

陈阳雪,赵晓佳,谈家金.松树内生细菌 GD2 对松材线虫入侵寄主时转录组的影响[J].华中农业大学学报,2021,40(5):37-45.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.05.006

松树内生细菌 GD2 对松材线虫入侵寄主时转录组的影响

陈阳雪,赵晓佳,谈家金

南京林业大学林学院,南京 210018

摘要 为了进一步阐明细菌在松材线虫病中的作用,采用松材线虫(CK)和松材线虫与马尾松内生细菌 GD2 的混合物(T)分别接种马尾松,对松材线虫进行转录组测序、Gene Ontology(GO)及 KEGG 富集分析,并利用 Real-time Quantitative PCR(RT-qPCR)验证目标基因表达情况。结果显示,与对照组(空白虫)CK 相比,共筛选到 143 个差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs),其中有 63 个上调基因,80 个下调基因。Gene Ontology 分析显示,差异表达基因在免疫系统过程、细胞膜、代谢过程、转运活性等功能类富集。KEGG 通路在 ECM-receptor 互作、肾素-血管紧张素、糖酵解、胰岛素信号等通路富集。这些 GO 功能与 KEGG 通路涉及机体的免疫调节。选取 8 个基因进行 RT-qPCR 验证,表达水平与测序结果一致,证明了测序结果的准确性。表明菌株 GD2 可以通过提高松材线虫的免疫调节能力来影响松材线虫病的发生。

关键词 转录组分析;松材线虫;马尾松内生细菌 GD2;差异表达基因;线虫-细菌微生态

中图分类号 S 763 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)05-0037-09

松材线虫是一种危险性极高的外来有害生物,由它引起的松材线虫病是一种毁灭性的森林病害^[1]。松材线虫病可使易感病松树在感染松材线虫后 2~3 个月内发生枯萎死亡^[2]。自 1905 年在日本大暴发以来,该病害在世界各地被发现,截至目前该病已在欧亚和北美等多个国家或地区被发现和报道^[3-4]。亚洲是松材线虫病流行危害最严重的地区,其中中国是目前遭受松材线虫病威胁最严重的国家,病害已经在中国 10 多个省造成了大面积松树死亡,现有 6 000 万 hm² 松林正面临着松材线虫病大流行的威胁^[5]。经统计,该病害目前已在我国危害马尾松(*Pinus massoniana*)、油松(*P. tabulaeformis*)、赤松(*P. densiflora*)、华山松(*P. armandii*)、黑松(*P. thunbergii*)等 50 多种松科松属树种和落叶松(*Larix olgensis*)、云杉(*Picea asperata*)、冷杉(*Abies fabri*)等 10 多种非松属树种^[6],对森林生态系统造成严重的破坏,也造成了严重的经济损失。

松材线虫病由松材线虫、寄主、传播媒介、细菌真菌和环境等多个因素构成了其复杂的病害系统,因此松材线虫的致病机制尚未完全弄清^[7]。目前,

国内外学者对松材线虫病的研究工作主要以松材线虫为病原展开^[1,8-10]。近年来,已有研究显示松材线虫致病作用是松材线虫与其共生细菌共同致病^[11]。Kawazu 等^[12-15]、洪英娣等^[16-17]从松材线虫体表分离出细菌,并通过接种试验表明松材线虫与其伴生细菌共同导致松材线虫病。但是细菌在这种复杂病害中的特定参与特性仍然存在争议。Wang 等^[18]、He 等^[19]、Xue 等^[20]通过转录组测序研究了细菌对松材线虫基因表达的影响,发现细菌对松材线虫的致病相关基因有一定的影响。这些对于深入研究细菌在松材线虫病中的作用提供了重要的实验依据。菌株 GD2 是课题组前期从马尾松体内分离的内生细菌,初步研究显示其在松材线虫致病过程中发挥着重要作用^[21]。本研究拟进一步探讨在松材线虫入侵寄主建立适应性的过程中,菌株 GD2 对线虫转录组的影响,这对全面认识松材线虫的致病机理和松材线虫-细菌微生态系统具有重要的理论意义。

1 材料与方法

1.1 材料处理

供试菌株为马尾松内生细菌 GD2。供试松材

收稿日期:2021-02-05

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1200400)

陈阳雪,E-mail:749873382@qq.com

通信作者:谈家金,E-mail:tanjiabin@njfu.edu.cn

线虫 AA3, 分离自安徽的感病黄山松(*P. taiwanensis*)。虫株由南京林业大学森林病理实验室提供。供试松苗为生长较一致的 2 年生马尾松(中国, 广西), 由江苏沂北园林苗木有限公司提供。

将松材线虫 AA3 接种到长满新鲜灰葡萄孢的 PDA 平板上, 置于 25 °C 培养 6 d 后, 采用贝尔曼漏斗法分离。将线虫液收集到无菌的 15 mL 离心管中, 3 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 用 0.1% 硫酸链霉素处理 15 min, 用无菌水冲洗离心 3 次。将松材线虫调成浓度为 15 000 条/mL 的虫悬液。

用接种环挑取 1 环菌株 GD2 的新鲜单菌落, 接入含有 20 mL NB 培养液的锥形瓶中, 27 °C、200 r/min 振荡摇培 12 h, 置入无菌的 50 mL 离心管中, 6 500 r/min 离心 3 min, 弃上清, 无菌去离子水洗 3 次。将菌体用无菌水重悬制成菌悬液(浓度为 5×10^7 CFU/mL)。

线虫 AA3 与菌株 GD2 预处理后, 采用皮接法^[22]接种到 2 年生马尾松。设 3 个处理, 1 个对照, 每处理接种 13 棵马尾松: (1) AA3+GD2(T): 接种 1 mL 虫悬液和 1 mL 菌悬液; (2) AA3(CK): 接种 1 mL 虫悬液和 1 mL 无菌去离子水; (3) 菌株 GD2: 接种 1 mL 菌悬液和 1 mL 无菌去离子水; (4) AG: 接无菌去离子水共 2 mL。放于温室 25 °C 培养, 24 h 后将接种无菌水(AG)、AA3(CK)、AA3+GD2(T)的马尾松接种点部位剪下, -80 °C 保存备用。每个处理各 3 个生物学重复。剩余的马尾松每 7 d 观察接种寄主的感病症状, 统计感病率和感病指数。根据病害分级标准和参照 Yu 等^[23]方法计算感病指数。马尾松的感病严重程度分为 5 个级别, I 级: 植物针叶绿色, 健康生长, 代表值 0; II 级: 0~25% 针叶褪绿变黄, 代表值 1; III 级: 25%~50% 针叶褪绿变黄, 枝头弯曲, 代表值 2; IV 级: 50%~70% 针叶褪绿变黄, 枝头下垂, 代表值 3; V 级: 75%~100% 针叶失绿褐变, 植株枯萎死亡, 代表值 4。计算公式如下:

$$\text{感病率} = (\text{感病株数} / \text{接种株数}) \times 100\%$$

$$\text{感病指数} = [\sum(\text{各级病树株数} \times \text{代表值}) / (\text{总株数} \times \text{发病最高级代表值})] \times 100$$

1.2 总 RNA 提取、文库构建及测序

将前面 -80 °C 保存备用的样品采用 Omin-Plant RNA kit(DNase I)(CWBIO)法提取各处理组的总 RNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 2100

Bioanalyser (Agilent)、ND-2000 (NanoDrop Technologies)方法检测 RNA 样品的质量。RNA 文库的建立采用 TruSeq™ RNA sample preparation Kit(Illumina, San Diego, CA)试剂盒。使用 IlluminaNovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。数据已提交 NCBI, 登录号为 PRJNA690180。

1.3 数据处理

首先将测得马尾松(AG 组)的 Raw reads 先进行过滤处理得到 Clean reads, 再用 CK 组和 T 组的 Raw reads 直接比对马尾松的 Clean reads, 去除比对上的 reads, 将剩下的 reads 经过滤后比对到参考基因组松材线虫基因组(参考基因组版本: GCA_000231135.1; 参考基因组来源: https://parasite.wormbase.org/Bursaphelenchus_xylophilus_prjea64437/Info/Index)进行序列比对。

1.4 生物信息学分析

使用 FPKM (Fragments Per Kilobases per Millionreads)软件进行定量计算获得基因的表达量, 再用软件 DESeq2 进行差异基因分析, 并用 BH (fdr correction with Benjamini/Hochberg)进行多重检验。将 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 0.585$ 设为条件筛选差异表达基因并进行 GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)、COG (clusters of orthologous groups, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog-project/>)以及 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>)分析。

1.5 实时荧光定量 PCR 验证差异基因

选取 8 个差异表达基因(5 个上调基因、3 个下调基因), 利用 SIGMA 在线设计软件(<http://www.oligoarchitect.com/LoginServlet>)为 8 个差异表达基因设计引物(表 1), 以松材线虫肌动蛋白基因 Actin(GenBank EU100952)为内参基因, 每个样品 3 个技术学重复, 3 个生物学重复, 并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法分析数据。

2 结果与分析

2.1 菌株 GD2 影响松材线虫病的发生

温室接种试验表明, 菌株 GD2 增强了松材线虫在马尾松中的致病力。AA3 处理组、GD2+AA3 混合处理组都使 2 年生马尾松盆栽苗出现感病症状, 并且所致萎蔫症状一致, 均为针叶先褪色、黄化,

进而枯萎变成红褐色；而 GD2 处理组和对照无菌水处理组均保持健康，马尾松松针绿色。接种后 21 d，接种 AA3 的马尾松感病率为 20%，感病指数为 5，而混合接种 AA3 和菌株 GD2 的马尾松感病率达到 40%，感病指数为 10；接种后 42 d，AA3 处理组的感病率为 60%，感病指数 52.5，而 GD2+AA3 处理组的感病率为 70%，感病指数为 55(表 2)。

表 1 松材线虫 8 个差异表达基因的 qRT-PCR 引物

Table 1 The qRT-PCR primers for 8 differentially expressed genes of *Bursaphelenchus xylophilus*

基因 ID Gene ID	正向引物(5'-3') Forward primer	反向引物(5'-3') Reverse primer	通路 Pathway
BXY_0289500	GGAGGGCAACATGTCGATGA	TTCTCGAACTGCGCTGGAT	长寿调节通路 Longevity regulating pathway
BXY_1047600	ACCGAGAAGTTGTGCAGAGG	CAATTACCCGGTTTTGGCGT	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism
BXY_0706100	GATGCGTCCTCGTGAATCT	CATGATGGGCTCCACACCTT	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway
BXY_1767700	GTCATCTACTCCGGCGTCTG	TTGACCCACTTGATACCCGC	细胞色素 P450 对外源物质的代谢 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450
BXY_1558900	AGCAAAATCGATGCGGATGC	AAGAAGCCTCCGGTGATGTG	ECM-receptor 相互作用 ECM-receptor interaction
BXY_0512100	CGGGCGCTAATTTGTCGAAG	CCCGTTTCAAAACGTCCACC	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism
BXY_0841800	AGCTCCAACAATCCGAGCAA	CCTCAATGTTCCCGACCACA	细胞凋亡 Apoptosis
BXY_1285800	CACCGCTTCGTATCCACCTT	CACCGCTTCGTATCCACCTT	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism
EU100952	GCAACACGGAGTTCGTTGTA	GTATCGTCACCAACTGGGA	

表 2 接种不同处理的松材线虫的马尾松的感病率和感病指数

Table 2 Disease incidence and disease index (DI) of *Pinus massoniana* inoculated with different treatments of *Bursaphelenchus xylophilus*

接种时间/d Inoculation time	AA3		AA3+GD2		GD2		CK	
	感病率/% Disease incidence	感病指数 Disease index	感病率/% Disease incidence	感病指数 Disease index	感病率/% Disease incidence	感病指数 Disease index	感病率/% Disease incidence	感病指数 Disease index
7	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
21	20	5.0	40	10.0	0	0	0	0
28	50	12.5	60	15.0	0	0	0	0
35	60	35.0	60	35.0	0	0	0	0≥
42	60	52.5	70	55.0	0	0	0	0

2.2 差异表达基因的筛选

对含松材线虫的 RNA 样本进行转录组测序，去除比对到的马尾松 reads，剩下的 reads 经过滤后得到的 clean reads 质量达到 Q20 以上的碱基比例大于 80%，达到 Q30 以上的碱基比例大于 85%，每个样本碱基 GC 含量较为一致，且测序碱基平均错误率均在 0.1% 以下，说明测序数据良好(表 3)。将过滤后的数据与 rRNA 数据库进行比对(表 4)，再

利用 HISAT2 软件将质控后的原始数据，即 Clean reads，与参考基因组(https://parasite.wormbase.org/Bursaphelenchus_xylophilus_prjea64437/Info/Index)比对(表 5)。将 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 0.585$ 设为条件共筛选到 143 个差异表达基因，其中 63 个基因表达上调，80 个基因表达下调(图 1)。这些差异基因与内生细菌 GD2 协同松材线虫感染马尾松相关。

表 3 转录组序列质量统计表

Table 3 The data statistics for RNA-sequencing

Simple	Raw reads	Raw bases	Clean reads	Clean bases	Error rate/%	Q20/%	Q30/%	GC content/%
AG_1	69 094 090	10 433 207 590	68 474 232	10 138 658 713	0.023 1	98.82	96.13	45.39
AG_2	70 156 920	10 593 694 920	69 428 180	10 315 165 932	0.023 2	98.78	96.03	45.38
AG_3	70 659 004	10 669 509 604	69 690 428	10 356 025 568	0.023 4	98.67	95.74	45.40
CK_1	\	\	12 743 318	1 899 558 142	0.025 7	97.50	93.77	45.20
CK_2	\	\	20 109 334	2 990 725 616	0.024 7	97.93	94.62	48.51
CK_3	\	\	24 898 398	3 700 500 963	0.024 3	98.17	94.98	47.48
T_1	\	\	14 854 974	2 213 321 244	0.025 6	97.53	93.82	46.73
T_2	\	\	15 397 998	2 294 770 917	0.025 2	97.71	94.16	45.98
T_3	\	\	13 195 758	1 967 389 172	0.026 0	97.34	93.53	45.80

注 Note: Sample:样品名称; Raw reads:原始测序数据的总条目数; Raw bases:原始测序总数数据量; Clean reads:质控后测序数据的总条目数; Clean bases:质控后测序总数数据量; Error rate:碱基平均错误率; Q20、Q30:测序质量在 99%和 99.9%以上的碱基占总碱基的百分比; GC content:G 和 C 碱基总和占总碱基的百分比。

表 4 过滤后数据与 rRNA 数据库比对统计表

Table 4 Results of comparison with rRNA database

Simple	Clean reads	Clean bases	rRNA ratio/%
AG_1	68 474 232	10 138 658 713	0.633
AG_2	69 428 180	10 315 165 932	0.928
AG_3	69 690 428	10 356 025 568	2.563
CK_1	12 743 318	1 899 558 142	0.526
CK_2	20 109 334	2 990 725 616	3.664
CK_3	24 898 398	3 700 500 963	1.285
T_1	14 854 974	2 213 321 244	2.940
T_2	15 397 998	2 294 770 917	3.198
T_3	13 195 758	1 967 389 172	2.993

注 Note: Sample:样品名称; Clean reads:质控后测序数据的总条目数; Clean bases:质控后测序总数数据量; rRNA ratio(%):质控后数据与 rRNA 数据库的比对率。

表 5 序列与松材线虫参考基因组比对结果统计

Table 5 Results of comparison with the reference genome of *Bursaphelenchus xylophilus*

Simple	Total reads	Total mapped	Multiple mapped	Unique mapped
CK_1	12 743 318	139 138 (1.09%)	1 714 (0.01%)	137 424 (1.08%)
CK_2	20 109 334	1 286 176 (6.4%)	24 395 (0.12%)	1 261 781 (6.27%)
CK_3	24 898 398	7 191 705 (28.88%)	90 933 (0.37%)	7 100 772 (28.52%)
T_1	14 854 974	266 817 (1.8%)	7 029 (0.05%)	259 788 (1.75%)
T_2	15 397 998	1 653 700 (10.74%)	24 745 (0.16%)	1 628 955 (10.58%)
T_3	13 195 758	452 358 (3.43%)	9 042 (0.07%)	443 316 (3.36%)

注 Note: Sample:样本名称; Total reads:过滤后的序列数量统计(即 Clean reads); Total mapped:能定位到基因组上的 Clean reads 数目; Multiple mapped:在参考序列上有多个比对位置的 Clean reads 数目; Unique mapped:在参考序列上有唯一比对位置的 Clean reads 数目。

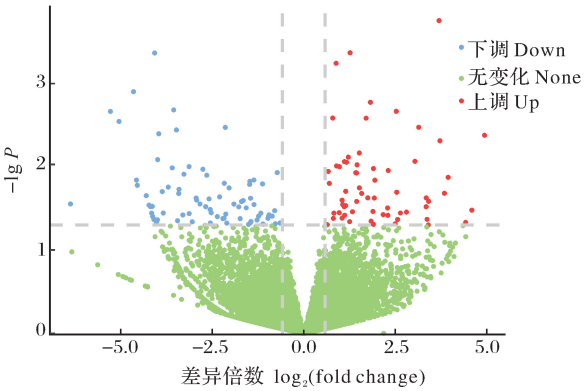


图 1 差异基因火山图

Fig.1 Differential gene volcano

2.3 差异基因 GO 分析

对差异表达基因进行 GO 功能注释与分类统计。差异基因被归类到 GO 3 个组分的 38 个功能分类中(图 2)。细胞组成(cellular component)中细胞组分(cell part)和膜组分(membrane part)最多, 分别有 52 个基因和 44 个基因;分子功能(molecular functions)中结合(binding)和催化活性(catalytic activity)最多, 分别有 60 个基因和 51 个基因, 生物代谢过程(biological processes)中细胞进程(cellular process)和代谢过程(metabolic process)最多, 分别有 48 个基因和 41 个基因。此外, 还检测到一些涉及先天免疫的生物过程, 如免疫系统过程、行为、对刺激的反应等。

2.4 差异表达基因 COG 数据库注释分析

将差异表达基因比对到 COG 数据库当中, 预测基因的功能并进行分类和统计, 可分为 16 类(图 3)。除了未知功能, 所占数量最多的功能是蛋白质翻译后修饰与转运, 分子伴侣(posttranslational modification, protein turnover, chaperones), 注释到

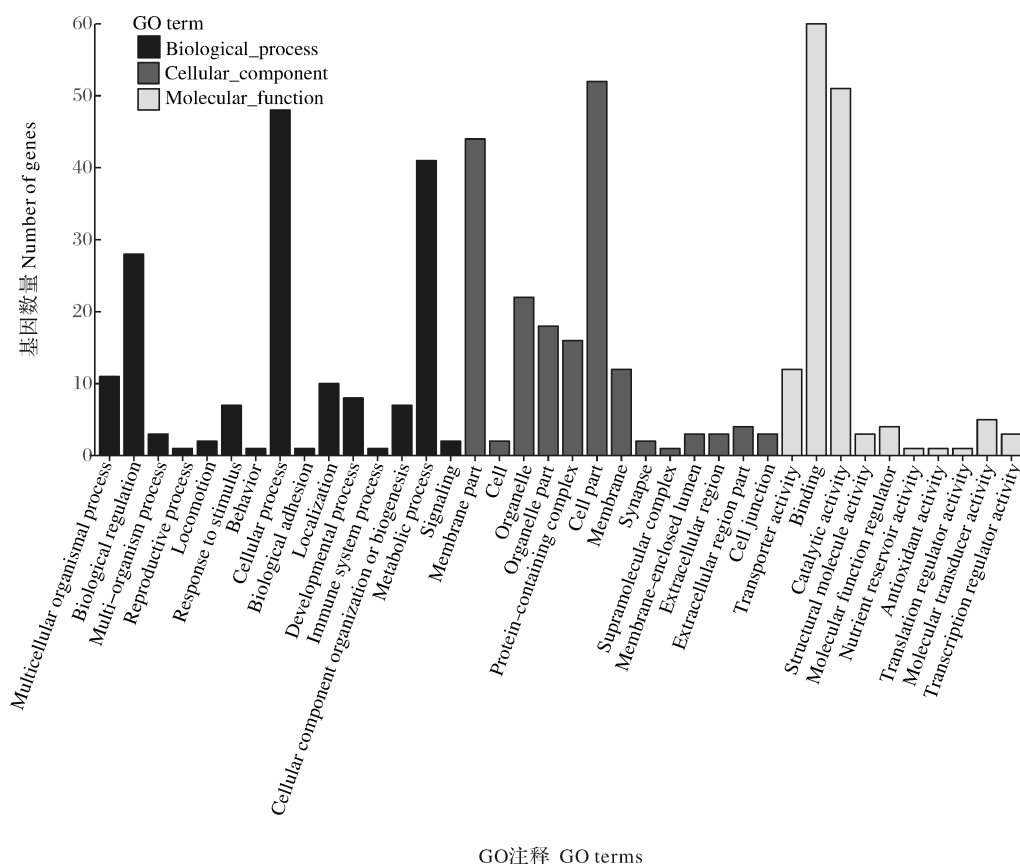


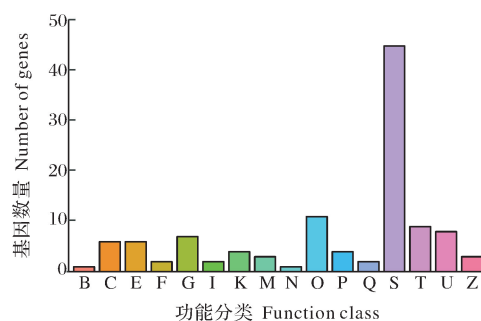
图 2 差异基因 GO 功能分析

Fig.2 GO functional analysis of differential gene

此类的差异基因有 11 个。其次是信号转导机制 (signal transduction mechanisms)、碳水化合物运输与代谢 (carbohydrate transport and metabolism) 和细胞内运输、分泌和囊泡运输 (intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport)。

2.5 差异基因 KEGG 功能分析

将差异表达基因进行 KEGG 生物通路富集分析,为挖掘细菌 GD2 增强松材线虫寄主适应性相关基因提供依据。全部差异表达基因共映射到 106 个代谢通路,图 4 显示了富集程度在前 50 的通路,其中新陈代谢 (metabolism)、有机系统 (organismal systems)、人类疾病 (human diseases) 涉及的通路最多。ECM-receptor 互作 (ECM-receptor interaction)、细胞凋亡 (cellular senescence)、肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system) 和 PPAR 信号通路 (PPAR signaling pathway)、AMPK 信号通路 (AMPK signaling pathway)、谷胱甘肽代谢 (glutathione metabolism) 等通路主要涉及机体的免疫调节、延长寿命和生长代谢。



B: 染色质结构和变化 Chromatin structure and dynamics; C: 能量生产和转化 Energy production and conversion; E: 氨基酸运输和代谢 Amino acid transport and metabolism; F: 核苷酸运输和代谢 Nucleotide transport and metabolism; G: 碳水化合物运输和代谢 Carbohydrate transport and metabolism; I: 脂质运输和代谢 Lipid transport and metabolism; K: 转录 Transcription; M: 细胞壁/膜/包膜生物发生 Cell wall/membrane/envelope biogenesis; N: 细胞运动 Cell motility; O: 蛋白质翻译后修饰与转运, 分子伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P: 无机离子转运与代谢 Inorganic ion transport and metabolism; Q: 次级代谢物的生物合成、运输和代谢 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; S: 功能未知 Function unknown; T: 信号转导机制 Signal transduction mechanisms; U: 细胞内运输、分泌和囊泡运输 Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; Z: 细胞骨架 Cytoskeleton.

图 3 差异基因 COG 注释分类统计

Fig.3 COG annotated classification statistics of differential gene

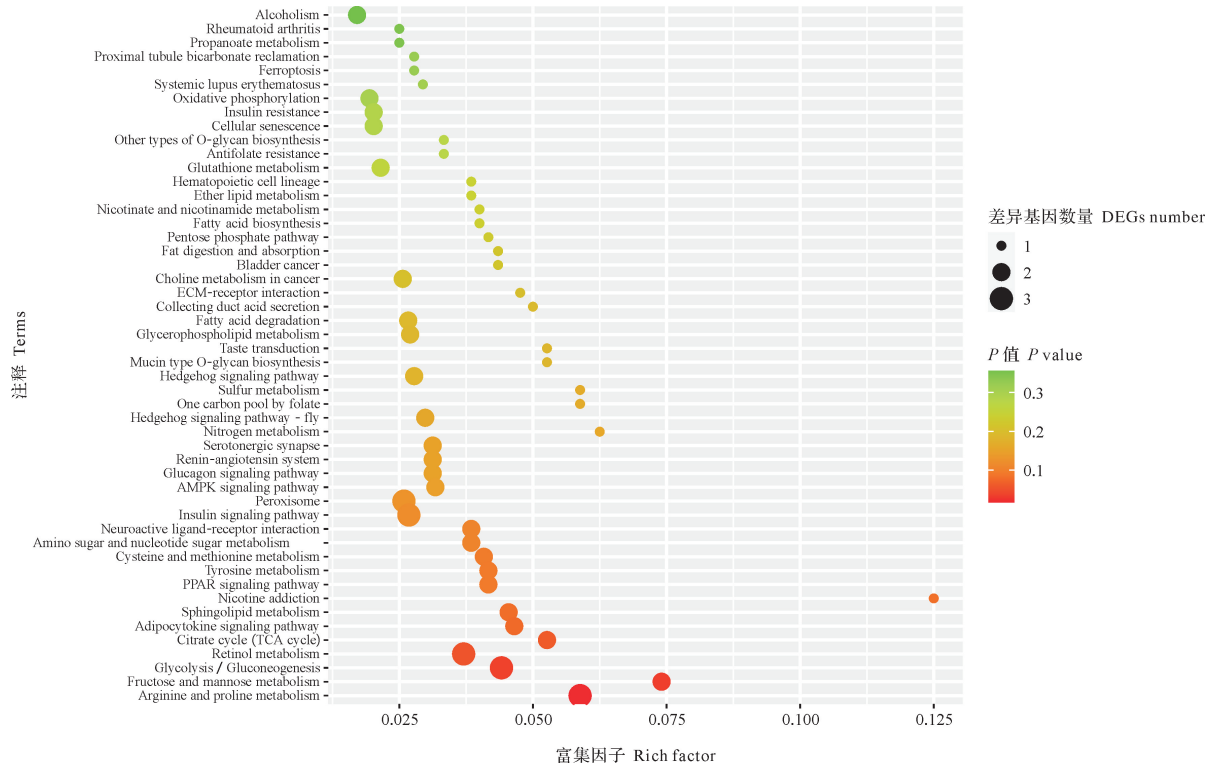


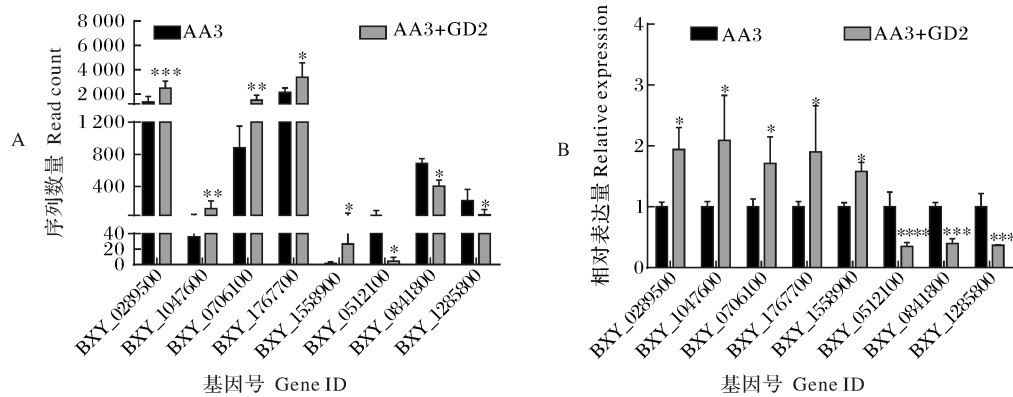
图 4 差异基因 KEGG 功能分类

Fig.4 KEGG functional classification of differential gene

2.6 qPCR 验证

通过 RT-qPCR 对 8 个表达丰度不同的转录本 (5 个上调和 3 个下调) 进行验证, 发现基因的 qPCR

验证结果与转录组中的趋势一致, 说明转录组测序数据较为准确, 可用于下一步研究 (图 5)。



A. 转录组所测 8 个差异表达基因 Read count 值; B. RT-qPCR 检测所得 8 个差异表达基因的相对表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。A. Read count of the 8 differentially expressed genes measured in the transcriptome; B. The relative expression levels of the 8 differentially expressed genes detected by RT-qPCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 5 荧光实时定量 PCR 检测转录组数据的准确性

Fig.5 Validation of RNA-seq results by quantitative real-time polymerase chain reaction

3 讨论

RNA 测序 (RNA-Seq) 是一种用高通量测序技

术进行测序分析的转录组测序技术, 目前已成为所有物种全基因组分析的第一方法, 而鉴定比较组间的差异表达基因是 RNA-Seq 最典型的应用^[24-25]。

尽管 RNA-Seq 是一项正在积极开发的技术,但它提供的基因关键功能仍使之成为目前最为广泛使用的测序技术^[26]。本研究通过转录组测序分析了细菌 GD2 对松材线虫入侵寄主马尾松 24 h 后的影响,但是我们发现松材线虫转录组序列与参考基因组的比对率比较低。原因可能是①没有确保每棵马尾松都准确接种到 15 000 条松材线虫;②在松材线虫接种到马尾松 24 h 后,没有将松材线虫用贝尔曼漏斗法漏下线虫进行 RNA 提取,而是直接将接种部位取下,这时候已经有部分线虫已经扩散到松树其他地方,再加上马尾松和松材线虫混样提取 RNA,所以导致提取的 RNA 里马尾松的 RNA 占比很大,只有较少的为松材线虫的 RNA;③由于混样提取 RNA,为了剔除马尾松的同源序列,我们将测得的松材线虫的 reads 与马尾松的 Clean reads 进行了比对,去除了比对上的 reads,将剩下的 reads 进行过滤后得到的松材线虫的 Clean reads 再与参考基因组比对。所以可能是松材线虫的 Clean reads 的基因覆盖度比较低,导致了松材线虫转录组序列与参考基因组的比对率比较低。

通过本次转录测序,从中筛选出 143 个差异表达显著的基因,并对这些差异基因进行 GO、COG 以及 KEGG 分析。

从 GO 功能注释可以看出,差异表达基因主要集中在代谢过程、结合、催化活性、膜等与药物的吸收、运输、代谢有关的功能,这些基因可能参与了外源有害物质(马尾松抗病反应中产生的植保素)的解毒作用。此外,涉及的 GO 功能免疫和行为是动物保护自己免受伤害的 2 种机制^[27]。这可能是松材线虫应对寄主的防御反应所产生的。

COG 功能注释结果表明,细菌 GD2 与松材线虫混合接种马尾松后,GD2 帮助线虫增强信号转导机制来感受寄主的防御反应,然后线虫通过改变自身的能量运输与代谢以及蛋白质翻译后修饰与转运等方面来加强对寄主的适应性。

对差异基因富集的 KEGG 通路进行分析,发现差异基因集中于视黄醇新陈代谢、酪氨酸代谢、果糖和甘露糖的代谢、鞘脂类代谢等代谢通路。可见细菌 GD2 对松材线虫的生长代谢产生了影响。此外,一些差异基因如 BXY_0706100 涉及的 PI3K-Akt 信号通路在与细菌互作及对抗逆境胁迫中发挥着重要作用^[28],涉及的胰岛素信号通路调节固有免疫^[29];BXY_1558900 涉及的 ECM-receptor 互作通

路被认为是免疫相关通路^[30];BXY_1767700 涉及的细胞色素 P450 对外源物质的代谢通路可催化杀虫剂、植物次生代谢物等外源物质的代谢,使生物体适应其生存环境或产生抗逆性^[31]。

本研究通过 RNA-Seq,初步揭示了接种马尾松后,马尾松内生细菌 GD2 对松材线虫转录组的影响,发现菌株 GD2 影响着松材线虫的 143 个基因,这些 DEGs 显著富集于一些与代谢、免疫相关的 GO、COG 类别和 KEGG 途径,这些与松材线虫的生命活动密切相关。推测菌株 GD2 在松材线虫抵御寄主的防御反应时增强了线虫的信号传导机制,刺激了线虫的免疫相关反应,提高了线虫的能量运输和对寄主所产生的次生代谢物代谢的能力,从而加重了松材线虫病的发生。这为进一步从分子层面弄清细菌增强松材线虫对寄主的适应性机制奠定了基础。

参考文献 References

- [1] TOMOYA K, YOZAN T. Inoculation experiments of a nematode, *Bursaphelenchus* sp., onto pine trees[J]. Journal of the Japanese forestry society, 1971, 53(7): 210-218.
- [2] 杨宝君. 松材线虫病致病机理的研究进展[J]. 中国森林病虫, 2002, 21(1): 27-31, 14. YANG B J. Advance in research of pathogenetic mechanism of pine wood nematode[J]. Forest pest and disease, 2002, 21(1): 27-31, 14 (in Chinese with English abstract).
- [3] 蒋敏, 黄斌, 余旭, 等. 松材线虫病的分布、危害及其防治对策[J]. 浙江林业科技, 2018, 38(6): 83-91. JIANG M, HUANG B, YU X, et al. Distribution, damage and control of pine wilt disease[J]. Journal of Zhejiang forestry science and technology, 2018, 38(6): 83-91 (in Chinese with English abstract).
- [4] PROENÇA D N, GRASS G, MORAIS P V. Understanding pine wilt disease: roles of the pine endophytic bacteria and of the bacteria carried by the disease-causing pinewood nematode[J/OL]. Microbiology open, 2017, 6(2): e00415 [2021-02-05]. <https://doi.org/10.1002/mbo3.415>.
- [5] 叶建仁. 松材线虫病在中国的流行现状、防治技术与对策分析[J]. 林业科学, 2019, 55(9): 1-10. YE J R. Epidemic status of pine wilt disease in China and its prevention and control techniques and counter measures[J]. Scientia silvae sinicae, 2019, 55(9): 1-10 (in Chinese with English abstract).
- [6] 王敏敏, 叶建仁, 潘宏阳. 松材线虫病致病机理和防治技术研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2006, 30(2): 103-107. WANG M M, YE J R, PAN H Y. Research advances of pathogenic mechanism and controlling technology for pine wood nematode disease[J]. Journal of Nanjing Forestry Uni-

- versity (natural sciences edition), 2006, 30(2): 103-107 (in Chinese with English abstract).
- [7] 理永霞, 张星耀. 松材线虫病致病机理研究进展[J]. 环境昆虫学报, 2018, 40(2): 231-241. LI Y X, ZHANG X Y. Research advance of pathogenic mechanism of pine wilt disease[J]. Journal of environmental entomology, 2018, 40(2): 231-241 (in Chinese with English abstract).
 - [8] BOLLA R I, JORDAN W. Cultivation of the pine wilt nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in axenic culture media[J]. Journal of nematology, 1982, 14(3): 377-381.
 - [9] KEIKO K, ITO S I. Migration speed of pine wood nematodes and activities of other microbes during the development of pine-wilt disease in *Pinus thunbergii* [J]. Journal of the Japanese forestry society, 1992, 74(5): 383-389.
 - [10] ZHU L H, YE J R, NEGI S, et al. Pathogenicity of aseptic *Bursaphelenchus xylophilus* [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(5): e38095 [2021-02-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038095>.
 - [11] 徐小明, 王岚, 周爱东. 松材线虫病致病机理研究进展[J]. 绿色科技, 2018(5): 111-112, 124. XU X M, WANG L, ZHOU A D. Research advance of pathogenic mechanism of pine wilt disease [J]. Journal of green science and technology, 2018(5): 111-112 (in Chinese).
 - [12] KAWAZU K, KANEKO N, HIRAOKA K, et al. Reisolation of the pathogens from wilted red pine seedlings inoculated with the bacterium-carrying nematode, and the cause of difference in pathogenicity among pine wood nematode isolates[R]. Okayama; Okayama University (Japan), 1999.
 - [13] KAWAZU K, ZHANG H, KANZAKI H. Accumulation of benzoic acid in suspension cultured cells of *Pinus thunbergii* parl. in response to phenylacetic acid administration[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1996, 60(9): 1410-1412.
 - [14] KAWAZU K, ZHANG H, YAMASHITA H, et al. Relationship between the pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and phenylacetic acid production[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1996, 60(9): 1413-1415.
 - [15] KAWAZU K, KANEKO N. Asepsis of the pine wood nematode isolate OKD-3 causes it to lose its pathogenicity[J]. Japanese journal of nematology, 1997, 27(2): 76-80.
 - [16] 洪英娣, 曹越, 赵博光, 等. 松材线虫携带细菌的鉴定和毒性研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2002, 26(5): 37-40. HONG Y D, CAO Y, ZHAO B G, et al. Studies on identification and toxicity of bacteria carried by pine wood Nematodes [J]. Journal of Nanjing Forestry University (natural sciences edition), 2002, 26(5): 37-40 (in Chinese with English abstract).
 - [17] 洪英娣, 赵博光, 曹越, 等. 松材线虫携带细菌的致病性[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(2): 45-48. HONG Y D, ZHAO B G, CAO Y, et al. Pathogenicity of bacteria carried by pine wood Nematodes [J]. Journal of Nanjing Forestry University (natural sciences edition), 2003, 27(2): 45-48 (in Chinese with English abstract).
 - [18] WANG L S, ZHANG T T, PAN Z S, et al. The alcohol dehydrogenase with a broad range of substrate specificity regulates vitality and reproduction of the plant-parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Parasitology, 2019, 146(4): 497-505.
 - [19] HE L X, WU X Q, XUE Q, et al. Effects of endobacterium (*Stenotrophomonas maltophilia*) on pathogenesis-related gene expression of pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) and pine wilt disease[J/OL]. International journal of molecular sciences, 2016, 17(6): 778 [2021-02-05]. <https://doi.org/10.3390/ijms17060778>.
 - [20] XUE Q, WU X Q, WU F, et al. Transcriptome analysis of *Bursaphelenchus xylophilus* uncovers the impact of *Stenotrophomonas maltophilia* on nematode and pine wilt disease[J]. Forests, 2020, 11(9): 908 [2021-02-05]. <https://doi.org/10.3390/f11090908>.
 - [21] 谈家金, 向红琼, 冯志新. 马尾松内生细菌与松材线虫病关系的初步研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(5): 474-476. TAN J J, XIANG H Q, FENG Z X. A preliminary study on the relationship between the endophytic bacterium of *Pinus massoniana* and pine wood nematode disease[J]. Acta phytopathologica sinica, 2003, 33(5): 474-476 (in Chinese with English abstract).
 - [22] ZHAO B G, FUTAI K, SUTHERLAND J R, et al. Pine wilt disease[M]. Tokyo: Springer Japan, 2008.
 - [23] YU L Z, WU X Q, YE J R, et al. NOS-like-mediated nitric oxide is involved in *Pinus thunbergii* response to the invasion of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Plant cell reports, 2012, 31(10): 1813-1821.
 - [24] JONES J T, MOENS M, MOTA M, et al. *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions[J]. Molecular plant pathology, 2008, 9(3): 357-368.
 - [25] POPLAWSKI A, MARINI F, HESS M, et al. Systematically evaluating interfaces for RNA-seq analysis from a life scientist perspective[J]. Briefings in bioinformatics, 2016, 17(2): 213-223.
 - [26] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature reviews genetics, 2009, 10(1): 57-63.
 - [27] ZHANG X D, ZHANG Y. Neural-immune communication in *Caenorhabditis elegans* [J]. Cell host & microbe, 2009, 5(5): 425-429.
 - [28] GAMI M S, WOLKOW C A. Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan[J]. Aging cell, 2006, 5(1): 31-37.
 - [29] 张秀妹, 高洁, 陈春红, 等. 秀丽隐杆线虫固有免疫功能神经调控机制研究进展[J]. 遗传, 2018, 40(12): 1066-1074. ZHANG X M, GAO J, CHEN C H, et al. Progress in the mechanisms of neural modulation of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* [J]. Hereditas, 2018, 40(12): 1066-1074 (in Chinese with English abstract).

- English abstract).
- [30] ZHANG Q L, ZHU Q H, LIANG M Z, et al. Comparative transcriptomic analysis provides insights into antibacterial mechanisms of *Branchiostoma belcheri* under *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. Fish & shellfish immunology, 2018, 76: 196-205.
- [31] 张露菲, 廖一露, 郑明辉, 等. 几种寄生线虫与秀丽隐杆线虫细胞色素 P450 基因家族研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(10): 1032-1036. ZHANG L F, LIAO Y L, ZHENG M H, et al. Comparative study of cytochrome P450s in *Caenorhabditis elegans* and several other types of parasitic nematodes[J]. Journal of pathogen biology, 2017, 12(10): 1032-1036 (in Chinese with English abstract).

Effect of *Bacillus cereus* GD2 on transcriptome of pine wood nematode invading host

CHEN Yangxue, ZHAO Xiaojia, TAN Jiajin

College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210018, China

Abstract To further clarify the role of bacteria in pine wilt disease (PWD), *Pinus massoniana* was inoculated with *Bursaphelenchus xylophilus* (CK), and a mixture of *B. xylophilus* and the endophytic bacterium GD2 (T), respectively. Transcriptome sequencing, Gene Ontology (GO) and KEGG enrichment analysis were performed on the *B. xylophilus*, and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to verify the accuracy of the sequencing results. The results showed that 143 differentially expressed genes (DEGs) were detected, among which 63 were up-regulated and 80 were down-regulated. GO analysis showed that the DEGs were enriched in immune system process, cell membrane, metabolic process, transporter activity and other functions. KEGG pathway was enriched in ECM-receptor interaction, renin-angiotensin system, insulin signaling pathway and other pathways. These GO functions and KEGG pathways were involved in immune regulation and reproductive development of the body. Eight genes were randomly selected for RT-qPCR verification, and the expression level was consistent with the sequencing results, which proved the accuracy of the sequencing results. The results showed that strain GD2 could affect the occurrence of PWD by improving the immune regulation ability of pine wood nematode.

Keywords transcriptomic analysis; *Bursaphelenchus xylophilus*; endophytic bacterial strain GD2 from *Pinus massoniana*; differentially expressed genes; nematode-bacteria microecology

(责任编辑: 边书京)