

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.06.004

# 松材线虫 *cyp-33D3* 基因的 RNA 干扰及其功能研究

冯梦婷<sup>1,3</sup>, 盛东萍<sup>1,3</sup>, 叶建仁<sup>2</sup>, 陈凤毛<sup>2</sup>, 张晓阳<sup>3</sup>, 邱秀文<sup>1,2\*</sup>

(1. 九江学院江西长江经济带研究院, 江西 九江 332005; 2. 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037; 3. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

**摘要:** [目的] 研究松材线虫 cytochrome P450 33D3 (*cyp-33D3*) 基因功能, 为揭示松材线虫分子致病机制及其生物防治提供理论依据。[方法] 采用双链 RNA 对 *cyp-33D3* 基因的表达进行干扰, 测定该基因沉默后对松材线虫取食速率、个体大小、产卵数量、孵化率及致病力的影响。[结果] ddH<sub>2</sub>O 和 *gfp* dsRNA 处理的线虫取食速度明显较快, 在第 5 天已经几乎将灰葡萄孢菌丝取食殆尽, 而 *cyp-33D3* dsRNA 处理松材线虫取食灰葡萄孢的面积较小; *cyp-33D3* 基因 RNA 干扰对松材线虫雌、雄成虫的体长无显著影响 ( $P > 0.05$ ); 与 ddH<sub>2</sub>O 和 *gfp* dsRNA 处理相比, *cyp-33D3* dsRNA 处理每条雌虫平均产卵数量分别减低了 12 和 11 粒, 虫卵孵化率分别减低了 46% 和 43%; 在接种 40 d 后, ddH<sub>2</sub>O 处理的黑松苗发病率达到 100%, *cyp-33D3* dsRNA 处理的黑松发病率为 43.1%; 而 *gfp* dsRNA 处理的黑松生长状况良好。[结论] *cyp-33D3* 基因 RNA 干扰减缓了松材线虫的取食速度, 减少了松材线虫的产卵数量, 降低了松材线虫的虫卵孵化率和对黑松的致病力; 松材线虫 *cyp-33D3* 基因 RNA 干扰对线虫的个体大小无明显影响。

**关键词:** 松材线虫; *cyp-33D3* 基因; RNA 干扰; 繁殖能力; 致病力

**中图分类号:** S763.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2020)06-0032-07

松材线虫病, 即松树枯萎病 (pine wilt disease, PWD), 是一种以松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 为病原的国际检疫性林业病害<sup>[1-2]</sup>。松材线虫病具有发病部位隐秘、发病速度快、传播蔓延迅速、传播途径多、治理难度大等特点, 因此该病害又被称为松树的“癌症”<sup>[3]</sup>。我国于 1982 年在南京中山陵首次发现松材线虫病<sup>[4]</sup>, 随后在我国逐渐蔓延, 已经造成了重大的经济损失并严重威胁着我国众多名胜风景区和松林生态系统安全。细胞色素 P450 (cytochrome p450, P450), 又称单加氧酶, 是一类由数量众多、功能复杂的血红素结合蛋白组成的同工酶, 广泛存在于细菌、真菌、动物和植物等生物体中<sup>[5]</sup>。细胞色素 P450 在内源性化合

物 (脂肪酸、胆汁酸、类固醇、蜕皮激素和保幼激素等) 和外源性化合物 (农药、植物毒素和环境致癌物等) 代谢过程中十分重要<sup>[6-8]</sup>。大量研究表明细胞色素 P450 基因参与代谢过程和抗性机制主要通过上调来实现。Maja 等<sup>[9]</sup> 研究发现秀丽隐杆线虫受到毒物质侵害时, *cyp-33D3* 基因表达量上调明显。松材线虫全基因组序列于 2011 年测序完成, 为研究松材线虫致病相关基因的功能奠定了良好的基础<sup>[10]</sup>。我们前期研究发现松材线虫感染松树后, cytochrome P450 33D3 (*cyp-33D3*) 基因表达量上调显著, 表明 *cyp-33D3* 基因在松材线虫致病过程中发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。目前关于 *cyp-33D3* 基因的研究主要集中在过量表达方面, 而关于该基因的

收稿日期: 2019-12-31 修回日期: 2020-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目“松材线虫细胞色素 P450 基因的功能及其分子调控网络研究” (31660205); 江西省林业厅林业科技创新项目“庐山松材线虫媒介昆虫种类及防治技术研究” (201711)

\* 通讯作者: 邱秀文, 博士, 副教授, E-mail: qiuxiuwen3@163.com

功能研究鲜见报道。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象广泛存在于真核生物细胞中,它通过小分子双链 RNA 诱导同源 mRNA 降解从而阻断体内特定基因表达<sup>[12]</sup>。随着 RNA 干扰机制被阐明, RNA 干扰被认为是一种可以与基因敲除相媲美的技术,在基因功能、信号传导通路和基因治疗等研究领域得到了广泛的应用<sup>[13-16]</sup>。本研究采用 RNA 干扰技术研究 *cyp-33D3* 基因沉默后对松材线虫取食、繁殖和致病性的影响,阐明 *cyp-33D3* 基因在松材线虫致病过程中的功能,为进一步明确松材线虫分子致病机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试松材线虫 *BxJJ01* 分离自江西省九江市的黑松疫木,并保存于九江学院植物基因资源重点实验室。将松材线虫接种至长满灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 的马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 平板培养基上, 25℃ 恒温培养 5 d, 采用贝尔曼漏斗法分离线虫, 用无菌水清洗 3 次, 1500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min。将离心得到的线虫悬浮液储存于 1.5 mL 离心管中, 备用。

### 1.2 松材线虫总 RNA 提取及 cDNA 的合成

根据 RNA 抽提试剂盒 (天根生化科技有限公司) 的使用说明书提取松材线虫总 RNA。利用紫外分光光度计 (Nanodrop 2000) 测定 RNA 浓度, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。根据 TaKaRa 公司反转录试剂盒 (Prime Script 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis Kit) 使用说明书将松材线虫总 RNA 反转录为 cDNA 用于后续 PCR 实验。

### 1.3 松材线虫 *cyp-33D3* 基因片段的克隆

依据 GenBank 上下载的 *cyp-33D3* (GenBank: KM973212.2) 基因序列设计上游引物 *cyp-33D3*-F (5'-TCACCGACTACGAGGTCC-3') 和下游引物 *cyp-33D3*-R (5'-ATGGGATGAACGACGAAC-3'), 以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 预变性 5 s, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 34 s, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。根据 Axygen 公司的切胶回收试剂盒使用说明书对目标片段进行切胶回收, 并克隆于 Pmd™18-T 载体上, 转化至大肠杆菌感受态细胞, 委托华大基因

公司进行测序。

### 1.4 松材线虫 *cyp-33D3* 基因 dsRNA 的合成

以 Pmd™18-T 和 pCH-sGFP 载体为模板, 通过带有 T7 启动子的引物进行 PCR 扩增, 采用 MEGAscript RNAi Kit Protocol 试剂盒 (Life Technologies 公司) 分别合成松材线虫 *cyp-33D3* 和 *gfp* 基因 dsRNA。用无 RNA 酶 H<sub>2</sub>O 适当稀释合成的 dsRNA, 通过紫外分光光度计测定 A<sub>260</sub> 值, 同时测定溶解 dsRNA 相应 H<sub>2</sub>O 的 A<sub>260</sub> 值作为空白值, dsRNA 浓度 (μg·mL<sup>-1</sup>) 为 260 nm 的吸光值减去空白值后乘以稀释倍数再乘以系数 40。经测定合成的 *cyp-33D3* 和 *gfp* 基因 dsRNA 浓度分别为 1.45 mg·mL<sup>-1</sup> 和 1.53 mg·mL<sup>-1</sup>, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 完整性, 将合成好的 dsRNA 储存于 -80℃ 冰箱, 备用。

dsRNA 浓度 (μg·mL<sup>-1</sup>) = (A<sub>260</sub>-空白值) × 稀释倍数 × 40

### 1.5 松材线虫 *cyp-33D3* 基因的 RNA 干扰

将收集的松材线虫混合虫态浸泡于 1 μg·μL<sup>-1</sup> 的 *cyp-33D3* dsRNA 中<sup>[17]</sup>, 以 *gfp* dsRNA 作为非靶标性 dsRNA 对照, 以 ddH<sub>2</sub>O 作为空白对照, 每个处理约 8000 条线虫, 每次试验 3 次重复, 将各处理置于 25℃ 摇床 170 r·min<sup>-1</sup> 48 h 后<sup>[15-16]</sup>, 用 ddH<sub>2</sub>O 洗脱线虫。

分别挑取 30 对 (成熟雄虫和雌虫各 30 条) 干扰后和对照组的松材线虫, 接种至长有灰葡萄孢的 PDA 平板上, 25℃ 条件下培养 5 d, 用贝尔曼漏斗法进行分离。拍照观察各处理松材线虫取食情况, 用光学显微镜统计其数量, 每个处理 3 次重复。

分别挑取 20 对 (成熟雄虫 20 条, 怀孕雌虫 20 条) 干扰后和对照组的松材线虫, 置于直径为 30 mm 的小培养皿上, 加入适量 ddH<sub>2</sub>O, 25℃ 黑暗培养 12 h 后, 轻轻倒掉线虫悬浮液, 用无菌水将粘附在培养皿底部的线虫虫卵洗出, 收集松材线虫卵粒并统计其数量, 每个处理重复 3 次。

分别挑取 100 颗线虫虫卵浸泡在等量的 ddH<sub>2</sub>O、*gfp* dsRNA 和 *cyp-33D3* dsRNA 溶液中, 置于 25℃ 恒温培养箱黑暗条件下孵化 48 h。使用倒置显微镜对已孵化卵的数量进行计数, 每个处理重复 3 次。

分别挑取 20 对 (成熟雄虫和雌虫各 20 条) 干扰后和对照组的松材线虫, 接种至长有灰葡萄孢的 PDA 平板上进行交配和繁殖, 从而得到子一代

(F1) 的老熟成虫。将获得的成虫转移至孔板并用高温杀死, 在光学显微镜下测量其个体长度, 每个处理重复 3 次。

采用人工皮接法分别将 ddH<sub>2</sub>O 浸泡和 *cyp-33D3* dsRNA 干扰后含有 2 000 条松材线虫的悬液接种到生长情况一致的两年生黑松上, 同时将等体积的 *gfp* dsRNA 溶液接种至黑松, 每个处理接种 6 株。接种后观察松树的发病情况, 持续观察 40 d, 统计发病率。

### 1.6 松材线虫 *cyp-33D3* 基因干扰效率的测定

分别提取对照组和干扰后子一代 (F1) 松材线虫总 RNA, 反转录合成第 1 链 cDNA, 以松材线虫 *Actin* 基因为内参基因, 根据 TransStart Green qPCR SuperMix (北京全式金生物技术有限公司) 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR, 测定松材线虫 *cyp-33D3* 基因的表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 松材线虫 *cyp-33D3* 基因的克隆

以松材线虫 cDNA 为模板, 用特异性引物扩增获得细胞色素 *cyp-33D3* 基因, 结果显示扩增片段长度介于 1 000~1 500 bp 之间 (图 1A), 与预期大小 1 192 bp 相符。回收目的条带与 pMDTM19-T 载体连接后转化至大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞中, 挑取阳性克隆进行测序验证。通过带有 T<sub>7</sub> 启动子的特异性引物进行 PCR 扩增, 合成 dsRNA。

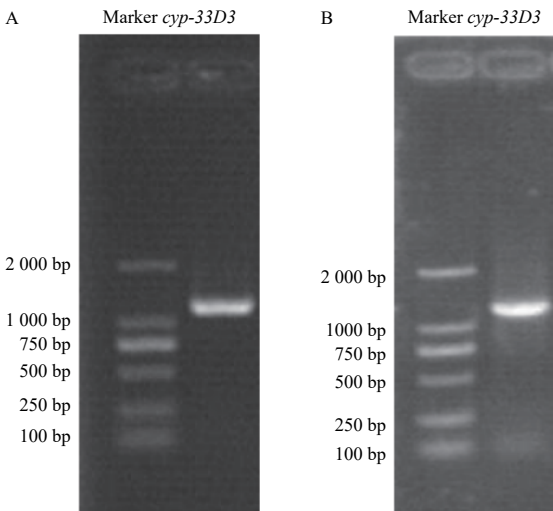


图 1 松材线虫细胞色素 *cyp-33D3* 基因的克隆 (A) 及双链 RNA 的合成 (B)

Fig. 1 Clone of *cyp-33D3* gene from *B. xylophilus* (A) and synthesis of double-stranded RNA (B)

从图 1B 中可以看出, 琼脂糖凝胶电泳条带单一、明亮、完整, 可用于后续的 RNA 干扰实验。

### 2.2 干扰后松材线虫 *cyp-33D3* 基因表达量分析

如图 2 所示, 松材线虫经 *gfp* dsRNA 和 *cyp-33D3* dsRNA 浸泡后, *cyp-33D3* 基因的表达量分别为 0.974 和 0.036 (将 ddH<sub>2</sub>O 处理对照组的细胞色素 *cyp-33D3* 基因表达量设为 1), 说明外源 dsRNA 对松材线虫细胞色素 *cyp-33D3* 基因表达量无影响, 而 *cyp-33D3* dsRNA 可以有效抑制靶基因的表达。

### 2.3 松材线虫 *cyp-33D3* 基因 RNAi 对线虫取食的影响

从图 3 可以看出, ddH<sub>2</sub>O 和 *gfp* dsRNA 处理的线虫取食速度明显较快, 在第 5 天已经几乎将灰葡萄孢菌丝取食殆尽, 而 *cyp-33D3* dsRNA 处理松材线虫取食灰葡萄孢的面积较小, 说明细胞色素 *cyp-33D3* 基因表达沉默后对松材线虫的取食有重要影响。

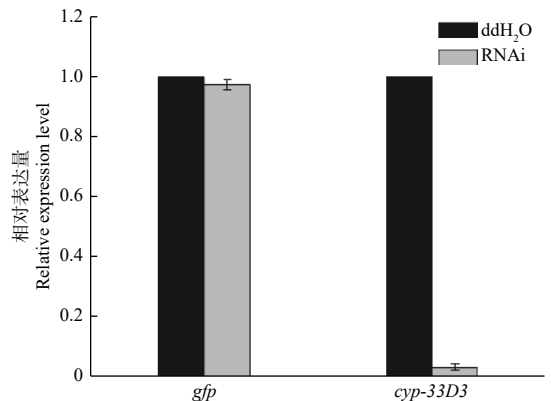


图 2 RNAi 后松材线虫 *cyp-33D3* 基因表达分析

Fig. 2 The analysis of expression of *cyp-33D3* gene following RNAi of *B. xylophilus*

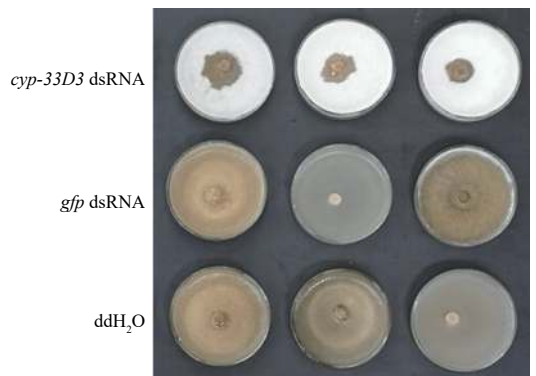


图 3 RNAi 对松材线虫取食的影响

Fig. 3 Effects of RNAi on feeding of *B. xylophilus*



## 2.4 松材线虫 *cyp-33D3* 基因 RNAi 对线虫个体体长的影响

经测量, ddH<sub>2</sub>O 处理雌、雄成虫的体长分别为 964.33 μm 和 777.12 μm; *gfp* dsRNA 处理雌、雄成虫的体长分别为 951.66 μm 和 775.34 μm; *cyp-33D3* dsRNA 处理雌、雄成虫的体长分别为 942.57 μm 和 761.33 μm (图 4)。RNA 干扰后雌、雄成虫的体长有所减短, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。因此, 我们推测 RNA 干扰对松材线虫体长无明显影响。

## 2.5 松材线虫 *cyp-33D3* 基因 RNAi 对线虫产卵的影响

由图 5 可知, ddH<sub>2</sub>O 和 *gfp* dsRNA 处理的每条雌虫平均产卵数量分别为 24 和 23 粒, 而 *cyp-33D3* dsRNA 处理中每条雌虫平均产卵数量为 12 粒。结果表明, *cyp-33D3* dsRNA 干扰显著 ( $P < 0.01$ ) 减少了雌虫的产卵数量, 降低了松材线虫的繁殖能力。

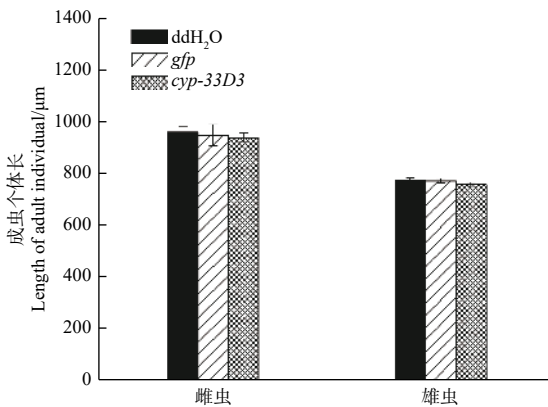


图 4 RNAi 对松材线虫成虫个体体长的影响

Fig. 4 Effects of RNAi on individual body length of adult *B. xylophilus*

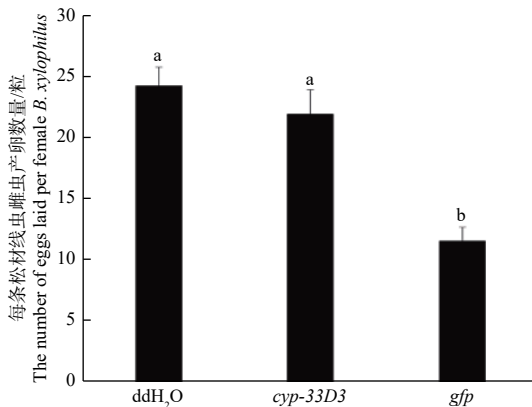


图 5 RNAi 对松材线虫产卵的影响

Fig. 5 Effects of RNAi on oviposition of *B. xylophilus*

## 2.6 松材线虫 *cyp-33D3* 基因 RNAi 对线虫孵化率的影响

不同处理的松材线虫卵孵化率如图 6 所示, *cyp-33D3* dsRNA 处理的虫卵孵化率为 49.67%, 与 ddH<sub>2</sub>O 处理相比差异显著 ( $P < 0.01$ ); 而 *gfp* dsRNA 处理和 ddH<sub>2</sub>O 处理的虫卵孵化率无明显差异 ( $P > 0.05$ )。由此可见, *cyp-33D3* dsRNA 干扰对松材线虫卵孵化具有一定的抑制作用, 而非内源双链 RNA 干扰对其无影响。

## 2.7 松材线虫 *cyp-33D3* 基因 RNAi 对线虫致病力的影响

在接种 40 d 后, ddH<sub>2</sub>O 处理的黑松针叶全部枯萎, 发病率达到 100%; *cyp-33D3* dsRNA 处理的黑松发病率为 43.1%; 而 *gfp* dsRNA 处理的黑松在整个实验过程中生长状况良好, 发病率为零 (图 7)。据此推测, RNA 干扰在一定程度上减弱了松材线虫的致病能力, 进而降低了黑松的发病率。

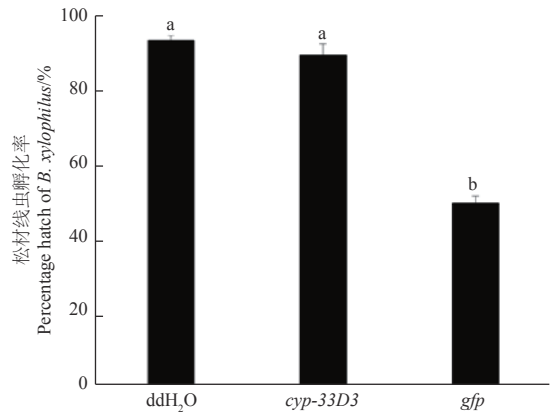


图 6 RNAi 对松材线虫孵化率的影响

Fig. 6 Effects of RNAi on percentage hatch of *B. xylophilus*

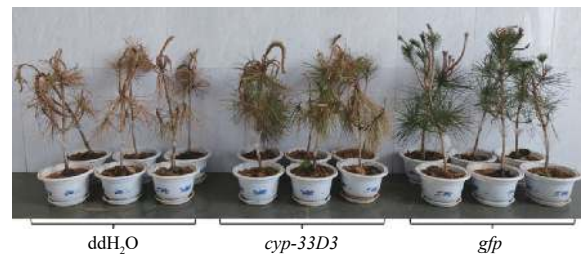


图 7 不同接种处理后第 40 天黑松的发病状况

Fig. 7 Wilting symptoms of *P. thunbergii* after different inoculation treatments at 40 days

## 3 讨论

由于松材线虫的生活史和寄生环境与其他线虫

差别很大,致使其分子致病机制研究进展缓慢。Kikuchi 等人于 2011 年完成了松材线虫全基因组测序,这为进一步研究松材线虫致病基因的功能奠定了良好的基础。松材线虫感染寄主后,寄主会分泌一系列的次级代谢产物抵御松材线虫的入侵。有研究表明,CYP450 基因产物是松材线虫代谢寄主松树次级代谢产物第一阶段最重要的酶。我们的前期研究结果发现在松材线虫入侵寄主后 *cyp-33D3* 基因表达量上调显著,说明该基因在松材线虫致病过程中发挥了重要作用。

RNA 干扰是由与靶基因序列同源的双链 RNA 引发的广泛存在于生物体内的序列特异性基因转录后沉默的过程。RNA 干扰具有特异、有效的基因沉默效应,克服了建立基因敲除动物模型费时费力的缺点,已成为研究基因功能非常有效的手段。Wang 等<sup>[18]</sup>通过 RNA 干扰技术研究松材线虫精氨酸激酶 (*BxAK1*) 基因的功能,发现该基因表达量下调增加了线虫的死亡率,同时减弱了线虫的繁殖能力。Kang 等<sup>[19]</sup>通过该方法对松材线虫毒液过敏原样蛋白 (*BxVap-1*) 基因进行 RNA 干扰,结果表明毒液过敏原样蛋白基因与线虫的迁移能力有密切联系。魏丽莎子等<sup>[20]</sup>利用 RNA 干扰技术对象耳豆根结线虫二龄幼虫 *Me-mapk1* 基因进行沉默,线虫诱导番茄根结形成的数量显著减少,推测 *Me-mapk1* 基因的下调表达有可能与象耳豆根结线虫二龄幼虫 (J2) 的生长发育相关。以上研究表明, RNA 干扰是一种研究基因功能的有效技术。细胞色素 P450 作为线虫体内三大与代谢抗性相关的超基因家族之一,对松材线虫生长发育和致病性起到至关重要的作用。Benenati 等<sup>[21]</sup>通过 RNA 干扰技术研究了秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) *cyp-31A2* 和 *cyp-31A3* 基因的功能,发现这两个基因表达量下调导致线虫胚胎细胞不能正确执行减数分裂以及卵壳形成所需的脂质物质合成受阻。Verma 等<sup>[22]</sup>研究表明, *cyp5122A1* 基因表达量下降增加了杜氏利什曼虫 (*Leishmania donovani*) 的死亡率,降低了利什曼虫对药物的敏感性和减少了麦角固醇的合成。本研究通过 RNA 干扰技术沉默了松材线虫 *cyp-33D3* 基因,发现 *cyp-33D3* 基因下调表达后,松材线虫取食速率降低,繁殖能力下降。这可能是由于 *cyp-33D3* 基因沉默后影响了松材线虫胚胎细胞减数分裂的正确执行,抑制了卵壳形成

所需脂质物质的合成以及增加了线虫的死亡率,导致线虫繁殖数量下降,进而影响了松材线虫的取食速度。

植物寄生线虫致病的前提是能够在寄主体内存活和进行繁殖。我们将 *cyp-33D3 dsRNA* 干扰后的松材线虫接种至黑松苗上,发现线虫的致病能力明显下降,推测原因可能是:(1) *cyp-33D3* 基因表达沉默后,松材线虫在松树体内的取食和产卵受到影响,进而降低了线虫的繁殖数量,导致其致病力下降;(2) 松材线虫入侵寄主后,松树会分泌出大量的次生代谢产物抵御松材线虫的入侵,松材线虫为了应对这些次生代谢产物的毒害作用,必须通过解毒基因对该类物质进行代谢转化,由于 CYP450 基因在松材线虫解毒过程中具有重要作用,因此 *cyp-33D3* 基因被表达被沉默后,可能致使松材线虫不能有效降解寄主分泌的有毒次生代谢产物,大量线虫被杀死,最终导致松材线虫的致病力下降。我们的研究表明 *cyp-33D3* 基因与松材线虫的取食、繁殖和致病力密切相关,为揭示松材线虫 *cyp-33D3* 基因的功能提供了理论依据,对科学指导松材线虫病生物防治具有重要的理论和实践意义。然而,关于 *cyp-33D3* 基因对松材线虫卵壳形成和致病力的具体调控机理还不清楚,还有待于进一步深入研究。

## 4 结论

通过 RNA 干扰技术对松材线虫 *cyp-33D3* 基因功能进行了研究,发现 *cyp-33D3 dsRNA* 干扰可以有效抑制 *cyp-33D3* 基因的表达, *cyp-33D3* 基因干扰后降低了松材线虫的取食速度,每条线虫的产卵数量以及虫卵的孵化率都下降显著 ( $P < 0.01$ )。然而, *cyp-33D3* 基因干扰对松材线虫个体体长影响较小。 *cyp-33D3* 基因干扰减弱了松材线虫的致病能力,降低了黑松的发病率。本研究不仅为阐明松材线虫 *cyp-33D3* 基因的功能提供了数据支撑,而且为研究松材线虫其他基因的功能提供了参考。

## 参考文献:

- [1] Baojun Y, Qouli W. Distribution of the pinewood nematode in China and susceptibility of some Chinese and exotic pines to the nematode[J]. Canadian Journal of Forest Research, 1989, 19(12): 1527-1530.
- [2] Zhang F, Kajiwaru J, Mori Y, et al. Metabolites from resistant and

- susceptible *Pinus thunbergii* after inoculation with pine wood nematode[J]. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4(3): 512-518.
- [3] 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.
- [4] 程瑚瑞, 林茂松, 黎伟强, 等. 南京黑松上发生的萎蔫线虫病[J]. 森林病虫通讯, 1983, (4): 1-5.
- [5] Coon M J, Vaz A D, Bestervelt L L. Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes[J]. Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1996, 10(4): 428-434.
- [6] Scott J G, Scott J. Insect cytochrome P450s: Thinking beyond detoxification[J]. Recent Advances in Insect Physiology Toxicology & Molecular Biology, 2008, 1: 17-124.
- [7] Li X, Schuler M A, Berenbaum M R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics[J]. Annual Review of Entomology, 2007, 52(1): 231-253.
- [8] Schuler M A. P450s in plant-insect interactions[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1814(1): 36-45.
- [9] Studencka M, Wesołowski R, Opitz L, et al. Transcriptional repression of Hox genes by *C. elegans* HP1/HPL and H1/HIS-24[J]. PLoS Genetics, 2012, 8(9): e1002940.
- [10] Kikuchi T, Cotton J A, Dalzell J J, et al. Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(9): e1002219.
- [11] Qiu X, Wu X, Huang L, et al. Specifically expressed genes of the nematode *Bursaphelenchus xylophilus* involved with early interactions with pine trees[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e78063.
- [12] Niu J H, Jian H, Xu J M, et al. RNAi technology extends its reach: engineering plant resistance against harmful eukaryotes[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(45): 7573-7582.
- [13] Wang M, Wang D, Zhang X, et al. Double-stranded RNA-mediated interference of dumpy genes in *Bursaphelenchus xylophilus* by feeding on filamentous fungal transformants[J]. International Journal for Parasitology, 2016, 46(5-6): 351-360.
- [14] Ma H B, Lu Q, Liang J, et al. Functional analysis of the cellulose gene of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, using RNA interference[J]. Genetics and Molecular Research, 2011, 10(3): 1931-1941.
- [15] Xie B Y, Dai S M, Xiao L, et al. Influence of cellulase gene knock-down by dsRNA interference on the development and reproduction of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Nematology, 2010, 12(2): 225-233.
- [16] Xue Q, Wu X Q, Zhang W J, et al. Cathepsin L-like cysteine proteinase genes are associated with the development and pathogenicity of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20: 215.
- [17] 王守先, 牛宝龙, 沈卫锋, 等. 松材线虫 RNA 聚合酶基因的 RNA 干扰研究[J]. 浙江农业科学, 2007, (6): 690-81.
- [18] Wang X, Cheng X, Li Y, et al. Cloning arginine kinase gene and its RNAi in *Bursaphelenchus xylophilus* causing pine wilt disease[J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 134(3): 521-532.
- [19] Kang J S, Koh Y H, Moon Y S, et al. Molecular properties of a venom allergen-like protein suggest a parasitic function in the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. International Journal for Parasitology, 2012, 42(1): 63-70.
- [20] 魏丽莎子, 龙海波, 陈绵才, 等. 象耳豆根结线虫 *Me-mapk1* 基因的克隆及 RNAi 分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(10): 1980-1985.
- [21] Benenati G, Penkov S, Müller-Reichert T, et al. Two cytochrome P450s in *Caenorhabditis elegans* are essential for the organization of eggshell, correct execution of meiosis and the polarization of embryo[J]. Mechanisms of Development, 2009, 126(5): 382-393.
- [22] Verma S, Mehta A, Shaha C. CYP5122A1, a novel cytochrome P450 is essential for survival of *Leishmania donovani*[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25273.

## Study on the Function of *cyp-33D3* Gene of *Bursaphelenchus xylophilus* with RNA Interference Method

FENG Meng-ting<sup>1,3</sup>, SHENG Dong-ping<sup>1,3</sup>, YE Jian-ren<sup>2</sup>, CHENG Feng-mao<sup>2</sup>,  
ZHANG Xiao-yang<sup>3</sup>, QIU Xiu-wen<sup>1,2</sup>

(1. Jiangxi Yangtze River Economic Zone Research Institute, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of Invasive Species, College of Forest, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** [Objective] To study the function of cytochrome P450 33D3 (*cyp-33D3*) gene in *Bursaphelenchus xylophilus* in order to further reveal the molecular pathogenesis mechanism of *B. xylophilus*, and provide useful information for its biological control. [Method] Double strand RNA (dsRNA) interference was used to investigate the effect of silencing of *cyp-33D3* on feeding speed, individual size, number of eggs, hatching rate and pathogenicity of *B. xylophilus*. [Result] It was found that the feeding speed of *B. xylophilus* under ddH<sub>2</sub>O and *gfp* dsRNA treatments were faster than that under *cyp-33D3*dsRNA interference treatment in the first 5 days. Almost all the hyphae of *Botrytis cinerea* were consumed by *B. xylophilus* soaked under ddH<sub>2</sub>O and *gfp* dsRNA treatments. In contrast, a large portion of the hyphae still existed under *cyp-33D3* dsRNA treatment. No significant effect was found on the individual size of *B. xylophilus* when *cyp-33D3* gene was interfered by dsRNA ( $P > 0.05$ ). Compared to ddH<sub>2</sub>O and *gfp* dsRNA treatments, the average number of eggs per female decreased 12 and 11 under *cyp-33D3* treatment, and the hatching rate of eggs decreased by 46% and 43%, respectively. 40 days after the soaked *B. xylophilus* were inoculated in *Pinus thunbergii* seedlings, the pathogenicity of *B. xylophilus* under ddH<sub>2</sub>O and *cyp-33D3* treatments were 100% and 43.1%, respectively, while the *P. thunbergii* seedlings inoculated with *B. xylophilus* under *gfp* dsRNA treatment still grew well. [Conclusion] The RNA interference of *cyp-33D3* gene decreases the feeding speed, the number of eggs, hatching rate and pathogenicity of *B. xylophilus*. However, RNA interference of *cyp-33D3* gene exhibits no significant effect on individual size of *B. xylophilus*.

**Keywords:** *Bursaphelenchus xylophilus*; *cyp-33D3* gene; RNA interference; reproduction ability; pathogenicity

(责任编辑: 崔 贝)