

扩散型与繁殖型松材线虫数字基因表达谱对比分析

田浩楷^{1,2}, 张 帅³, 柳小龙^{1,2}, 张志伟^{1*}, 赵莉蔺^{2*}

¹山西农业大学林学院, 山西 太谷 030801; ²中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101; ³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:【目的】松材线虫作为林业重大外来入侵种, 扩散型幼虫的形成对其传播扩散起着非常重要的作用, 但扩散虫态的形成与维持机制尚未阐明。【方法】通过构建松材线虫数字基因表达谱(DGE), 从滞育状态的维持、化学感受、代谢途径等方面分析松材线虫不同虫态的基因表达差异。【结果】参考松材线虫基因组数据, 鉴定出2种扩散型幼虫(L_{III} , L_{IV})和繁殖型幼虫(L_n)各有11184、8533和10781个基因。相对于繁殖型虫态, 大多数基因在 L_{IV} 中下调表达, 该虫态中特异上调表达的基因有化感受体基因、核受体基因以及一些代谢相关基因。推测这可能与扩散型线虫滞育状态的维持相关, 并在其生理功能如化学感受和媒介/寄主互作中发挥作用。GO和Pathway富集分析显示, 多数代谢相关通路在 L_{IV} 中下调表达, 而在 L_{III} 中的表达均活跃。【结论】以上结果与 L_{IV} 处于不进食、总体代谢水平较低等生理状态的表型相一致。

关键词:松材线虫; 扩散型虫态; 数字基因表达谱; 差异表达基因

Comparative analysis of dispersal and propagative larval stages in the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) based on a digital gene expression library

TIAN Haokai^{1,2}, ZHANG Shuai³, LIU Xiaolong^{1,2}, ZHANG Zhiwei^{1*}, ZHAO Lilin^{2*}

¹College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; ²State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

³State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract:【Aim】The formation of the dispersal larva plays an important role in the transmission and spreading of pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) which is a major alien invasive pests of forest worldwide. However, its mechanism about formation and maintenance remains unclear.【Method】In this study, digital gene expression (DGE) libraries of two dispersal larvae [3rd instar (L_{III}), and 4th instar (L_{IV})] and of the propagative larva (L_n) were constructed to analyze the differences of gene expression of different developmental stages from aspects of maintenance of diapause, chemoreception and metabolic pathways.【Result】A total of 11184, 8533, 10781 genes were found for L_{III} , L_{IV} and L_n according to reference genome, respectively. Compared with L_n , most of the genes in L_{IV} were down-regulated, and some genes, including chemoreceptor genes, nuclear hormone receptors and other metabolism related genes were up-regulated. The probable function of these genes is in regulating diapause stages, chemosensation and vector/host interaction in the dispersing larva. Gene ontology and pathway clustering analysis showed that most metabolic pathway in L_{IV} were down-regulated. However, genes related to metabolic pathways in L_{III} expressed vigorously.【Conclusion】This results are consistent with phenotype of the physiological status of L_{IV} , which does not feed and has low level of overall metabolism.

Key words: pinewood nematode; dispersal larva; digital gene expression; differential gene expression

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer, 1934) Nickle, 1970 是世界公认的检疫性有

害生物, 是松树萎蔫病 (pine wilt disease, PWD) 的主要致病因子 (Mamiya, 1983)。该线虫在原产地北

收稿日期(Received): 2016-12-11 接受日期(Accepted): 2017-01-20

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201204501); 国家自然科学基金(31572272, 31272323); 中国科学院创新工程项目(KSCX2-EW-J-2); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDB-SSW-SMC014); 国家高技术研究发展计划(“863”计划: 2014AA020529)

作者简介: 田浩楷, 男, 硕士研究生。研究方向: 森林保护学。E-mail: tianhaokai2013@163.com

* 通信作者(Author for correspondence): 张志伟, E-mail: nmgzhiwei@163.com; 赵莉蔺, E-mail: zhaoll@ioz.ac.cn

美并未造成大面积危害,但被引入亚洲和欧洲等国家后大规模暴发,短时间内致大量松树死亡,并不断扩散蔓延(詹开瑞等,2013; Wingfield *et al.*, 1982)。

松材线虫的生活史分为 2 个周期:繁殖周期(propagative pathway)和扩散周期(dispersal pathway)(Ishibashi & Kondo, 1977)。每年夏季,松材线虫在树体内经过卵、繁殖型 1~4 龄幼虫(L_1 ~ L_4 , L_n)发育为成虫。在环境不利的条件下,如低温、干燥、种群密度高等,松材线虫转变为扩散型Ⅲ龄幼虫(dispersal third stage larva, L_{III}); L_{III} 在媒介天牛存在的情况下转变为扩散型Ⅳ龄幼虫(dispersal fourth stage larva, L_{IV})。 L_{III} 和 L_{IV} 均为滞育型虫态,有很强的抗逆性,它们即使不进食也可以生存数月(Mamiya, 1983; Zhao *et al.*, 2014)。

滞育型虫态在线虫中普遍存在(Hu, 2007)。如模式线虫秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (Maupas),在环境适宜的条件下,由受精卵经过 L_1 ~ L_4 4 龄幼虫发育为成虫;而遇到食物缺乏、种群密度增大、温度升高等不利环境条件时, *C. elegans* 会形成一种滞育型虫态 dauer。相对于繁殖型幼虫, dauer 不再进食且身体结构特化,可以抵御干燥、高温或食物短缺等外界不良环境条件(Cassada & Russell, 1975; Golden & Riddle, 1984; Riddle *et al.*, 1981);当外界环境恢复时, dauer 会转变为 L_4 进入繁殖周期。松材线虫与 *C. elegans* 相比,特殊之处在于其可以形成 2 种滞育虫态: L_{III} 相当于 *C. elegans* 的 pre-dauer, L_{IV} 相当于 *C. elegans* 的 dauer;但是, *C. elegans* 的 pre-dauer 不能长期存在,松材线虫的 L_{III} 却可以长期稳定存在。 L_{IV} 除抗逆性强以外,还拥有特化的功能,即可以准确识别与定位松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope,以便被其携带并传播扩散, L_{III} 则不能被携带(Zhao *et al.*, 2007, 2013)。代谢方面, L_{III} 仍然可以进食,同时储存大量脂肪粒; L_{IV} 不再进食,靠分解 L_{III} 积累的脂类物质维持生命活动或蜕皮转变为成虫。

在滞育虫态差异表达基因的挖掘方面, Jones *et al.*(2001)通过基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)技术鉴定出 358 个 *C. elegans* dauer 特异表达的转录本,其中,热激蛋白 hsp-12.6 为高表达的转录本。Wang & Kim (2003)利用基因芯片技术发现了 2430 个在 dauer 虫态中差异

表达的基因。松材线虫 2 种特有的扩散型虫态(L_{III} 和 L_{IV})的形成除了受环境因素的调控外,还与其携带者产生的化学信号诱导有关(Zhao *et al.*, 2014),推测其在转型发育调控中与 *C. elegans* 存在差异。Kikuchi *et al.*(2007)通过对松材线虫 L_n 和 L_{IV} 的 EST 谱发现了一些 L_{IV} 特有的 EST;但未涉及 L_{III} ,且基因分析主要侧重于致病性方面。Yan *et al.*(2012)对松材线虫与拟松材线虫 *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya et Enda 比较转录组的研究也是集中在 2 种线虫的致病性与解毒相关基因的对比分析方面。目前,有关松材线虫特有的 2 种扩散型虫态的形成与维持机制的研究甚少。因此,本研究运用数字基因表达谱分析技术,着重从滞育状态的维持、化学感受、代谢途径等方面分析松材线虫不同虫态的基因表达差异,为研究其扩散型虫态的形成与维持机制提供分子基础。

1 材料与方法

1.1 供试松材线虫来源与培养方法

供试松材线虫均来源于浙江省富阳市新登镇马鞍山。繁殖型线虫分离自采集的疫木,经过分离鉴定后挑取目的虫态,使用常规 PDA (potato dextrose agar) 培养基(Difco, BD)接种灰葡萄孢菌进行进一步增殖培养。 L_{III} 分离自采集的疫木, L_{IV} 分离自采集的松墨天牛成虫。

繁殖型线虫样本制备:将混合龄期繁殖型线虫置于 90 mm 平板 PDA 培养基上生长 10 d,用灭菌 ddH₂O 将线虫从培养基洗下,3000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 收集上清液。 L_{III} 样本制备:把疫木砍成 3~5 cm 细木条,用贝尔曼漏斗法(baermann funnel technique)分离线虫(Baermann, 1917),镜检,去除非 L_{III} 线虫。 L_{IV} 样本制备:解剖初羽化天牛,置于 35 mm 培养皿中,加入灭菌 ddH₂O, 浸泡 30 min 后,选取线虫量多的样品进行贝尔曼漏斗分离,镜检,去除非 L_{IV} 线虫。采用蔗糖悬浮(sucrose flotation)离心方法去除真菌菌丝和其他杂质,进一步纯化线虫(Freckman *et al.*, 1975),离心,去除上清后将线虫用液氮速冻,2 h 后转入-80 ℃冰箱保存待用。

1.2 样本 RNA 提取、建库及基因表达谱测序

RNA 提取使用 RNeasy Micro Kit (Qiagen, 德国)试剂盒。RNA 提取后,使用 NanoDrop DN-1000 (NanoDrop Technologies, 美国) 检测样品质量,选取

质量好的样本进行建库测序。具体流程:先利用 Oligo(dT)的磁珠(beads)富集总 RNA 中 mRNA,并引导反转录合成双链 cDNA,采用 4 碱基识别酶 NlaIII 酶切双链 cDNA,链接 Illumina adaptor1,利用 MmeI 酶切 3'端 CATG 下游 17 bp 碱基,并在 3'端链接 Illumina adaptor2;再加入 Primer GX1 和 Primer GX2 进行 PCR 扩增;样本扩增后,通过 6% TBE PAGE 胶回收 95 碱基条带,纯化后通过 Illumina 基因表达测序法测序。

1.3 差异表达基因的筛选

利用泊松分布的算法筛选 2 个文库间的差异表达基因,对差异检验的 *P*-value 做多重假设检验校正,通过控制错误发现率 (false discovery rate, FDR) 决定 *P*-value 的域值。根据基因的表达量 (TPM 值),计算该基因在不同样本间的差异表达倍数 (Fold)。差异表达基因的筛选条件: $FDR \leq 0.001$, $\log_2 Fold > 1$ 。FDR 值越小,差异倍数越大,说明表达水平差异越显著。当 $\log_2 Fold \geq 1$ 时,表示该基因表达上调;当 $\log_2 Fold \leq -1$ 时,表示表达下调;当 $|\log_2 Fold| < 1$ 时,表示表达无差异 (王海英等, 2016; 姚敏磊等, 2016)。

1.4 差异表达基因的 GO 功能和 KEGG 通路分析

差异表达基因的 GO (gene ontology) 分析数据来自 Gene ontology 数据库 (<http://www.geneontology.org/>)。用在线软件 Veen (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 对差异表达基因进行聚类分析。用 KEGG 数据提供的代谢通路信息进行 Pathway 富集分析,当 *Qvalue* ≤ 0.05 时,表示差异表达基因在该通路中显著富集。

2 结果与分析

2.1 测序数据统计

经过 Illumina 测序,去除纯接头及含 N 序列和拷贝数 < 2 的标签后,得到高质量测序标签 (clean tags)。各虫态 Clean tags 统计如表 1 所示。

表 1 线虫不同虫态 clean tag 数

Table 1 Clean tags from different larval stages of *B. xylophilus*

虫态 Stage	总计 Total		对应种数 Distinct	
	高质量标签数 Clean tags	比例/% Percentage	高质量标签数 Clean tags	比例/% Percentage
L_n	5060562	95.98	83531	41.27
L_{III}	4808908	93.22	114089	34.70
L_{IV}	3436973	94.72	84328	30.70

测序饱和度曲线表明,当测序 tag 数大于等于 $20 \times 100 K (2 M)$ 时,基因数已经趋于饱和(图 1A)。clean tags 在 3 个样本中都大于 $3 M$,表明表达谱测序的数据量较为充足。从检测出的基因数量看, L_n 和 L_{III} 接近,且都显著高于 L_{IV} (约 1.5 倍)。这表明 L_n 和 L_{III} 基因表达比 L_{IV} 活跃,因此有更多的转录本 (transcripts) 被检测到。

clean tags 拷贝数分布统计(图 1B)显示,拷贝数大于 100 的高表达 tags 在 3 个样本中占 80% 左右,数量上占绝对优势;而拷贝数小于 5 的低表达 tags 种类非常丰富,达到 60% 左右。这说明少量种类的丰度极高,而大部分种类的表达水平很低,该结果符合细胞中 mRNA 的显著特征。因此,从整体上评估数据是正常的。

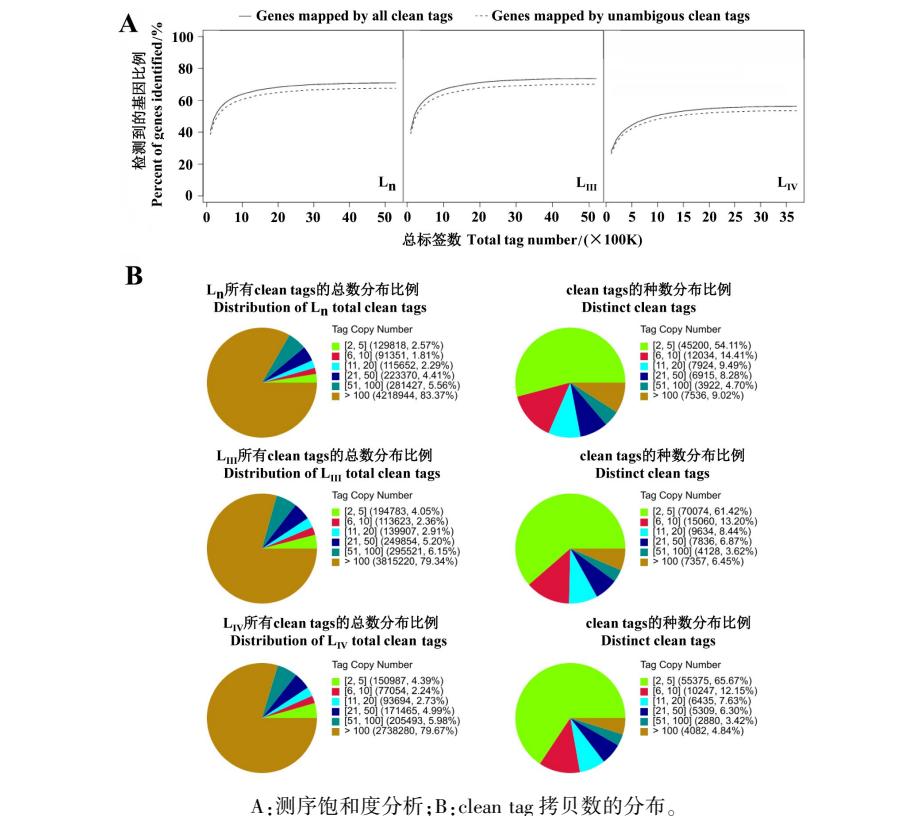
基于参考基因数据库,产生参考基因总数 15971 个,其中,含有 CATG 序列的 14144 个(占 88.56%);同时产生 70912 个参考 tag 序列,可以 map 到单个基因的 tag 数为 69278 个(占 97.7%)。各虫态检测出的基因总数分别为 L_n 10781 个、 L_{III} 11184 个、 L_{IV} 8533 个,其中各有 8531(占 79.1%)、8846(占 79.1%)、7049(占 82.6%) 个基因被注释。这是 EST 分析结果的 2 倍以上,且比 EST 有更准确的基因表达量信息 (Kikuchi *et al.*, 2007),有助于不同龄期线虫基因表达水平的比较。

2.2 差异表达基因总体统计

相对于 L_n , L_{III} 有 1585 个(占 14.2%) 基因上调表达,1440 个(占 12.9%) 基因下调表达;相对于 L_n , L_{IV} 有 568 个(占 6.7%) 基因上调表达,3723 个(占 43.6%) 基因下调表达。这些数据显示, L_{III} 中上、下调表达的基因数量较少且相当,而在 L_{IV} 中仅少量基因的表达上调,约一半基因均下调表达。相对于 L_n , L_{III} 与 L_{IV} 上、下调表达一致的基因分别为 303 和 1262 个; L_{IV} 下调而 L_{III} 上调的基因 161 个,主要包括热激蛋白基因 (heat shock protein, HSP) 以及一些细胞色素 P450 基因 (cytochrome P450, CYP),可能与 L_{III} 抗逆性强相关; L_{IV} 上调而 L_{III} 下调的基因 5 个(图 2A),其中包括 annexin 基因,该基因在 *C. elegans* 中与其咽部吞食作用有关 (Rogers *et al.*, 2001),而在 L_{IV} 中可能与其不再进食的生理状态有关。 L_{IV} 相对于 L_{III} ,下调基因居多(上调 298 个,下调 4115 个)。以上结果表明, L_{III} 基因表达较为活跃,

而绝大多数基因在 L_{IV} 中下调表达, 可能由于 L_{IV} 不再进食, 仅依靠 L_{III} 阶段积累的脂肪类物质提供营养。

GO 分析显示, 相对于 L_n 、 L_{III} 与 L_{IV} 差异表达的基因集中在生物过程和分子功能方面(图 2B)。

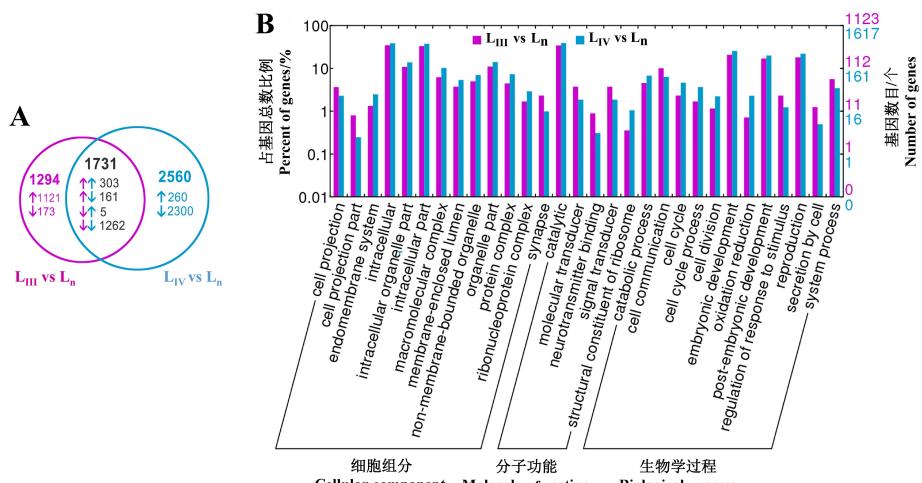


A: 测序饱和度分析; B: clean tag 拷贝数的分布。

A: Analysis of sequencing saturation; B: Distribution of clean tags.

图 1 测序质量评估

Fig.1 Sequencing quality assessment



A: 差异表达基因的韦恩图; B: 差异表达基因 GO 功能分类。

A: Venn diagram of differentially expressed genes; B: GO terms alignment of differentially expressed genes.

图 2 L_{III} 和 L_{IV} 相对于 L_n 差异表达基因统计分析

Fig.2 Statistics of differentially expressed genes of L_{III} and L_{IV} vs L_n

2.3 不同虫态的高表达转录本分析

高表达转录本 (abundantly represented transcripts) 是生物体在特定发育阶段内表达量较高的

基因, 参与该阶段主要生理机能的维持。在 L_{III} 中, HSP、FMRFamide 神经肽相关蛋白、精子主要蛋白 (major sperm protein)、山梨醇脱氢酶 (sorbitol dehy-

drogenase)、层黏连蛋白受体 (laminin receptor) 等为表达量较高的转录本 (表 2)。

在 L_{IV} 中, 高表达转录本主要包括 FMRFamide 神经肽相关蛋白、肌球蛋白 (myosin)、脂肪酸延长相关蛋白、胚胎发育晚期富集蛋白 (late embryogen-

esis abundant-like protein) 以及一些功能未知的重要假定蛋白 (hypothetical protein) (表 3)。这些基因的功能集中在发育调节、神经感受以及中间代谢方面, 推测可能与 L_{IV} 维持滞育状态、感受外界环境和降低代谢率相关。

表 2 L_{III} 表达量最高的 15 种转录本Table 2 Most abundantly represented transcripts in L_{III} (top 15)

基因编号 Gene ID	基因注释 Gene annotation
CASBxy006642-TA	热激蛋白 Heat shock protein [<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>]
CASBxy015639-TA	聚腺苷酸结合蛋白 1 Polyadenylate-binding protein 1 [<i>Brugia malayi</i>]
CASBxy011160-TA	热激蛋白-21 Small HSP21-like protein [<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>]
CASBxy011590-TA	精子主要蛋白 Major sperm protein (msp-78) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]
CASBxy011204-TA	翻译抑制肿瘤蛋白 Translationally controlled tumor protein [<i>Brugia malayi</i>]
CASBxy011450-TA	FMRFamide 神经肽相关蛋白 FMRFamide-related peptide FLP-16 [<i>Teladorsagia circumcincta</i>]
CASBxy001869-TA	假定蛋白 F59F4.2 Hypothetical protein F59F4.2 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]
CASBxy006770-TA	热激蛋白-21 Small HSP21-like protein [<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>]
CASBxy013612-TA	层黏连蛋白受体 1 Laminin receptor 1 [<i>Brugia malayi</i>]
CASBxy013457-TA	假定蛋白 F58E10.3 Hypothetical protein F58E10.3 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]
CASBxy006755-TA	山梨醇脱氢酶 Sorbitol dehydrogenase (sodh-1) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]
CASBxy014132-TA	腺苷酸核糖基化作用因子 1 ADP-ribosylation factor 1 [<i>Marsupenaeus japonicus</i>]
CASBxy006119-TA	核糖体蛋白 S16 40S ribosomal protein S16 [<i>Brugia malayi</i>]
CASBxy005485-TA	胚胎发育晚期富集蛋白 1 Late embryogenesis abundant-like protein 1 [<i>Brachionus plicatilis</i>]
CASBxy000719-TA	假定蛋白 CBG06665 Hypothetical protein CBG06665 [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]

表 3 L_{IV} 表达量最高的 15 种转录本Table 3 Most abundantly represented transcripts in L_{IV} (top 15)

基因编号 Gene ID	基因注释 Gene annotation
CASBxy001869-TA	假定蛋白 F59F4.2 Hypothetical protein F59F4.2 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]
CASBxy002459-TA	假定蛋白 CBG21051 Hypothetical protein CBG21051 [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]
CASBxy000404-TA	未注释到 Not annotated
CASBxy014466-TA	核糖体蛋白 L27a 60S ribosomal protein L27a [<i>Caligus clemensi</i>]
CASBxy004976-TA	轻链肌球蛋白 Myosin regulatory light chain 1 [<i>Brugia malayi</i>]
CASBxy007342-TA	真核翻译延长因子 1A Eukaryotic translation elongation factor 1A [<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>]
CASBxy011550-TA	脂肪酸延长相关蛋白 elo-6 Fatty acid elongation family member (elo-6) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]
CASBxy001044-TA	假定蛋白 CBG01832 Hypothetical protein CBG01832 [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]
CASBxy007282-TA	核糖体蛋白 L27 60S ribosomal protein L27 [<i>Brugia malayi</i>]
CASBxy011450-TA	FMRFamide 神经肽相关蛋白 FLP-16 FMRFamide-related peptide FLP-16 [<i>Teladorsagia circumcincta</i>]
CASBxy005005-TA	假定蛋白 H05L03.3 Hypothetical protein H05L03.3 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]
CASBxy004288-TA	核糖体蛋白 L3 60S ribosomal protein L3 [<i>Brugia malayi</i>]
CASBxy008932-TA	UBA/TS-N 主要包含蛋白 UBA/TS-N domain containing protein [<i>Brugia malayi</i>]
CASBxy004282-TA	核糖体蛋白 L36 Ribosomal protein L36 [<i>Ancylostoma caninum</i>]
CASBxy005485-TA	胚胎发育晚期富集蛋白 Late embryogenesis abundant-like protein 1 [<i>Brachionus plicatilis</i>]

繁殖型线虫中, 与 L_{III} 类似, 精子主要蛋白和山梨醇脱氢酶等基因表达量也很高。在线虫中, 精子主要蛋白主要参与细胞质骨架的装配以及细胞运动相关功能。与扩散型虫态不同的是, 繁殖型线虫中, 核糖体蛋白、在糖酵解途径中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 以及细胞结构相关蛋白如副肌球蛋白 (paramyosin)、胶原蛋白 (collagen) 等表达量相对较高 (表 4)。这表明繁殖型线虫的细胞生长与分裂活动及

代谢水平高于扩散型虫态。此外, 在 L_{IV} 和 L_{III} 中表达量高的基因如胚胎发育晚期丰富蛋白和 FMRFamide 神经肽等在 L_n 中的表达量均不高, 表明此类基因可能与扩散型虫态滞育状态的维持有关。

2.4 扩散型线虫 L_{IV} 中特异上调表达的基因

相对于 L_n , L_{IV} 特异上调表达的基因有 260 个 (图 2A)。表 5 是去除未成功注释和注释到未知功能蛋白或假定蛋白的基因, 同时略去一些功能广泛的蛋白激酶, 按照表达量排序筛选出的前 25 个基因。

表 4 L_n 表达量最高的 15 种转录本
Table 4 Most abundantly represented transcripts in L_n (top 15)

基因编号 Gene ID	基因注释 Gene annotation
CASBxy006755-TA	山梨醇脱氢酶 (sodh-1) Sorbitol dehydrogenase (sodh-1) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy011590-TA	精子主要蛋白 (msp-78) Major sperm protein (msp-78) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy003402-TA	假定胶原蛋白 Putative collagen [Angiostrongylus cantonensis]
CASBxy005400-TA	未注释到 Not annotated
CASBxy010555-TA	Roller 家族成员 (rol-6) Roller family member (rol-6) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy006434-TA	胶原蛋白家族成员 (col-17) Collagen family member (col-17) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy006804-TA	胶原蛋白家族成员 (col-125) Collagen family member (col-125) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy006119-TA	40S 核糖体蛋白 S16 40S ribosomal protein S16 [Brugia malayi]
CASBxy004288-TA	60S 核糖体蛋白 L3 60S ribosomal protein L3 [Brugia malayi]
CASBxy006944-TA	未注释到 Not annotated
CASBxy000952-TA	未注释到 Not annotated
CASBxy007423-TA	副肌球蛋白 Paramyosin
CASBxy014463-TA	CBR-RLA-1 蛋白 <i>C. briggsae</i> CBR-RLA-1 protein [Caenorhabditis briggsae]
CASBxy002290-TA	CBR-RLA-1 蛋白 <i>C. briggsae</i> CBR-ALH-1 protein [Caenorhabditis briggsae]
CASBxy003774-TA	3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Ascaris suum]

表 5 L_{IV} 特异上调表达的部分基因
Table 5 Selected genes specifically up-regulated in L_{IV}

基因编号 Gene ID	Log2 比率 Log2 ratio	基因注释 Gene annotation
CASBxy014551-TA	12.42	化感受体 SX (srsx-29) Serpentine receptor class SX (srsx-29) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy012490-TA	11.01	谷胱甘肽-S-转移酶 Glutathione-S-transferase-3 [Necator americanus]
CASBxy002208-TA	10.97	羟基类脂脱氢酶 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase [Heterodera glycines]
CASBxy013300-TA	9.11	化感受体 ODR-10 ODR-10 [Caenorhabditis remanei]
CASBxy015102-TA	8.45	果胶裂解酶 Pectate lyase [Bursaphelenchus xylophilus]
CASBxy015126-TA	8.18	化感受体 SX (srsx-30) Serpentine receptor class SX (srsx-30) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy014429-TA	8.03	CBR-STR-89 蛋白 CBR-STR-89 protein [Caenorhabditis briggsae]
CASBxy014269-TA	7.47	羟基丁酸脱氢酶 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2 [Tribolium castaneum]
CASBxy005917-TA	5.75	乙醛脱氢酶 Aldehyde dehydrogenase (alh-10) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy009944-TA	4.63	化感受体蛋白 (str-19) Seven TM receptor family member (str-19) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy015858-TA	4.62	CBR-SCL-1 蛋白 CBR-SCL-1 protein [Caenorhabditis briggsae]
CASBxy004923-TA	4.55	核受体蛋白 NHR-10 CBR-NHR-10 protein [Caenorhabditis briggsae]
CASBxy001321-TA	4.40	环核苷酸门控离子通道 Cyclic-nucleotide gated cation channel [Brugia malayi]
CASBxy007708-TA	3.98	CBR-GES-1 蛋白 CBR-GES-1 protein [Caenorhabditis briggsae]
CASBxy014352-TA	3.98	鸟苷酸环化酶 (gcy-36) Guanylyl cyclase family member (gcy-36) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy015205-TA	3.84	叶酸转运家族成员 (folt-1) Folate transporter family member (folt-1) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy010659-TA	3.81	钾离子通道 Twik 家族 Twik (KCNK-like) family of potassium channels [Brugia malayi]
CASBxy014549-TA	3.61	山梨醇脱氢酶家族 (sodh-1) Sorbitol dehydrogenase family member (sodh-1) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy010812-TA	3.51	CBR-ACR-5 蛋白 CBR-ACR-5 protein [Caenorhabditis briggsae]
CASBxy012953-TA	3.46	Destabilase 家族蛋白 Destabilase family protein [Brugia malayi]
CASBxy013321-TA	3.28	化感受体 (str-93) Seven TM receptor family member (str-93) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy005079-TA	3.09	核受体蛋白 (nhr-246) Nuclear hormone receptor (nhr-246) [Caenorhabditis elegans]
CASBxy007174-TA	2.90	磷脂酰肌醇蛋白激酶 Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein [Brugia malayi]
CASBxy003770-TA	2.89	二氢二醇聚合脱氢酶 Dimeric dihydrodiol dehydrogenase [Aedes aegypti]
CASBxy005091-TA	2.85	域包含蛋白质 DNAJ domain containing protein [Brugia malayi]

数据显示,化感受体 (serpentine receptor) 基因在 L_{IV} 中特异上调幅度较大,包括 srsx-29、srsx-30、str-19、str-89、str-93、odr-10 共 6 个相关基因,表明此类基因可能与 L_{IV} 虫态对外界化学信号更为敏感有关。在自然条件下, L_{IV} 通过有效识别媒介天牛释放的化学

信号而进入天牛体内,传播扩散至新的寄主松树后选择合适的时间从天牛体内逸出,这些过程都需要化感受体基因的参与。

上调幅度较大的还有核受体 (nuclear receptor) 基因 nhr-10 和 nhr-246。核受体基因一般直接调控

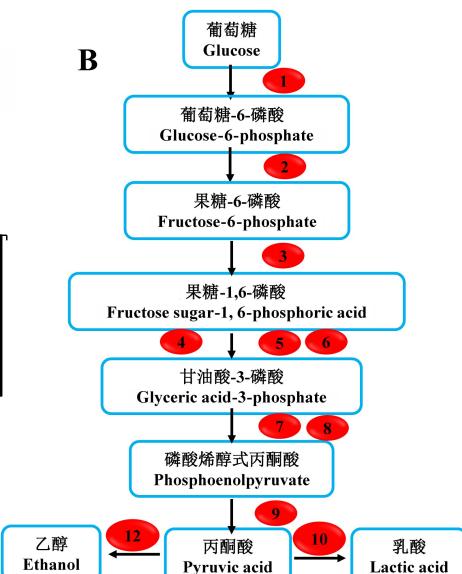
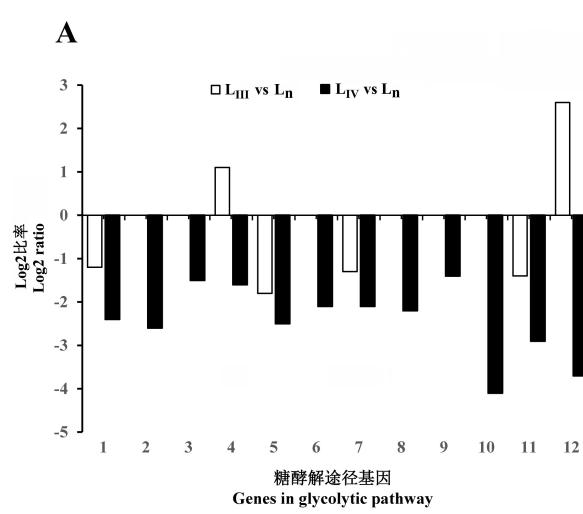
下游效应基因的表达,以启动特定的代谢或发育通路。这些核受体可能调控 L_{IV} 特异的代谢或发育途径。一些代谢酶类也位列其中,如谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase)、羟基类脂脱氢酶(17beta-hydroxysteroid dehydrogenase)、羟基丁酸脱氢酶(3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2)、二氢二醇聚合脱氢酶(dimeric dihydrodiol dehydrogenase)、UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyl transferase)等。

2.5 扩散型线虫代谢途径分析

通过KEGG pathway的富集分析,着重筛选了不

同虫态在三大代谢途径中的差异基因,这些差异基因均为 L_n 、 L_{III} 和 L_{IV} 表达谱中共同注释到的转录本。

糖酵解途径中,相对于 L_n 、 L_{III} 有 2 个基因上调表达,4 个基因下调表达,其余基因表达无显著差异。上调表达的基因有果糖-二磷酸醛缩酶(fruuctose-bisphosphate aldolase)和乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase),下调表达的基因有葡萄糖激酶(glucokinase)、3-磷酸甘油醛脱氢酶等。而 L_{IV} 在该途径中大部分基因下调表达。这可能是由于 L_{IV} 线虫需要的能量较少;但 L_{III} 糖酵解途径仍然保持一定的活跃程度,维持着主要的能量输出(图 3)。



A: 糖酵解途径中部分基因的表达差异;B: 差异基因在糖酵解途径中的分布。

A: The differentially genes expression in glycolytic pathway; B: The distribution of differential genes in glycolytic pathway.

- 1:葡萄糖激酶 Glucokinase; 2:葡萄糖-6-磷酸异构酶 Glucose-6-phosphate isomerase; 3:果糖-1,6-二磷酸酶 Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA); 4:果糖-二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase; 5:3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; 6:磷酸甘油酸激酶 Phosphoglycerate kinase; 7:磷酸甘油变位酶 Phosphoglycerate mutase; 8:磷酸丙酮酸水合酶 Phosphopyruvate hydratase; 9:丙酮酸激酶 Pyruvate kinase; 10:乳酸脱氢酶连接酶 L-lactate dehydrogenase; 11:乙酰辅酶 A 连接酶 Acetate-CoA ligase; 12:醛脱氢酶 Aldehyde dehydrogenase (NAD⁺)。

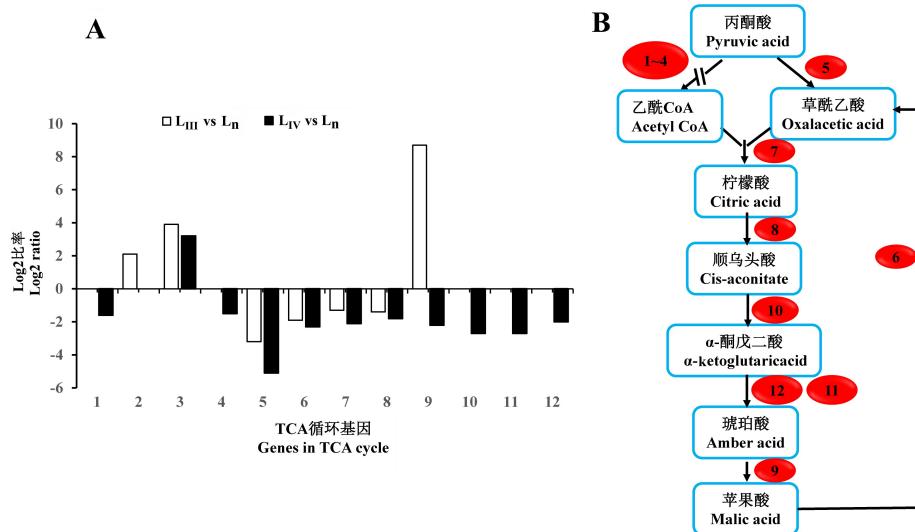
图 3 L_{III} 、 L_{IV} 相对于 L_n 糖酵解途径基因表达变化

Fig.3 Expression profiling of genes in glycolytic pathway of L_{III} and L_{IV} vs L_n

从三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)来看, L_{III} 相对于 L_n 有 3 个基因上调表达,4 个基因表达量下调(图 4)。上、下调基因较少且数目相近,呈平衡状态,且该通路的其他基因表达量无变化,表明松材线虫 L_{III} 有氧代谢仍比较旺盛。而 L_{IV} 相对于 L_n 共有 11 个基因的表达量改变,其中,只有丙酮酸脱氢酶复合体 E1 组分的部分 Tag 表达量上调,其余基因全部下调表达(图 4)。这表明 TCA 循环通路的基因在 L_{IV} 中的表达低于 L_n 和 L_{III} 。TCA

是线粒体中能量代谢的主要通路, L_{IV} 有氧代谢水平降低,与其不进食、不活跃的生理状态相符。

脂肪酸代谢方面, L_{III} 相比繁殖型线虫较为活跃,通路大多数基因上调表达,包括脂肪酰 CoA 氧化酶(fatty acyl-CoA oxidase)、脂肪酰 CoA 脱氢酶(fatty acyl-CoA dehydrogenase)、3-羟基脂肪酰 CoA 脱氢酶(3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)等。而在 L_{IV} 中,仅脂肪酰 CoA 氧化酶上调表达,其余大多数基因都下调表达(图 5)。



A: TCA 循环中部分基因的表达差异; B: 差异基因在 TCA 循环中的分布

A: The differentially genes expression in TCA cycle; B: The distribution of differential genes in TCA cycle.

1: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 Phosphoenolpyruvate carboxykinase; 2: 丙酮酸脱氢酶复合体 E2 Pyruvate dehydrogenase complex E2 component;

3:丙酮酸脱氢酶复合体 E1 Pyruvate dehydrogenase complex E1 component; 4:二氢硫辛酰胺脱氢酶 Dihydrolipoamide dehydrogenase;

5:丙酮酸羧化酶 Pyruvate carboxylase; 6:苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase; 7:柠檬酸合酶 Citrate synthase;

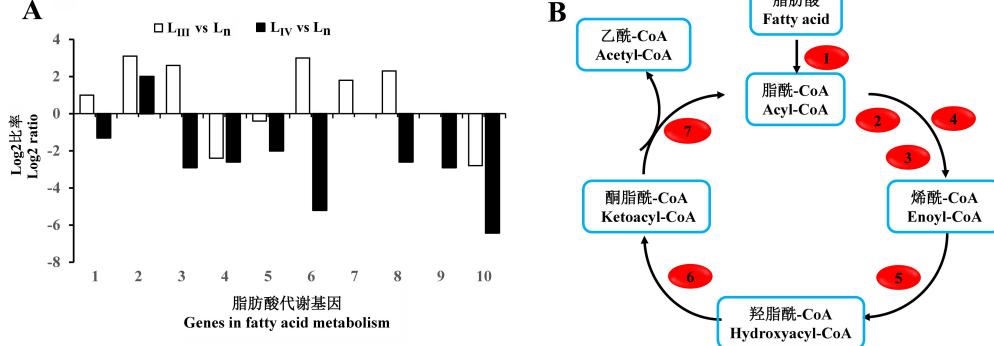
8:顺乌头酸酶 Aconitase; 9:琥珀酸脱氢酶 Succinate dehydrogenase; 10:异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase;

11:琥珀酰-CoA 合成酶 Succinyl-CoA synthetase; 12: α -酮戊二酸脱氢酶 α -ketoglutarate dehydrogenase。

图4 L_{m} 、 $L_{\text{m}'}$ 相对于 L_{c} TCA 循环基因表达变化

图 4. L_{III} 、 L_{IV} 相对于 L_n TCA 循环基因表达变化

Fig.4 Expression profiling of genes in TCA cycle of E_{III} and E_{IV} vs E_I



A:脂肪酸代谢中部分基因的表达差异;B:差异基因在脂肪酸代谢通路中的分布

A: The differentially genes expression in fatty acid metabolism; B: The distribution of differential genes in the pathway of fatty acid metabolism.

1:长链脂肪酸-CoA 连接酶 Long chain fatty acid-CoA ligase; 2:脂肪酰 CoA 氧化酶 Fattyacyl-CoA oxidase; 3:脂肪酰 CoA 脱氢酶 Fatty acyl-CoA dehydrogenase; 4:琥珀酸脱氢酶 Succinate dehydrogenase; 5:不饱和脂肪酰 CoA 水合酶 Unsaturated acyl-CoA hydratase;

6,3-羟基脂肪酰 CoA 脱氢酶 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; 7,3-酮基脂肪酰硫解酶 3-ketoacyl-CoA thiolase;

8. 十二氢羟基辅酶 A 异构酶 Dodecenoyl-CoA isomerase; 9. Z -酰辅酶 A 酰基转移酶

Acetyl-CoA C-acetyltransferase: 10, Z-醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase

图 5 L_1 、 L_2 相对于 L_0 脂肪酸代谢基因表达变化

Fig 5 Expression profiling of genes in fatty acid metabolism of L- and L- vs L-

3 讨论与结论

本研究表明,相对于 L_n 而言, L_{III} 基因表达仍较为活跃,而 L_{IV} 大多数基因下调表达。 L_{IV} 上调表达的基因主要集中于维持滞育状态、提高对不良环境的耐受力和感受外界信号方面。从基因表达模式

看, L_{IV} 更接近于 *C. elegans* 的 dauer 虫态, 而 L_{III} 更接近一个正在转变的状态, 对应于 *C. elegans* 中 L_1 转变为 dauer 的过程 (Jones *et al.*, 2001; Wang & Kim, 2003)。

不同于繁殖型线虫中细胞生长与分裂相关转录本的高表达。扩散型线虫共有的高表达转录本以

及上调表达的基因则集中体现在滞育状态的维持及对不良环境耐受力的提高等方面。在 L_{III} 和 L_{IV} 表达谱的高表达转录本中均检测到了 FMRFamide 神经肽相关蛋白;在 L_{III} 高表达转录本中检测到山梨醇脱氢酶;而山梨醇脱氢酶、谷胱甘肽 S-转移酶等在 L_{IV} 中特异上调表达。此结果与 Kikuchi *et al.* (2007) 通过 EST 研究发现的扩散型线虫特异的高表达转录本基本一致。其中,松材线虫中的 FMRFamide 神经肽相关蛋白基因与 *C. elegans* 中的 *fpl-16* 基因同源, *fpl-16* 基因在 *C. elegans* 中参与抑制咽部肌肉动作电位的传导 (Rogers *et al.*, 2001)。此基因在松材线虫 L_{IV} 中大量表达,可能与其咽部活动的抑制有关,这与 L_{IV} 不再进食和咽部食道球不活动的表型相符。谷胱甘肽 S-转移酶在 *C. elegans* dauer 虫态中也上调表达,它与内源或外源有毒代谢物质的排出有关 (Liu *et al.*, 2004; McElwee *et al.*, 2004)。另外,细胞色素 P450、短链化合物脱氢酶/还原酶、UDP-葡萄糖醛酸基转移酶等基因在 *C. elegans* 中也具有类似的作用 (McElwee *et al.*, 2004),这些基因在松材线虫 L_{IV} 中同样上调表达,说明此类基因在 L_{IV} 生理状态的维持中可能起重要作用。综上所述,松材线虫扩散型虫态的高表达基因与 *C. elegans* dauer 虫态具有相似之处,进一步体现了线虫滞育虫态的普遍性与一致性。

在松材线虫 L_{IV} 特异上调表达的基因中,上调表达最显著的是一些化感受体基因,这些化感受体都属于 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 家族;而在 *C. elegans* dauer 虫态显著上调的基因中未见这些感受体 (Jones *et al.*, 2001; Wang & Kim, 2003)。这表明作为植物寄生线虫,松材线虫 L_{IV} 与自由生活的 *C. elegans* dauer 虫态在化学感受方面存在差异。Kim *et al.* (2009) 研究表明,2 个多次跨膜 G 蛋白偶联受体 (srbc-64 和 srbc-66) 相应的突变体在 dauer 诱导信息素存在的条件下不能形成滞育虫态,从而证明该受体参与 *C. elegans* 对 dauer 信息素 (C6、C7、C9) 的响应。这表明化感受体参与了线虫的转型发育。此外,化感受体的表达具有时间与空间差异性 (Bargmann, 2006; Chen *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005, 2008)。上调显著的 6 个化感受体基因中,2 个属于 srsx 家族 (srsx-29, srsx-30),3 个属于 str 家族 (str-19, str-89, str-93),1 个属于 odr 家族 (odr-10)。这些基因中除了

odr-10 被证明在 *C. elegans* 中感受双乙酰 (Sengupta *et al.*, 1996) 外,其他基因的具体功能尚不清楚。在松材线虫中这些基因可能与 L_{IV} 对外界化学信号的感受相关。本研究的前期工作证实了松材线虫 L_{III} 向天牛蛹室的聚集、 L_{III} 到 L_{IV} 的转变以及 L_{IV} 识别与定位初羽化的媒介天牛并向其气管系统迁移等过程都受到化学信号的介导 (Zhao *et al.*, 2013, 2014)。当松材线虫被天牛携带转移至新的寄主后,需要在适当的时机逸出天牛体内,此过程可能也需要感受特定的化学信号。有研究显示,健康松树产生的 β -香叶烯 (β -myrcene) 可以促进线虫逸出天牛体内 (Enda & Ikeda, 1983; Ishikawa *et al.*, 1986; Stamps & Linit, 1998)。Burnell & O'Halloran (2004) 研究表明,昆虫寄生性线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* 的化学感受谱在其扩散型虫态形成过程中会产生适应性的变化,体现在对细菌代谢物敏感性的降低和对长链醇及昆虫特异挥发物敏感性的增加。总之,线虫需要特定的化感受体去感受这些化学信号。因此推测,松材线虫 L_{IV} 中特异上调表达的化感受体,对其准确地进出媒介天牛并进一步传播扩散起重要作用;但具体的感应机制有待深入研究。

代谢相关基因分析表明,松材线虫 L_{IV} 的总体代谢水平低于 L_n ,与 *C. elegans* dauer 虫态总体代谢率的降低相符 (Houthoofd *et al.*, 2002; O'Riordan & Burnell, 1989; Vanfleteren & De Vreeze, 1996)。这是由糖酵解、氧化磷酸化、TCA 循环、糖异生等代谢途径中的酶活性下降所致 (O'Riordan & Burnell, 1989)。芯片和 SAGE 研究发现,甘油三酯在 *C. elegans* dauer 虫态中被转变为糖 (Holt & Riddle, 2003; Jones *et al.*, 2001; McElwee *et al.*, 2004; Wang & Kim, 2003), 表明该虫态可以利用脂类物质为自身提供能量。但是,在松材线虫表达谱中,相对于繁殖型虫态,扩散型 L_{IV} 在三大代谢通路中的大部分基因下调表达,只有个别基因上调表达,推测松材线虫 L_{IV} 的基础代谢低于 *C. elegans* dauer 虫态,两者的代谢与维持机制有所差异,具体的差别有待深入研究。另外,松材线虫 L_{III} 和 L_{IV} 中山梨醇脱氢酶基因的表达量均上调,与该基因在 *C. elegans* dauer 虫态中的表达相一致。该酶在果糖到山梨醇的可逆氧化还原反应过程中起催化作用 (Holt & Riddle, 2003), 可能参与无氧状态下的乙醇发酵 (ethanol

fermentation) 过程 (Hu, 2007; McElwee *et al.*, 2006)。推测此基因在松材线虫中具有类似作用, 可能是为适应不良的环境条件而启动的特殊代谢方式。 L_{III} 在脂肪酸 β -氧化/脂肪酸合成代谢途径中相关基因显著上调表达, 说明此发育阶段在大量积累脂质, 为转变为 L_{IV} 做准备。

总之, 在生理状态的维持、对不良环境的耐受以及基础代谢率降低等方面, 松材线虫扩散型虫态的基因表达模式与模式线虫 *C. elegans* dauer 虫态类似; 但是, 作为植物寄生线虫, 松材线虫在传播扩散过程中又有媒介昆虫的参与, 使其基因表达模式变得更加复杂和特殊。

参考文献

- 王海英, 魏广兵, 刘影霞, 杜贝贝, 岳玲, 黄涛, 王立鹏, 徐世清, 司马杨虎, 2016. 基于数字基因表达谱(DGE)分析异烟肼诱导家蚕脂肪体损伤的差异表达基因. *蚕业科学*, 42(3): 404-414.
- 姚敏磊, 张璟曜, 周汐, 韩少怀, 谢凤斌, 朱月林, 盖钧镒, 杨守萍, 2016. 大豆响应低磷胁迫的数字基因表达谱分析. *大豆科学*, 35(2): 213-221.
- 詹开瑞, 游源浅, 张晓燕, 陈艳, 2013. 甲酸乙酯对松材线虫的熏蒸效果. *生物安全学报*, 22(2): 127-131.
- BAERMANN G, 1917. Eine einfache methode zur auffindung von ankylostomum (nematoden) larven in Erdproben. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie Batavia*, 57: 131-137.
- BARGMANN C I, 2006. Chemosensation in *C. elegans*. (2006-10-25) [2016-11-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19746/>.
- BURNELL A M, O'HALLORAN D M, 2004. Chemoreceptor genes: what can we learn from *Caenorhabditis elegans* and how can we apply this information to studies on other nematodes? *Nematology Monographs & Perspectives*, 2: 707-714.
- CASSADA R C, RUSSELL R L, 1975. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 46(2): 326-342.
- CHEN N S, PAI S, ZHAO Z Y, MAH A, NEWBURY R, JOHNSEN R C, ALTUN Z, MOERMAN D G, BAILLIE D L, STEIN L D, 2005. Identification of a nematode chemosensory gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1): 146-151.
- ENDA N, IKEDA T, 1983. Role of volatiles of a pine tree as emerging stimulants for attracting the pine wood nematode

- from the pine sawyer. *Transactions of the 94th Annual Meeting Japanese Forestry Society*, 94: 479-480.
- FRECKMAN D W, MANKAU R, FERRIS H, 1975. Nematode community structure in desert soils — nematode recovery. *Journal of Nematology*, 7(4): 343-346.
- GOLDEN J W, RIDDLE D L, 1984. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology*, 102(2): 368-378.
- HOLT S J, RIDDLE D L, 2003. SAGE surveys *C. elegans* carbohydrate metabolism: evidence for an anaerobic shift in the long-lived dauer larva. *Mechanisms of Ageing and Development*, 124(7): 779-800.
- HOUTHOOFD K, BRAECKMAN B P, LENAERTS I, BRYSKA K, DE VREESE A, VAN EYGEN S, VANFLETEREN J R, 2002. Ageing is reversed, and metabolism is reset to young levels in recovering dauer larvae of *C. elegans*. *Experimental Gerontology*, 37(8): 1015-1021.
- HU P J, 2007. *Dauer*. (2007-08-08) [2016-10-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK116082/>.
- ISHIBASHI N, KONDO E, 1977. Occurrence and survival of the dispersal forms of pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*. *Applied Entomology and Zoology*, 12(4): 293-302.
- ISHIKAWA M, SHUTO Y, WATANABE H, 1986. Beta-myrcene, a potent attractant component of pine wood for the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(7): 1863-1866.
- JONES S J M, RIDDLE D L, POUZYREV A T, VELCULESCU V E, HILLIER L, EDDY S R, STRICKLIN S L, BAILLIE D L, WATERSTON R, MARRA M A, 2001. Changes in gene expression associated with developmental arrest and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research*, 11(8): 1346-1352.
- KIKUCHI T, AIKAWA T, KOSAKA H, PRITCHARD L, OGURA N, JONES J T, 2007. Expressed sequence tag (EST) analysis of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 155(1): 9-17.
- KIM K, SATO K, SHIBUYA M, ZEIGER D M, BUTCHER R A, RAGAINS J R, CLARDY J, TOUHARA K, SENGUPTA P, 2009. Two chemoreceptors mediate developmental effects of dauer pheromone in *C. elegans*. *Science*, 326: 994-998.
- LIU T, ZIMMERMAN K K, PATTERSON G I, 2004. Regulation of signaling genes by TGF-beta during entry into dauer diapause in *C. elegans*. *BMC Developmental Biology*, 4(1): 1.
- MAMIYA Y, 1983. Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology*

- gy, 21(1): 201–220.
- MCELWEE J J, SCHUSTER E, BLANC E, THOMAS J H, GEMS D, 2004. Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae and long-lived daf-2 mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 44533–44543.
- MCELWEE J J, SCHUSTER E, BLANC E, THORNTON J, GEMS D, 2006. Diapause-associated metabolic traits reiterated in long-lived daf-2 mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(12): 922–936.
- O'RIORDAN V B, BURNELL A M, 1989. Intermediary metabolism in the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans*: 1. glycolysis, gluconeogenesis, oxidative-phosphorylation and the tricarboxylic-acid cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology B — Biochemistry & Molecular Biology*, 92(2): 233–238.
- RIDDLE D L, SWANSON M M, ALBERT P S, 1981. Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature*, 290: 668–671.
- ROGERS C M, FRANKS C J, WALKER R J, BURKE J F, HOLDEN-DYE L, 2001. Regulation of the pharynx of *Caenorhabditis elegans* by 5-HT, octopamine, and FMRFamide-like neuropeptides. *Journal of Neurobiology*, 49(3): 235–244.
- SENGUPTA P, CHOU J H, BARGMANN C I, 1996. odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell*, 84(6): 899–909.
- STAMPS W, LINIT M, 1998. Chemotactic response of propagative and dispersal forms of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* to beetle and pine derived compounds. *Fundamental and Applied Nematology*, 21(3): 243–250.
- THOMAS J H, KELLEY J L, ROBERTSON H M, LY K, SWANSON W J, 2005. Adaptive evolution in the SRZ chemoreceptor families of *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12): 4476–4481.
- THOMAS J H, ROBERTSON H M, 2008. The *Caenorhabditis* chemoreceptor gene families. *BMC Biology*, 6(1): 42.
- VANFLETEREN J R, DE VREESE A, 1996. Rate of aerobic metabolism and superoxide production rate potential in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology*, 274(2): 93–100.
- WANG J, KIM S K, 2003. Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 130(8): 1621–1634.
- WINGFIELD M J, BLANCHETTE R A, NICHOLLS T H, ROBBINS K, 1982. The pine wood nematode: a comparison of the situation in the United-states and Japan. *Canadian Journal of Forest Research — Revue Canadienne De Recherche Forestiere*, 12(1): 71–75.
- YAN X, CHENG X Y, WANG Y S, LUO J, MAO Z C, FERRIS V R, XIE B Y, 2012. Comparative transcriptomics of two pathogenic pinewood nematodes yields insights into parasitic adaptation to life on pine hosts. *Gene*, 505(1): 81–90.
- ZHAO L, MOTA M, VIEIRA P, BUTCHER R A, SUN J, 2014. Interspecific communication between pinewood nematode, its insect vector, and associated microbes. *Trends in Parasitology*, 30(6): 299–308.
- ZHAO L, WEI W, LIU X, KANG L, SUN J, 2007. A novel rapid sampling method for pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *Canadian Journal of Forest Research — Revue Canadienne De Recherche Forestiere*, 37(10): 1867–1872.
- ZHAO L, ZHANG S, WER W, HAO H, ZHANG B, BUTCHER R A, SUN J, 2013. Chemical signals synchronize the life cycles of a plant-parasitic nematode and its vector beetle. *Current Biology*, 23(20): 2038–2043.

(责任编辑:杨郁霞)