

转录组测序及其在植物病原菌、植物与真菌互作研究中的应用与进展

许铜硕, 刘太国, 刘 博, 陈万权, 高 利*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)技术是用来分析动态转录组的重要工具。RNA-seq 生成的数据不仅可以量化基因表达, 还有助于发现新的转录本、识别选择性剪接基因和检测等位基因特异性表达。本文主要综述了 RNA-seq 的技术步骤及工作原理, 并介绍了其在植物病原菌及植物与真菌互作研究中的应用与进展。

关键词 转录组测序; 寄主; 病原物

中图分类号: S 432 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019358

Application and progresses in transcriptome sequencing for the study of plant pathogens and plant-fungal interactions

XU Tongshuo, LIU Taiguo, LIU Bo, CHEN Wanquan, GAO Li*

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Transcriptome sequencing (RNA-seq) is an important tool for analyzing dynamic transcriptomes. In addition to quantifying gene expression, RNA-seq generated data helping discover new transcripts, recognize alternative splicing genes and detect allele-specific expression. This paper mainly reviewed the technical steps and working principles of RNA-seq and introduced its application and progresses in the study of plant pathogens and plant-fungal interactions.

Key words RNA-seq; host; pathogen

转录组是特定细胞、组织和有机体在特定发育阶段或生理条件下的一整套转录本^[1], 主要由核糖体 RNA(80%~90%, rRNA), 转运 RNA(5%~15%, tRNA), 信使 RNA(2%~4%, mRNA)以及基因内或者基因间的非编码 RNA(1%, ncRNA)组成^[2]。与相对稳定的基因组不同, 转录组随生物的生理条件、发育阶段和外部环境因素而变化。转录组测序(RNA-seq)是分析表型与基因型之间关系的有力工具, 它可以准确地测定特定基因的表达水平、差异剪接和转录产物的等位基因的特异性表达^[3], 从而更好地了解细胞的生长发育以及疾病进展的潜在途径和机制。

1 RNA-seq 概述

RNA-seq 的转录组分析主要分为 4 部分, 包括

试验设计、文库构建、特定 NGS 平台上的测序和利用生物信息学进行数据分析^[4]。

1.1 试验设计

试验设计是 RNA-seq 的关键步骤, 应根据试验目的选择适当的组织进行设计。需要注意的是组织的不均匀性, 因为组织中通常包括多种细胞类型, 因此得到的结果是某种类型组成细胞的真实转录谱混合在了整个组织的转录组表达谱中^[5]。目前已经开发了多种单细胞分离方法^[6], 可与 RNA-seq 技术相结合应用于实践中, 如肿瘤的异质性研究^[7]等。

1.2 文库构建

文库构建是在样品收集完后制备总 RNA 并对其分级以获得目的转录产物。研究表明在大多数细胞中, rRNA 通常占总细胞 RNA 的 80%以上。

收稿日期: 2019-07-15

修订日期: 2019-07-23

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0200406); 国家自然科学基金国际(组织间)合作项目(31761143011); 国家自然科学基金(31571965)

* 通信作者 E-mail: lgao@ippcaas.cn

如果在构建文库时不去除 rRNA 转录物,它们将降低序列覆盖的深度,从而影响其他含量较少的 RNA 的检测^[8]。因此可以通过直接选择 poly(A) RNA 或者选择性去除 rRNA 来处理总 RNA^[3]。前者是利用 Oligo(dT)微珠纯化 mRNA,广泛应用于真核生物。后者富集所有非 rRNA 种类,包括 non-poly(A)mRNA、预处理的 RNA、tRNA。

然后将 RNA 分子进行片段化处理并反转录成双链 cDNA,或者先转录成 cDNA 再进行片段化^[10]。片段化的目的是达到 NGS 技术所需要的长度。产生片段化 cDNA 后,使用特定的测序接头连接 DNA 片段两侧,即可扩增构建成功的文库。

1.3 特定 NGS 平台的测序

RNA-seq 技术的实现依赖于高通量测序技术。目前较成熟的 NGS 测序平台主要有应用二代测序技术的 Roche/454、ABI/SOLiD 和 Solexa/Illumina 测序平台以及应用三代测序技术的 PacBio/SMRT 测序平台。

2005 年,454 公司引入焦磷酸测序技术,开启了新一代测序的革命^[11]。Roche/454 技术的原理是利用特定的珠子捕获单链化的文库 cDNA 并通过乳液 PCR 进行扩增。然后将珠子转移到 picotiter 板的孔中,同时需要添加多种酶类,如 ATP 硫酸化酶、荧光素酶和 DNA 聚合酶等。在测序过程中,按照一定的顺序添加 dNTPs 使其与模板链互补,通过产生的光信号来确定待测样品的序列。Roche/454 技术具有测序速度快,节省人力的优点,但是对于长度大于 6 bp 的多碱基序列测序时,其错误率相对较高,且测序成本较高^[12]。

ABI/SOLiD 技术平台应用的是连接测序 (sequencing by ligation, SBL) 的机制^[13-14]。单向的 SOLiD 测序包括 5 轮测序反应,需要一个具有 8 个碱基的探针进行多次的连接反应,探针结构中第 1、2 位碱基决定携带荧光基团的颜色,切割位点位于第 5 个碱基,4 种不同的荧光染料标记在 5' 末端。荧光信号将在探针与模板链互补配对时被测序仪记录,并且通过探针的最后 3 个碱基的切割而消失。经过一系列连接反应后,引物重置,开始第 2 轮测序,起始位置与第 1 轮测序错开 1 个碱基。因此在 5 轮测序完成后,每个碱基被不同的引物检测 2 次。因此 ABI/SOLiD 测序系统的优势在于测序精度高,但是测序序列较短。

Illumina 测序技术的核心是“桥式扩增”和“边

合成边测序”的技术,其所有酶促反应以及荧光信号的产生都在流动池中进行。根据具体的 Illumina 平台,它可以分为 1 个(miSeq),2 个(HiSeq2500)或 8 个(HiSeq2000,HiSeq2500)单独的通道^[15]。首先将含有特定接头的文库 DNA 变性为单链并转移到流动池中进行桥式 PCR。扩增形成簇后,通过加入带不同荧光标记的 dNTPs 和改造过的聚合酶,使得带有荧光标记的 dNTPs 结合到测序链上,再进行激光扫描,得到荧光。通过每个簇的每个延伸步骤的荧光信号来读取序列。这些 dNTPs 都携带可逆终止子,每个循环只允许加入单个碱基。其中碱基结合到测序链并发出荧光的过程被称为 sequences-by-synthesis。与前两种测序技术相比,Illumina 测序技术测序成本更低,测序所需时间更短。

基于单分子的平台 PacBio 可实现单分子实时 (SMRT) 测序^[16]。该技术利用 DNA 聚合酶使用荧光标记的核苷酸进行不间断的模板合成。在碱基配对阶段,随着不同碱基的加入会发出不同颜色的光,通过零模波导孔(zero-mode waveguide,ZMW)实时检测独特的荧光脉冲。SMRT 的优点是它不包括 PCR 扩增步骤,从而避免扩增偏倚并改善跨转录组的均匀覆盖,并且能够产生平均长度为 4 200 bp 至 8 500 bp 的非常长的读数,这极大地改善了新转录物结构的检测^[17]。缺点是误差率很高(约 5%),主要是碱基的插入和缺失^[18],由于难以将错误读取与参考基因组匹配,将导致错位和测序读取丢失^[8]。

1.4 生物信息学分析

RNA-seq 数据分析从原始数据(raw data)的质控开始,主要包括对原始数据的过滤以获得 clean data,再通过检测 clean data 的碱基质量值(quality score,Q-score)、碱基分布情况以及 GC 含量,确定原始数据的测序质量和过滤效果^[19]。这一阶段主要的软件工具有 FastQC、FASTX-Toolkit 和 Trimmomatic^[20]。数据质控完成后,进行 clean reads 的比对与拼接,序列比对方法有两种:一是在有参考基因组存在的情况下,通过参考基因组组装过滤的测序读长,最终获得转录本信息,常用的序列比对软件有 TopHat2^[21]、GSNAP^[20]、Bowtie2^[22]、STAR^[23]、SOAP2^[24]等;二是无参考基因组的情况下的组装也称为从头组装(de novo assembly),是将各测序读长按顺序拼接组装成连续的长度序列,通过与模式生物进行序列比对,获得基因序列。常用软件有 Velvet、Abyss 和 SOAPdenovo 等。根据比对到基因组上的

序列数量,对各基因进行均一化处理和定量估计,以进行差异表达化分析。常用到的有 DESeq、DEG-seq、Cuffdiff、Bayseq、EdgeR 等工具^[19]。获得差异基因后,即可进行基因表达归类分析,以发现关键的生物学通路,进而了解一些生物学过程中的分子机制。这一阶段常用的数据库有 GO、KEGG、GenMAPP^[25]和 BioCarta^[26]等。

2 RNA-seq 在植物病原菌研究中的应用

植物病原物主要包括真菌、细菌、病毒和线虫等,研究病原物中致病基因及其表达是当前分子植物病理学的重要任务。

稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 被认为是分子植物病理学上的头号真菌病原体。Jaehyuk 等^[27]利用 RNA-seq 分析了稻瘟病菌在缺氧条件下的转录反应,共鉴定出 1 047 个基因因缺氧而上调,进一步 GO 分析发现这些基因主要参与菌丝体发育,甾醇生物合成和金属离子转运过程,并且这些基因在白念珠菌和新型隐球菌中也是十分保守的。Kim 等^[28]通过体外注射水稻叶提取物(rice leaf extract, RLX)激活白叶枯菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 的致病相关基因,并在注射提取物后 1 h 内分别对 7 个时间点的样品进行 RNA-seq 分析,其中与无机离子摄取如铁吸收和无机磷吸收相关基因在 5 min 内上调,致病调控因子 *hrpX* 和 *hrpG* 基因分别在接触诱导后 15 min 和 10 min 内达到峰值, cyclic-di-GMP 调控基因以及趋化性和鞭毛生物合成相关基因下调,10 min 后上调,进而证明了白叶枯菌致病基因的表达顺序和相互依赖关系。Jin 等^[29]利用 RNA-seq 分析了 2 个具有毒性差异的大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* V991w 和 V991b 在体外培养时的差异表达基因,分别发现 2 250 和 1 102 个差异表达基因。其中在 V991w 菌株中下调的基因主要参与黑色素、疏水蛋白、黄曲霉毒素以及膜蛋白等与致病机理和耐药性有关的物质合成过程,V991b 中上调的基因中有 62 个和 71 个分别与氧化还原过程和氧化还原酶活性相关,表明 V991b 菌株在体外培养时氧化还原能力比 V991w 菌株强,为进一步分析大丽轮枝菌的致病性提供了依据。Somani 等^[30]在利用 RNA-seq 分析丙环唑处理根腐叶枯病菌 *Cochliobolus sativus* 3、6 h 和 12 h 后的基因的转录水平,共发现 564 个差异表达基因,其中 280 个基因上调,284 个基因下调。GO 富集分析将

这些基因分为了跨膜转运蛋白基因、转录和翻译相关基因、生物合成相关基因、细胞代谢相关基因、应激反应相关基因、碳水化合物代谢相关基因、电子转运相关基因以及其他基因和假想蛋白基因 9 类。Donaldson 等^[31]利用 RNA-seq 技术改进了玉蜀黍黑粉菌 *Ustilago maydis*、大麦坚黑粉菌 *U. hordei* 和丝黑穗菌 *Sporisorium reilianum* 的转录组注释,获得超过 10 亿个序列读数,显著增加了每种真菌的已知转录单位数量,检测到的转录本总数(FPKM>1)是美洲斑潜蝇数量的 2.2 倍,大肠杆菌数量的 1.5 倍。在使用深度转录组测序分析在酵母蔗糖培养基(yeast sucrose media, YES)和酵母蛋白胨培养基(yeast peptone media, YEP)条件下培养的黄曲霉 *Aspergillus flavus* 的全基因组转录组谱时,研究人员们发现,在 YES 与 YEP 中,黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)生物合成途径和氨基酸的生物合成显著上调^[32]。通过比较两种马铃薯孢囊线虫(potato cyst nematodes, PCN) *Globodera rostochiensis*、*G. pallida*与它们的近亲 *G. tabacum*、*G. mexicana* 的转录组差异,共鉴定了 7 种 PCN 物种特有的转录本,包括一种参与泛素化的蛋白。还发现了 545 个在 PCN 和非 PCN 物种之间差异表达的基因,其中包含编码效应蛋白的 78 个基因。证明宿主特异性的决定因素在于基本效应基因表达调控,而这种调控可以由单个调控基因控制,也可以由极少数调控基因控制^[33]。

3 RNA-seq 在寄主植物与真菌互作研究中的应用

为了揭示野生水稻根抗性增强的机制,Tian 等^[34]利用 RNA-seq 比较了野生水稻和栽培水稻根对稻瘟病菌侵染的差异反应。发现在野生稻中,抗性机制与脂质代谢、WRKY 转录因子、几丁质酶活性、茉莉酸、乙烯、木质素和苯丙烷类及二萜类代谢有关;而栽培稻对病原菌的反应主要与苯丙烷、黄酮和蜡代谢有关。Yu 等^[35]对两个抗感玉米品种进行了在感染灰斑病 81、89、91 d 和 93 d 后的 RNA-seq 试验,与 81 d 的起始阶段相比,抗性品种分别检测到了 4 666、1 733 和 1 166 个差异表达基因;易感品种的差异表达基因较少,分别为 4 713、881 和 722 个。同时丰富了玉米对灰斑病菌反应的多种途径,包括“对水杨酸的反应”“蛋白质磷酸化”“氧化还原过程”和“类胡萝卜素生物合成过程”。Zhang 等^[36]

通过比较白粉病菌致病小种 E09 和条锈病菌致病小种 CYR31 侵染小麦后的转录水平,发现这两种病原菌的侵染共导致了小麦基因组中 23.8% 的基因发生了转录水平的差异,其中白粉病菌导致的小麦基因表达差异更强烈。进一步确定了有 7 种高度富集的 KEGG 途径响应白粉病菌的侵染,4 种途径响应条锈菌的侵染,其中只有 2 条途径是重叠的,即泛醌和其他萜类醌的生物合成(ko00130)以及光合作用-天线蛋白通路(ko00196)。Dobon 等^[37]通过对小麦条锈病菌感染的小麦植株进行 RNA-seq 分析,发现与植物应激激素水杨酸、茉莉酸、乙烯和脱落酸相关的生物合成和反应途径显著富集,与植物的先天性免疫密切相关。同时还发现编码抗菌特性蛋白的基因表现为富集,这些蛋白主要有病程相关蛋白、几丁质酶和富含半胱氨酸的重复蛋白。Li 等^[38]通过对感染小麦赤霉病菌后不同时期的小麦抗性品种及易感品种进行差异表达基因的分析,在一个 140 kb 的区域内鉴定了 53 个组成型差异表达基因,并且确定了在这些基因中有 13 个参与叶绿体中的代谢途径。同时还发现了一种基因编码肌醇磷酸(inositol monophosphate, IMPa),两种基因编码核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO),表明局部感染的穗状花序中,RuBisCO 和 IMPa 之间的相互作用导致了短暂的易感性,这种作用阻断了水杨酸介导的二级信号通路,并诱导了远处叶组织的系统获得性抗性。

4 问题与展望

转录组学的研究随着高通量测序技术的不断发展得到了极大推动, RNA-seq 技术已经被越来越多的研究者认可和使用,其在量化基因表达、发现新的转录本、识别选择性剪接基因和检测等位基因特异性表达等研究中都发挥着重要作用。但是这一技术也存在一定问题,比如对样本要求较高,采样部位、采样时期以及个体间的差异都会导致转录组分析结果存在较大差异^[39],因此,应用单一的转录组技术并不能全面有力地诠释相关研究的分子机制,结合应用蛋白质组学、代谢组学和表型组学等将成为必然发展趋势。

参考文献

- [1] WANG Zhong, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 10(1):57–63.
- [2] LINDBERG J, LUNDEBERG J. The plasticity of the mammalian transcriptome [J]. *Genomics*, 2010, 95(1):1–6.
- [3] COSTA V, ANGELINI C, DE FEIS I, et al. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-seq [J/OL]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 2010(5757):853916. DOI: 10.1155/2010/853916.
- [4] QIAN Xi, BA Yi, ZHUANG Qianfeng, et al. RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics [J/OL]. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2013, 18(2):98. DOI: 10.1089/omi.2013.0110.
- [5] ISLAM S, KJALLQUIST U, MOLINER A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq [J]. *Genome Research*, 2011, 21(7):1160–1167.
- [6] SHAPIRO E, BIEZUNER T, LINNARSSON S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(9):618–630.
- [7] DALERBA P, KALISKY T, SAHOO D, et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(12):1120–1127.
- [8] KUKURBA K R, Montgomery S B. RNA sequencing and analysis [J/OL]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015, 11:951. DOI: 10.1101/pdb.top084970.
- [9] JACQUIER A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(12):833–844.
- [10] ROBERTS A, TRAPNELL C, DONAGHEY J, et al. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias [J/OL]. *Genome Biology*, 2011, 12(3):R22. DOI: 10.1186/gb-2011-12-3-r22.
- [11] BESSER J, CARLETON H A, GERNER-SMIDT P, et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2017, 24(4):335–341.
- [12] LIU Liu, LI Yinhu, LI Siliang, et al. Comparison of next-generation sequencing systems [J/OL]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 2012(7):251364. DOI: 10.1201/b16568-3.
- [13] LANDEGREN U, KAISER R, SANDERS J, et al. A ligase-mediated gene detection technique [J]. *Science*, 1988, 241(4869):1077–1080.
- [14] SHENDURE J, JI H. Next-generation DNA sequencing [J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(10):1135–1145.
- [15] BUERMANS H P J, DEN DUNNEN J T. Next generation sequencing technology: Advances and applications [J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2014, 1842(10):1932–1941.
- [16] EID J, FEHR A, GRAY J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules [J]. *Science*, 2009, 323

- (5910):133–138.
- [17] SHARON D, TILGNER H, GRUBERT F, et al. A single-molecule long-read survey of the human transcriptome [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(11):1009–1114.
 - [18] CARNEIRO M O, RUSS C, ROSS M G, et al. Pacific biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data [J/OL]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 375. DOI: 10.1186/1471-2164-13-375.
 - [19] 李欣, 李小俊, 陈晓丽, 等. 转录组数据分析与功能基因挖掘 [J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(3):22–32.
 - [20] CONESA A, MADRIGAL P, TARAZONA S, et al. Erratum to: A survey of best practices for RNA-seq data analysis [J/OL]. *Genome Biology*, 2016, 17(1):181. DOI: 10.1186/s13059-016-1047-4.
 - [21] KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions [J]. *Genome Biology*, 2013, 14(4): R36. DOI: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
 - [22] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4):357–359.
 - [23] DOBIN A, DAVIS C A, SCHLESINGER F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(1):15–21.
 - [24] LI Ruiqiang, YU Chang, LI Yingrui, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(15):1966–1967.
 - [25] YANG Hailing, HUO Pengfei, HU Guozhang, et al. Identification of gene markers associated with metastasis in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Oncology Letters*, 2017, 13(6):4755–4761.
 - [26] CHEN Ai, LEI Kong. CGPS: A machine learning-based approach integrating multiple gene set analysis tools for better prioritization of biologically relevant pathways [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2018, 45(9):27–42.
 - [27] JAEHYUK C, HYUNJUNG C, GIR-WON L, et al. Genome-wide analysis of hypoxia-responsive genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* [J/OL]. *PLoS ONE*, 2015, 10(8):e0134939. DOI: 10.1371/journal.pone.0134939.
 - [28] KIM S, CHO Y J, SONG E S, et al. Time-resolved pathogenic gene expression analysis of the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1):345. DOI: 10.1186/s12864-016-2657-7.
 - [29] JIN Lirong, CHEN Dong, LIAO Shengjie, et al. Transcriptome analysis reveals downregulation of virulence-associated genes expression in a low virulence *Verticillium dahliae* strain [J]. *Archives of Microbiology*, 2019, 201(7):927–941.
 - [30] SOMANI D, ADHAV R, PRASHANT R, et al. Transcriptomics analysis of propiconazole-treated *Cochliobolus sativus* reveals new putative azole targets in the plant pathogen [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2019, 19(3):453–465.
 - [31] DONALDSON M E, OSTROWSKI L A, GOULET K M, et al. Transcriptome analysis of smut fungi reveals widespread intergenic transcription and conserved antisense transcript expression [J/OL]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1):340. DOI: 10.1186/s12864-017-3720-8.
 - [32] YAO Guangshan, YUE Yuewei, FU Yishi, et al. Exploration of the regulatory mechanism of secondary metabolism by comparative transcriptomics in *Aspergillus flavus* [J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:1568. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01568.
 - [33] SABEH M, LORD E, GRENIER É, et al. What determines host specificity in hyperspecialized plant parasitic nematodes? [J/OL]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1):457. DOI: 10.1186/s12864-019-5853-4.
 - [34] TIAN Lei, SHI Shaohua, NASIR F, et al. Comparative analysis of the root transcriptomes of cultivated and wild rice varieties in response to *Magnaporthe oryzae* infection revealed both common and species-specific pathogen responses [J/OL]. *Rice*, 2018, 11(1):26. DOI: 10.1186/s12284-019-0287-9.
 - [35] YU Yang, SHI Jianyang, LI Xiyang, et al. Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms of the defense response to gray leaf spot disease in maize [J/OL]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1):742. DOI: 10.1186/s12864-018-5072-4.
 - [36] ZHANG Hong, FU Ying, GUO Huan, et al. Transcriptome and proteome-based network analysis reveals a model of gene activation in wheat resistance to stripe rust [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(5):1106. DOI: 10.3390/ijms20051106.
 - [37] DOBON A, BUNTING D C E, CABRERA-QUIO L E, et al. The host-pathogen interaction between wheat and yellow rust induces temporally coordinated waves of gene expression [J/OL]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1):380. DOI: 10.1186/s12864-016-2684-4.
 - [38] LI Xin, ZHONG Shengfu, CHEN Wanquan, et al. Transcriptome analysis identifies a 140 kb region of chromosome 3b containing genes specific to Fusarium head blight resistance in wheat [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(3):852. DOI: 10.3390/ijms19030852.
 - [39] 王晓丹, 肖钢, 张振乾, 等. 转录组学和蛋白质组学关联分析在植物研究中的应用 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(1):432–439.

(责任编辑: 田 喆)