

水稻干尖线虫 *Ab-lea* 基因在高渗透压下的表达

陈俏丽 王峰* 李丹蕾 零雅茗 张瑞芝

(东北林业大学 林学院, 哈尔滨 150040; *通讯联系人, E-mail: fengwang@nefu.edu.cn)

Expression Under Hypertonic Osmotic Stress of *Ab-lea* from *Aphelenchoides besseyi*

CHEN Qiaoli, WANG Feng*, LI Danlei, LING Yaming, ZHANG Ruizhi

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin China, 150040, *Corresponding author, E-mail: fengwang@nefu.edu.cn)

Abstract: 【Objective】Rice white tip nematodes (*Aphelenchoides besseyi*) can enter osmobiogenesis to survive hypertonic osmotic stress in soil and seeds before infecting hosts, making the prevention and control of the nematode rather difficult. Normally, under hypertonic osmotic stress, the gene expression of late embryogenesis abundant protein (LEA) will significantly increase. As an adversity expressive protein, LEA can protect the organism under adversity. In order to study the expression pattern and the function of LEA gene from *A. besseyi* (*Ab-lea*) under hypertonic osmotic stress,

【Method】the gene was cloned according to the results of the transcriptome sequencing. A saturated $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ solution was used as a hypertonic osmotic solution to dehydrate nematodes. The expression of *Ab-lea* was tested by RT-PCR during Osmobiogenesis. RNAi was used to investigate the survival of nematodes under hypertonic osmotic stress after silencing of *Ab-lea*. 【Result】Nematodes will turn into osmobiogenesis after soaking in a saturated $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ solution for 240 min. RT-PCR results showed that the expression of *Ab-lea* was upregulated when nematodes were at the beginning of hypertonic osmotic stress treatment and during the osmobiogenesis. 【Conclusion】The survival rate of the nematodes dropped significantly under osmobiogenesis after *Ab-lea* silence, which showed that *Ab-lea* may be involved in the regulation of osmobiogenesis of the nematode. It lays a foundation of further exploration for the physiological mechanism of nematode-resistance to hypertonic osmotic stress and provides new ideas for the prevention and control of the nematode.

Key words: late embryogenesis abundant protein; *Aphelenchoides besseyi*; hypertonic osmotic stress; osmobiogenesis; RNAi

摘要: 【目的】水稻干尖线虫(*Aphelenchoides besseyi*)在侵染寄主以前,能够以变渗隐生状态在土壤和种子中的高渗透压环境下长期存活,使防治该线虫极为困难。通常,非生物胁迫下,胚胎发育晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant protein, LEA)的基因表达量会显著上调。作为逆境表达蛋白,LEA能在逆境下保护生物。为探究水稻干尖线虫 LEA 编码基因(*Ab-lea*)在高渗透压胁迫下的表达模式及功能,【方法】根据转录组数据克隆到 *Ab-lea*。以无机溶剂饱和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液为高渗透压胁迫剂,对水稻干尖线虫进行高渗透压胁迫,240 min 后该线虫进入变渗隐生。通过 RT-PCR 验证 *Ab-lea* 在线虫进入变渗隐生及维持变渗隐生过程中的表达特性。使用 RNAi 技术,探究该线虫 *Ab-lea* 沉默后,高渗透压胁迫下存活率变化。【结果】RT-PCR 结果表明, *Ab-lea* 在进入变渗隐生前及维持变渗隐生过程中表达量上调。*Ab-lea* 沉默后,水稻干尖线虫在进入变渗隐生后存活率显著下降。【结论】表明该基因可能参与调控水稻干尖线虫变渗隐生。本研究为进一步探究该线虫抗高渗透压胁迫的生理机制奠定基础,为防治该线虫提供新思路。

关键词: 胚胎发育晚期丰富蛋白; 水稻干尖线虫; 高渗透压胁迫; 变渗隐生; 基因干涉

中图分类号: S435.111.4⁺8

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2017)06-0652-06

水稻(*Oryza sativa*)是重要的粮食作物,世界范围内,受水稻干尖线虫(*Aphelenchoides besseyi*)危害,水稻减产达 10%~71%^[1,2]。水稻干尖线虫通过进入变渗隐生状态,可在高渗透压环境下存活^[3,4],当环境适宜时,又恢复正常代谢,防治极为困难。对水稻干尖线虫应对高渗透压胁迫时的生理机制进行研究,可为防治该线虫提供理论依据。

Dure等^[5]于1981年首次于棉花中发现一类蛋白质,这类蛋白质在棉花胚胎晚期大量积累,使胚胎具有干旱耐受性,被命名为胚胎发育晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant protein, LEA)。而后在多种植物的花粉、种子和营养组织中发现LEA^[6],近年来,又在线虫^[7-9]及其他无脊椎动物^[10-12]中发现LEA同源蛋白。作为一种逆境表达蛋白,LEA具有

很高的亲水性和热稳定性, 具有稳定细胞膜, 清除活性氧自由基和结合金属离子等功能^[13, 14]。在干旱、低温、盐等非生物胁迫下, 多种生物的LEA基因表达量显著上调。LEA还能与海藻糖协同作用, 对一些酶起到保护作用^[15], 从而达到在逆境下保护生物的作用^[16]。根据氨基酸序列及保守结构域, LEA可分为六个家族^[17, 18]。目前, 在秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)、夜蛾斯氏线虫(*Steinernema feltiae*)以及燕麦真滑刃线虫(*Aphelenchus avenae*)中均发现有第三家族LEA^[19-23]。

饱和MgSO₄·7H₂O溶液是理想的高渗透压溶液^[4], 在该溶液胁迫下, 短时间内线虫死亡率较低, 且胁迫过程中线虫收缩缓慢, 便于观察其活力变化及体长变化。基于LEA在生物抵抗非生物胁迫中的重要作用, 本研究以水稻干尖线虫LEA编码基因为研究对象, 以饱和MgSO₄·7H₂O溶液为高渗透压胁迫剂, 研究该基因在高渗透压胁迫下的表达模式, 并通过基因沉默技术, 研究该基因沉默后, 水稻干尖线虫在高渗透压胁迫下的存活率, 探究其在生物防治中的潜力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用水稻干尖线虫种群为NCBI(national center for biotechnology information)国际生物标本注册种群, 注册号为SAMN02420038^[24]。纯化后的线虫在灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)上避光25℃培养。

1.2 *Ab-lea* 基因阅读框克隆及同源序列比对

贝曼漏斗法分离收集线虫, 取50~100 mg线虫, DEPC处理水清洗后离心去上清, 液氮处理下研磨。取研磨粉末, 应用TRIzol法(Invitrogen, cat. No. 15596-026)提取水稻干尖线虫总RNA。根据试剂盒说明书, 应用AMV反转录系统(Promega, cat. No. A3500), 以Oligo (dT)₁₈为引物进行第一链cDNA反转录。根据转录组测序结果, BLAST筛选到LEA编码基因同源序列^[24]。根据筛选到的序列设计引物(*Ab-lea-F*: 5' -TGT GAT GAT GCC GTC GAT TC-3', *Ab-lea-R*: 5' -CCT TAG CGT TCT TGG CTG TT-3'), 以第一链cDNA为模板, 进行编码序列(coding sequence, CDS)的PCR扩增。扩增产物送生物公司测序, 测序所得序列命名为*Ab-lea*。应用ORF Finder(open reading frame finder)对PCR产物测序结果进行在线ORF分析, 并推导出氨基酸序列。

1.3 高渗透压胁迫下线虫体长及形态变化测定

贝曼漏斗法分离收集混合虫龄线虫, M9缓冲液清洗线虫, 离心去上清, 用饱和MgSO₄·7H₂O浸泡进行高渗透压胁迫。在显微镜下(Olympus, Bx51)测量线虫体长并拍照。60 min内, 线虫体长变化迅速, 每10 min进行一次测量; 60 min后线虫体长变化减缓, 每60 min进行一次测量。每个时间点测量20条线虫, 重复3次。

1.4 荧光定量RT-PCR

贝曼漏斗法分离收集线虫, M9缓冲液清洗线虫, 离心去上清, 用饱和MgSO₄·7H₂O浸泡进行高渗透压胁迫。高渗透压胁迫处理后的线虫用液氮研磨, 取研磨粉末, 应用TRIzol法提取水稻干尖线虫总RNA。DEPC处理水溶解后, 应用二步法荧光定量PCR试剂盒(GoTaq 2-Step RT-qPCR System, Promega, cat. No. A6010)进行第一链cDNA反转录。而后应用荧光定量PCR仪(Stratagene qPCR system, Mx3000P, Agilent), 采用二步法荧光定量PCR试剂盒(GoTaq 2-Step RT-qPCR System)和*Ab-lea*基因特异引物对(*Ab-lea-QF*: 5' -CGT TCA CTG TGA TGA TGC CG-3', *Ab-lea-QR*: 5' -AAA CCC AGC GGA GTT AGA CG-3')进行RT-PCR扩增。以水稻干尖线虫*actin*为内参基因(positive internal control), 应用特异引物对(*Ab-act-QF*: 5' -TTG GAA CAA TCG GAA ACG GG-3', *Ab-act-QR*: 5' -CTT CAG ACC AAT CGT TGT GC-3')进行RT-PCR扩增。使用两步法PCR: 95℃下预变性2 min, 95℃下30 s, 58℃下1 min, 共40个循环。融解曲线测定从55℃到95℃。对RT-PCR扩增采用相对定量法计算3次重复试验初始模板量比值, 两配对样本*t*检验差异显著性^[25]。

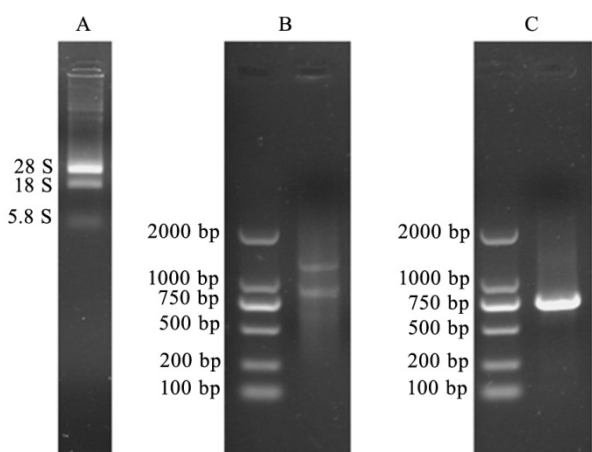
1.5 *Ab-LEA* 基因沉默

选取*Ab-lea* GC含量20%~50%, 涵盖不同剪接型的核苷酸序列为基因沉默靶序列, 生产相对应的dsRNA。以水稻干尖线虫cDNA为模板, 分别应用引物*Ab-lea-iF*(5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGG TGC GAG CAA AGT GAA TG-3')和*Ab-lea-R*(5' -TCG GCA TGA CCC ATC ACA AA-3')进行PCR扩增生产正义链模板, 应用引物*Ab-lea-F*(5' -GGG TGC GAG CAA AGT GAA TG-3')和*Ab-lea-iR*(5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TCG GCA TGA CCC ATC ACA AA-3')进行PCR扩增生产反义链模板^[25]。而后应用MEGAscript® RNAi试剂盒(ThermoFisher, cat. No. AM1626)进行体外转录反应, 合成正义链与反义链

表1 NCBI 登录的胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA)直系同源序列

Table 1. Late embryogenesis abundant protein(LEA) orthologous sequence in NCBI.

物种 Species	GenBank 登录号 NCBI No.	蛋白 Protein	E 值 E value
鼠类圆线虫 <i>Strongyloides ratti</i>	CEF69463	假定蛋白 SRAE_2000411200 Hypothetical protein SRAE_2000411200	6×10^{-11}
秀丽隐杆线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001256172.1	植物胚胎发育晚期丰富蛋白相关 Plant LEA related	3×10^{-9}
广杆属线虫 <i>Caenorhabditis brenneri</i>	EGT57645.1	假定蛋白 CAEBREN_08606 Hypothetical protein CAEBREN_08606	5×10^{-9}
广杆属线虫 <i>Caenorhabditis remanei</i>	XP_003116340.1	CRE-LEA-1 蛋白 Protein CRE-LEA-1	4×10^{-8}
广杆属线虫 <i>Caenorhabditis briggsae</i>	CAP25449.2	CBR-LEA-1 蛋白 Protein CBR-LEA-1	1×10^{-7}
犬蛔虫 <i>Toxocara canis</i>	KHN75743.1	假定蛋白 Tcan_16220 Hypothetical protein Tcan_16220	4×10^{-6}

图1 水稻干尖线虫 RNA(A)、Cdna(B)和 *Ab-lea* ORF(C) 扩增Fig. 1. RNA(A), cDNA(B) and the *Ab-lea* (C) PCR product of *A. besseyi*.

RNA, 经退火生产 dsRNA。用 DEPC 处理过的 ddH₂O 稀释 dsRNA 浓度至 3 mg/mL, 采用 dsRNA 浸泡法处理线虫 12 h, 以在 DEPC 处理过的 ddH₂O 中浸泡 12 h 为对照。

处理后一部分线虫用于高渗透压处理 1 d~10 d 下线虫存活率测定, 以蒸馏水处理相同时间为对照。高渗透压胁迫处理后在蒸馏水中复苏 24 h 后, 针刺无反应, 定义为死亡。另一部分线虫提取 RNA, 反转录后应用引物 *Ab-lea*-QF 和 *Ab-lea*-QR 进行 RT-PCR 扩增, 验证 RNAi 效果。应用水稻干尖线虫 *actin* 基因引物 *Ab-act*-QF 和 *Ab-act*-QR 进行 RT-PCR 扩增作为对照^[25]。

2 结果与分析

2.1 *Ab-LEA* 基因完整阅读框(ORF)克隆及同源序列比对

水稻干尖线虫总 RNA(图 1-A), 经 AMV 反转录系统反转录第一链 cDNA, 随机引物法合成第二链 cDNA(图 1-B)。以 cDNA 为模板进行 *Ab-lea* 基因 ORF 克隆, PCR 扩增得到一条约 1000 bp 的序列

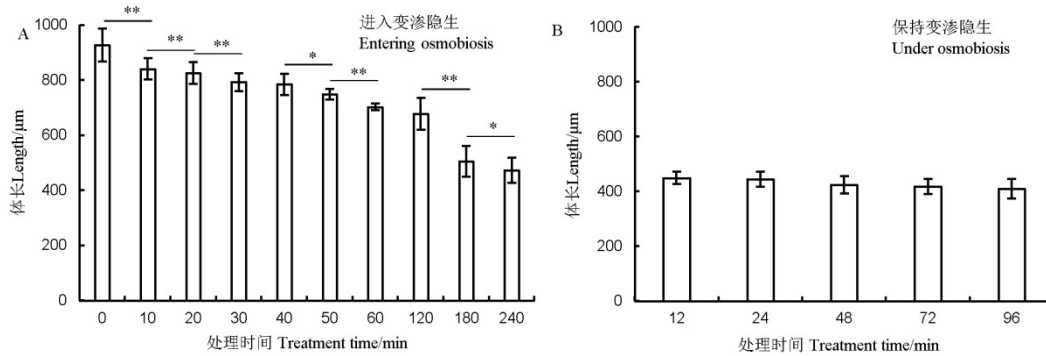
(图 1-C)。测序结果的 ORF 分析表明 *Ab-lea* 含有一个 1 095 bp 的阅读框, 编码蛋白含有 364 个氨基酸, 分子量为 38.6949 kD, 等电点(theoretical pI)为 7.67。含有 Apolipoprotein 保守结构域(pfam01442), 无跨膜结构域, ProtScale 分析为亲水性蛋白。BLASTX 分析表明 *Ab-lea* 与 *CRE-LEA-1* 蛋白(*Caenorhabditis remanei*, XP_003116340.1) 同源性最高。BLASTT 分析表明 *Ab-LEA* 与假定蛋白 SRAE_2000411200 (*Strongyloides ratti*, CEF69463.1) 同源性最高(表 1)。

2.2 高渗透压胁迫下线虫体长及形态变化测定

使用 MgSO₄·7H₂O 饱和溶液, 对水稻干尖线虫进行高渗透压胁迫过程中, 0~60 min 内, 线虫活动活跃, 体长缩短较快, 其他表型无明显差异(图 2-A, 图 3~A-F)。60~120 min 内, 线虫活力减弱, 游动僵硬, 体长持续缩短, 但缩短减缓, 虫体稍稍弯曲, 表面略有皱缩, 肌肉层变厚(图 2-A, 图 3-G)。120~180 min 内, 线虫活力微弱, 缓慢扭动, 体长大量缩短, 虫体皱缩形成螺旋体(图 2-A, 图 3-H)。180~240 min, 线虫几乎进入休眠状态, 微微挪动, 体长变化较少, 虫体表面出现整齐排列的横向皱纹, 侧线成弯曲有规则的波浪状(图 2-A, 图 3-I)。240 min 后线虫进入变渗隐生状态, 体长和体宽减至一个稳定值, 虫体呈弯曲皱缩状态(图 2-B, 图 3-J)。

2.3 荧光定量 RT-PCR

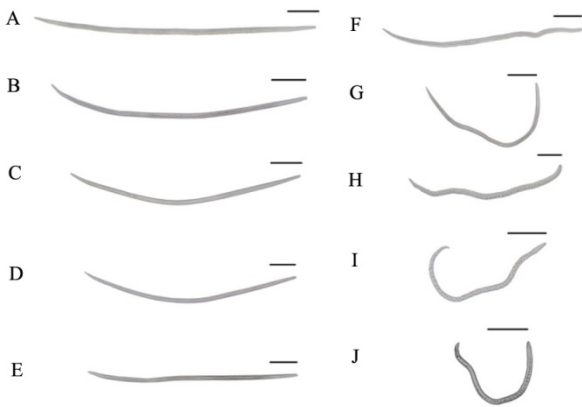
试验结果表明水稻干尖线虫 *Ab-lea* 响应高渗透压胁迫, 在进入变渗隐生前出现表达量显著上调现象, 并在 40 min 时达到最高值(图 4-A), 此时线虫尚未进入变渗隐生状态, 且游动活跃。随高渗透压胁迫时间增加, *Ab-lea* 表达量随后出现下调, 直至水稻干尖线虫在高渗透压胁迫 240 min 时, 进入变渗隐生状态。在持续高渗透压胁迫 12 h 后, *Ab-lea* 表达量又逐渐上调, 并在 48 h 时达到峰值, 随后其表达量逐渐下降(图 4-B)。相对定量法计算 3 次重复试验, 两配对样本 *t* 检验差异显著(**P*<0.05,



柱上横线表示标准差。*, **分别表示在 0.05,0.01 水平上差异显著。下同。
Error lines are standard deviation. *, ** indicate significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively. The same as in figures below.

图 2 高渗透压胁迫处理后水稻干尖线虫体长变化

Fig. 2. Changes in length of *A. besseyi* during hypertonic osmotic stress treatment.



A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 分别代表在饱和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液中浸泡 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240min。比例尺为 100 μm 。

A, B, C, D, E, F, G, H, I, J indicate *A. besseyi* is soaked in saturated $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ solution for 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240 min, respectively. Bar= 100 μm .

图 3 高渗透压胁迫处理后水稻干尖线虫体型变化

Fig. 3. The changes of morphology of *A. besseyi* during hypertonic osmotic stress treatment.

** $P < 0.01$).

2.4 *Ab-LEA* 基因沉默

合成的正义链 RNA、反义链 RNA 及经退火生产的 dsRNA，如图 4 所示。经过 12 h dsRNA 喂饲处理，未发现线虫死亡或表型明显变化，RT-PCR 结果表明 *Ab-lea* 沉默效果明显 ($\log_2 \text{fold} = -1.79 \pm 0.1036$)。RNAi 对照组与 CK 对照组存活率无明显差异，10 d 内存活率均大于 95%。水稻干尖线虫高渗透压处理后，*Ab-lea* RNAi 高渗透压处理组存活线虫数量明显低于 CK 高渗透压处理组(图 5)。

3 结论与讨论

Ab-lea 在进入变渗隐生过程，及维持变渗隐生状态过程中，表达量均有上调，表明该基因在水稻干尖线虫抗高渗透压胁迫及维持变渗隐生中起作用。*Ab-lea* 基因沉默后，水稻干尖线虫在高渗透压条件下存活率显著下降，表明该基因在水稻干尖线虫抗高渗透压胁迫中起到重要作用，可能参与调控水稻干尖线虫变渗隐生。

线虫体内水分的逐渐流失会导致新陈代谢减弱。当新陈代谢的减弱到难以检测时，线虫处于“隐生状态”^[26, 27]。当这种水份流失由蒸发脱水引起，称为“低湿隐生”^[28]，当这种水份流失由高渗透压引起，称为“变渗隐生”^[3-4]。与低湿隐生不同，对变渗隐生生理生化研究较少。使用饱和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液对水稻干尖线虫进行高渗透压胁迫，1~3 d 内该线虫存活率无明显降低，10 d 时存活率约等于 40%，表明该线虫具有较高的抗渗透压胁迫能力，可作为研究变渗隐生现象的模式生物。

根据 *Ab-lea* 表达量变化趋势，发现 *Ab-lea* 并非始终显著上调表达，其两个峰值分别出现在高渗透压胁迫初期 40 min 时和进入变渗隐生 48 h 时。此时，线虫存活率均无明显降低。高渗透压胁迫 40 min 时，线虫活动活跃，表型无明显变化。高渗透压胁迫 48 h 时，线虫处于变渗隐生状态，表型无变化。72 h 后线虫存活率出现明显下降，*Ab-lea* 表达量上调逐渐降低。表明 *Ab-lea* 在水稻干尖线虫抗高渗透压胁迫初期及维持变渗隐生中起作用，但可能与线虫在高渗透压胁迫中的表型变化无关。

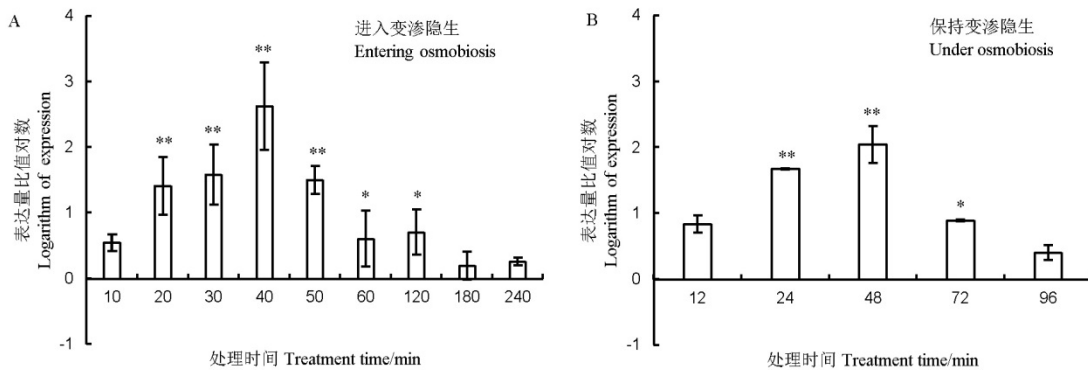


图4 高渗透压胁迫处理后水稻干尖线虫 *Ab-lea* 基因表达量情况
Fig. 4. Expression of *Ab-lea* during hypertonic osmotic stress treatments.

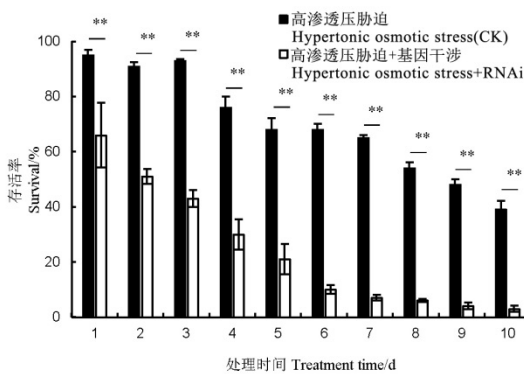


图5 *Ab-lea* 基因沉默后高渗透压胁迫处理水稻干尖线虫存活数
Fig. 5. Survival of *A. besseyi* under hypertonic osmotic stress after *Ab-lea* RNAi.

LEA作为参与细胞抗逆保护的一类重要蛋白质,在线虫抗逆中起到重要作用。在燕麦真滑刃线虫中,LEA蛋白编码基因的表达不仅受干旱胁迫诱导,还受盐胁迫、低温胁迫等影响^[29]。用基因沉默方法抑制秀丽隐干线虫*Ce-lea-1*基因的表达后,该线虫的耐脱水胁迫能力明显下降^[7]。在水稻干尖线虫中,*Ab-lea*沉默后,线虫在高渗透压环境下存活率显著降低。表明*Ab-lea*有提高水稻干尖线虫抗高渗透压胁迫的功能,具有生物防治潜力。

Ab-lea 在水稻干尖线虫抗高渗透压胁迫中的重要作用,在防治水稻干尖线虫中具有重要的生物学意义和潜在的应用价值。通过对*Ab-lea*基因的研究,为研究水稻干尖线虫应对高渗透压胁迫的生理机制,及利用分子生物技术防治水稻干尖线虫奠定基础,为防治水稻干尖线虫提供新思路。

参考文献:

[1] Fortuner R, Williams K J O. Review of the literature on

Aphelenchoides besseyi Christie, 1942, the nematode causing “White tip” disease in rice. *Helminthol Abstr Ser B, Plant Nemat*, 1975, 44(1): 1-40.

[2] 裴艳艳, 程曦, 徐春玲, 杨再福, 谢辉. 中国水稻干尖线虫部分群体对水稻的致病力测定. *中国水稻科学*, 2012,26(2): 218-226.

Pei Y Y, Cheng X, Xu C L, Yang Z F, Xie H. Virulence of part populations of *Aphelenchoides besseyi* on rice in China. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26(2): 218-226.(in Chinese with English abstract)

[3] Xun Y, Patrick D C, Richou H, John J, Shulong C, Maurice M. Osmotic responses of different strains of *Steinernema carpocapsae*. *Nematol*, 2011, 13(7): 845-851.

[4] Glazer I, Salame L. Osmotic survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Biol Control*, 2000, 18(3): 251-257.

[5] Dure L 3rd, Greenway S C, Galau G A. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: Changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 1981, 20(14): 4162-4168.

[6] Battaglia M, Covarrubias A A. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*, 2008, 148(1): 6-24.

[7] Gal T Z, Glazer I, Koltai H. An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Let*, 2004, 577(1/2): 21-26.

[8] Browne J A, Dolan K M, Tyson T, Goyal K, Tunnacliffe A, Burnell A M. Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukar Cell*, 2004, 3(4): 966-975.

[9] Adhikari B N, Wall D H, Adams B J. Desiccation survival in an Antarctic nematode: Molecular analysis using expressed sequenced tags. *BMC Genom*, 2009, 10(1): 1-18.

[10] Tunnacliffe A, Lapinski J, Mcgee B. A putative LEA

- protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiol*, 2005, 546(1): 315-321.
- [11] Kikawada T, Nakahara Y, Kanamori Y, Iwata K, Watanabe M, McGee B, Tunnacliffe A, Okuda T. Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem Biophys Res Comm*, 2006, 348(1): 56-61.
- [12] Hand S C, Jones D, Menze M A, Witt T L. Life without water: Expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol*, 2007, 307A(1): 62-66.
- [13] Liu G, Xu H, Zhang L, Zheng Y. Fe binding properties of two soybean (*Glycine max* L.) LEA4 proteins associated with antioxidant activity. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(6): 994-1002.
- [14] Krüger C, Berkowitz O, Stephan U W, Hell R. A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J Biol Chem*, 2002, 277(28): 25062-9.
- [15] Goyal K, Walton L, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J*, 2005, 388(388): 151-7.
- [16] Tunnacliffe A, Hinch D K, Leprince O, Macherel D. LEA proteins: versatility of form and function// Dormancy and Resistance in Harsh Environments. Springer: Berlin Heidelberg, 2010: 91-108.
- [17] Dure L 3rd, Crouch M, Harada J, Ho T H, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung Z R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Bio*, 1989, 12(5): 475-486.
- [18] Shih M D, Hoekstra F A, Hsing Y I C. Late embryogenesis abundant proteins. *Adv Bot Res*, 2008, 48(2008): 211-255.
- [19] Solomon A, Salomon R, Paperna I, Glazer I. Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat-stable protein. *Parasitology*, 2000, 121(4): 409-416.
- [20] Dure Iii L. Occurrence of a repeating 11-mer amino acid sequence motif in diverse organisms. *Prot Peptide Let*, 2001, 8(2): 115-122.
- [21] Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A. Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode. *Nature*, 2002, 416(6876): 38.
- [22] Curry J, Walkersimmons M K. Unusual sequence of group 3 LEA (II) mRNA inducible by dehydration stress in wheat. *Plant Mol Biol*, 1993, 21(5): 907-912.
- [23] Hsing Y C, Chen Z Y, Shih M D, Hsieh J S, Chow T Y. Unusual sequences of group 3 LEA mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. *Plant Mol Biol*, 1995, 29(4): 863-868.
- [24] Wang F, Li D, Wang Z, Dong A, Liu L, Wang B, Chen Q, Liu X. Transcriptomic analysis of the rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Plos One*, 2014, 9(3): 131-134.
- [25] Wang F, Wang Z, Li D, Chen Q. Identification and characterization of a *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphenlenchida: Aphelenchoididae) thermotolerance-related gene: Bx-HSP90. *Inter J Mol Sci*, 2012, 13: 8819-8833.
- [26] Perry R N. Desiccation survival of parasitic nematodes. *Parasitology*, 1999, 119(S1(Parasite Adaptation to Environmental Constraints)): 19-30.
- [27] Clegg J S. Cryptobiosis: a peculiar state of biological organization. *Compar Biochem Physiol Part B Biochem Mole Biol*, 2001, 128(4): 613-624.
- [28] Crowe J H, Hoekstra F A, Crowe L M. Anhydrobiosis. (1992). *Ann Rev Physio*, 1992, 54: 579-599.
- [29] Reardon W, Chakrabortee S, Pereira T C, Tyson T, Banton M C, Dolan K M, Culleton B A, Wise M J, Burnell A M, Tunnacliffe A. Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *BMC Mol Biol*, 2010, 11(1): 6.