个样品中有差异; Blast 比较发现, 11个片段(31.4%) 与已知基因具有较高的同源性, 主要涉及与离子转运、信号转导有关的蛋白及与氧化胁迫有关的蛋白, 另外24个片段(68.6%) 与已知基因同源性较低或未发现同源性。

Hmida-Sayari 等^[24]运用 cDNA-AFLP 技术研究高盐胁迫下马铃薯植株的表达情况, 获得了5000个特异片段, 其中154个片段被盐胁迫激活, 120个片段受到抑制; 在对其中18个片段进行二次扩增、克隆和序列测定时发现, 部分片段与番茄表现一致; 序列分析结果表明, 部分蛋白与其他物种中细胞壁结构蛋白、富脯氨酸蛋白及 β 糖苷酶蛋白有一定的相似性; 部分基因编码如依赖NADP的甘油醛脱氢酶、伤害诱导蛋白及抗晚疫病和线虫病等相关蛋白。

3 在抗高温和低温相关基因表达研究中的应用

热带作物如大豆、花生及豆科作物氮的主要来源是生物固氮, 而生物固氮常常受到高温的胁迫。相对而言, 豇豆的根瘤耐高温性强。Smoes-Araujo 等^[25]运用 cDNA-AFLP 技术研究热激处理后豇豆根瘤的表达转录情况, 结果表明, 热激后豇豆根瘤表达谱得到约600个特异片段、55个上调基因和9个相关基因, 其中20个转录片段被分离、克隆和测序, 多数胁迫转录物编码低分子量热激蛋白、伤害诱导蛋白、抗病蛋白及木聚糖内源水解酶、等位酶及不同的持家基因。Avrova 等^[26]在研究番茄和马铃薯晚疫病发病机制时, 用 cDNA-AFLP 技术分离到64个特异片段, 其中包括 HSP60, HSP70, HSP90 和 HSP100 多种热激蛋白, 但对其功能未进行研究。Barret 等^[27]在应用 cDNA-AFLP 技术研究玉米雄

性单性生殖时, 将玉米材料置于低温条件下7~14 d, 结果在4个特异片段中发现1个新的类HSP70基因片段。虽然试验材料并非置于严格的高、低温环境条件下, 但均分离到热激蛋白, 表明热激蛋白参与许多逆境反应过程。

4 在抗病虫相关基因表达研究中的应用

目前, 利用 cDNA-AFLP 技术在藜属植物、拟南芥、扁桃、马铃薯等多种植物中分离到抗病虫等抗性相关基因(表1)。

郭军等^[41]运用 cDNA-AFLP 技术, 并结合空间隔离分析 (Bulk Segregant Analysis, BSA) 研究马铃薯晚疫病病菌小种特异性无毒基因差异表达片段时, 得到与6个无毒基因相关的差异表达片段85条, 其中与无毒基因 *Avr1* 相关的有20条, 与 *Avr* 相关的有228条, 与 *Avr3-Avr10-Avr* 相关的有1116条; 与 *Avr* 相关的有21条片段主要分布在100~300 bp, 最小片段为60 bp, 最大片段为440 bp, 这有利于进一步克隆全长无毒基因以及对马铃薯晚疫病垂直抗性机制的研究。Zheng 等^[35]将水稻杂交双单倍体后代分为抗、感两个样品池, 通过 cDNA-AFLP 分析, 找到12个转录表达片段 (Transcript Derived Fragments, TDF), 其中8个来自抗病样品池, 4个来自感病样品池, 图谱分析结果表明, *R1*, *R8*, *S9* 和 *S17* 均定位在水稻1号染色体上; 序列比较及等位分析结果显示, *R1/S16* 和 *R8/S9* 属于两对等位基因。蛋白功能预测表明, *S8* 存在于水稻抗条锈病反应的信号通路上, 其编码的蛋白与拟南芥钙调蛋白高度一致, 属于P-磷酸镶嵌的且包括多种激酶的核酸-3-磷酸水解酶类。

在抗虫相关基因分离中, cDNA-AFLP 技术也得到成功应用。Van 等^[28]分离了寄生虫侵染拟南芥过程中诱导的一些基因片段, Qin 等^[42]分离了几个新的线虫侵染土豆过程中特异表达的基因片段, Petters 等^[43]分离到1个与磷酸饥饿诱导磷酸酶相关基因。Samuelian 等^[36]选取了抗、感包囊线虫的2个甜菜品种, 从其毛状根中提取并分离 mRNA, 通过对得到的8000个TDF片段进行分析发现, 其中1个TDF在两个材料中均得到表达, 经RT-PCR证实, TDF是在抗性品种中特异性上调表达的; 将片段进行基因全长后进行序列分析表明, 该基因编码1个未知功能含有317个氨基酸的多肽, 目前未发现任何序列与其同源; 将 cDNA 转入毛状根中发现, 该

基因可诱导甜菜产生对包囊线虫的抗性。

表1 运用cDNA-AFLP 技术分离到的与抗性相关的基因

Table 1 Genes related to stress resistance isolated by cDNA-AFLP technique

分离基因 Isolated gene	功能 Function	来源 Source
CA F15, CA F42	感染卵菌的植株中特异表达 Peronoapora-Parasitica genes expressed during infection	拟南芥 ^[28] <i>A.robidopsis thaliana</i>
DESCA 1-DESCA 12	过敏反应中的抗病因子 Resistance factor during the hypersensitive reaction	藜属植物 ^[29] <i>Chenopodium amaranticolor</i>
PaN TR1, Pahsp17. 5, PaL PA-AT, PaPRP, PaCYP1	干旱或脱水条件下特异表达 Differentially expressed genes during dehydration	杏 ^[14] Amond
StPPP1	防御反应中的重要因子 Factor during the protective reaction	马铃薯 ^[30] Potato
Sir73	盐胁迫诱导表达 Expression induced by salt stress	小麦 ^[23] Wheat
APRT	水稻种子根尖表达 Expression in roots	水稻 ^[11] Rice
OSAR	铝胁迫表达 Expression induced by aluminum stress	水稻 ^[31] Rice
Zmg1p1	幼叶、木质部表达 Expression in young leaf and xylem	玉米 ^[32] Maize
BdMF3	编码胶质甲基化酶 Coding pectin methyl-enzyme	大白菜 ^[33] Chinese cabbage
GmH21	转录激活因子 Transcription activate factor	大豆 ^[34] Soybean
R1/S16, S17, R8/S9	抗病反应基因 Gene in response to rice blast disease	水稻 ^[35] Rice
BVKil	抗虫 Up-regulated upon cyst nematode infection	甜菜 ^[36] Sugar beet
PWMK1	抗病相关因子 Powdery mildew-induced gene	大麦 ^[37] Barley
LRRL	抗病反应 Gene in response to disease resistance	棉花 ^[38] Cotton
E9,M3-530	孤雌生殖 Gene for androgenesis induced by low-temperature	玉米 ^[27] Maize
eIF4E, eIF(iso)4E	抗病反应 Gene for resistance to seed-borne mosaic virus	豌豆 ^[39] Pea
ACRE	抗病反应 Gene in rase-specific resistance	烟草 ^[40] Tobacco

5 展 望

由于cDNA-AFLP 技术的PCR 反应采用较高的退火温度,反应条件严谨,可靠性高,重复性好,不需要预先知道序列信息,且能集中显示基因组表达序列的多态性差异,所需仪器设备简单,在生物基因差异表达特性、表达基因遗传连锁作图和分离目的基因研究方面应用越来越多。Qin 等^[42]开发的计算机程序使得cDNA-AFLP 与已知的EST 序列有效地结合起来,已经成为分离差异表达基因,并在此基础上进行深入基因功能分析的新工具。对TDF 进行克隆、测序,得到差异表达TDF 序列后,通过 Gen-

EST 可以方便地将cDNA-AFLP 所得的基因表达信息与已知EST 序列信息进行连接和转化;该技术不但可以通过GenEST 程序将EST 序列中产生的TDF 与cDNA-AFLP 凝胶上相对应的TDF 进行比较分析,从而确定EST 序列的功能,而且还可以将cDNA-AFLP 产生有价值的TDF 转化为EST,再根据已知的EST 序列进行全长cDNA 的克隆,获取特异表达的基因。随着不同作物EST 数目的增加,将cDNA-AFLP 技术与EST 结合,将为研究基因表达及进行相关基因的分离与克隆提供更为快速的技术手段。

[参考文献]

[1] ParniskeM. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3: 320-328

[2] Zimmernann J W, Schultz R. A nalysis of gene expression in the preimplantation mouse embryouse of mRNA differential display[J]. Proc Natl Acad Sci U SA, 1994, 91: 5456-5460

[3] MalatrasiM, Close T J, MannioliN. Identification and mapping of a putative stress response regulator gene in barley[J]. PlantMolBiol, 2002, 50(1): 143-152

[4] Zhang C K, Lang P, Dane F, et al Cold acclimation induced genes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) [J]. Plant Cell Rep, 2005, 23 (10-11): 764-769

[5] Bachem C W B, Oomen R J F J, Kuyt S, et al Antisense suppression of a potato -SNAP homologue leads to alterations in cellular development and assimilate distribution[J]. PlantMolBiol, 2000, 43(2): 473-484

[6] Bachem C W B, Horvath B, Trindade L, et al A potato tuber-expressed mRNA with homology to steroid dehydrogenases affects gibberellin levels and plant development[J]. The Plant Journal, 2001, 25(6): 595-604

[7] Breynne P, Dreesen R, Cannoot B, et al Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies[J]. Mol Genet Genomics,

- 2003, 269(2): 173-179
- [8] 卢 钢, 曹家树. cDNA-AFLP 技术在植物表达分析上的应用[J]. 植物学通报, 2002, 19(1): 103-108
- [9] 姜立杰, 张开春, 张晓明. cDNA-AFLP 技术及其在基因表达研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 82-86
- [10] Costa A, Di Giacomo M, Massarelli I, et al. Isolation of genes responsive to water stress in potato cell cultures[C]. Giardini Naxos, Italy: Proceedings of the XVI Italian Society of Agricultural Genetics, 2002, 9: 18-21
- [11] Farinha A P, Goday A, Pag M, et al. Molecular responses to abiotic stress in tolerant and sensitive rice varieties[C]. Italy: Recent advances in rice genome analysis and functional Genomics, 2003: 18-26
- [12] Feng C, James M C D, Stewart A. cDNA-AFLP profile of cotton genes in response to drought stress[C]. San Diego, CA: Plant & Animal Genomes XII conferences, 2004: 10-14
- [13] Catherine B, Barreneche T, Saintagene C, et al. Molecular differentiation between two European oak species: quercus robur and quercus petraea[C]. San Diego, CA: Plant & Animal Genome IX Conference, 2001: 17-21
- [14] Campalans A, Pages M, Messegue R. Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*) [J]. Tree Physiol, 2001, 21(10): 633-643
- [15] Dubos C, Le Provost G, Pot D, et al. Identification and characterization of water-stress-responsive genes in hydroponically grown maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings[J]. Tree Physiol, 2003, 23(3): 169-179
- [16] Dubos C, Plomion C. Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots[J]. Plant Mol Biol, 2003, 51(2): 249-262
- [17] Wang J P, Bughara S U. Use cDNA-AFLP to detect the specific drought tolerance transcription fragments in *Festuca mairei*[C]. Dallas, Texas, USA: Molecular Breeding of Forage and Turf Third International Symposium, 2003: 2
- [18] 程佑发, 浦铜良, 薛勇彪, 等. 沙芦茎高效表达的胸腺嘧啶二磷酸葡萄糖脱水酶与水分胁迫相关[J]. 科学通报, 2001, 6(7): 573-577
- [19] Zheng B S, Yang L, Zhang W P, et al. Mapping QTLs and candidate genes for rice traits under different water-supply conditions and comparative analysis across three populations[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107(8): 1505-1515
- [20] Yang L, Zheng B, Mao C, et al. cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit[J]. Gene, 2003, 18(314): 141-148
- [21] Kojima T, Habu Y, Iida S, et al. Direct isolation of differentially expressed genes from a specific chromosome region of common wheat: application of the amplified fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting (AMF) method in combination with a deletion line of wheat[J]. Mol Gen Genet, 2000, 263(4): 635-641
- [22] Bruggmann R, Abderhalden O, Reymond P, et al. Analysis of epidermis- and mesophyll-specific transcript accumulation in powdery mildew-inoculated wheat leaves[J]. Plant Mol Biol, 2005, 58(2): 247-267
- [23] 陈贵平, 马闻师, 黄占景, 等. 小麦耐盐突变体盐胁迫下基因片段的分离与鉴定[J]. 遗传, 2003, 25(2): 173-176
- [24] Hmidia-Sayari A, Costa A, Leone A, et al. Identification of salt stress-induced transcripts in potato leaves by cDNA-AFLP[J]. Mol Biotechnol, 2005, 30(1): 31-40
- [25] Simoes-Araujo J L, Rodrigues R L, De A Gerhardt L B, et al. Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules[J]. FEBS Lett, 2002, 515(1-3): 44-50
- [26] Avrova A O, Venter E, Birch P R, et al. Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection[J]. Fungal Genet Biol, 2003, 40(1): 4-14
- [27] Barret P, Brinkman M, Dufour P, et al. Identification of candidate genes for *in vitro* androgenesis induction in maize[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109(8): 1660-1668
- [28] Van der Biezen E A, Juwana H, Parker J E, et al. cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora-Parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(8): 895-899
- [29] Cooper B. Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*[J]. The Plant Journal, 2002, 26(3): 339-349
- [30] Qin L, Prins P, Jones J T, et al. GenEST, a powerful bi-directional link between cDNA sequence data and gene expression profiles generated by cDNA-AFLP[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(7): 1616-1622
- [31] Mao C, Yi K, Yang L, et al. Identification of aluminum-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminum-regulated genes for the metabolism of cell wall components[J]. Plants and the Environment, 2003, 55(394): 137-143
- [32] Fan Z, Gu H, Chen X, et al. Cloning and expression analysis of Zmglp1, a new gemin-like protein gene in maize[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 17; 331(4): 1257-1263
- [33] 王永勤, 余小林, 曹家树. 白菜小孢子发育相关基因 *BCM F3* 的分离及其表达特征分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(11): 1302-1308
- [34] Wang Y J, Li Y D, Luo G Z, et al. Cloning and characterization of an HDZip I gene *GmH Z1* from soybean[J]. Planta, 2005, 221(6): 831-843
- [35] Zheng X, Chen X, Zhang X, et al. Isolation and identification of a gene in response to rice blast disease in rice[J]. Plant Mol Biol, 2004, 54

- (1): 99-109
- [36] Samuelian S, Kleine M, Ruyter-Spira C P, et al Cloning and functional analyses of a gene from sugar beet up-regulated upon cyst nematode infection[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(1): 147-156
- [37] Eckey C, Korell M, Leib K, et al Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(1): 1-15
- [38] 肖月华, 罗明, 侯磊 棉花类LRR抗病蛋白(GhLRR RL)基因的克隆及表达分析[J]. *遗传学报*, 2002, 29(7): 653-658
- [39] Gao Z, Evers S, Thomas C, et al Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to Pea seed-borne mosaic virus[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(3): 488-494
- [40] Durrant W E, Rowland O, Piedras P, et al cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12: 963-977.
- [41] 郭军, 崔冬玉, 王晓武, 等. cDNA-AFLP 结合研究马铃薯晚疫病菌小种特异无毒基因差异表达片段[J]. *中国马铃薯*, 2004, 18(1): 1-3
- [42] Qin L, Overmars B, Helder J, et al An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(8): 830-836
- [43] Petters J, Gobel C, Scheel D, et al A pathogen-responsive cDNA from potato encodes a protein with homology to a phosphate starvation-induced phosphatase[J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(9): 1049-1053

Application of cDNA-AFLP technique in gene expression related to plant stress resistance

GUO Xiu-lin^{1,2}, ZHANG Zheng-bin¹, LI Jing-juan¹, LI Guang-min²

(1 Center of Agriculture Resource, Institute of Genetics and biology Development, China Academy of Science, Shijiazhuang, Hebei 050021, China;

2 Institute of Genetics and Physiology, Academy of Agriculture and Forestry of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

Abstract: cDNA-AFLP technique is a new AFLP technique with advantages of abundant polymorphism, high stability, dispensation and sequence information, with cDNA as templates reversely transcribed from mRNA of segregation population. Because of its reproducibility, accuracy and reliability, this technique has been developing as a common method to display gene differential expression, construct genetic linkage map of expression genes and clone genes. This paper introduced its application in displaying stress resistant gene differential expression and genes isolation.

Key words: cDNA-AFLP; mRNA; stress resistance; gene expression