

## 松树响应松材线虫侵染的分子特征

徐亮<sup>1,2</sup>,刘振宇<sup>2,3\*</sup>,李中新<sup>4</sup>,理永霞<sup>1,2</sup>,吕全<sup>1,2</sup>,张星耀<sup>1,2\*</sup>

1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091
2. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037
3. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018
4. 山东农业大学学报编辑部, 山东 泰安 721018

**摘要:** 松材线虫病是松属树种的重大病害之一,“松树-松材线虫”互作的分子机制是病害监测与防控的基础。近年来,随着新发展分子研究技术的介入,学者们揭示了松树应答松材线虫侵染的系列分子特征,主要包括氧化胁迫、解毒、病程相关、次生代谢、转录调控等方面。本文对此进行综合评述,以期“松树-松材线虫”互作的分子机制研究提供重要参考。

**关键词:** 松材线虫; 侵染; 分子特征

**中图分类号:** S763

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2016)04-0525-06

## Molecular Characterization of *Pinus* spp. Response to the Infection of *Bursaphelenchus xylophilus*

XU Liang<sup>1,2</sup>, LIU Zhen-yu<sup>2,3\*</sup>, LI Zhong-xin<sup>4</sup>, LI Yong-xia<sup>1,2</sup>, LV Quan<sup>1,2</sup>, ZHANG Xing-yao<sup>1,2\*</sup>

1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection/Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China
2. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing 210037, China
3. College of Plant Protection/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China
4. Editorial Department of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

**Abstract:** Pinus pine wilt disease is one of the key diseases of pines, which is infected by *Bursaphelenchus xylophilus*. The discovery of molecular mechanism of pine - *B. xylophilus* interaction is the basis of disease management. With the development of new molecular techniques, a series of molecular characteristics of pine responding to *B. xylophilus* infection have been revealed, including oxidative stress, detoxification, pathogenesis-related proteins, secondary metabolism, transcription regulation, and so on. We discussed these researches in the paper to provide a reference for pine - *B. xylophilus* interaction studies.

**Keywords:** *Bursaphelenchus xylophilus*; infection; molecular characterization

松材线虫病由松材线虫[*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle]侵染引起的世界性病害,是以病原松材线虫为主导,寄主松树、媒介天牛传播、人为参与等因素综合的复杂病害系统<sup>[1,2]</sup>。1905年在日本首次发现,目前主要分布在中国、日本、韩国、墨西哥、葡萄牙、加拿大、美国等国家<sup>[1-5]</sup>,尤其在东亚地区造成了严重的经济和生态损失。在日本曾造成每年 1,000,000 m<sup>3</sup> 松树死亡<sup>[6]</sup>,截止 2005 年已在韩国造成 7,811 ha 松树死亡<sup>[7]</sup>,在中国其引起的经济损失约合 2.5 亿人民币<sup>[1,2]</sup>。

松材线虫病是我国一种重要的外来入侵有害生物,自 1982 年传入以来,其扩散速度和范围越来越大。至 2016 年,我国的江苏、浙江、江西、山东、安徽、福建、河南、湖南、湖北、广东、广西、重庆、贵州、四川和陕西 15 个省的多个区县都被列为松材线虫病疫区;较 2015 年,有 25 个县区新发生松材线虫病(国家林业局 2016 年第 6 号公告)。扩散蔓延趋势依然存在,防控形势严峻,亟需行之有效的防控策略与技术的形成。

科学家给予松材线虫病广泛的关注。大量研究揭示了松材线虫侵染后松树的结构和生理生化响应,近年来,松树响应松材线虫侵染的分子特征也逐步被阐释。本文即围绕松树响应松材线虫侵染所发生的分子事件,对国内外相关研究进行综合论述,以期理解“松树-松材线虫”互作机制,及为下一步从分子水平上深入开展“松树-松材线虫”互作机制研究提供参考。

**收稿日期:** 2013-09-12

**修回日期:** 2016-05-20

**基金项目:** 国家林业局行业重点项目资助(项目编号:200904061)

**作者简介:** 徐亮(1982-),男,山东烟台蓬莱人,博士,主要从事森林病理研究。Xuliang19824@163.com

**\*通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:cosmosliuchina@gmail.com; E-Mail:zhangxingyao@126.com

## 1 感染松材线虫侵染的主要树种

松材线虫寄主范围广, 研究揭示, 松材线虫能够侵染包括松属 (*Pinus* spp.)、落叶松属 (*Larix* spp.)、云杉属 (*Picea* spp.)、雪松属 (*Cedrus* spp.) 等多属植物。其中松属植物是最主要的寄主, 包括马尾松 (*P. massoniana*)、日本黑松 (*P. thunbergii*)、日本赤松 (*P. densiflora*)、湿地松 (*P. elliotii*)、白皮松 (*P. bungeana*)、华南五针松 (*P. kwangtungensis*)、琉球松 (*P. luchuensis*)、欧洲黑松 (*P. nigra*)、海岸松 (*P. pinaster*)、欧洲赤松 (*P. sylvestris*) 和意大利松 (*P. pinea*) 等<sup>[1-5]</sup>。

松树感染松材线虫侵染后, 其发病过程分为早期、晚期两个阶段。早期阶段, 在接种点附近出现典型症状, 皮层韧皮组织和形成层坏死, 皮层树脂道破坏, 树脂道周围的皮层薄壁细胞创伤周边形成以及乙烯释放。晚期阶段, 乙烯大量产生, 形成层破坏以及木栓化增加, 最终导致针叶枯萎, 树木死亡<sup>[8]</sup>。伴随着主要症状的发展, 过敏反应启动, 导致酚的释放, 毒素和植物抗毒素的合成以及木质部和其他组织的分离, 最后管胞充满树脂油和毒性物质<sup>[9,10]</sup>。随着这些特征的揭示, 其分子机制也逐步被发现。

## 2 松树响应松材线虫侵染分子特征研究的主要方法

松树响应松材线虫侵染的分子特征研究, 早期主要采用单基因克隆与功能鉴定的研究策略与方法, 发现了与松树抗、感病特征相关的部分基因及其功能。近年来, 随着研究技术的发展, 更多的分子手段用于松树响应松材线虫侵染的研究。

Shin 等<sup>[11]</sup>采用引物退火控制技术 (Annealing Control Primer System, ACP) 以及差异消减杂交技术 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 研究了松材线虫侵染的日本红松在发病过程中的相关基因表现, 发现一些涉及防卫反应、次生代谢以及转录相关的基因诱导表达。Santos 等<sup>[12]</sup>采用 SSH 技术在松材线虫侵染的意大利松和海岸松鉴定了表达序列标签, 发现松树在分子水平上启动了防卫反应, 涉及氧胁迫、木质素和乙烯合成、核酸的转录后调控。Santos 等<sup>[13]</sup>进一步采用高通量筛选 (High Throughput Screening) 发现在感病海岸松品种中, 苹果酸脱氢酶、ABA、水分胁迫相关蛋白以及 PAR1 等基因高水平表达, 而在不感病意大利松品种中蓖麻蛋白质 B 凝集素、SNARE 蛋白以及高迁移率族蛋白等基因高水平表达。Hirao 等<sup>[14]</sup>构建了松材线虫侵染日本黑松的 7 个 SSH cDNA 数据库, 发现抗菌肽和病程相关蛋白等基因的差异表达特征。Xu 等<sup>[15]</sup>基于 SSH 技术, 发现松材线虫侵染早期, 马尾松中参与防卫反应、ROS 积累以及防卫信号诱导产生、增强植物细胞壁的基因等基因显著上调表达。此外, Kuroda 等<sup>[16]</sup>基于 Megasort 的珠分离技术 (Megasort Beads Technology) 发现从抗病黑松品种中筛选获得的差异表达的 EST 数量是感病品种的 3 倍, 认为抗病品种在线虫侵染时启动了防卫反应, 而感病品种防卫反应基因表达可能受限制。Nose 等<sup>[17]</sup>使用修饰的长基因表达序列标签技术 (Modified Long SAGE Technique) 发现在抗、感病黑松品种中, 病程相关蛋白基因及次生代谢相关基因表现出响应松材线虫侵染的典型特征。这些研究方法与技术对系统揭示松树响应松材线虫侵染的分子特征给予了良好技术支撑。

## 3 松树响应松材线虫侵染的分子特征

### 3.1 氧化胁迫和解毒相关的分子特征

在松材线虫侵染过程中, 线虫分泌的酶及毒素作用, 以及寄主自身的次生代谢物, 通常局限在特殊细胞或亚细胞位置, 进而导致了植物细胞遭受高毒性的氧胁迫<sup>[18,19]</sup>。越来越多的研究发现一些上调表达的氧胁迫相关蛋白在维持细胞内的氧化还原平衡以及环境胁迫/忍受方面发挥了重要的作用, 并且这些氧胁迫相关蛋白基因的诱导表达揭示了活性氧(ROS)的积累以及防卫信号在线虫侵染早期的松树体内诱导表达, 进而能够快速诱导防卫反应基因的表达<sup>[13]</sup>。

膜 NADPH 氧化酶 (NOX) 系统是  $H_2O_2$  产生的主要来源之一<sup>[20,21]</sup>。研究发现松材线虫侵染松树早期 (24 h) 就会导致活性氧和丙二醛积累, 膜脂过氧化作用加剧<sup>[22]</sup>。在松材线虫侵染 24 h 的海岸松中发现醛酮还原酶基因诱导表达, 该酶可催化还原松材线虫侵染的松树中由于膜脂过氧化产生的活性碳<sup>[13,20,21]</sup>; Shin 等<sup>[11]</sup>在线虫侵染 7 d 的日本红松中发现了氧胁迫诱导的 NADP 依赖的氧化还原

酶上调表达。抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 参与了还原  $H_2O_2$  生成  $H_2O$  的过程, 是植物参与氧化胁迫响应的重要分子<sup>[23,24]</sup>, APX 被证实在线虫侵染的日本红松里诱导表达<sup>[11]</sup>, 何龙喜等<sup>[25]</sup>发现松材线虫侵染松树早期 (24 h), APX 活性显著升高。APX 的积累进一步提供了松材线虫侵染早期松树参与活性氧代谢的功能基因响应特征。此外, 氧化胁迫相关的黄素单核苷酸还原酶、硫氧还蛋白家族在先前的研究中被证实与松材线虫侵染相关, 而一个 *phox/Bem1* (PB1) 结构域在线虫侵染的意大利松也高表达, 并且这个结构域通常在信号蛋白包括氧化酶、胞质因子中被发现<sup>[13,26]</sup>。Shin 等<sup>[11]</sup>在松材线虫侵染 24 h 的日本红松上发现金属硫因蛋白和重金属相关蛋白等在松材线虫侵染的松树体内强烈的诱导表达, 尤其在氧胁迫的组织中高表达, 而 Hirao 等<sup>[14]</sup>揭示编码金属硫因蛋白的 EST 序列响应松材线虫侵染, 在 1 d、3 d 的敏感黑松体内显著下调表达。这些基因它们涉及在金属的动态平衡以及重金属的解毒, 具有高的活性氧清除能力。

### 3.2 病程相关蛋白特征

病程相关蛋白 (PR) 是寄主植物响应病原侵染诱导表达的一类防卫相关蛋白, 它们通常积累于侵染处, 也被诱导系统表达<sup>[27,28]</sup>。研究表明 PRs 参与了松树和松材线虫互作, 包括 PR-2 ( $\beta$ -1,3-葡聚糖酶), PR-3 (几丁质酶), PR-4 (几丁质结合蛋白) 以及 PR-5 (类甜蛋白)。Shin 等<sup>[11]</sup>在松材线虫侵染 24 h 的日本红松上, 发现编码 PR-2, PR-3 以及 PR-4 的基因表达上调。Hirao 等<sup>[14]</sup>在接种松材线虫的感病黑松品种上同样也发现 PR-5 基因高表达; Nose 等<sup>[17]</sup>研究发现 PR-1 和 PR-3 基因的表达仅在接种松材线虫的非抗性日本黑松树种中检测到, PR-2 基因在非抗性黑松中的表达量高于接种的抗性黑松中的表达量。Hirao 等<sup>[14]</sup>观察到在感病日本黑松树种中, PR-9 (过氧化物酶) 基因在松材线虫侵染 1 d、3 d 高表达, 在抗性黑松树种 7 d、14 d 高表达。PR-10 (类核糖核酸酶) 基因在松材线虫侵染 21 h 的日本红松上发现诱导表达上调<sup>[11]</sup>, 同样, Hirao 等<sup>[14]</sup>在线虫侵染 7 d 抗性黑松品种中, 也发现 PR-10 基因明显上调表达。分析认为, PR10 可能起到了抵抗松材线虫分泌的纤维素酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶以及果胶酯裂解酶的作用<sup>[29,30]</sup>。此外, Santos 等<sup>[12,13]</sup>先后在松材线虫侵染 3 h 和 24 h 的海岸松上发现 PR-14 (脂转移酶) 基因表达上调。PR-14 作为抗菌肽, 除了通过可能的信号途径以及参与角质屏障的形成来增强植物的防御功能外, 自身也能通过改变病原细菌或真菌细胞膜的通透性来杀死或限制病原菌的生长<sup>[31]</sup>。

### 3.3 次生代谢相关分子特征

次生代谢物是针叶物种防卫反应的重要物质, 越来越多的次生代谢相关基因被发现在线虫侵染松树过程中差异表达<sup>[32-36]</sup>。陈玉惠等<sup>[22]</sup>研究发现马尾松植株接种松材线虫早期, 苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 的活性水平高于对照; Shin 等<sup>[11]</sup>在线虫侵染 24 h 的日本红松上同时检测到查尔酮合酶 (Chalcone and stilbene synthase family Protein, CHS) 和苯丙氨酸解氨酶基因 (PAL) 表达上调。苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 位于初生代谢和次生代谢分界处, 因此被定位为是苯丙烷类化合物代谢的中心酶, 该途径可形成包括植保素、木质素和酚类化合物等在内的抗病次生物质; 查尔酮合酶则是将苯丙烷类代谢途径引向黄酮类合成的第一个酶。细胞色素 P450 涉及在针叶植物树脂油的一系列二萜树脂酸形成过程<sup>[37,38]</sup>, 编码 CYP450 的基因在线虫侵染 1 d、3 d 的抗性树种被发现显著下调, 其下调表达可能引起线虫侵染的松树内二萜树脂酸的减少<sup>[17]</sup>。Abrahams 等<sup>[39]</sup>在非抗性松树树种发现线虫侵染引起的活性氧的增加能够加强编码无色花色素加双氧酶 (LDOX) 基因的表达, 无色花色素加双氧酶 (LDOX) 在产生凝缩类丹宁前体即表儿茶酸的途径中起作用。Santos 等<sup>[13]</sup>发现 (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate (HMB-PP) 还原酶以及类硫解酶蛋白的编码基因在松材线虫侵染的海岸松中差异表达, 它们参与了松树萜烯次生代谢途径。此外, Wei 等<sup>[40]</sup>研究发现, 松材线虫侵染 30 d 时, 抗性马尾松 ABC 转运蛋白基因表达显著上调, 揭示了不断分泌的树脂限制了松材线虫的迁移和繁殖。

### 3.4 细胞壁相关蛋白特征

细胞壁相关蛋白是植物防卫病原菌的第一道防线, 它们能够限制线虫的迁移<sup>[41,42,43]</sup>。木质素不仅

可以增强细胞的机械支持力或抗压强度,而且与富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGP)一起作为结构屏障物保护细胞免受病原菌的侵害<sup>[14,44,45]</sup>。木质素被发现在松材线虫侵染的松树中较多形成<sup>[45]</sup>,Shin等<sup>[11]</sup>在线虫侵染1 d的日本红松中发现咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶基因上调表达,其参与了木质素单体的甲基化过程;而Hirao等<sup>[14]</sup>观察到在感病日本黑松树种中,羟脯氨酸糖蛋白(HRGPs)、伸展蛋白基因高表达,其高表达特征,在感病树种中发生在松材线虫侵染1 d、3 d,但在抗性树种中则在7 d、14 d高表达。Nose等<sup>[17]</sup>也发现伸展蛋白家族的编码基因在松材线虫侵染的非抗性日本黑松树种中上调表达。Nose等<sup>[17]</sup>还发现在线虫侵染1 d的抗、感病树种中,木葡聚糖内糖基转移酶(XET)基因表达下调。木葡聚糖内糖基转移酶(XET)的作用涉及在纤维素-微纤维素间的葡聚糖交联重排引起的细胞膨胀过程中调节细胞壁松弛,揭示了线虫侵染过程中,木葡聚糖内糖基转移酶(XET)下调表达限制了木质部、韧皮部的膨胀,或者细胞壁被羟脯氨酸糖蛋白(HRGPs)和伸展蛋白的交联作用所固定。

### 3.5 转录调节子的特征

转录调节子是特异基因表达的关键因子,并且保证了细胞响应胞内、胞外的刺激<sup>[46,47]</sup>。上述松树响应松材线虫侵染的差异表达基因,包括涉及松树防卫反应、氧化胁迫应答、次生代谢物形成等基因,这些基因都具有转录调控特征。研究发现,部分转录因子在松材线虫侵染的松树中发现特异表达。在线虫侵染1 d的松树中,检测到编码同源域转录因子、类bZIP蛋白以及推测的包含AP2结构域蛋白的基因特异表达,而编码转录起始因子和推测的螺旋-环-螺旋转录因子基因在线虫侵染7 d的松树中被检测到<sup>[11]</sup>。这些调节子在松材线虫侵染的松树体内的差异表达,显示了在松树响应松材线虫侵染中表现出的转录调控特征。当然,松树响应松材线虫侵染的复杂生理学和生物化学反应背后,必然有更为复杂的转录调控机制,因此松树体内与松材线虫侵染相关转录因子以及它们对下游基因的调节模式在以后的研究中将被更加重视。

## 4 结语和展望

松材线虫病是世界性森林重大生物灾害,松材线虫是重要的外来入侵有害生物,研究者围绕“松树-松材线虫”互作展开了系列研究工作,并取得了长足进展,对于了解松树和松材线虫互作的分子机制提供了重要信息,对推动松材线虫病的控制具有重要的基础性意义。松树响应线虫侵染的分子特征研究,目前,更多的集中在松树响应松材线虫侵染的基因鉴定上,获得了跟松树抗、感病反应相关的若干基因或者基因的EST。进一步,研究者应加强这些基因的功能鉴定,深入探讨其在松树响应松材线虫侵染所发挥的作用。随着基因组学、后基因组学、转录组学等组学理论与技术的不断发展,松树响应松材线虫侵染的分子特征,将会更多地向系统的水平发展,基因的功能研究不仅仅局限于单个基因的作用,单个路径中多个基因的功能的互作,以及多个路径的基因功能的交叉,都是值得发展的研究方向,也是目前松树响应松材线虫侵染的重要研究内容。同时,在基因功能的深入分析基础上,开展基因在转录水平的调控研究,对于了解松树响应线虫侵染的复杂机制具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 张星耀,骆有庆.中国重大森林生物灾害[M].北京:中国林业出版社,2003:1-46
- [2] Jones JT, Moens M, Mota M, et al. *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions[J]. Mol. Plant Pathol., 2008,9:357-368
- [3] Yano S. Investigation on pine death in Nagasaki prefecture (in Japanese)[J]. Sanrin-Kouhou, 1913,4:1-14
- [4] Mamiya Y, Kiyohara T. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and histopathology of nematode-infested trees[J]. Nematol., 1972,18:120-124
- [5] Huang L, Ye J, Wu X, et al. Detection of pine wood nematode using a real-time PCR assay to target the DNA topoisomerase I gene[J]. Eur. J. Plant Pathol., 2010,127:89-98
- [6] Forestry Agency. Annual Report on Trends of Forest and Forestry-Fiscal Year 2003[R]. Forestry Agency: The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, 2004

- [7] Shin SC, Han HR. Current status on research and management of pine wilt disease in Korea. In: Proceedings of the international symposium on current status on research and management of pine wilt disease[R]. Seoul, Korea, 2006:31-40
- [8] Fukuda K. Physiological process of the symptom development and resistance mechanism in pine wilt disease[J]. J. For. Res., 1997,2:171-181
- [9] Myers RF. Pathogenesis in pine wilt caused by pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. J. Nematol., 1988,20:236-244
- [10] Schiffer R, Görg R, Jarosch B, et al. Tissue dependence and differential cordycepin sensitivity of race-specific resistance responses in the barley-powdery mildew interaction[J]. Mol. Plant Microbe In., 1997,10:830-839
- [11] Shin H, Lee H, Woo KS, et al. Identification of genes upregulated by pinewood nematode inoculation in Japanese red pine[J]. Tree Physiol., 2009,29:411-421
- [12] Santos CSS, Vasconcelos MW. Identification of genes differentially expressed in *Pinus pinaster* and *Pinus pinea* after infection with the pine wood nematode[J]. Eur. J. Plant Pathol., 2012,132:407-418
- [13] Santos CSS, Pinheiro M, Silva AI, et al. Searching for resistance genes to *Bursaphelenchus xylophilus* using high throughput screening[J]. BMC Genomics, 2012,13:599-613
- [14] Hirao T, Fukatsu E, Watanabe A. Characterization of resistance to pine wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization[J]. BMC Plant Biol., 2012,12:13-26
- [15] Xu L, Liu ZY, Zhang K, et al. Characterization of the *Pinus massoniana* transcriptional Response to *Bursaphelenchus xylophilus* infection using suppression subtractive hybridization[J]. Int. J. Mol. Sci., 2013,14(6):11356-11375
- [16] Kuroda H, Goto S, Kazumi E, et al. The expressed genes of Japanese red pine (*Pinus densiflora*) involved in the pine wilt disease severity[J]. BMC Proc., 2011,5(Suppl 7):92
- [17] Nose M, Shiraiishi S. Comparison of the gene expression profiles of resistant and non-resistant Japanese black pine inoculated with pine wood nematode using a modified LongSAGE technique[J]. For. Path., 2011,41:143-155
- [18] Zhang Q, Bai G, Yang W, et al. Pathogenic cellulase assay of pine wilt disease and immunological localization[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2006,70:2727-2732
- [19] Ralph S, Park JY, Bohlmann J, et al. Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound- and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea* spp.)[J]. Plant Mol. Biol., 2006,60:21-40
- [20] Bedard K, Lardy B, Krause KH. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals[J]. Biochimie, 2007,89:1107-1112
- [21] Yamauchi Y, Hasegawa A, Taninaka A, et al. NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants[J]. J. Biol. Chem., 2011,286:6999-7009
- [22] 陈玉惠. 松材线虫与寄主植物互作中的生理生化研究[D]. 南京:南京林业大学, 2002
- [23] Çakir B, Agasse A, Gaillard C, et al. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling[J]. Plant Cell, 2003,15(9):2165-2180
- [24] Van Breusegem F, Vranová E, Dat JF, et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction[J]. Plant Sci., 2001,161:405-414
- [25] 何龙喜, 吴小芹, 俞禄珍, 等. 不同抗性松树与松材线虫互作中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及其氧化酶活性的差异[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2010,34(6):13-17
- [26] Hirano Y, Yoshinaga S, Takeya R, et al. Structure of a cell polarity regulator, a complex between atypical PKC and Par 6 PB1 domains[J]. J. Biol. Chem., 2005,280:9653-9661
- [27] Scherer NM, Thompson CE, Freitas LB, et al. Patterns of molecular evolution in pathogenesis-related proteins[J]. Genet. Mol. Biol., 2005,28:645-653
- [28] Osmond RIW, Hrmova M, Fontaine F, et al. Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)- $\beta$ -D-glucans[J]. Eur. J. Biochem., 2001,268:4190-4199
- [29] Kikuchi T, Jones JT, Aikawa T, et al. A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. FEBS Lett., 2004,572:201-205
- [30] Kikuchi T, Shibuya H, Jones JT. Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1,3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria[J]. Biochem. J., 2005,389:117-125
- [31] Kikuchi T, Shibuya H, Aikawa T, et al. Cloning and characterization of pectate lyases expressed in the esophageal

- gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Mol. Plant Microbe. Interact., 2006,19:280-287
- [32] Kusumoto D, Yonemichi T, Murata M, *et al.* Histological observations on host responses and nematode distribution in resistant pine trees infected with pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (in Japanese)[J]. Tree Forest Health, 2010,14:98-100
- [33] Keeling CJ, Bohlmann J. Diterpene resin acids in conifers[J]. Phytochemistry, 2006b,67:2415-2423
- [34] Ro DK, Bohlmann J. Diterpene resin acid biosynthesis in loblolly pine (*Pinus taeda*): Functional characterization of abietadiene / levopimaradiene synthase (PtTPS-LAS) cDNA and subcellular targeting of PtTPS-LAS and abietadienol / abietadienal oxidase (PtAO, CYP720B1)[J]. Phytochemistry, 2006,67:1572-1578
- [35] Futai K. Tannin accumulation in the stems of pine seedlings infected with *Bursaphelenchus xylophilus* or *B. mucronatus*[M]. Trans. 95<sup>th</sup> Ann. Meet. Jpn. For. Soc., 1984:473-474
- [36] Futai K. Abnormal metabolites in pine wood nematode-inoculated Japanese black pine[J]. Jpn. J. Nematol., 2003,33:45-56
- [37] Funk C, Croetau R. Diterpenoid resin acid biosynthesis in conifers: characterization of two cytochrome P450-dependent monooxygenases and an aldehyde dehydrogenase involved in abietic acid biosynthesis[J]. Arch. Biochem. Biophys., 1994,308:258-266
- [38] Ro DK, Arimura GI, Lau SYW, *et al.* Loblolly pine abietadienol/abietadienal oxidase PtAO (CYP702B1) is a multifunctional, multisubstrate cytochrome P450 monooxygenase[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005,102:8060-8065
- [39] Abrahams S, Lee E, Walker AR, *et al.* The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development[J]. Plant J., 2003,35:624-636
- [40] Wei Y, Liu Q, Dong H, *et al.* Selection of reference genes for real-time quantitative PCR in *Pinus massoniana* post nematode inoculation[J]. PLoS One, 2016,11(1):e0147224
- [41] Yamada T. Biochemical responses in pine trees affected by pine wilt disease. In: Pine Wilt Disease[M]. Tokyo: Springer, 2008:223-234
- [42] Regente MC, Giudici AM, Villalaín J, *et al.* The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells[J]. Lett. Appl. Microbiol., 2005,40:183-189
- [43] Fukuda K, Utsuzawa S, Sakaue D. Correlation between acoustic emission, water status and xylem embolism in pine wilt disease[J]. Tree Physiol., 2007,27:969-976
- [44] Hüchelhoven R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility[J]. Annu. Rev. Phytopathol., 2007,45:101-127
- [45] Ishida K, Hogetsu T, Fukuda K, *et al.* Cortical responses in Japanese black pine to attack by the pine wood nematode[J]. Can. J. Bot., 1993,71:1399-1405
- [46] Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, *et al.* Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses[J]. Plant Cell, 2002,14:559-574
- [47] Ulker B, Somssich IE. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function[J]. Curr. Opin. Plant Biol., 2004,7:491-498