

沙田柚自交不亲和花柱数字基因表达谱及相关基因分析

张 渝, 李惠敏, 刘玉洁, 郭丹妮, 刘华英, 秦新民*

广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林
Email: *xmqin@mailbox.gxnu.edu.cn

收稿日期: 2020年10月13日; 录用日期: 2020年11月5日; 发布日期: 2020年11月12日

摘 要

为探索沙田柚自交不亲和的分子机理, 以沙田柚自交与异交1~3天的花柱为材料, 利用数字基因表达谱技术对样品cDNA文库进行差异基因表达谱分析。结果表明: 异交1 d/自交1 d花柱中, 上调表达的基因有244个, 下调表达的基因有27个; 异交2 d/自交2 d花柱中, 上调表达基因有265个, 下调表达基因有244个; 异交3 d/自交3 d花柱, 上调表达的基因有193个, 下调表达的基因有685个。在SY1/SZ1、SY2/SZ2和SY3/SZ3中共有的差异表达的基因为30个。差异表达基因的GO功能显著性富集分析结果表明, 这些差异表达的基因主要参与应对各种化学物质、植物激素、内源和外源物质的刺激及信号转导过程。通过本研究, 挖掘出了一些与沙田柚自交不亲和相关的基因, 可为今后阐明沙田柚配子体自交不亲和的分子机理提供依据。

关键词

沙田柚, 配子体自交不亲和, 花柱, 差异表达基因, 数字基因表达谱

Digital Gene Expression Profiling Analysis of Self-Incompatibility Styles in *Citrus grandis* var. Shatinyu

Yu Zhang, Huimin Li, Yujie Liu, Danni Guo, Huaying Liu, Xinmin Qin*

College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin Guangxi
Email: *xmqin@mailbox.gxnu.edu.cn

Received: Oct. 13th, 2020; accepted: Nov. 5th, 2020; published: Nov. 12th, 2020

*通讯作者。

文章引用: 张渝, 李惠敏, 刘玉洁, 郭丹妮, 刘华英, 秦新民. 沙田柚自交不亲和花柱数字基因表达谱及相关基因分析[J]. 植物学研究, 2020, 9(6): 536-544. DOI: 10.12677/br.2020.96066

Abstract

This study aimed to understand the self-incompatibility mechanism in *Citrus grandis* var. Shatinyu. The one day, two days and three days styles of Shatinyu after self-pollination and cross-pollination were used to construct DNA libraries and the gene expression profiles were analyzed by Solexa sequencing technology. The results of solexa sequencing showed that a total of 271 different expression genes (DEGs) were obtained from the 1 d self-and cross-pollinated styles, in which 244 up-regulated expression and 27 down-regulated expression. 265 up-regulated expressed genes and 244 down-regulated expressed genes were in 2 d self-and cross-pollinated styles, 193 up-regulated expressed genes and 685 down-regulated expressed genes in comparing 3 d self-and cross-pollinated styles. Moreover, statistics of differentially expressed genes showed that there were 30 differentially expressed genes coexisted in SY1/SZ1, SY2/SZ2 and SY3/SZ3. Gene Ontology analysis showed that the DEGs were mainly involved in responding to all kinds of chemicals, plant hormones, the stimulation of endogenous and exogenous substances and signal transduction process. In sum, through this study some genes associated with self-incompatibility in Shatinyu were discovered. These results will provide a theoretical reference for further exploration of self-incompatibility molecular mechanism in *Citrus grandis* var. Shatinyu.

Keywords

Citrus grandis var. Shatinyu Hort, Gametophytic Self-Incompatibility, Styles, Differentially Expressed Genes, Digital Gene Expression Profile

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

植物自交不亲和性(Self-incompatibility, SI)对于避免近亲繁殖有很重要的作用[1] [2], 其研究在植物生殖学和杂交优势利用等方面具有重要的理论和应用价值。

目前植物自交不亲和的研究主要集中在十字花科、茄科、蔷薇科、玄参科和罂粟科植物。沙田柚为芸香科、柑橘属植物, 其自交不亲和的研究在细胞学、蛋白质化学等方面取得了一定进展[3]-[9], 但有关沙田柚配子体自交不亲和相关基因表达和鉴定方面的研究尚未见报道。

数字基因表达谱技术以高通量测序为基础, 可用于检测特定细胞或组织在特定状态下不同样品中的差异表达基因的种类和丰度信息[10], 因而, 近年来已被广泛应用于许多领域的研究中[11] [12] [13]。

本研究以沙田柚自花授粉和异花授粉 1 d、2 d、3 d 后的花柱为实验材料, 分别构建测序文库, 进行了数字基因表达谱测序, 试图挖掘与自交不亲和反应相关的差异表达的基因, 进而为研究沙田柚配子体自交不亲和性机理提供分子依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料处理与收集

实验材料为沙田柚(*Citrus grandis* var. Shatinyu Hort)花柱。在沙田柚的盛花期分别对沙田柚样树进行

人工自花授粉(沙田柚 × 沙田柚)和异花授粉(酸柚 × 沙田柚),然后分别采集自交 1~3d (标记为 SZ1、SZ2、SZ3)和异交授粉 1~3d (标记为 SY1、SY2、SY3)后的花柱,立即放入液氮,保存于-80℃超低温冰箱中备用。

2.2. 总 RNA 的提取及文库构建

总 RNA 的提取采用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司)并参照其操作手册进行。建库与测序由华大科技有限公司进行。

2.3. 测序数据分析及差异表达基因的筛选

测序数据采用 RPM 和 RPKM [14]值进行标准化处理。异交 1d/自交 1d、异交 2d/自交 2d 和异交 3d/自交 3d 花柱组合之间的差异表达基因采用 DESeq 方法[15]进行确定。差异基因筛选条件为 $qvalue < 0.005$ 且 $\log_2(\text{fold change}) > 1$ 。

2.4. 差异基因基因功能注释和 KEGG 代谢通路分析

沙田柚自交和异交授粉花柱差异表达基因进行 GO 功能富集显著性分析与 KEGG 代谢通路富集性分析分别采用 GO 数据库(<http://www.Geneontology.org/>)和 KOBAS (2.0)软件进行。

2.5. 荧光定量 RT-PCR 检测

为检测测序结果的可靠程度,随机挑选 6 个基因进行 RT-PCR 测定。内参基因为 GAPDH (表 1)。荧光定量 PCR 的反应体系和程序参见 Fermentas 公司的 SYBR Green master mix 说明书,引物的退火温度为 56℃~60℃,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对表达量进行分析计算,实验设置 3 次重复。

Table 1. The primers of genes analysed by qPCR

表 1. 差异表达基因 qRT-PCR 验证引物信息

基因序列号	基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
Unigene6484_All	<i>GAPDH</i>	ACTGTGGAAGCGAGCAGAAT	ACTTCGGTGACTGCATCCTT
Unigene34907_All	<i>SLA</i>	ACGTTAACAGCGATGGCATC	CTGATTCCGATCGCTTTGAG
Unigene2441_All	<i>SRA</i>	GCCTAATTACAACGACGGCT	GGCCAGTTCCTTAGCATGCT
Unigene35613_All	<i>EBA</i>	GCCAAAACCTGACAGCAGCAA	TGCTGGCTGTTTCGATGATG
Unigene674_All	<i>RIH</i>	AGCTTTTAGTGGCGTTGGA	CCACGCACCAATGAAGCTTA
Unigene15891_All	<i>UBP</i>	TGTGACTGATTGGCCATTCG	ATTCAACTCCGGCAAGACGA
Unigene21248_All	<i>CBP</i>	ACTGCACTTTGGACAGAGCT	TATGACGCTTTTGGAGGTC

3. 结果

3.1. 测序数据评估

文库测序得到的获得的 Raw Data 经处理分别得到 Clean Reads,用比对软件 SOAPaligner/SOAP2 [16] 将 Clean Reads 与参考基因组(甜橙)进行比对。结果表明 SY1、SY2、SY3、SZ1、SZ2 和 SZ3 获得的 clean reads 分别为 11528402、11334516、11286963、11414971、11329671、11352636,6 个样本中 clean reads 所占的比例在 92.69%~95.07%。

3.2. 差异表达基因分析的 GO 分类与富集分析

3.2.1. 差异基因的筛选

以 $qvalue < 0.005$ 且 $\log_2(\text{fold change}) > 1$ 为标准对 SY1/SZ1、SY2/SZ2、SY3/SZ3 三个组合之间的差异基因进行筛选。结果表明 SY1/SZ1 中, 差异表达基因总数为 271 (上调表达的基因 244 个, 下调表达的基因 27 个)。SY2/SZ2 的差异表达基因为 509 (上调表达基因 265 个, 下调表达基因 244 个)。SY3/SZ3 的差异表达基因为 878, 其中上调表达基因 193 个, 下调表达基因为 685 个(图 1)。

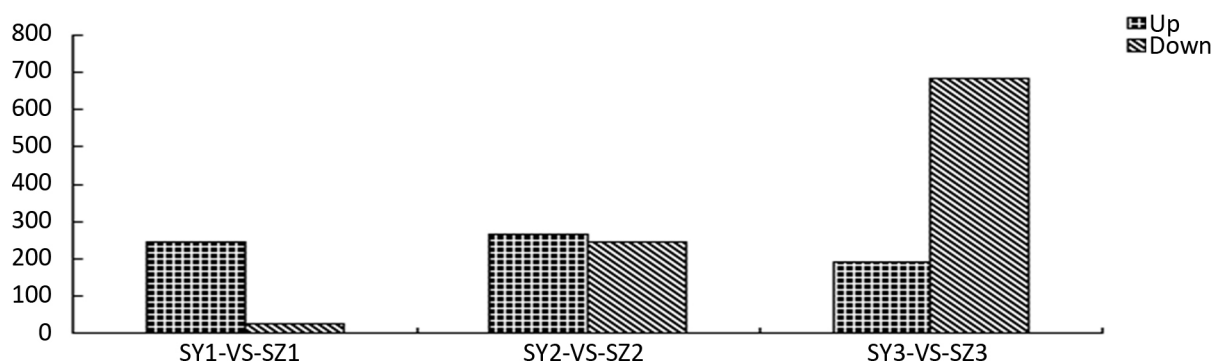


Figure 1. The statistics of differentially expressed genes in self-pollinated styles and cross-pollinated styles

图 1. 沙田柚自花授粉与异花授粉花柱差异表达基因的统计

3.2.2. 差异表达基因的 GO 功能显著性富集分析

在 SY1/SZ1 中, 生物过程、细胞组分和分子功能三个功能富集分析的基因数分别为 741 个, 425 个, 198 个。其中, 生物过程的 741 个基因分为 19 个功能基因群; 细胞组分中的 425 个基因分为 12 个功能基因群; 分子功能中的 198 个基因分为 8 个功能基因群。SY2/SZ2 中生物过程、细胞组分、分子功能三个功能富集分析的基因个数分别为 1199 个, 797 个, 384 个。其中, 生物过程的 1199 个基因分为 21 个功能基因群; 细胞组分中的 797 个基因分为 13 个功能基因群; 而分子功能中的 384 个基因则分为 12 个功能基因群。SY3/SZ3 比对中, 生物过程、细胞组分和分子功能富集分析的基因个数分别为 2227 个, 1389 个, 715 个。其中, 生物过程中的 2227 个基因可分为 21 个功能基因群; 细胞组分中的 1389 个基因分为 14 个功能基因群; 分子功能中的 715 个基因分为 10 个功能基因群。

3.3. 差异表达基因的 Pathway 显著性富集分析

SY1/SZ1 差异表达基因注释到 146 条 KEGG 代谢通路中(表 2)。其中注释到淀粉和蔗糖代谢途径(ko00500)通路的基因数量最多, 为 10 个(6.85%), 其次是戊糖和葡萄糖醛酸酯互变途径(ko00040), 以及聚糖降解(ko00511)途径, 数量均为 6 (4.11%)。

Table 2. Differentially expressed genes enriched of KEGG pathways in SY1-VS-SZ1

表 2. SY1/SZ1 差异表达基因 Pathway 显著性富集统计

途径	差异基因注释	Qvalue	Pathway ID
其他聚糖降解	6 (4.11%)	0.001404909	ko00511
糖和葡萄糖醛酸酯互变现象	6 (4.11%)	0.019126583	ko00040
淀粉和蔗糖代谢	10 (6.85%)	0.019696451	ko00500

SY2/SZ2 差异表达基因注释到 251 个 KEGG 代谢通路中(表 3)。其中注释代谢途径(ko01100)通路的

基因数量最多, 为 73 个(29.08%), 其次为次生代谢产物的生物合成途径(ko01110)和植物激素信号转导途径(ko04075), 基因数量分别为 44 个(17.53%)和 26 个 (10.36%)。

Table 3. Differentially expressed genes enriched of KEGG pathways in SY2-VS-SZ2
表 3. SY2/SZ2 差异表达基因 Pathway 显著性富集统计

途径	差异基因注释	Qvalue	Pathway ID
淀粉和蔗糖代谢	18 (7.17%)	0.0003874210	ko00500
戊糖和葡萄糖醛酸酯互变现象	10 (3.98%)	0.0004252822	ko00040
苯丙素的生物合成	14 (5.58%)	0.0004252822	ko00940
次生代谢产物的生物合成	44 (17.53%)	0.0074408390	ko01110
氨基糖和核苷酸糖代谢	9 (3.59%)	0.0074408390	ko00520
苯丙氨酸代谢	7 (2.79%)	0.0074408390	ko00360
氰基氨基酸代谢	7 (2.79%)	0.0117669696	ko00460
醚脂类代谢	10 (3.98%)	0.0129689933	ko00565
植物激素信号转导	26 (10.36%)	0.0129689933	ko04075
代谢途径	73 (29.08%)	0.0196072044	ko01100
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	5 (1.99%)	0.0204112822	ko00250
黄酮和黄酮醇生物合成	6 (2.39%)	0.0219457980	ko00944
α -亚麻酸代谢	5 (1.99%)	0.0432683354	ko00592
异喹啉生物碱生物合成	3 (1.2%)	0.0481040160	ko00950

SY3/SZ3 差异表达基因注释到 KEGG 代谢通路为 481 条(表 4)。与 SY2/SZ2 相同, 注释到代谢途径(ko01100)通路的基因数量最多, 为 157 (32.64%), 其次为次生代谢产物的生物合成途径(ko01110)和植物激素信号转导途径(ko04075), 基因数量分别为 118 (24.53%)和 47 (9.77%)。

Table 4. Differentially expressed genes enriched of KEGG pathways in SY3-VS-SZ3
表 4. SY3/SZ3 差异表达基因 Pathway 显著性富集统计

途径	差异基因注释	Qvalue	Pathway ID
次生代谢产物的生物合成	118 (24.53%)	3.111726e-17	ko01110
黄酮类生物合成	33 (6.86%)	7.801713e-15	ko00941
黄酮和黄酮醇生物合成	21 (4.37%)	1.799464e-11	ko00944
二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜辣素的生物合成	28 (5.82%)	1.799464e-11	ko00945
代谢途径	157 (32.64%)	8.988912e-08	ko01100
苯丙素的生物合成	26 (5.41%)	1.093121e-07	ko00940
柠檬烯、蒾烯降解	17 (3.53%)	2.702901e-06	ko00903
玉米素生物合成	14 (2.91%)	9.886923e-05	ko00908
泛醌和其他吡咯醌生物合成	11 (2.29%)	1.350563e-04	ko00130
其他聚糖降解	9 (1.87%)	7.671060e-04	ko00511
植物激素信号转导	47 (9.77%)	7.671060e-04	ko04075

Continued

氰基氨基酸代谢	10 (2.08%)	6.456259e-03	ko00460
醚脂类代谢	15 (3.12%)	7.769444e-03	ko00565
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	7 (1.46%)	9.855672e-03	ko00400
角质,亚角质和蜡生物合成	8 (1.66%)	9.855672e-03	ko00073
油菜素类固醇生物合成	4 (0.83%)	1.048609e-02	ko00905
戊糖和葡萄糖醛酸酯互变现象	10 (2.08%)	1.057777e-02	ko00040
淀粉和蔗糖代谢	20 (4.16%)	1.133609e-02	ko00500
花青素生物合成	2 (0.42%)	1.882419e-02	ko00942
苯丙氨酸代谢	8 (1.66%)	2.536549e-02	ko00360
α -亚麻酸代谢	7 (1.46%)	3.322518e-02	ko00592
半乳糖代谢	8 (1.66%)	3.731857e-02	ko00052
苯并噻类生物合成	4 (0.83%)	3.792505e-02	ko00402
胞吞作用	18 (3.74%)	3.851186e-02	ko04144
倍半萜和三萜生物合成	4 (0.83%)	3.854513e-02	ko00909
类胡萝卜素生物合成	10 (2.08%)	3.935430e-02	ko00906
单萜生物合成	3 (0.62%)	4.441394e-02	ko00902
抗坏血酸和醛酸代谢	7 (1.46%)	4.441394e-02	ko00053

3.4. 自交与异交花柱共有的差异表达基因

在 SY1/SZ1、SY2/SZ2、SY3/SZ3 组合差异表达基因分别统计的基础上,对在 SY1/SZ1、SY2/SZ2 和 SY3/SZ3 均达到差异表达的基因进行挖掘,结果表明共有 30 个基因在自交花柱与异交花柱之间达到差异表达水平,其表达量(Reads Per Kilobase per Million, RPKM)及功能注释见表 5。在 30 个差异表达基因中目前 GO、KEGG、NR 数据库中未有功能注释(包括注释为 hypothetical protein、uncharacterized protein 或 predicted protein)的基因为 11 个,其中无注释的基因 4 个。

Table 5. Differentially expressed genes coexisted in self- and cross-pollinated styles

表 5. 自交与异交花柱之间差异表达基因

Gene ID	SY1	Y2	SY3	SZ1	SZ2	SZ3	Function annotation
Unigene12309_All	0.00	0.20	0.41	1.13	2.78	2.18	hypothetical protein
Unigene15891_All	0.92	6.72	2.08	10.49	20.99	11.71	protein serine/threonine kinase activity
Unigene30969_All	1.74	22.25	8.33	19.71	59.16	33.84	alpha-L-fucosidase; hydrolase activit;
Unigene27111_All	0.54	2.63	0.89	5.02	10.11	5.15	Ribonuclease H
Unigene21493_All	5.62	58.07	14.88	51.21	117.95	60.43	alpha-galacturonidase; polygalacturonase
Unigene32078_All	8.85	79.77	33.15	68.58	202.73	110.23	—
Unigene37536_All	1.62	1.26	0.85	12.61	11.30	3.02	cation-transporting ATPase activity
Unigene9477_All	1.82	13.47	5.07	13.72	34.81	19.28	predicted protein
Unigene27143_All	0.67	4.39	1.25	4.62	11.00	5.99	Xyloglucan galactosyltransferase

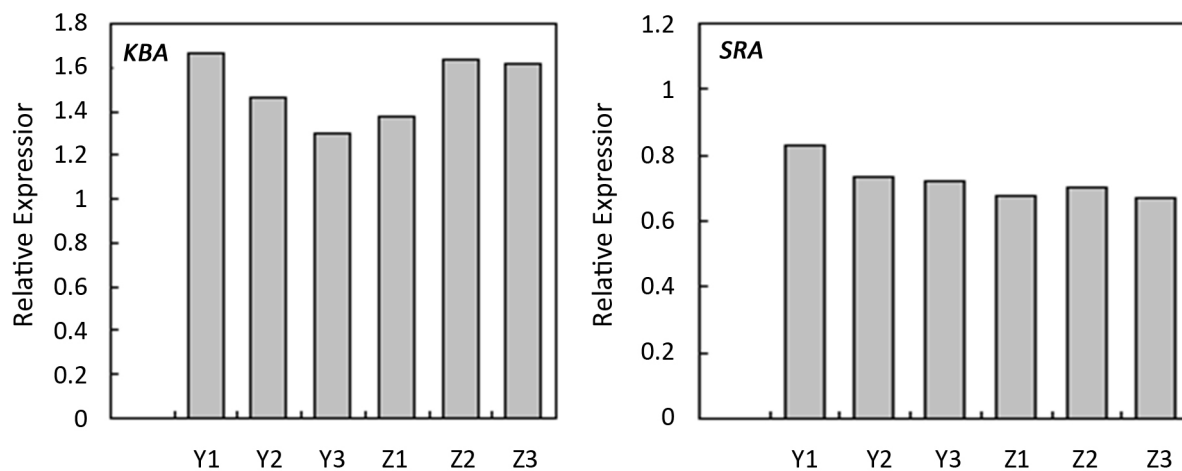
Continued

Unigene24605_All	4.17	19.20	6.38	26.50	44.38	19.09	UDP-glucosyl transferase
Unigene2299_All	12.18	36.84	22.90	58.40	117.90	68.80	cell wall modification
Unigene1873_All	16.09	43.79	20.06	73.69	145.29	59.30	—
Unigene17404_All	16.53	14.05	4.87	3.72	35.95	17.25	predicted protein
Unigene13392_All	14.58	55.81	27.44	60.06	136.27	76.54	uncharacterized protein
Unigene34584_All	2.09	9.05	4.62	8.56	29.28	18.43	acetate beta-D-glucosyltransferase
Unigene31258_All	2.68	7.98	4.66	10.41	28.54	11.61	2-alkenal reductase activity
Unigene21006_All	11.72	38.32	23.09	45.11	108.25	67.45	—
Unigene24125_All	10.88	31.69	11.12	40.51	70.47	51.12	xyloglucosyl transferase;
Unigene5640_All	6.18	19.11	10.75	22.14	64.04	37.50	uncharacterized protein
Unigene9582_All	3.20	8.24	3.89	10.41	22.10	13.59	LOB domain-containing protein
Unigene20618_All	4.24	13.65	4.05	13.61	32.93	17.26	conserved hypothetical protein
Unigene23161_All	19.04	6.45	19.58	56.51	96.35	43.17	conserved hypothetical protein
Unigene676_All	2.05	3.48	0.90	5.44	7.07	3.72	ATP binding protein
Unigene17565_All	4.79	13.54	4.74	12.45	30.40	14.30	predicted protein
Unigene24843_All	7.00	18.23	6.05	17.19	37.90	18.21	hypothetical protein
Unigene5338_All	3.47	0.09	2.97	8.22	7.66	12.23	adiponectin receptor
Unigene15711_All	9.96	27.57	16.36	21.14	13.57	3.84	—
Unigene29154_All	6.21	20.08	7.53	0.00	0.00	1.75	hypothetical protein
Unigene10706_All	1.58	3.92	2.03	0.00	0.00	0.10	predicted protein
Unigene13515_All	42.37	96.34	47.84	13.03	14.04	16.98	DNA binding protein

注：—示数据库中无任何注释。

3.5. qRT-PCR 分析

分别提取自交和异交 1~3d 花柱总 RNA, 反转录后进行定量 PCR 验证。结果表明 6 个差异表达基因(*EBA*、*SRA*、*UBP*、*RIB*、*RIH* 和 *CBP*) 在自交和异交 1~3d 花柱的相对表达量与表达谱分析的变化趋势一致(图 2)。



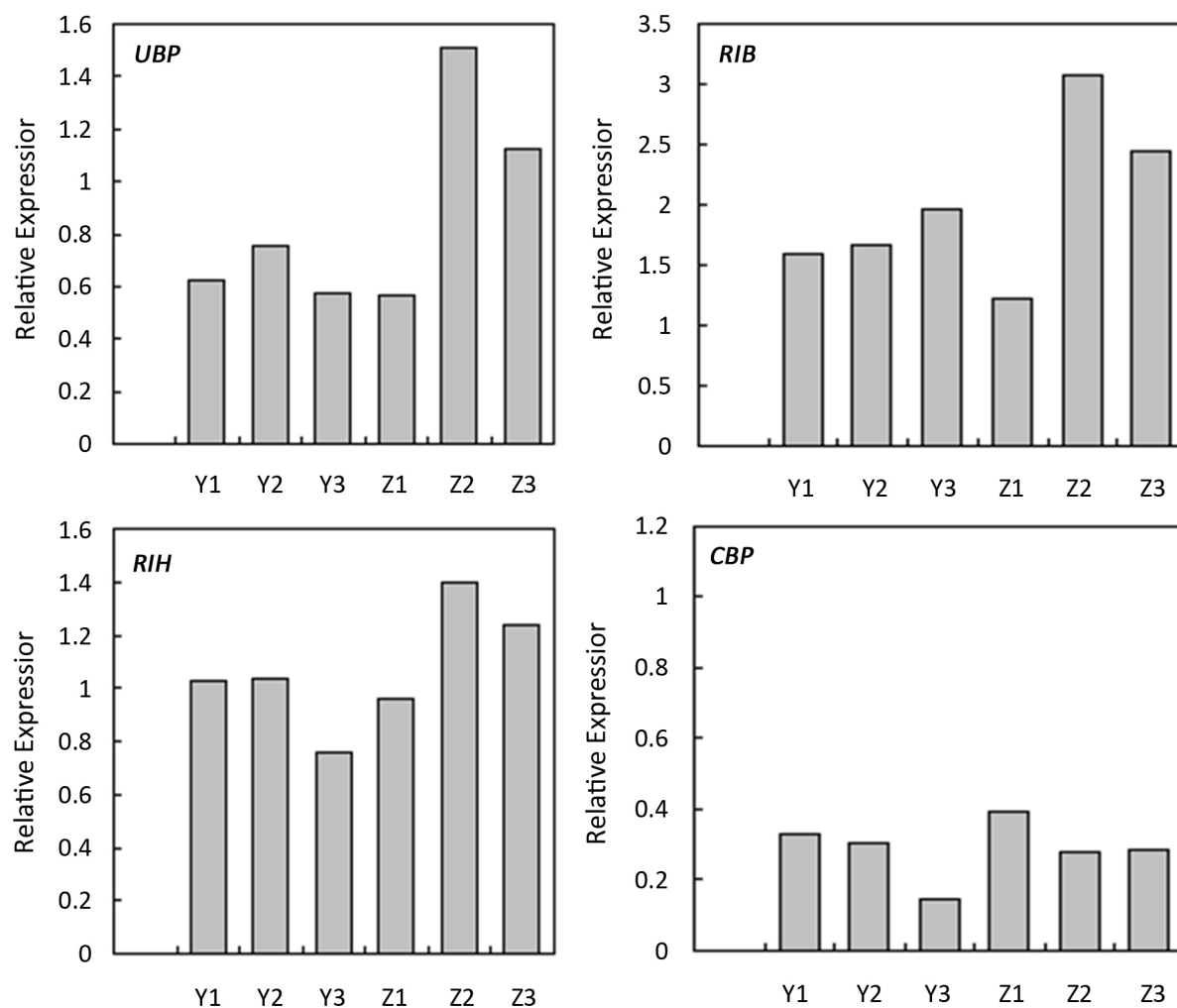


Figure 2. The relative expression between samples verified by qPCR

图 2. 差异表达基因 qPCR 验证

4. 讨论与结论

数字基因表达谱技术能快速检测植物在不同组织细胞、不同发育阶段以及在众多逆境环境胁迫下基因的表达差异,在功能基因组学方面正在发挥着越来越重要的作用[17][18][19]。本实验采用数字基因表达谱技术对沙田柚自交和异交 1~3 d 花柱之间的差异基因进行了分析。差异基因的 Go 功能注释结果表明在自交 1 d 与异交 1 d 的花柱中,差异表达的基因主要参与花粉管的伸长和发育的调控和植物细胞壁的修饰。在自交 2 d/异交 2 d 的花柱和自交 3 d/异交 3 d 的花柱,差异表达的基因主要参与应对化学物质、植物激素、内源和外源物质的刺激,信号转导。因此,沙田柚配子体自交不亲和反应是一个多基因协同作用的复杂过程。

KEEG 显著性富集分析发现 SY1-VS-SZ1、SY2-VS-SZ2、SY3-VS-SZ3 三组差异表达基因的共有的通路为淀粉和蔗糖的代谢(ko00500)和戊糖和葡糖糖醛酸之间的互变(ko00040)。SY2-VS-SZ2 和 SY3-VS-SZ3 所共有的显著性富集通路为木质素的生物合成(ko00940),苯丙氨酸代谢(ko00360),氰氨酸的代谢(ko00460),醚酯的代谢(ko00565),植物激素的信号转导(ko04075)、新陈代谢途径(ko01100)、黄酮和黄酮醇的生物合成(ko00944)、 α -亚麻酸代谢(ko00592)。

自交与异交花柱共有的差异表达基因为 30 个, 目前有注释的仅为 15 个, 功能涉及到丝氨酸/苏氨酸激酶活性、 α -岩藻糖苷酶、核糖核酸酶 H、半乳糖醛酸酶、ATP 结合蛋白(酶)、木葡聚糖半乳糖基转移酶、UDP-葡萄糖苷转移酶、乙酰乙基葡萄糖基转移酶、DNA 结合蛋白, 以及细胞壁修饰等, 但其在沙田柚自交不亲和中的生理功能尚不明确。此外, 15 个差异表达基因目前数据库中尚无功能注释, 其在沙田柚自交不亲和中的功能值得进一步深入研究。

基金项目

国家自然科学基金(31360477); 广西教育厅项目(2013YB036)。

参考文献

- [1] 孟金陵. 植物生殖遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] Takayama, S. and Isogai, A. (2005) Self-Incompatibility in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 467-489. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144249>
- [3] 薛妙男, 陈腾士, 杨继华. 沙田柚自交和异交亲和性观察[J]. 园艺学报, 1995, 22(2): 127-132.
- [4] 杨继华, 李红艳, 薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白分离及鉴定[J]. 广西师范大学学报, 2000, 18(4): 66-70.
- [5] 杨继华, 尧桂荣, 薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白的纯化和 N-端序列测定[J]. 广西师范大学学报, 2001, 19(1): 72-79.
- [6] 秦新民, 李惠敏, 薛妙男, 等. 沙田柚自交, 异交花粉管蛋白的双向电泳分析[J]. 广西植物, 2004, 24(6): 566-569.
- [7] 薛妙男, 杨继华. 沙田柚花粉管在花柱中的生长途径及其识别[J]. 广西师范大学学报, 2001, 19(2): 60-66.
- [8] 秦新民, 莫花浓, 万珊, 等. 沙田柚花粉管特异蛋白的免疫细胞化学研究[J]. 广西师范大学学报, 2008, 26(4): 113-115.
- [9] 秦新民, 莫花浓, 石菁萍, 等. 沙田柚花粉管 S1-RNase 免疫胶体金定位研究[J]. 广西农业科学, 2009, 40(5): 483-485.
- [10] Ness, R.W., Sisl, M. and Barrett, S.C. (2011) De Novo Sequence Assembly and Characterization of the Floral Transcriptome in Cross- and Self-Fertilizing Plants. *BMC Genomics*, **12**, 298-310. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-298>
- [11] Alagna, F., Torchia, L., Servili, M., et al. (2009) Comparative 454 Pyrosequencing of Transcripts from Two Olive Genotypes during Fruit Development. *BMC Genomics*, **10**, 399-413. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-399>
- [12] Severin, A.J., Woody, J.L., Bolon, Y.T., et al. (2010) RNA-Seq Atlas of Glycine Max: A Guide to the Soybean Transcriptome. *BMC Plant Biology*, **10**, 160-165. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-160>
- [13] Morrissy, A.S., Morin, R.D., Delanry, A., et al. (2009) Next-Generation Tag Sequencing for Cancer Gene Expression Profiling. *Genome Research*, **19**, 1825-1835. <https://doi.org/10.1101/gr.094482.109>
- [14] Mortazavi, A., Williams, B.A., Schaeffer, L., et al. (2008) Mapping and Quantifying Mammalian Transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, **5**, 621-628. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>
- [15] Anders, S. and Huber, W. (2010) Differential Expression Analysis for Sequence Count Data. *Genome Biology*, **11**, 106-109. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- [16] Li, R., Yu, C., Li, Y., et al. (2009) SOAP2: An Improved Ultrafast Tool for Short Read Alignment. *Bioinformatics*, **25**, 1966-1967. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp336>
- [17] 张渝, 刘玉洁, 郭丹妮, 等. 基于高通量测序的数字基因表达谱技术研究进展[J]. 北方园艺, 2015(10): 170-176.
- [18] 李穆, 程志远, 何丽莲, 等. 甘蔗印度种响应干旱胁迫的数字基因表达谱[J]. 分子植物育种, 2018, 16(7): 2099-2106.
- [19] 韩娟娟, 纪砚耘, 梁晓艳, 等. 干旱胁迫下丹参数字基因表达谱分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(10): 4439-4448.