

镰刀菌诱导的泸定百合 SSH 文库 构建及抗病相关基因筛选

杨嫦丽^{1,2}, 王有国¹, 王祥宁², 张艺萍², 崔光芬²,
段 青², 贾文杰², 杜文文², 马璐琳^{2*}

(1 云南农业大学, 昆明 650201; 2 云南省农业科学院花卉研究所/云南省花卉育种重点实验室, 昆明 650205)

摘 要: 该研究以泸定百合 (*Lilium sargentiae* Wilson) 为材料, 构建其组培苗经百合尖孢镰刀菌侵染后的叶片 SSH 文库, 从中筛选镰刀菌枯萎病抗病相关基因。从正向 SSH 文库中随机挑取 300 个单克隆测序后得到 280 条 ESTs, 进行功能比对分析后, 除去未知功能、冗余蛋白以及无同源序列, 得到有功能的 ESTs 共 168 条, 其功能涉及信号传导、蛋白质合成与代谢、抗病与防御、物质与能量代谢、转录相关等多种途径, 其中有 31 条 ESTs 与抗病防御相关。从抗病防御相关基因中选取 8 条 ESTs: 过氧化氢酶、ATP 结合盒转运蛋白 (ABC transporter)、Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 4 (Kunitz trypsin inhibitor 4)、丝氨酸乙醛酸氨基转移酶、多聚泛素、脂氧合酶 I (Lipoxygenase I)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Serine/Threonine-protein kinase)、抗坏血酸过氧化物酶 (*Arabidopsis thaliana*), 通过 RT-PCR 对其表达情况进行分析, 发现经镰刀菌诱导后均为上调表达, 推测它们可能参与了泸定百合镰刀菌枯萎病的抗病反应途径。

关键词: 泸定百合; 镰刀菌枯萎病; SSH 文库; 抗病基因

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Construction of *Lilium sargentiae* SSH Library Induced by *Fusarium oxysporum* and Screening of the Resistance Related Genes

YANG Changli^{1,2}, WANG Youguo¹, WANG Xiangning², ZHANG Yiping², CUI Guangfen²,
DUAN Qing², JIA Wenjie², DU Wenwen², MA Lulin^{2*}

(1 Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2 Yunnan Flower Breeding Key Lab, Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650205, China)

Abstract: In order to screening candidate resistance related genes against Lily *Fusarium* Wilt, we constructed a suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA library from leaves of tissue-culture seedling of *Lilium sargentiae* Wilson induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. 300 clones of the forward SSH library were picked out randomly and sequenced, and then 280 qualified sequence tags (ESTs) were obtained. After functional annotation, 168 ESTs were found putatively encoding functionally known protein. The function-known ESTs related to signal transduction, protein synthesis and transporters, disease resistance and defense, energy metabolism and transcription, etc. Among them, 31 ESTs were the defense response genes, and 8 defense response ESTs (Catalase, ABC transporter, Kunitz trypsin inhibitor 4, Serine-glyoxy-

收稿日期: 2014-06-05; 修改稿收到日期: 2014-09-18

基金项目: 863 计划 (2011AA100208); 云南省应用基础研究计划 (2012FB189, 2012FD072); 云南省科技计划 (2012BB011); 国家观赏园艺工程技术研究中心 (2012FU125X10); 云南省农业科学院创新团队 (YAAS2014TD002)

作者简介: 杨嫦丽 (1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事花卉分子育种研究。E-mail: ycl_dream123@163.com

* 通信作者: 马璐琳, 博士, 副研究员, 主要从事花卉遗传育种及植物分子生物学。E-mail: malulin@sohu.com

late aminotransferase, Polyubiquitin, lipoxygenase I, Serine/threonine-protein kinase, *Arabidopsis thaliana*) were analyzed by the semi-quantitative RT-PCR, the results showed they were upregulated by *F. oxysporum* f. sp. *lilii* and supposed to involved in the disease resistance reaction for Lily *Fusarium* Wilt.

Key words: *Lilium sargentiae* Wilson; Lily *Fusarium* Wilt; SSH library; resistance relate genes

百合(*Lilium* spp.)为百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生球根花卉,花姿优美,色彩艳丽,深受人们喜爱。百合既能作切花、盆花,又能在园林绿地中应用,在全球花卉产品中的产值占到第三位,在中国已居于第一位。近年来,百合切花的销售量在国际、国内花卉市场上都名列前茅,市场需求量已跃居世界五大切花之列。然而随着百合种植面积的不断扩大,百合病害也日益严重,造成百合切花和种球的产量、品质下降。

由百合尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*)引起的百合镰刀菌枯萎病是目前百合生产中危害最为严重的病害。百合镰刀菌枯萎病(Lily *Fusarium* Wilt)又称百合根腐病、茎腐病,该病不仅会造成百合切花产量下降,品质降低,还可侵染百合鳞茎基部,造成基盘坏死,鳞片腐烂、散落,种球质量下降,而镰刀菌是一种在许多作物上引起严重病害的土传真菌,很难进行有效控制。利用抗镰刀菌枯萎病百合种质资源,筛选发掘抗病基因,培育抗病品种是防治百合镰刀菌枯萎病最经济有效的方法^[1]。目前百合目标基因克隆及利用的研究多见于其观赏性状以及无症病毒等方面^[2-8]。在百合抗镰刀菌枯萎病研究方面, Straathof 等^[9]运用 RAPD 分子标记对亚洲百合杂种系的镰刀菌抗性进行了遗传分析,筛选出 3 个与镰刀菌抗性显著相关的标记。Shahin 等^[10]运用 3 种不同的分子标记系统(DArT、AFLP 和 NBS profiling)构建了亚洲百合回交群体的遗传图谱,并将 4 个抗镰刀菌 QTL 位点进行了定位。马璐琳等^[11]通过构建并筛选 SSH 文库,从大花卷丹中筛选到 4 个镰刀菌诱导后上调表达的抗病相关基因。同样, Rao 等^[11]在镰刀菌诱导的闽江百合 SSH 文库中也筛选到一批抗病相关基因。

泸定百合(*Lilium sargentiae* Wilson)为中国特有,花型优美,花色洁白并具芳香,适应性好,对百合镰刀菌枯萎病有较强的抗性^[12]。泸定百合是非常好的野生鲜切花材料,也是现代百合品种(如喇叭百合系和 OT 杂种系)重要育种亲本以及优良基因供体材料^[13-18]。

抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术是由 Diatchenko 等建立的减法

分离差异表达基因的方法。该技术具有假阳性率低的突出优点,现已广泛应用于差异表达基因的筛选克隆等研究方面,目前在棉花、马铃薯、小麦、玉米、水稻、拟南芥等多种植物上得到了很好的应用^[19-22]。在百合上,马璐琳等^[1]和 Rao 等^[11]将该技术分别用于镰刀菌诱导的大花卷丹百合和岷江百合 SSH 文库构建中。本研究针对泸定百合的镰刀菌抗性性状,构建泸定百合经镰刀菌诱导的 SSH 文库,通过筛选文库来分离候选功能基因,对候选基因进行 RT-PCR 表达分析,这将为百合镰刀菌抗病育种分子育种提供一定研究基础,对培育中国生产上急需的具有良好抗病性的自主知识产权优良品种具有一定实际应用价值和理论意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料及处理

野生泸定百合由云南省农业科学院花卉研究所球宿根花卉中心收集保存并组培扩繁。百合尖孢镰刀菌病原菌为田间百合枯萎病植株上分离得到的尖孢镰刀菌致病菌株 Fol2ysc 菌株,由农业部花卉产品质量监督检验测试中心(昆明)分离纯化,于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PSA)上保存待用。

泸定百合组培生根苗在 25 ℃、10 h 光照/14 h 暗培养条件下培养 20 d,选取植株高度、叶片数和大小基本一致的组培生根苗,经百合尖孢镰刀菌(孢子悬浮液)诱导做为处理组,以无菌水处理做为对照组(菌液诱导和水处理时间段均分别为 0、6、12、24、48 和 72 h),剪取材料叶片于液氮中速冻后,置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.2 百合尖孢镰刀菌诱导的 SSH 文库构建

RNA plant 植物 RNA 提取试剂盒购自北京天为时代科技有限公司, Super SMARTTM PCR cDNA-NASynthesis Kit、PCR-Select cDNA Subtraction Kit、Advantage 2 Polymerase Mix 购自 Clontech 公司(America), QIA quick PCR Purification Kit 购自 Qiagen 公司(Germany), DL2000 DNA marker、AMV 反转录酶、Taq 酶、dNTP、pMD-18-T 载体购自 TaKaRa 公司(Japan)。

取经百合尖孢镰刀菌诱导 6、12、24 和 48 h 后

的泸定百合组培苗叶片,提取其总 RNA 构建 SSH 文库。百合叶片总 RNA 提取按照 RNA plant 植物 RNA 提取试剂盒(购自北京天为时代科技有限公司)说明书进行,提取的各时段总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测后进行下一步 SSH 文库的构建工作。双链 cDNA 合成参照 Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit(Clontech 公司)说明书完成,然后按照 PCR-Select cDNA Subtraction Kit(Clontech 公司)说明书进行抑制消减杂交。两次差减 PCR 扩增产物按照 QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen 公司)说明书进行纯化回收,回收产物与 pMD18-T 连接后转化大肠杆菌感受态宿主菌,培养过夜后挑取白色单克隆菌落扩大培养并制备甘油菌于一80℃保存。从正向 SSH 文库随机挑取 300 个单克隆扩大培养后作为扩增模板进行 PCR 扩增,对插入目标基因片段大小进行鉴定,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测后送交上海欧易生物科技有限公司进行测序,对测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST)上进行比对分析,并进行功能注释和归类。

1.3 抗病相关基因半定量 RT-PCR 表达分析

DL2000 DNA marker、AMV 反转录酶、*Taq* 酶、dNTP 均购自 TaKaRa 公司(Japan)。

在正向文库推测的抗病相关基因 ESTs 中选择相关研究报道较多的 8 条 ESTs: 过氧化氢酶(CAT)、ABC 转运蛋白(ABC transporter, ABCT)、Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 4(Kunitz trypsin inhibitor 4, KTI)、丝氨酸乙醛酸氨基转移酶(serineglyoxylate aminotransferase, SGT)、多聚泛素(polyubiquitin, UBI)、脂氧合酶 I(lipoxygenase I, LOX I)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine-protein kinase, S/TPK)、抗坏血酸过氧化物酶

(ascorbate peroxidase, APX), 根据 EST 序列用 Primer 5.0 软件分别设计引物(表 1), 对其表达情况进行 RT-PCR 分析, RT-PCR 所用内参基因为百合 *Actin* 基因^[23]。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

对经镰刀菌诱导 6 个不同时间段的泸定百合组培苗叶片分别提取总 RNA, 再按 AMV 反转录酶(TaKaRa 公司)说明书分别逆转录成 cDNA 后进行 RT-PCR 验证。RT-PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 44~53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 28~30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。其中, 上、下游引物浓度为 10 pmol · L⁻¹, dNTP 浓度为 10 mmol · L⁻¹, *Taq* DNA 聚合酶浓度 1 U。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪拍照, 观察并分析结果。

2 结果与分析

2.1 百合尖孢镰刀菌诱导的泸定百合 SSH 文库构建

利用 SMART 技术构建了中国野生泸定百合组培苗经百合兼并镰刀菌诱导后 6、12、24 和 48 h 的叶片混合 SSH 文库, 在正向 SSH 文库中随机挑选了 300 个单克隆进行 PCR 检测并测序。PCR 产物电泳检测结果(图 1)显示, 绝大部分克隆中检测到含有插入片段, 插入片段大小集中在 200~1 000 bp 之间, 且大部分为单片段插入, 说明文库构建过程中 *Rsa* I 酶切较为彻底, 连接和转化效果理想。

随机挑选 300 个单克隆进行测序后, 共得到 280 条高质量有效 ESTs 序列, 通过同源比对和功能查询, 除序列太短无法匹配、无同源性或同源性太低和假定蛋白外, 得到有一定功能的 ESTs 总 168 条, 占有效序列的 60%, 其功能主要涉及信号转导、

表 1 引物列表

Table 1 Primers list

引物 Primer	上游引物(5'→3') Forward primer	下游引物(5'→3') Reverse primer	退火温度 Melting temperature/℃
CAT	AACTACAATTCGCCGTTCT	CGAGGTACTCCTGGTGC	51
ABCT	GTGGGCATACTCCTGAA	CAGCATTGCTCATAGAA	46
KTI	GATTTCGTTGAGTGTC	AGATGTCTGTGGTGCTG	44
SGT	CTCAGACAACCCAGCAA	CGTGAAGCGATACAAT	48.7
UBI	AAGCAGCTTGAGGATGG	TCCAGGGTGATCGTTTT	51
LOX I	ACCCAGATGATGGTAGTGC	GAGGTGTCGCCGAGAAG	53
S/TPK	AGAAAGAAGTGGGCGTAA	GACTGGTGGAGTGTGGT	50
APX	TCAGGACCCAGGAAAGC	GGAAATGCGGTGGAAT	53
Actin	ATGGAAGTGAATGGTTAAG	ATAGCAACATACATAGCAGG	51

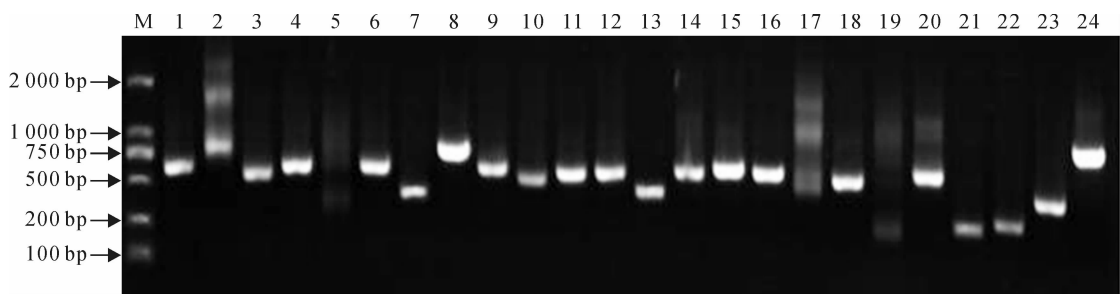


图 1 SSH 文库插入片段 PCR 检测

M. DL2000 marker;1~24. SSH 文库中随机挑选的克隆

Fig. 1 Detection of the insert fragments of clones in SSH library by PCR amplification

M. DL2000 marker;1~24. Randomly selected single clone in SSH library

表 2 部分阳性克隆(抗病防御相关基因)Blast 比对结果

Table 2 Analysis of some positive clones(disease/defense gene)by Blast

样品序列号 Sample No.	匹配长度 Identification	同源序列 Homologous gene	次数 Times
MT1	268	过氧化氢酶 Catalase	1
MT3	245	ABC 转运蛋白 ABC transporter	2
MT7	226	Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 4 kunitz trypsin inhibitor 4	1
MT6	215	丝氨酸乙醛酸氨基转移酶 Serine-glyoxylate aminotransferase	1
MT9	362	多聚泛素 Polyubiquitin	1
MT4	292	脂氧合酶 I Lipoxxygenase I	2
MT_89	650	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Serine/threonine-protein kinase	1
MT_12	235	抗坏血酸过氧化氢酶 Arabidopsis thaliana	1
MT_33	496	胰蛋白酶抑制因子 Kunitz trypsin inhibitor	1
MT_100	841	钙调磷酸酶 B Calcineurin B-like protein	1
MT_90	377	锌结合蛋白 Zn-binding protein	1
MT_88	511	bHLH 转录因子 bHLH transcription factor	1
MT_71	686	泛素结合酶 E2 Ubiquitin-conjugating enzyme E2	1
MT_62	601	F-box/kelch 蛋白 F-box/kelch protein	1
MT_53	352	丝氨酸羧基肽酶 Serine carboxypeptidase	1
MT_19	220	细胞色素 P450 单氧化酶 Cytochrome P450 monooxygenase	1
MT_46	568	Mlo2 基因 Mlo2	1
MT_31	732	硫-腺苷甲硫氨酸合成酶 S-adenosylmethionine synthase	1
MT_17	346	CCCH 型锌指蛋白 CCCH-type Zinc finger	1
MT_221	403	谷胱甘肽硫转移酶 Glutathione s-transferase	1
MT_204	336	亚硫酸氧化酶 Sulfite oxidase	1
MT_108	249	几丁质酶 Class I chitinase	1
MT_133	374	核酮糖-1,5-二磷酸,羧化酶/加氧酶大亚基 ribulose-1,5-bisphosphate,carboxylase/ox-ygenase activase	2
MT_10	253	富亮氨酸重复类受体蛋白激酶 Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase	1
MT_5	261	14-3-3 蛋白 14-3-3 protein	1
MT_107	389	MYB 家族转录因子 MYB family transcription factor	1
MT-11	535	非特异性脂质转移蛋白 Nonspecific lipid transfer protein	1
MT_200	438	抗性相关巨噬蛋白 Resistance-associated macrophage protein	1

物质与能量代谢、蛋白质合成与代谢、转运、抗病与防御等途径,其中推测的抗病相关基因 ESTs 共 31 个(表 2)。

2.2 部分抗病相关基因 ESTs 的 RT-PCR 分析

RT-PCR 表达结果(图 2)显示,8 个抗病相关基

因 ESTs 在经百合镰刀菌诱导后均显示不同程度上调表达,且表达趋势相近,具体表现为:在 0 h 时段表达均为最小,从 6 h 后逐渐上升,在一定时间段达到高峰表达量后逐渐下降,在 72 h 时下降到最低。其中,KTI 在 6 h 段表达量达到最高,24 h 段后逐渐

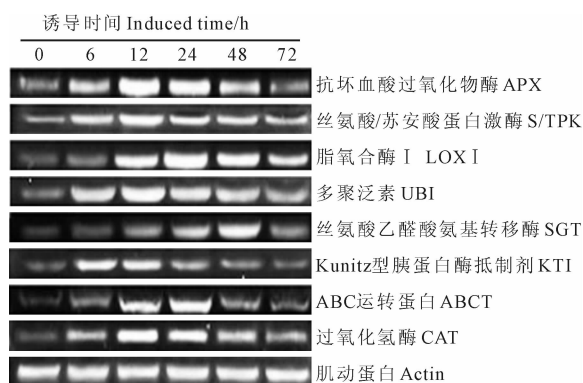


图2 部分抗病相关基因 ESTs 的
半定量 RT-PCR 分析

Fig. 2 The semi-quantitative RT-PCR results
of some resistance-related ESTs

下降;CAT、UBI、APX 以及 S/TPK 表达趋势相近,均在 12 h 段表达量达到最高峰;ABCT 和 LOX I 在 24 h 段表达最高,其前者在 48 h 开始就表现出很低的表达量,而后者在 72 h 段才有明显的低表达量,但 0 h 段表达量甚小;SGT 在 48 h 段表达量最高,但 0~6 h 之间表达量甚微。

3 讨论

3.1 SSH 文库构建及抗病相关 ESTs 表达谱分析

本研究利用 SMART 技术构建了泸定百合 SSH 文库,对泸定百合经百合尖孢镰刀菌诱导后叶部组织基因表达谱进行检测分析,发现泸定百合在镰刀菌诱导后有大量差异表达的基因出现。从基因作用角度来分析,直接参与或控制抗病作用的基因可能更易受镰刀菌的诱导而表现为上调表达,因此应优先考虑正向 SSH 文库中上调(差异)表达较明显的基因。有研究表明,镰刀菌在侵染植物时通常会产生一定的毒素,如禾谷镰刀菌产生的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)毒素,这些毒素可能会损伤植物的细胞膜,并抑制植物体内蛋白质的合成,从而可能会使镰刀菌处理的正向文库中的

部分基因表现为下调表达^[24]。然而本研究中,没有对 SSH 文库克隆进行斑点杂交,只是随机挑取了 300 个单克隆进行了测序,尽管完成 RT-PCR 表达分析的 8 个抗病相关基因 ESTs 均表现为镰刀菌诱导后上调表达,但其它基因是否也表现为上调表达还不得而知。另外,本研究只对正向文库中的部分克隆进行了测序比对,没有挑取反向文库中的克隆进行测序比对,反向文库的差异表达基因是否与抗病相关,还有待进一步探究。

此外,本研究从 SSH 文库中筛选得到的多种抗病相关基因与前人的百合同类研究结果有很多相似^[1,11];马璐琳等^[1]从大花卷丹百合镰刀菌诱导的正向 SSH 文库构建中也筛选到 CHI、SAM 等抗病相关基因 ESTs;在镰刀菌诱导的岷江百合 SSH 文库中,Rao 等^[11]也筛选到 SGT、CP450、CAT、S/TPK、KTI 等抗病相关基因 ESTs。

3.2 泸定百合抗镰刀菌基因的表达分析

RT-PCR 分析结果显示,8 条抗病相关基因 ESTs (CAT, ABC transporter, KTI, SGT, UBI, LOX I, S/TPK, APX)均受到镰刀菌一定时间段的诱导而上调表达,推测这 8 条 ESTs 可能都参与了百合对镰刀菌枯萎病的抗病过程。在表达趋势上,不同 ESTs 表达量高峰值存在异同,但表达量均随着侵染时间均先升高后降低的趋势。本研究中,部分基因在不同时间段病菌诱导后的表达趋势与前人的报道存在一定差异,这种表达上的差异可能是由于物种的抗病基因自身存在的异同,还可能与植物材料、病菌种类和诱导处理时的浓度、侵染部位和方式以及实验环境等存在差异有关。因为关于百合镰刀菌抗性基因的研究鲜见报道,所以以上这些基因是否与百合镰刀菌枯萎病抗性直接相关还待进一步研究。此外,SSH 文库筛选及 RT-PCR 分析结果表明有多个抗性相关基因参与了百合的镰刀菌抗病反应,因此推测泸定百合对镰刀菌枯萎病的抗性途径可能是一个多基因控制的复杂过程。

参考文献:

- [1] MA L L(马璐琳),ZHANG Y P(张艺萍),DING K(丁 颢),et al. Resistance identification of lily germplasms to *Fusarium oxysporium* and screening of the resistance related genes[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报),2012,**39**(6):1141-1150(in Chinese).
- [2] ZHANG Y(张 云),LIU Q L(刘青林),OUYANG Q(欧阳青),et al. Cloning of flower development associated MADS box gene fragments in *Lilium*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报),2004,**31**(3):332-336(in Chinese).
- [3] YANG L(杨 丽),LIU Y L(刘雅莉),WANG Y J(王跃进),et al. Cloning and analysis of chalcone synthase genes in *Lilium*[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报),2006,**26**(5):933-936(in Chinese).

- [4] LIU X Y(刘鲜艳), LIU Y L(刘雅莉), WANG Y J(王跃进), *et al.* Cloning and sequencing full-length cDNA encoding ACC oxidase in *Lilium*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2008, **28**(4): 651—656(in Chinese).
- [5] WU J X(吴建祥), LIU CH K(刘成科), HONG J(洪 健), *et al.* Production of monoclonal antibodies to *Lily symptomless virus* and application in lily virus detection[J]. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2005, **45**(4): 580—583(in Chinese).
- [6] WANG J H(王继华), DING Y M(丁元明), WANG L H(王丽花). The cloning and sequences analysis of CP gene of Yunnan isolates of *Lily symptomless virus*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2003, **33**(6): 562—563(in Chinese).
- [7] WANG X(王 贤), TIAN B H(田保华), WANG Y Q(王永勤), *et al.* Clone and analysis of gene CP of *Lily symptomless virus* in Beijing area[J]. *China Plant Protection* (中国植保导刊), 2011, **31**(5): 5—7(in Chinese).
- [8] ZHAO D(赵 丹), KONG B H(孔宝华), LI F(李 凡). Cloning and sequencing on cp gene of *Cucumber mosaic virus* subgroup II isolated from Lily(*Lilium* cv. *Oriental hybrids*)[J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2007, **37**(5): 456—460(in Chinese).
- [9] STRAATHOF TH P, VAN TUYL J M, Dekker B. Genetic analysis of Inheritance of Partial Resistance to *Fusarium oxysporum* in Asiatic Hybrids of Lily using RAPD Markers[C]//Proceeding of International Symposium on the Genus Lilium, Taejon; International Society for Horticultural Science 1996, 414: 209—218.
- [10] SHAHIN A, ARENS P, VAN HEUSDEN S, *et al.* Conversion of Molecular Markers Linked to Fusarium and Virus Resistance in Asiatic Lily Hybrids[C]. Proceeding of XXIII International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals; Colourful Breeding and Genetics. Leiden; International Society for Horticultural Science, 2009: 131—136.
- [11] RAO J, LIU D Q, ZANG N N. *et al.* Identification of genes differentially expressed in a resistant reaction to *Fusarium oxysporum* in *Lilium regale* by SSH [C]. International Conference on Agricultural and Natural Resources Engineering, IERI Procedia, 2013, **5**: 95—101.
- [12] YANG X M(杨秀梅), WANG J H(王继华), WANG L H(王丽花), *et al.* Resistance identification and genetic diversity among lily varieties based on resistance gene analogue[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2012, **39**(12): 2 404—2 412(in Chinese).
- [13] YU H(虞 泓), WANG H X(王红霞), YOU D(游 丹). Study on chromosomal morphology in populations of *Lilium sargentiae* Wilson[J]. *Journal of Yunnan University* (Nat. Sci. Edi.) (云南大学学报·自然科学版), 2000, **22**(1): 60—67(in Chinese).
- [14] HE L P(何丽萍), LI L G(李龙根), PANG Z Y(庞祖云). Study on dormancy and germination characters of wild lily (*Lilium sargentiae* Wilson) seed[J]. *Seed* (种子), 2010, **29**(4): 46—49(in Chinese).
- [15] WU X W(吴学尉), CUI G F(崔光芬), WU L F(吴丽芳), *et al.* Identification of ISSR in lily hybrids[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2009, **36**(5): 749—754(in Chinese).
- [16] CUI G F(崔光芬), WU L F(吴丽芳), WU X W(吴学尉), *et al.* Relationships among species in *Nomocharis* and *Lilium* based on ITS sequences[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2008, **28**(10): 1 941—1 946(in Chinese).
- [17] YANG X M(杨秀梅), QU S P(瞿素萍), WU X W(吴学尉), *et al.* Resistance identification of *Lilium* germplasms to *Fusarium oxysporum*[J]. *Journal of Southwest University* (Nat. Sci. Edi.) (西南大学学报·自然科学版), 2010, **32**(6): 31—34(in Chinese).
- [18] WANG J H(王继华), WANG L H(王丽花), DING Y M(丁元明), *et al.* Detection of *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* by multiplex RT-PCR[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2005, **32**(2): 1 284—1 287(in Chinese).
- [19] ZHU L F(朱龙付), TU L L(涂礼莉), ZHANG X L(张献龙), *et al.* Construction and analysis of SSH library of *Gossypium barbadense* upon infection with *Verticillium dahliae*[J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2005, **32**(5): 528—532(in Chinese).
- [20] LI G C(李广存), JIN L P(金黎平), XIE K Y(谢开云), *et al.* The principle of suppression subtractive hybridization technique and its application in plant gene isolation[J]. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2004, **24**(9): 26—32(in Chinese).
- [21] WANG SH F(王省芬), MA ZH Y(马峙英), ZHANG G Y(张桂寅), *et al.* Comparison of identification for cotton genetic resources using SSR and AFLP markers[J]. *Cotton Science* (棉花学报), 2006, **18**(6): 391—393(in Chinese).
- [22] WANG SH F(王省芬), MA J(马 骏), MA ZH Y(马峙英), *et al.* BAC library construction and characterization of Suyuan 7235, a cotton germplasm with high fiber strength[J]. *Cotton Science* (棉花学报), 2006, **18**(4): 200—203.
- [23] XIN H B(辛海波), CHEN L(陈 莉), LI X Y(李晓燕), *et al.* Cloning and expression analysis of hsf from *Lilium longiflorum*[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2010, **37**(3): 435—440.
- [24] MA L L(马璐琳), SHANG Y(尚 毅), QI Z J(齐增军), *et al.* Gene expression analysis upon DON infection on a scab resistant wheat variety wangshuibai by affymetrix wheat chip[J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2009, **29**(6): 959—964(in Chinese).