

岷江百合中黄瓜花叶病毒诱导的 *LrPR10* 的克隆及表达分析

张响玲, 张延龙*, 牛立新, 孙道阳, 梁振旭

(西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了研究黄瓜花叶病毒 (CMV) 诱导的岷江百合 (*Lilium regale*) 病程相关蛋白 PR10 基因在抗病毒防御反应中的作用, 对岷江百合叶片接种 CMV, 采用 RACE 技术获得岷江百合 *LrPR10* 的全长 cDNA 序列, 并对其进行生物信息学分析; 利用实时荧光定量 PCR 对 *LrPR10* 在各器官特异性以及 CMV 和水杨酸 (SA) 处理后的表达模式进行了测定分析。结果表明: *LrPR10* 全长 756 bp, 可编码由 157 个氨基酸组成的蛋白质, 该蛋白具有病程相关蛋白典型的 Bet_v1_like 保守结构域; *LrPR10* 在岷江百合鳞茎中相对表达量最高, 在嫩叶中最低; 该基因可以被 CMV 和 SA 诱导上调表达, 岷江百合、卷丹 (*L. lancifolium*) 和宜昌百合 (*L. leucanthum*) 在 CMV 接种处理后 *LrPR10* 的相对表达量分别在 4 d、4 d 和 1 d 达到最大值, 分别为处理前的 58 倍、27 倍和 292 倍, 在 SA 处理后 *LrPR10* 的相对表达量都在 8 h 达到最大值, 分别为处理前的 34 倍、8 倍和 38 倍。以上结果表明 *LrPR10* 在岷江百合抗黄瓜花叶病毒防御反应过程中发挥作用。

关键词: 岷江百合; 黄瓜花叶病毒; *LrPR10*; RACE; 表达分析

中图分类号: S 682.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 06-1218-09

Cloning and Expression Analysis of *LrPR10* Gene from *Lilium regale* Induced by *Cucumber mosaic virus*

ZHANG Xiang-ling, ZHANG Yan-long*, NIU Li-xin, SUN Dao-yang, and LIANG Zhen-xu

(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This study aimed to clone *PR10* gene which was up-regulated in the leaves of *Lilium regale* infected by *Cucumber mosaic virus* (CMV) and examine the role of *PR10* gene in defense response against CMV. The full length of *LrPR10* was amplified by RACE and analyzed with bioinformatics tools. Real-time PCR was performed to check the transcript levels of *LrPR10* in different organs of *L. regale*, CMV-inoculated and salicylic acid (SA) - treated leaves. The results showed that the length of complete cDNA of *LrPR10* was 756 bp, which encoded 157 amino acids consisting of a Bet_v1_like conserved domain of pathogenesis-related proteins. The transcript level of *LrPR10* was the highest in bulbs, whereas the lowest in tender leaves. *LrPR10* was significantly induced by CMV inoculation and SA treatment. Transcript level of *LrPR10* reached a peak at 4 d, 4 d and 1d in the CMV-inoculated leaves of *L. regale*,

收稿日期: 2013 - 11 - 20; 修回日期: 2014 - 05 - 08

基金项目: 国家高技术研究发展计划 ('863') 项目 (2011AA1008)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangyanlong@nwsuaf.edu.cn)

L. lancifolium and *L. leucanthum* respectively, while the maximum relatively expression values in CMV-inoculated samples were about 58, 27 and 292 times higher than the uninoculated ones in these three species. After SA treatment, *LrPR10* peaked at 8 h in *L. regale*, *L. lancifolium* and *L. leucanthum* and the maximum relatively expression values in treated samples were about 34, 8 and 38 times higher than the untreated ones in three species. We hypothesize that *LrPR10* from *L. regale* probably plays an essential role in plant defense against CMV.

Key words: *Lilium regale*; *Cucumber mosaic virus*; *LrPR10*; RACE; expression analysis

自 Stewart (1896) 首次报道侵染百合的黄瓜花叶病毒 (CMV) 到现在, 已经确定能够侵染百合的病毒有 19 种 (Yamaji et al., 2001; 刘博, 2009), CMV 是其中危害最为严重的病毒之一, 常与其他病毒进行复合侵染 (Asjes, 2000)。百合育种专家都亟希望利用分子生物学的方法获得抗病病毒种质资源 (Lipsky et al., 2002; 徐秉良 等, 2004; Benidito et al., 2005; 王进忠 等, 2005), 以选育抗病病毒百合新品种。

岷江百合 (*Lilium regale*) 被公认为百合属中抗病性优异的种类 (Yoshiji et al., 1996; Yumi et al., 2000), 对尖孢镰刀菌具有很高的抗性 (Lim et al., 2003), 对病毒病的表现尤其突出。王仙芝等 (2008) 用 RT-PCR 技术对岷江百合及秦巴山区的 5 种野生百合进行抗病病毒病检测, 发现岷江百合对 CMV、百合无症病毒 (LSV) 及百合斑驳病毒 (LMoV) 的抗性达到免疫水平。

PR10 蛋白最早在真菌诱导的欧芹培养细胞中发现 (Somssich et al., 1986), 目前已经从 70 多种植物中鉴别出了 100 多种 *PR10* 基因 (Wen et al., 1997; Markovic-Housley et al., 2003; Colditz et al., 2007)。研究表明, *PR10* 蛋白具有体外抑菌活性和核酸酶活性 (Park et al., 2004; Liu et al., 2006), 能被病原体 (包括病毒、细菌、真菌)、SA、脱落酸、茉莉酸甲酯或乙烯诱导表达 (Constabel & Brisson 1992; Lo et al., 1999; McGee et al., 2001; 贺明阳, 2012; Parinita et al., 2013)。van Loon 和 van Strien (1999) 及 Park 等 (2004) 认为, *PR10* 蛋白可以通过降解病毒的 RNA 来增强植物的抗性。在麻风树中, *PR10* 蛋白具有核酸酶活性, 并且对炭疽病菌表现出抗性 (Parinita et al., 2013)。*PR10* 在华东葡萄中可以被葡萄霜霉菌诱导表达, 将该基因转到易感病的葡萄品种中可以增强其对霜霉菌的抵抗能力 (He et al., 2013)。

本研究中根据岷江百合在 CMV 诱导下 cDNA 文库中的 *PR10* 的 EST 序列设计特异引物, 利用 RACE 技术克隆全长 cDNA, 并通过实时定量 PCR 分析 *LrPR10* 在岷江百合不同器官中的表达模式, 以及 CMV 和 SA 处理后该基因的表达情况, 旨在了解该基因的有关特性及在抗病防御反应中的作用, 为进一步开展百合抗病病毒育种工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及其处理

供试植物材料岷江百合 (*Lilium regale*)、卷丹 (*L. lancifolium*) 和宜昌百合 (*L. leucanthum*) 均取自西北农林科技大学百合资源圃, 材料的处理及取样时间为 2012 年 4—6 月。已知岷江百合、卷丹和宜昌百合复合接种 LMoV 和 CMV 的相对抗病毒指数分别为 0.64、0.64 和 0.18, 抗病程度分别为高抗、高抗和高感 (王仙芝, 2013)。黄瓜花叶病毒从该资源圃中感染该病毒的‘西伯利亚’百合 (*L. Oriental Hybrids ‘Siberia’*) 叶片中获得。

分别采集正常生长的岷江百合嫩叶、嫩茎、花、鳞茎、根等器官, 于液氮中冷冻后, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保

存。

选取正常生长的岷江百合、卷丹和宜昌百合, 将 CMV 毒源植株黑暗处理 8 h 后取嫩叶 1 g, 用已灭菌的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 稀释至 $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 研磨后加少量石英砂摩擦接种叶片, 接种后用蒸馏水冲洗。取样时间为接种后 0、1、2、3、4、5 和 6 d, 将所取样品液氮速冻后 -80°C 保存。

用 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SA 喷洒到正常生长的岷江百合、卷丹和宜昌百合叶片上, 于处理后 0、2、4、6、8、10 和 12 h 取样, 样品经液氮速冻后, 置于 -80°C 保存。

1.2 岷江百合基因 *LrPR10* 的全长克隆

百合叶片总 RNA 的提取采用改良的 CTAB 法 (尹慧 等, 2008)。反转录按照 Fermentas 公司的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 进行。

根据已获得的黄瓜花叶病毒诱导的岷江百合 cDNA 文库中的 EST 核心序列设计 3'RACE 特异引物, Gene Racer 3'Primer: 5'-AGCTCGCTCCCGAGATCTTGCTCAGT-3', 巢式特异引物 Gene Racer 3'Nested Primer: 5'-GGGTGCATCGTGAAGGTGGTGACAG-3'。根据获得的基因 3'端序列设计 5'RACE 特异引物 Gene Racer 5'Primer: 5'-TTCATTCTGCAAGTGGTTCTAAGCA-3', 巢式特异引物 Gene Racer 5' Nested Primer: 5'-AGGTAAGCTTCTGCAGCCTTGAAGAG-3'。引物设计用 Primer 5.0 软件进行并委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

以接种黄瓜花叶病毒的岷江百合各时期叶片提取的 RNA 混合样为模板, 使用 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 进行 RACE cDNA 扩增。扩增产物经 1% 的琼脂糖电泳检测, 回收目标条带连接至 pGEM-T Easy 克隆载体 (Promega) 后测序 (北京奥科鼎盛生物技术科技有限公司)。对测序获得的 *LrPR10* 的 5'端序列和 3'端序列利用 DNASTAR 软件进行拼接, 获得岷江百合基因 *LrPR10* cDNA 全长序列。

1.3 岷江百合基因 *LrPR10* 的生物信息学分析

采用 NCBI 的 ORF finder 预测开放阅读框; 通过 NCBI 网站上的 BLAST 搜索, 查找 *LrPR10* 的同源序列; 用 NCBI 的 protein blast 进行蛋白序列保守结构域分析; 通过 DNAMAN 软件分析 *LrPR10* 基因的编码氨基酸以及比较氨基酸序列的同源性; 利用 MEGA 5.1 构建系统发育树; 利用 ProtParam 程序 (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>) 预测蛋白质的分子量和等电点; 根据 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析蛋白质的信号肽; 用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白质的跨膜结构域分析; 据 ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 分析蛋白质的亲水性。根据 Motif Scan (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN/>) 研究蛋白 motifs。

1.4 岷江百合 *LrPR10* 表达的器官特异性分析

根据已获得的岷江百合基因 *LrPR10* 3'端非保守区序列设计合成定量的引物 *LrPR10*-1: 5'-TAAGAGGCTGGCTACCCCAATTC-3', *LrPR10*-2: 5'-ATTGGGGTAGCCAGCCTCTTACA-3'。以 18S rRNA 基因 (GenBank 登录号: D29775.1) 为内参基因, 其引物为 18S rRNA-1: 5'-TCTCAACCATAAACGATGCCGA-3', 18SrRNA-2: 5'-TTTCAGCCTTGCGACCATACTC-3'。分别取岷江百合嫩叶、嫩茎、花、鳞茎、根等器官的总 RNA 各 1 μg , 反转录为 cDNA。按照 SYBR Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) (TaKaRa, Japan) 的说明书进行实时荧光定量, 在 IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) 上检测基因在不同组织的相对表达量, 每个样品设 3 次重复。PCR 扩增

程序为: 95 °C 变性 1 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。用 Excel 2007 和 Origin 7.5 对数据进行计算和处理, 定量数据的处理方法采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

1.5 岷江百合 *LrPR10* 的表达模式分析

分别取 CMV 和 SA 处理后不同处理时间的叶片总 RNA 1 μg , 进行表达模式分析, 本操作所用的引物、PCR 程序及数据处理方法均同 1.4 所示。

2 结果与分析

2.1 岷江百合 *LrPR10* 全长 cDNA 序列的获得

RACE 扩增后, 得到长度为 405 bp 的 3' cDNA 序列和长度为 518 bp 的 5' cDNA 序列 (图 1), 利用 DNASTar 软件进行拼接后, 获得了 756 bp 的全长 cDNA。开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长 474 bp, 编码 157 个氨基酸。将该基因命名为 *LrPR10*, GenBank 登录号为 KF690636。

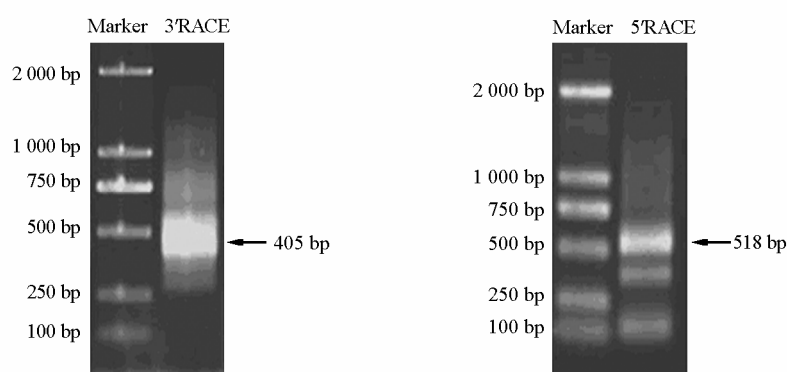


图 1 岷江百合 *LrPR10* 的 RACE 扩增结果

Fig. 1 RACE amplification product of *LrPR10* from *Lilium regale*

2.2 岷江百合 *LrPR10* 的生物信息学分析

经 ProtParam 预测 *LrPR10* 蛋白的分子量为 16.8 kD, 等电点为 5.39, 为酸性蛋白。利用 SignalP 4.1 分析可知, 该序列无信号肽, 为非分泌蛋白。经 TMHMM 预测该蛋白不具跨膜区, 属于胞内蛋白。通过 ProtScale 分析表明, *LrPR10* 蛋白为亲水性蛋白, 其亲水性氨基酸含量高于疏水性氨基酸含量。通过 NCBI 的 protein blast 分析显示, *LrPR10* 蛋白具有病程相关蛋白典型的 Bet_v1_like 保守结构域 (图 2)。

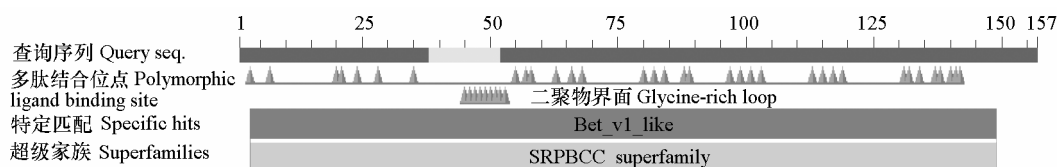


图 2 *LrPR10* 蛋白的保守域分析

Fig. 2 Conserved domain analysis of *LrPR10* protein

Motif Scan 分析表明, LrPR10 蛋白含有 1 个 N-糖基化位点 (56 ~ 59 位氨基酸), 4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (40 ~ 43、83 ~ 86、92 ~ 95 和 127 ~ 130 位氨基酸), 3 个 N-豆蔻酰化位点 (47 ~ 52、87 ~ 92 和 124 ~ 159 位氨基酸), 该编码蛋白 3 ~ 152 位氨基酸具有病程相关蛋白 Bet_v_I 家族保守域。

氨基酸序列比对结果 (图 3) 显示: LrPR10 蛋白与同属的麝香百合中 6 种 PR10 蛋白 (*Lilium longiflorum* AAD17336.1、AAF21625.1、AAF21624.1、AAF21623.1、AAF21622.1、AAD17335.1) 的同源性分别为 91%、89%、89%、88%、88%、87%; 而与小麦 (*Triticum aestivum*, TaPR10, ACG68733.1)、高粱 (*Sorghum bicolor*, AAVV83209.1)、玉米 (*Zea mays*, NP001131012.1)、番红花 (*Crocus sativus*, ADL09408.1) 的 PR10 蛋白同源性分别为 54%、54%、53%、53%, 这些蛋白都具有病程相关蛋白 Bet_v1_like 保守结构域。

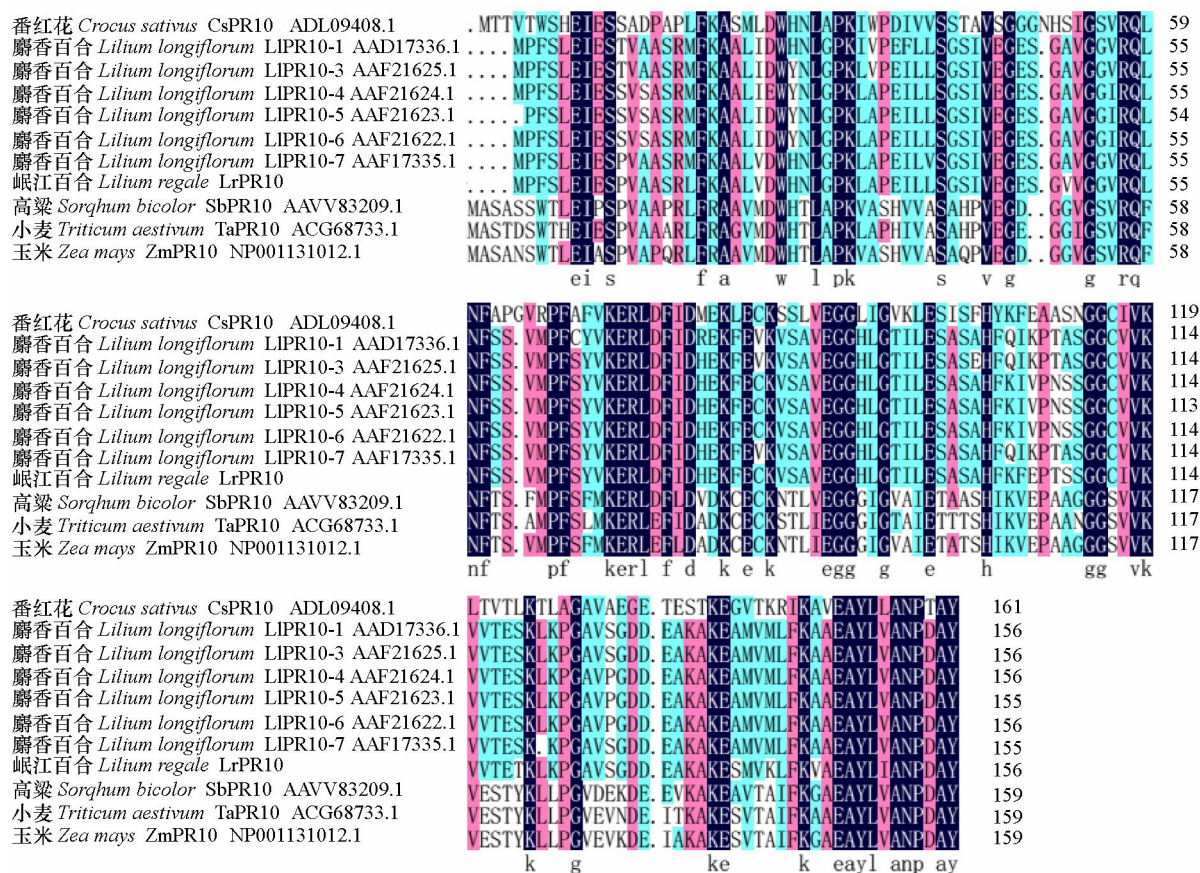


图 3 岷江百合 LrPR10 蛋白与其他植物 PR10 蛋白的氨基酸序列同源性比对

Fig. 3 Alignment of amino acid sequences of LrPR10 protein and PR10 protein from other plants

将 LrPR10 蛋白与 NCBI 检索的其他物种中 16 种 PR10 蛋白进行多序列比对后构建系统发育树 (图 4), 结果显示, 岷江百合 PR10 蛋白与同属的麝香百合 LIPR10-1 (*L. longiflorum*, AAD17335.1) 和 LIPR10-7 (*L. longiflorum*, AAD17336.1) 蛋白的亲缘关系最近, 与单子叶植物玉米 (*Zea mays*, NP001131012.1), 高粱 (*Sorghum bicolor*, AAVV83209.1), 水稻 (*Oryza sativa*, AAL74406.1), 小麦 (*Triticum aestivum*, ACG68733.1), 黑麦草 (*Lolium perenne*, AEO11776.1) 中的 PR10 蛋白具有相对近些的亲缘关系, 与裸子植物加州山松 (*Pinus monticola*, AFR78290.1) 的 PR10 蛋白亲缘关系相对较远, 而与双子叶植物 PR10 蛋白的亲缘关系最远。

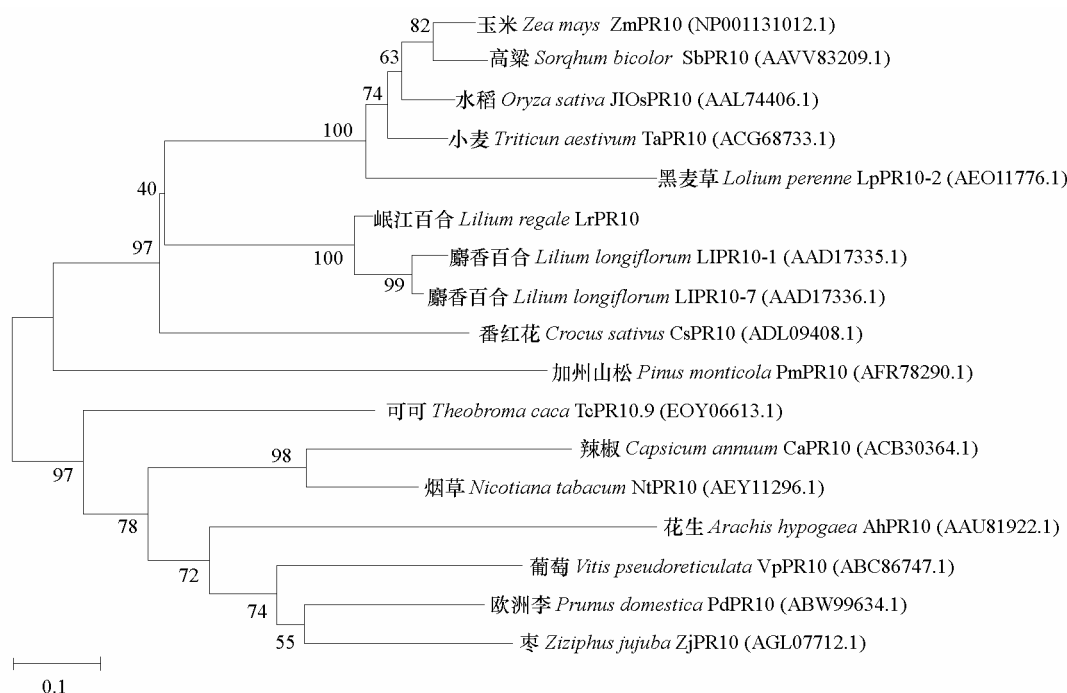


图 4 几种植物 PR10 氨基酸序列的系统发育树

数字代表进化距离。

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of the PR10 from several plant species

Numbers stand for evolutionary distance.

2.3 *LrPR10* 在岷江百合不同器官中的表达

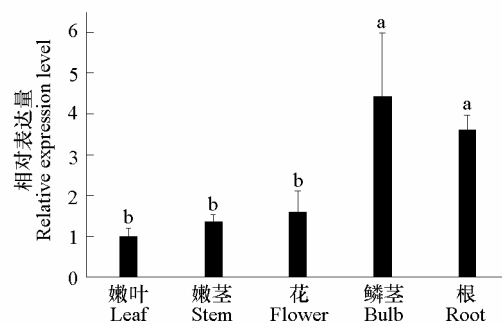
LrPR10 在岷江百合嫩叶、嫩茎、花、鳞茎、根等各器官中的表达量均不相同, 在鳞茎中的表达量最高, 在嫩叶中的表达量最低 (图 5)。说明 *LrPR10* 在岷江百合中存在组成型表达。

2.4 CMV 侵染后 *LrPR10* 的表达模式

岷江百合、卷丹和宜昌百合接种 CMV 后 *LrPR10* 的相对表达量均增加, 达到最大值的时间分别为 4 d、4 d 和 1 d (图 6)。*LrPR10* 的相对表达量在高感病毒的宜昌百合中最高, 为接种前的 292 倍, 在高抗病毒的岷江百合中相对表达量居中, 达处理前的 58 倍, 在高抗病毒的卷丹中表达量最低, 为接种前的 27 倍 (图 6)。不同抗性的百合中 *LrPR10* 的表达情况存在明显的差异, 说明 CMV 可以诱导 *LrPR10* 的表达, 该基因是一个百合抗病毒相关基因。

2.5 SA 处理后百合中 *LrPR10* 的表达模式

SA 处理不同抗性百合后, *LrPR10* 的表达量与百合的抗性有关。在高抗病毒的岷江百合中的表达量明显区别于卷丹和高感病毒的宜昌百合。

图 5 *LrPR10* 在岷江百合不同器官中的相对表达量不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Fig. 5 Expression analysis of *LrPR10* gene in different organs of *Lilium regale*Different letters indicate significant differences among different organs ($P < 0.05$).

SA 处理后, 岷江百合、卷丹和宜昌百合中 *LrPR10* 均被诱导表达, 该基因在 3 种不同抗性的百合中均在 8 h 时达到最大值, 但表达量存在明显的差异, 在高抗病毒的岷江百合中相对表达量为处理前的 34 倍, 而高抗病毒的卷丹中相对表达量仅为处理前的 8 倍, 高感病毒的宜昌百合中表达量的最大值为处理前的 38 倍 (图 7)。由此可见, 百合可以通过 SA 信号传导途径参与抗病毒反应。

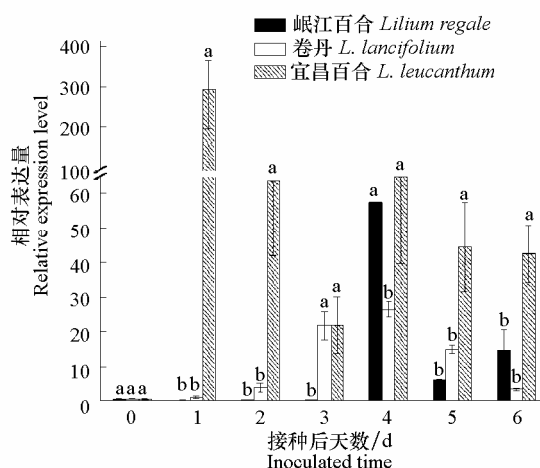


图 6 岷江百合、卷丹和宜昌百合接种 CMV 后 *LrPR10* 的相对表达量

同一时间, 不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Expression analysis of *LrPR10* in *Lilium regale*, *L. lancifolium* and *L. leucanthum* in response to CMV

In the same period, different letters indicate significant differences among groups ($P < 0.05$).

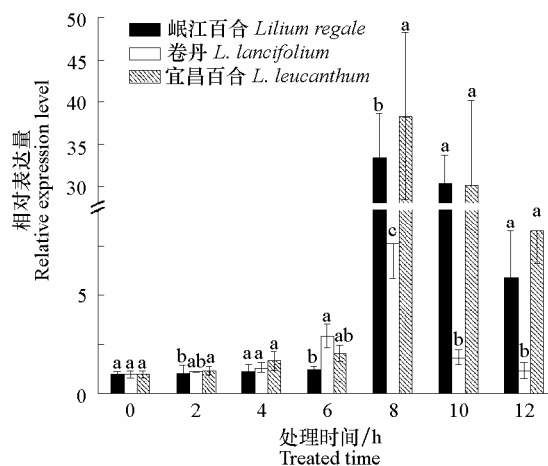


图 7 岷江百合、卷丹和宜昌百合 SA 处理后 *LrPR10* 的相对表达量

同一时间, 不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 7 Expression analysis of *LrPR10* in *Lilium regale*, *L. lancifolium* and *L. leucanthum* in response to SA

In the same period, different letters indicate significant differences among groups ($P < 0.05$).

3 讨论

本研究中, 3 种不同抗性的百合叶片接种 CMV 后, *LrPR10* 的表达量均有较大提高。其中, 高感病毒的宜昌百合中表达量最高, 高抗病毒的岷江百合中表达量居中, 高抗病毒的卷丹中最低 (图 6), 岷江百合和卷丹仅为宜昌百合中的 20% 和 9%。已知植物具有复杂的抗病机制, 其对某种病毒产生抗性是由结构抗病毒机制和生化抗病毒机制共同作用的结果。作者所在研究组以前的试验结果表明, 岷江百合和卷丹都易感蚜虫, 而宜昌百合对蚜虫却高抗 (王仙芝, 2013), 由此可知宜昌百合的结构抗病毒能力远强于岷江百合和卷丹。而通过人工复合接种 LMoV 和 CMV 试验证明, 3 种百合接种初期均易被病毒感染, 但最终对病毒的抗性表现却是高抗、高抗和高感 (王仙芝, 2013)。由此可知, 较强的结构抗病毒能力使高感病毒的宜昌百合中 *LrPR10* 的表达量远大于高抗病毒的岷江百合和卷丹。以上结果表明, 岷江百合 *LrPR10* 受 CMV 的诱导, 且表达量与百合本身的抗性存在一定的关系, 是一个百合抗病毒相关基因。

水杨酸依赖途径是植物中主要的防卫反应信号途径之一 (彭金英和黄勇平, 2005)。依赖于水杨酸的信号转导途径, 可以通过外源施加 SA 激活相同的一套 PR 基因 (王冬良 等, 2005)。已知 SA 是植物对病原菌产生抗性反应的信号分子, 能提高许多病原体响应基因的表达 (Thomma et al., 2001)。已有研究表明 SA 可诱导辣椒、刺茄等植物中 *PR10* 基因的表达 (Park et al., 2004; Liu et al., 2006)。本研究中, SA 处理不同抗性的百合叶片后, 实时定量结果显示 *LrPR10* 上调表达, 岷江百

合、卷丹和宜昌百合均在 8 h 时达到表达量的最大值, 但最大值存在明显的差别, 分别为未处理的 34 倍、8 倍和 38 倍。结果表明, *LrPR10* 可以通过 SA 信号传导途径参与岷江百合抗病毒的过程, 并且该过程与百合本身的抗性有关。

通过黄瓜花叶病毒诱导岷江百合中 *LrPR10* 的克隆及表达分析结果认为, *LrPR10* 基因是百合抗病毒相关基因, 而对于 *LrPR10* 在岷江百合抗病毒中的具体抗病作用以及抗性机理尚需进一步的研究。

References

- Asjes C J. 2000. Control of aphid-borne *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* in *Lilium* in the Netherlands. *Virus Research*, 71: 23 – 32.
- Benidito V A, van Kronenburg-van der Ven B C E, van Tuyl J M, Angenent G C, Krens F A. 2005. Transformation of *Lilium longiflorum* via particle bombardment and generation of herbicide-resistant plants. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5 (3): 259 – 264.
- Colditz F, Niehaus K, Krajinski F. 2007. Silencing of PR-10-like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic induction of other PR proteins and in an increased tolerance upon infection with the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Planta*, 226 (1): 57 – 71.
- Constabel C P, Brisson N. 1992. The defense-related *STH-2* gene product of potato shows race-specific accumulation after inoculation with low concentration of *Phytophthora infestans* zoospores. *Planta*, 188: 289 – 295.
- He M Y, Xu Y, Cao J L, Zhu Z G, Jiao Y T, Wang Y J, Guan X, Yang Y Z, Xu W R, Fu Z F. 2013. Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. *Protoplasma*, 250: 129 – 140.
- He Ming-yang. 2012. Cloning and functional analysis of stilbene synthase and pathogenesis-related 10 protein genes from Chinese wild grapevines. [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 贺明阳. 2012. 中国野生葡萄合成酶和病程相关蛋白 *PR10* 基因克隆与功能分析 [博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Lim J H, Rhee H K, Kim Y J, Lim K B, van Tuyl J M. 2003. Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* in *Lilium*. *Acta Horticulturae*, 620: 311 – 318.
- Lipsky A, Cohen A, Gaba V. 2002. Transpormation of *Lilium longiflorum* plants for cucumber virus resistance by particle bombardment. *Acta Hort*, 568: 209 – 214.
- Liu Bo. 2009. Virus elimination and molecular detection of lily and narcissus[M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 刘 博. 2009. 百合、水仙病毒分子检测及脱毒技术研究[硕士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Liu X J, Huang B B, Lin J, Fei J, Chen Z H, Pang Y Z, Sun X F, Tang K X. 2006. A novel pathogenesis-related protein (*SsPR10*) from *Solarium surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress and pathogen-inducible. *Plant Physiol*, 163 (5): 546 – 556.
- Lo S C C, Hipskind J D, Nicholson R L. 1999. cDNA cloning of a sorghum pathogenesis-related (PR-10) and differential expression of defense-related genes following inoculation with *Cochliobolus heterostrophus* or *Collectotrichum sublineolum*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 12: 479 – 489.
- Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H. 2003. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Betv 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *Journal of Molecular Biology*, 325: 123 – 133.
- McGee J D, Hamer J E, Hodges T K. 2001. Characterization of a *PR-10* pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interact*, 14: 877 – 886.
- Parinita Agarwal, Vacha Bhatt, Rekha Singh, Mamali Das, Sudhir K. Sopory, Jitendra Chikara. 2013. Pathogenesis-related gene, *JcPR-10a* from *Jatropha curcas* exhibit RNase and antifungal activity. *Molecular Biotechnology*, 54 (2): 412 – 425.
- Park C J, Kim K J, Shin R, Park J M, Shin Y C, Peak K H. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal*, 37 (2): 186 – 198.
- Peng Jin-ying, Huang Yong-ping. 2005. The signal pathways of plant defense response and their interaction. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 31 (4): 347 – 353. (in Chinese)
- 彭金英, 黄勇平. 2005. 植物防御反应的两种信号转导途径及其相互作用. *植物生理与分子生物学学报*, 31 (4): 347 – 353.

- Somssich I E, Schmelzer E, Bollmann J, Klaus Hahlbrock. 1986. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 2427 – 2430.
- Stewart P C. 1896. Two destructive lily diseases. *New York (Geneva) Agricultural Expedition Station Annual Report*, 45 (3): 245 – 253.
- Thomma B P H J, Penninckx I A M A, Cammue B, Broekaert W F. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology*, 13: 63 – 68.
- van Loon L C, van Strien E A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 85 – 97.
- Wang Dong-liang, Chen You-gen, Zhu Shi-dong, Pei Xiao-bo. 2005. The research of signal molecule in plant disease resistance. *Chinese Agriculture Science Bulletin*, 21 (12): 77 – 82. (in Chinese)
- 王冬良, 陈友根, 朱世东, 裴孝伯. 2005. 植物抗病中的信号分子研究. *中国农学通报*, 21 (12): 77 – 82.
- Wang Jin-zhong, Wang Yan-yao, Wang Xi-feng, Zhang Min-zhao, Gao Xia-hong, Sun Shu-ling, Zhou Guang-he. 2005. Expression of pokeweed antiviral protein gene in the callus of *Lilium longiflorum* by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 20 (6): 77 – 79. (in Chinese)
- 王进忠, 王彦瑶, 王锡锋, 张民照, 高遐虹, 孙淑玲, 周广和. 2005. 商陆抗病毒蛋白基因在麝香百合中的转化和表达. *华北农学报*, 20 (6): 77 – 79.
- Wang Xian-zhi. 2013. Evaluation of virus resistance in *Lilium* species from Qin-Ba Mountains and the utilization in breeding [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 王仙芝. 2013. 秦巴山区野生百合资源抗病种质鉴定及杂交利用研究 [博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Wang Xian-zhi, Zhang Yan-long, Niu Li-xin, Wu Yun-feng, Xie Song-lin. 2008. Identification of three kinds of viruses, and the preliminary evaluation on the resistance to the virus in six wild *Lilium* species from Qin-ba Mountains under the nursery field. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (11): 3618 – 3625. (in Chinese)
- 王仙芝, 张延龙, 牛立新, 吴云峰, 谢松林. 2008. 秦巴山区六种野生百合感染 3 种病毒病鉴定及田间抗病性初步分析. *中国农业科学*, 41 (11): 3618 – 3625.
- Wen J, Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Scheiner O, Breiteneder H. 1997. The potential of *Betv1* homologues, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8 (3): 317 – 333.
- Xu Bing-liang, Liang Qiao-lan, Xu Qiong. 2004. Occurrence and the types of symptoms of lily virus diseases. *Plant Protection*, 30 (5): 62 – 65. (in Chinese)
- 徐秉良, 梁巧兰, 徐琼. 2004. 百合病毒病的发生与症状类型. *植物保护*, 30 (5): 62 – 65.
- Yamaji Y, Lu X, Kagiwada S. 2001. Molecular evidence that a lily-infecting strain of tulip breaking virus. *Journal of Plant Pathology*, 107: 833 – 837.
- Yin Hui, Chen Li, Li Xiao-yan, Chen Qiu-ming, Yi Ming-fang. 2008. Analysis and improvement of high-quality RNA extraction in leaves of lily. *Journal of China Agricultural University*, 13 (4): 41 – 45. (in Chinese)
- 尹慧, 陈莉, 李晓艳, 陈秋明, 义鸣放. 2008. 百合叶片总 RNA 提取方法比较及优化. *中国农业大学学报*, 13 (4): 41 – 45.
- Yoshiji Niimi, Masaru Nakano, Ken-ichiro Maki. 1996. Production of interspecific hybrids between *Lilium regale* and *Lilium rubellum* via ovule culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64 (4): 919 – 925.
- Yumi Obata, Yoshiji Niimi, Masaru Nakano, Okazaki K, Miyajima I. 2000. Interspecific hybrids between *Lilium nobilissimum* and *Lilium regale* produced via ovules-with-placental-tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 84: 191 – 204.