

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2019.04.007

低温及其信息素蛔甙对松材线虫睡眠的影响

杨永昌^{1,2}, 赵美萍², 谢武韬³, 高玲玲⁴, 郭艳琼^{1*}, 赵莉茵^{2*}

¹山西农业大学农学院, 山西 太谷 030801; ²中国科学院动物研究所, 农业虫鼠害综合治理研究

国家重点实验室, 北京 100101; ³山西大学附属中学, 山西 太原 030006;

⁴澳大利亚联邦科学与工业研究组织农业与食品科学部, 澳大利亚 珀斯 6913

摘要:【目的】温度作为生态环境的重要组成因子,深刻影响松材线虫的生态分布,本研究旨在探讨松材线虫对温度的响应及其生态适应机制,为松材线虫防治提供依据。【方法】分别测定了不同龄期松材线虫在25和4℃条件下处理48h后静息率、糖醇含量和蛔甙的变化,以及蛔甙常温处理18h后对线虫成虫静息率的影响。【结果】与25℃对照处理相比,4℃条件下L₂、L₃、L₄和成虫的静息率大幅提升;4℃条件下海藻糖含量显著高于25℃对照处理,约为对照处理的2.32倍,而山梨糖醇、葡萄糖和甘油含量与对照处理均无明显差异;蛔甙测定结果显示,C5、C6和ΔC6含量均下调,C7和ΔC9停止分泌,而C9在4℃条件下开始分泌;生物测定表明,粗提物、C6、C7和C9能大幅增加线虫在25℃条件下的静息率。【结论】几种蛔甙共同参与了松材线虫低温压力诱导睡眠的调控。

关键词: 松材线虫; 低温; 蛔甙; 睡眠

Effects of low temperature and ascarosides on the sleep-induction in *Bursaphelenchus xylophilus*

YANG Yongchang^{1,2}, ZHAO Meiping², XIE Wutao³, GAO Lingling⁴, GUO Yanqiong^{1*}, ZHAO Lilin^{2*}

¹College of Agriculture, 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;

³The Affiliated High School of Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China; ⁴Department of Agriculture & Food Science, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization of Australia, Perth 6913, Australia

Abstract:【Aim】As an important ecological factor, temperature profoundly affects the distribution of *Bursaphelenchus xylophilus*. We studied the response of *B. xylophilus* to low temperature and the mechanism of its ecological adaption.【Method】In this study, fraction quiescent, free sugars, polyols and ascarosides contents were measured after the *B. xylophilus* had been treated at 25℃ and 4℃ for 48 hours. We also investigated the effects of ascarosides on fraction quiescent at 25℃.【Result】The fractions of quiescence of all ages, including L₂, L₃, L₄ and adult worms of *B. xylophilus*, significantly increased at 4℃ compared to the control at 25℃. Trehalose content was 2.32 times than the control, while sorbitol, glucose and glycerol did not significantly differ from the control. The analysis of ascarosides showed that the contents of C5, C6 and ΔC6 decreased, C7 and ΔC9 secretion ceased, while C9 began to secrete at 4℃. Simultaneously, bioassay showed that crude extracts containing C6, C7 and C9 significantly increased the fraction of quiescence at 25℃.【Conclusion】Several ascarosides were involved in the regulation of stress-induced sleep at low temperature in *B. xylophilus*.

Key words: pinewood nematode; low temperature; ascarosides; sleep

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle 是世界农林重大害虫之一,是松树 (Mamiya, 1983)。松材线虫传播到欧亚国家后便迅

收稿日期 (Received): 2019-02-15 接受日期 (Accepted): 2019-07-30

基金项目: 国家自然科学基金(31572272); 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)

作者简介: 杨永昌, 男, 硕士研究生。研究方向: 植物保护。E-mail: yangyongchang@163.com

* 通信作者 (Author for correspondence), 郭艳琼, E-mail: guoyq1979@163.com; 赵莉茵, E-mail: zhaoll@ioz.ac.cn

速蔓延,大面积危害松林(Wingfield *et al.*, 1982, 1984),现已成为40多个国家的植物检疫对象(Dwinell, 1997; Rautapaa, 1986; Smith, 1985)。

目前,对睡眠机制的研究主要集中于秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (Raizen *et al.*, 2008)。相关研究发现,秀丽隐杆线虫的静息行为符合判断睡眠的标准:拥有静息行为、觉醒阈值增高、特定的姿势、睡眠剥夺促进入睡、由分子时钟调控的片段化睡眠等(Nelson & Raizen, 2013)。秀丽隐杆线虫的静息行为分为两类:发育阶段睡眠(developmental sleep, DTS)和压力诱导睡眠(stress-induced sleep, SIS)(Trojanowski & Raizen, 2016)。其中,引起细胞应激的环境因素也可以促进SIS,包括热应激、感染、饥饿、毒性物质等(Los *et al.*, 2013; Jones & Candido, 1999; Raizen *et al.*, 2008; You *et al.*, 2008),其睡眠历期也取决于环境因素作用的强度(Hill *et al.*, 2014)。秀丽隐杆线虫在应对环境应激压力时,除采取dauer滞育转型措施外,SIS对线虫适应应激压力也很重要(Fry *et al.*, 2016)。类似的,松材线虫遇到长期的干燥、低温、食物缺乏、种群密度增大等不利环境条件时,会形成LⅢ滞育虫态(赵莉茜, 2007),在突然施加的短期环境压力下,可以观察到松材线虫采取了另一种“假死”策略,而此现象研究甚少。

蛔甙(ascarosides)是一类重要的信息素(Von *et al.*, 2012),可诱导dauer形成并影响线虫聚集、交配等其他复杂行为。研究发现,秀丽隐杆线虫处于饥饿和繁殖交配期等不同状态时分泌的蛔甙的种类、浓度和不同种类蛔甙比例有很大区别(Kaplan *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012)。Butcher *et al.* (2007)研究发现,秀丽隐杆线虫在不同温度下分泌蛔甙的浓度不同并可诱导不同的行为反应。蛔甙在秀丽隐杆线虫中研究较多。

葡萄糖、海藻糖、山梨糖醇和甘油等小分子抗冻物质常被线虫用来作为抗寒保护剂,其中海藻糖是最重要的一类(Ash *et al.*, 1986; Grewal *et al.*, 2002)。然而,迄今为止,有关蛔甙在松材线虫中的功能作用仅有与松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope 互作的少量报道(Zhao *et al.*, 2014, 2016)。温度作为生态环境的重要组成因子,深刻影响松材线虫的生态分布,其世代时间随着适温区温度的下降而延长(Zhao *et al.*, 2007)。线虫采取耐冻型和

避冻型2种耐寒策略应对低温胁迫作用,如马铃薯腐烂线虫 *Ditylenchus destructor* 以幼虫形式在土壤中越冬(林茂松, 1999)、海藻糖等低分子量抗冻保护物质在线虫体内聚集(Ash *et al.*, 1986; Grewal *et al.*, 2002)。本研究探讨了低温环境应激压力下,松材线虫的静息行为、糖醇含量变化和线虫蛔甙分泌种类及含量的变化,研究了不同种类、浓度的蛔甙对松材线虫静息行为的作用,以期为进一步阐明松材线虫种内互作的化学与分子机制提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 供试松材线虫来源与培养方法

供试松材线虫均取自浙江省富阳市的疫木,通过贝尔曼漏斗法(Baermann, 1917)分离线虫,并在中国科学院动物研究所农业虫鼠害综合治理国家重点实验室使用常规马铃薯葡萄糖(potato dextrose agar, PDA)培养基接种灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 并进一步扩大培养。

同步化繁殖型线虫样品制备:待灰葡萄孢菌长满90 mm PDA培养基时,接入混合龄松材线虫,置于25℃黑暗条件培养4~5 d。采用15 mL磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered solution, PBST)冲洗PDA培养基2~3遍,制得混合龄松材线虫悬液,并收集于90 mm玻璃培养皿内静置4~6 h。待松材线虫虫卵粘附在培养皿上,将含松材线虫的悬浮液丢弃,并用PBST缓冲液温和冲洗2~3次,取适量PBST缓冲液于培养皿内,以水位不超过3 mm为宜。24 h后,3000 r·min⁻¹离心2 min即得到同步化2龄幼虫(L₂)。分别将同步化L₂幼虫置于灰葡萄孢PDA培养基培养1、2、3 d,采用贝尔曼漏斗法收集并离心即得到同步化3龄幼虫(L₃)、4龄幼虫(L₄)和成虫。

1.2 线虫分泌粗提物的制备

使用50 mL锥形瓶大麦培养基接种灰葡萄孢菌,待菌生长17 d后,接种松材线虫悬液200 μL,25℃人工气候箱培养8~10 d,此时大量线虫转移到锥形瓶壁上。用30 mL蒸馏水将线虫冲出后,将洗脱液收集到15 mL离心管中,室温13300 r·min⁻¹离心15 min,收集上清液于新15 mL离心管中,用旋转蒸发器浓缩至蒸干,加入1 mL乙醇重溶,室温13300 r·min⁻¹离心15 min,收集上清液于0.22 μm针式过滤器(millipore)过滤后,-80℃保存备用。

1.3 低温胁迫处理

PBST 缓冲液清洗同步化 L_2 、 L_3 、 L_4 和成虫 3~4 遍后,分别取各龄期线虫 100 头置于含 3 mL PBST 缓冲液的培养皿中(直径 35 mm),并放到 4 °C 人工气候箱中,作为处理组;取相同处理的各龄期线虫放到 25 °C 人工气候箱中,作为对照组。每组 10 次重复。处理 48 h 后置于体视显微镜下观察计数,DP72 摄像拍照记录。

1.4 松材线虫糖及多元醇含量测定

样品制备:采用蔗糖悬浮法将接种灰葡萄孢菌的 PDA 培养基中冲出的松材线虫与其他杂质分离后(Freckman *et al.*, 1975),混匀,分为 3 份,其中 1 份用旋转蒸发器蒸干后称线虫干重,其余 2 份分别作为低温胁迫处理和对照,每组设置 5 个重复。处理 48 h 后,3000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min 收集线虫于 2 mL 离心管中,自动研磨仪破碎 90 s,加入色谱纯甲醇 700 μL 后,充分震荡 30 s,加入 80 μL 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 核糖醇内标后充分震荡 60 s,70 °C 水浴 20 min 后,11000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min;取上清 150 μL 置于 1.5 mL 离心管中,旋转蒸发器蒸干,加入 40 μL methoxyamination reagent (20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich),37 °C、120 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床震荡 3 h,再加入 70 μL 三氟乙酰胺,37 °C、120 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床震荡 1.5 h,待样品充分衍生化后,加入 300 μL ddH_2O ,500 μL 色谱纯异辛烷,充分震荡后离心,取上清液用无水硫酸钠过滤后置于样品瓶中,-80 °C 保存备用。

上机检测:使用气相色谱质谱(GC: Agilent 6890N, MSD: 5973)进行定性定量。具体色谱条件:载气为氦气,流速设置为 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;色谱柱(型号 HP-5,60 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm}$,0.25 μm)自动进样,进样量 1 μL ,无分流进样,进样口温度 230 °C。升温程序为:70 °C 保持 5 min,5 °C $\cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 310 °C,保持 12 min,快速降温至 70 °C 后保持 5 min。

1.5 松材线虫蛔甙含量测定

样品制备:与 1.4 中类似,采用蔗糖悬浮法清洗线虫后,混匀,分为 3 份,其中 1 份用旋转蒸发器蒸干后称线虫干重,其余 2 份分别作为低温胁迫处理和对照(以 ddH_2O 替代 PBST 缓冲液)。处理 48 h 后,3000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min,收集上清液于 1.5 mL 离心管中,弃线虫,旋转蒸发器蒸干后,加入 700 μL 色谱纯乙醇重溶,-80 °C 保存备用。

上机检测:样品先经 ZORBAX_SB-Aq 液相色谱柱(2.1 $\text{mm} \times 100 \text{ mm}$,3.5 μm)分离后,进入 LTQ Orbitrap 系统分析。样品在色谱柱上的洗脱梯度是 8%~100% 甲醇(另一相为 2% 甲醇、0.1% 甲酸)洗脱 15 min,洗脱速度为 250 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。质谱参数:一级质谱 Orbitrap 扫描范围是 90~400 $\text{m} \cdot \text{z}^{-1}$,一级质谱里选取 141、155、153、169、197、195 $\text{m} \cdot \text{z}^{-1}$ 进行二级质谱 LTQ-CID 碰撞模式,标准化碰撞能量 50%,活化 q 值 0.25,活化时间 10 ms。

1.6 生物测定

在 25 °C 条件下,以 700 μL 1% 琼脂(agar)为载体,将粗提物、蛔甙 C5、C6、 ΔC6 、C7、C9 和 ΔC9 涂抹于 agar 载体表面,超净台吹干后加入约 50 头松材线虫成虫,同时以蒸馏水涂抹 1% agar 作对照。蛔甙 C5、C6、 ΔC6 、C7、C9 和 ΔC9 浓度分别为 100、10、1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,10 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\text{fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 10 $\text{amol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每组设 3 个重复。蛔甙处理 18 h 后置于体视显微镜下计数,并用 DP72 拍照记录。

1.7 数据处理

数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,采用 Turkey 多重比较法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 低温对松材线虫静息率的影响

通过对低温条件下不同龄期的松材线虫的静息率比较,结果显示,与 25 °C 对照相比,4 °C 条件下, L_2 、 L_3 、 L_4 和成虫的静息率大幅提升,具体表现为活动减少、进食停止、形态上呈 C 型、对刺激的反应降低等。其中, L_3 对低温最为敏感,低温处理后的静息率最高,达到 73.70%,而 L_2 和成虫对低温的敏感度较 L_3 低,分别为 53.43% 和 55.80%;但是,成虫在 25 °C 条件下几乎不表现出静息状态,因此与对照组相比,成虫的静息表型差异最大,为对照的 30.09 倍,而 L_2 、 L_3 、 L_4 在常温条件下仍有少量静息虫态,所以与对照差异较小,分别为对照的 5.29、5.67、8.73 倍(图 1)。

2.2 低温对松材线虫体内糖、醇含量的影响

如图 2 所示,低温胁迫处理能诱导松材线虫中海藻糖合成,其海藻糖含量显著高于 25 °C 常温处理组,约为对照的 2.32 倍;而山梨糖醇、葡萄糖和甘油含量与对照均无明显差异。

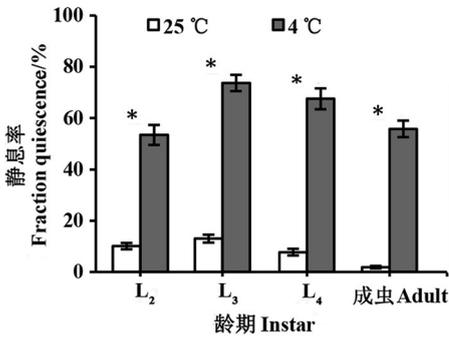


图 1 低温对松材线虫静息率的影响

Fig.1 Effects of low temperature on fraction quiescence of pinewood nematode

* 表示在 0.05 水平差异显著。

* indicated significant difference at 0.05 level.

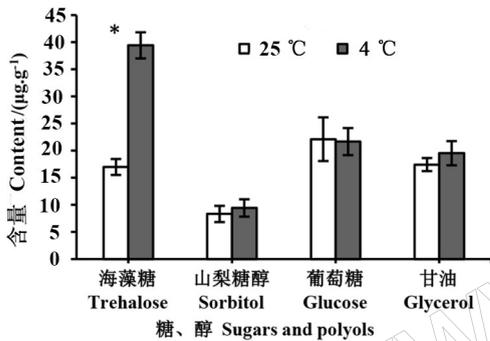


图 2 低温对松材线虫糖、醇含量的影响

Fig.2 Effects of low temperature on free sugars and polyols of pinewood nematode

* 表示在 0.05 水平差异显著。

* indicated significant difference at 0.05 level.

2.3 低温对松材线虫蚬甙分泌的影响

通过测定 6 种蚬甙 (C5、C6、 Δ C6、C7、C9 和 Δ C9) 在常温下 (25 °C) 的分泌模式及在 4 °C 低温条件下分泌量的变化。结果显示, C5、C6、 Δ C6、C7、C9 和 Δ C9 中, C5 含量最高, 浓度达到 $371.14 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, C6、C7 和 Δ C6 含量次之, 为 $77.21, 16.45, 8.10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, Δ C9 分泌的最少, 仅为 $0.31 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, C9 常温下几乎不分泌; 低温条件下, 除 C9 外, 其余蚬甙的含量均大幅下降, 其中, C5 和 C6 分别为对照的 4.36% 和 15.30%。值得注意的是, Δ C6、C7 和 Δ C9 在低温胁迫条件下停止分泌或者分泌含量低于仪器检测限, 几乎检测不到; 而 C9 在低温下开始分泌, 可能与松材线虫在低温条件下的滞育有关 (图 3)。

2.4 粗提物对松材线虫静息率的影响

如图 4 所示, 粗提物处理后, 松材线虫的静息率在 6~9 h 内较对照迅速升高, 在 9 h 时静息率最

高, 约为 100%; 之后在 9~12 h 中静息率维持在 100% 左右; 约 3 h 之后, 静息率逐渐下降, 在 27 h 时, 达到最低值, 仅为 1.10%。为了探究粗提物对从静息状态恢复的线虫的影响, 我们取 27 h 时一部分的恢复线虫再次进行粗提物处理, 结果显示, 其静息率在 1 h 内提升到最大值, 但仅为初次粗提物处理的一半, 达到了 50.15%。之后, 进入稳定时期, 松材线虫静息率随时间变化比较稳定。本实验也做了未加松材线虫的灰葡萄孢菌大麦培养基的粗提物对松材线虫静息率的影响, 结果显示, 其静息率维持在一个极低的水平。

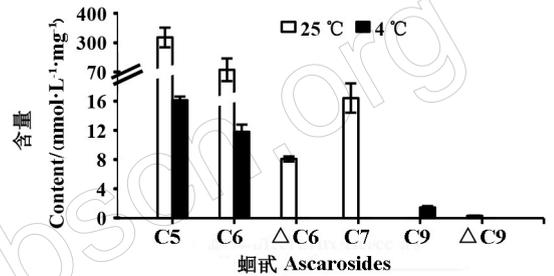


图 3 低温对松材线虫蚬甙含量的影响

Fig.3 Effects of low temperature on ascarosides of pinewood nematode

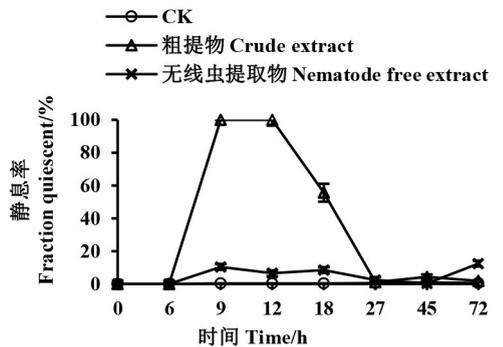


图 4 粗提物对静息率的影响

Fig.4 Effects of crude extracts on fraction quiescence of pinewood nematode

2.5 蚬甙对松材线虫静息率的影响

蚬甙静息率曲线 (图 5) 表明: 松材线虫对不同浓度的蚬甙静息表现不同。结果显示, 线虫对 C6、C9 和 Δ C9 的感受随着浓度变化具有基本相同的模式, 随着蚬甙浓度降低, 松材线虫的静息率呈现先上升后下降的趋势: 在 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时静息率达到最高点, 其中, C6 和 C9 效果较明显, 静息率为 47.36% 和 49.93%。而 C7 则呈现为另一种模式, 随着 C7 浓度降低, 松材线虫静息率持续升高: 在 $10 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时达到最大值 61.08%。

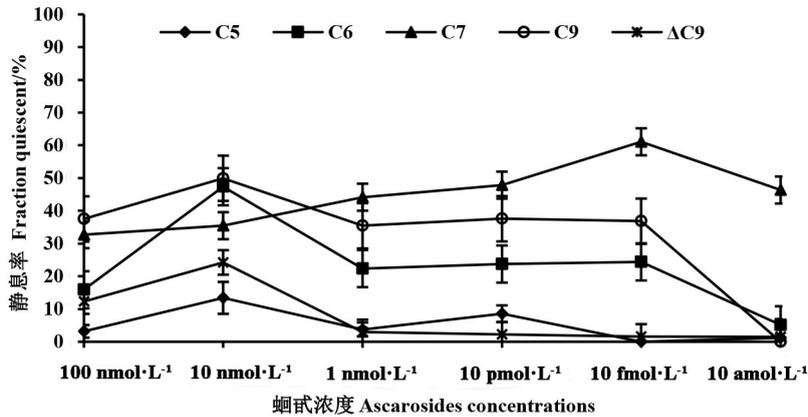


图 5 蛔甙对松材线虫静息率的影响

Fig.5 Effects of ascarosides on fraction quiescence of pinewood nematode

3 讨论与结论

本研究表明, L_2 、 L_3 和 L_4 在常温条件下存在一定数量的静息虫态, 这可能与一些线虫正处于龄期末的脱皮阶段 (Raizen *et al.*, 2008) 即 DTS 静息状态有关, 使松材线虫幼虫的静息率存在一定的本底水平, 与此相对地, 成虫在 25 °C 时几乎不存在静息虫态。研究表明, 低温胁迫作为一类应激条件可以诱导较多数量松材线虫进入 SIS 静息状态; 而糖醇测定结果则表明, 松材线虫通过增加海藻糖等抗冻物质合成的策略来降低过冷却点, 增强其耐寒性。

此外, 本研究表明, 松材线虫分泌粗提物中存在诱导线虫进入静息状态的信息物质。低温处理后, 松材线虫开始分泌 C9, 表明 C9 可能在诱导松材线虫进入静息状态或在低温条件下诱导其他蛔甙含量变化起着关键作用; 其他 5 种蛔甙 (C5、C6、 Δ C6、C7 和 Δ C9) 的含量均大幅下调, 其中 C7 和 Δ C9 停止分泌, 可能在诱导静息信号传导中起重要作用。而蛔甙静息实验证明, C6、C7、C9 和 Δ C9 为静息诱导信号分子, 松材线虫对 C5、C6、C9 和 Δ C9 的感受具有基本相同的模式, 在较高浓度作用较为明显; C7 在高浓度时诱导作用也较明显, 但是在较低浓度时与之相反, 松材线虫静息率反而有增高的趋势。值得注意的是, 任意单一一种蛔甙都无法解释低温下蛔甙种类及浓度变化对 SIS 的诱导现象, 由此可见, 可能 C5、C6、C7 和 C9 与 C7 共同参与了对松材线虫耐寒性的调控, C7 与其他种类蛔甙在静息调控方面是一种拮抗关系, 而 C7 在其中起主导作用, 在低温胁迫作用后, C5、C6、C7 和 C9 含量大幅下调, 解除了对 C7 的抑制作用。结果 C7 浓度虽然同样下降, 但其他蛔甙的抑制解除反而使松材线虫进入 SIS, 表现

出对低温的适应。因此, 有待进一步阐明蛔甙对松材线虫压力诱导睡眠行为的作用, 并揭示其内在分子机制。

参考文献

- 林茂松, 文玲, 方中达, 1999. 马铃薯腐烂线虫与甘薯茎线虫病. *江苏农业学报*, 15(3): 186-190.
- 赵莉茜, 2007. 线虫自然扩散及诱导进入扩散周期的化学信息机制. 博士学位论文. 北京: 中国科学院大学.
- ASH C, ATKINSON H J, 1986. *Nematodirus battus*: development of cold hardiness in dormant eggs. *Experimental Parasitology*, 62(1): 24-28.
- BAERMANN G, 1917. Eine einfache methode zur auffindung von ankylostomum (Nematoden) larven in erdproben. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië*, 57: 131-137.
- BUTCHER R A, FUJITA M, SCHROEDER F C, CLARDY J, 2007. Small-molecule pheromones that control dauer development in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Chemical Biology*, 3(7): 420-422.
- DWINELL L D, 1997. The pinewood nematode: regulation and mitigation. *Annual Review of Phytopathology*, 35(1): 153-166.
- FRECKMAN D W, MANKAU R, FERRIS H, 1975. Nematode community structure in desert soils nematode recovery. *Journal of Nematology*, 7(4): 343-346.
- FRY A L, LABOY J T, HUANG H, HART A C, NORMAN K R, 2016. A conserved GEF for rho-family GTPases acts in an EGF signaling pathway to promote sleep-like quiescence in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 202(3): 1153-1166.
- GREWAL P S, JAGDALE G B, 2002. Enhanced trehalose accumulation and desiccation survival of entomopathogenic nematodes through cold preacclimation. *Biocontrol Science and Technology*, 12(5): 533-545.

- HILL A, MANSFIELD R, LOPEZ J N G, RAIZEN D M, VAN B C, 2014. Cellular stress induces a protective sleep-like state in *C. elegans*. *Current Biology*, 24(20): 2399–2405.
- JONES D, CANDIDO E P, 1999. Feeding is inhibited by sublethal concentrations of toxicants and by heat stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*: relationship to the cellular stress response. *Journal of Experimental Zoology*, 284(2): 147–157.
- KAPLAN F, SRINIVASAN J, MAHANTI P, AJREDINI R, DURAK O, NIMALENDRAN R, STERNBERG P W, TEAL P E A, SCHROEDER F C, EDISON A S, ALBORN H T, 2011. Ascaroside expression in *Caenorhabditis elegans* is strongly dependent on diet and developmental stage. *PLoS ONE*, 6(3): e17804.
- LOS F C O, HA C, AROIAN R V, 2013. Neuronal gox and CAPS regulate behavioral and immune responses to bacterial pore-forming toxins. *PLoS ONE*, 8(1): e54528.
- MAMIYA Y, 1983. Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology*, 21(1): 201–220.
- NELSON M D, RAIZEN D M, 2013. A sleep state during *C. elegans* development. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(5): 824–830.
- PARK D, O'DOHERTY I, SOMVANSHI R K, BETHKE A, SCHROEDER F C, KUMAR U, RIDDLE D L, 2012. Interaction of structure-specific and promiscuous G-protein-coupled receptors mediates small-molecule signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 9917–9922.
- RAIZEN D M, ZIMMERMAN J E, MAYCOCK M H, TA U D, YOU Y, SUNDARAM M V, PACK A I, 2008. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*, 451: 569–572.
- RAUTAPÄÄ J, 1986. Experiences with *Bursaphelenchus* in Finland. *EPPO Bulletin*, 16(3): 453–456.
- REA S L, 2005. Metabolism in the *Caenorhabditis elegans* Mit mutants. *Experimental Gerontology*, 40(11): 841–849.
- SMITH I M, 1985. Pests and disease problems in European forests. *FAO Plant Protection Bulletin*, 33(4): 159–164.
- TROJANOWSKI N F, RAIZEN D M, 2016. Call it worm sleep. *Trends in Neurosciences*, 39(2): 54–62.
- VON REUSS S H, BOSE N, SRINIVASAN J, YIM J J, JUDKINS J C, STERNBERG P W, SCHROEDER F C, 2012. Comparative metabolomics reveals biogenesis of ascarosides, a modular library of small-molecule signals in *C. elegans*. *Journal of the American Chemical Society*, 134(3): 1817–1824.
- WINGFIELD M J, BLANCHETTE R A, NICHOLLS T H, 1984. Is the pine wood nematode an important pathogen in the United States? *Journal of Forestry*, 82(4): 232–235.
- WINGFIELD M J, BLANCHETTE R A, NICHOLLS T H, ROBINS K, 1982. The pine wood nematode: a comparison of the situation in the United States and Japan. *Canadian Journal of Forest Research*, 12(1): 71–75.
- YOU Y J, KIM J, RAIZEN D M, AVERY L, 2008. Insulin, cGMP, and TGF-beta signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: a model for satiety. *Cell Metabolism*, 7(3): 249–257.
- 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, KULHAVY D L, ZHANG X, SUN J, 2007. Low temperature induces two growth-arrested stages and change of secondary metabolites in *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*, 9(5): 663–670.
- ZHAO L, ZHANG X, WEI Y, ZHOU J, ZHANG W, QIN P, CHINTA S, KONG X, LIU Y, YU H, HU S, ZOU Z, 2016. Ascarosides coordinate the dispersal of a plant-parasitic nematode with the metamorphosis of its vector beetle. *Nature Communications*, 7: 12341.

(责任编辑: 郑姗姗 郭莹)