

秀丽隐杆线虫学习行为研究方法

赵 娜^{1,2}, 任长虹², 刘虎岐¹, 张成岗²

(1 西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨凌 712100;

2 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 100850)

[摘 要] 秀丽隐杆线虫具有受机械接触、温度、化学物质、离子、外激素等多种环境刺激产生敏感反应的能力, 其已被证明是研究行为可塑性的理想模式生物。文章阐述了秀丽隐杆线虫非联合型学习和联合型学习的研究方法、研究模型和相关分子遗传机制, 为了解高等动物学习过程、机理及相关疾病研究提供了重要信息。

[关键词] 线虫; 学习行为研究方法; 化学趋向性; 温度趋向性

[中图分类号] Q427

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)11-0055-07

Current progress on the methods for studying learning behavior of *Caenorhabditis elegans*

ZHAO Na^{1,2}, REN Chang-hong², LIU Hu-qi¹, ZHANG Cheng-gang²

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Beijing Institute of Radiation Medicine, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing 100850, China)

Abstract: The nematode *Caenorhabditis elegans* is an attractive model organism for studying the behavioral plasticity because of its ability to respond to diverse environmental stimuli such as touch, temperature, chemical, and pheromone. *C. elegans* have learning ability including both non-associative learning and associative learning. This review discusses the methods, models, molecular and genetic mechanisms of these two kinds of learning behaviors in *Caenorhabditis elegans*, which will provide a crucial novel information for understanding the process, mechanism and disease related to learning.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; research method of learning behavior; thermotaxis; chemotaxis

学习对人类及动物的生存和发展具有重要意义。关于学习的分子机制, 以往研究多采用大鼠、小鼠、果蝇等模式生物进行研究, 并取得了一系列结果。近年来秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, 以下简称线虫)也被用于学习记忆研究领域, 其以结构简单、神经功能复杂多样的优势, 引起了人们的极大兴趣。线虫是一种细胞定数动物, 两性成虫仅有

959 个体细胞, 雄性成虫只有 1 031 个体细胞。线虫神经系统的解剖结构十分简单, 仅有 302 个神经细胞, 约占整个动物体细胞总数的 1/3, 但其中却含有与高等动物脑类似的众多神经递质, 能感受各种环境刺激(机械接触、温度、化学物质、金属离子、外激素等), 可通过肌肉协调运动作出种种反应, 以完成趋利避害、进食、排便、交配等行为^[1-3]。除此之外,

* [收稿日期] 2009-03-20

[基金项目] 国家“973”计划项目(2006CB504100); 国家科技重大专项课题(2008ZXJ09014-0093); 国家自然科学基金项目(30771230, 30600365); 中国博士后科学基金特别资助基金项目(200801495); 中国博士后科学基金项目(20060400051); 军事医学科学院创新基金项目

[作者简介] 赵 娜(1983—), 女, 陕西乾县人, 在读硕士, 主要从事分子生物学及神经生物学研究。

[通信作者] 刘虎岐(1968—), 男, 陕西岐山人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事分子生物学、动物功能基因研究。

E-mail: liuhuqi@yahoo.com.cn

张成岗(1970—), 男, 陕西白水人, 研究员, 博士生导师, 主要从事动物功能基因、蛋白质组学研究。

E-mail: zhangcg@bmi.ac.cn

线虫还具有虫体透明、生长周期短、饲养条件简单、廉价、易操作的特点,基因操作便捷,可十分方便地进行转基因、RNA 干涉和突变体筛选等研究^[4-6],因此其已成为研究学习行为的理想模式生物。本文主要对线虫学习行为研究的方法及其应用进行综述,旨在为该领域的研究提供参考信息。

一般而言,线虫的学习行为是指线虫在经历某种经验之后最初行为的改变。目前研究表明,线虫的学习行为包括非联合型学习(Non-associative learning)和联合型学习(Associative learning)2 种方式。前者包括习惯化(Habituation)、非习惯化(Dishabituation)和敏感化(Sensitization)3 种形式。后者则包括温度趋向性(Thermotaxis)和化学趋向性(Chemotaxis)2 种形式。

1 非联合型学习行为研究方法

线虫具有非联合型学习能力,可对单个刺激(机械刺激、温度刺激或化学刺激)作出有效反应,例如可在受到机械刺激后做出后退反应。线虫对这种机械刺激表现为习惯化、非习惯化和敏感化反应。目前非联合型学习行为研究方法中的机械刺激研究方法,主要用于研究线虫的习惯化学习行为。

机械刺激是由 Rankin 等^[7]于 1990 年建立的研究线虫非联合型学习行为的常用方法,是基于线虫对机械刺激(常用金属片)产生后退反应来检测学习行为的方法。试验动物在特定的线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM)上,于 20 ℃培养 4 d 生长至成虫,将其转移到 3.5 cm 培养皿中,由刺激器产生刺激信号,并通过传感器传递到金属片(tap)对线虫进行刺激,同时辅以摄像检测系统拍摄动物的运动轨迹,随后根据其运动轨迹进行习惯化学习行为分析。当刺激部位在线虫前方位置时,动物将产生后退反应;而当刺激部位在线虫后方位置时,动物将产生前进反应。间断性给予刺激时,随着刺激次数的增加,线虫的后退或前进反应就会减弱,表现为移动距离缩短。其移动距离可以通过相应图像分析软件,对检测系统拍摄的线虫运动轨迹录像分析获得。习惯化异常的线虫表现为移动距离不变或变化不显著。

有学者研究发现,与其他动物一样,线虫在习惯化过程中对刺激的频率很敏感,而且线虫的短时程习惯化自发恢复比长时程习惯化更快^[8-9],进一步研究还发现,这 2 种习惯化受不同细胞通路的调控^[10]。结合 Chalfie 等^[11]绘制的控制线虫后退或前

进的神经环路, Hart 等^[12]和 Wicks 等^[13]利用激光损毁术,鉴定出由 7 个感觉神经元(ALMs、PLMs、PVDs 各 2 个,AVM)和 9 个中间神经元(AVAs、AVBs、AVDs、PVCs 各 2 个,DVA)组成的参与线虫习惯化神经网络。随后有研究小组发现,神经递质多巴胺、谷氨酸在线虫习惯化中发挥着重要作用^[14-15]。以上结果说明,机械刺激方法是研究线虫非联合型学习中长时程和短时程习惯化的理想方法,但其仪器装置比较复杂,不易掌握,操作上具有一定的难度。

2 联合型学习行为研究方法

联合型学习行为指个体可以在事件与事件之间建立起某种形式的联系或预示关系。虽然线虫结构简单,但也具有联合型学习行为,可将 2 种刺激联系在一起,从而通过其中一种刺激作为线索来寻找食物或躲避有害的环境^[16-17]。目前,已有大量文献报道了线虫的联合型学习行为,就其研究方法来看主要包括温度趋向性和化学物质趋向性检测分析 2 类方法。

2.1 温度趋向性

温度趋向性检测分析方法是由 Hedgecock 和 Ressel 建立的^[18],他们利用此方法成功地研究了线虫的温度趋向行为,随后被广泛用于研究线虫温度趋向联合型学习行为。该法是基于线虫能将温度和食物联系在一起的行为,通过测试分析线虫在温度梯度培养基上的运动轨迹,来评价线虫学习行为的研究方法。食物充足的线虫在温度梯度皿上能寻找到其原来的培养温度,而饥饿的线虫则不能准确地定位到原来的培养温度。目前,常采用放射状温度梯度检测分析法研究线虫的温度趋向性,大体过程为:将 NGM 皿于室温下干燥 1 h 倒置,在皿底部边缘距中央 1~1.5 cm 的位置做上记号,取装有 20 mL 冰醋酸(熔点 16.6 ℃)的管形瓶,置于 NGM 培养皿表面中央位置,2~3 h 后在培养皿表面形成连续的辐射状温度梯度,此时的培养皿称为温度趋向性检测皿(TTX 皿)。随后移走冰醋酸玻璃管,将一只线虫移入 TTX 皿培养基边缘标记的位置,让其自由爬行 1 h,之后将 TTX 皿置于 4 ℃直至拍照分析。

有研究者曾采用线性温度梯度的方法,研究线虫温度趋向性学习记忆。温度梯度的形成主要是借助铝平台和水浴锅(5 ℃和 35 ℃),在培养基上建立一个 17~23 ℃的线性温度梯度^[19]。后来有人对该温度梯度的建立做了改进,用 2 个热电极代替 2 个水浴锅与

铝质平板两端相连^[20]。这种改进可以将温度精确控制到 0.1℃,显著提高了试验温度控制的准确性,但是由于线性温度梯度整体建立过程比辐射状温度梯度复杂,故大多数研究者采用前一种方法。需要注意的是这种方法试验场所应保持无风状态,避免阳光照射影响温度变化,并且室内温度保持在 25℃,湿度维持在 20%~30%,保持试验台面水平。

以上述 2 种温度趋向性检测方法为基础,Mori 等^[21]和 Mohri 等^[22]发现,ADF 和 AIY 神经元可介导动物的热驱动作用,而 AIZ 神经元则对冷驱动起作用,同时 RIA 神经元对热驱动和冷驱动均有作用,从而能鉴定出线虫温度趋向性的神经环路。Gomez 等^[23]发现,AFD、AIY 和其他一些神经元中钙结合蛋白对线虫等温迁移的温度趋向行为是必需的。Clark 等^[24]研究发现,在空间温度梯度环境中,线虫 ADF 神经元活动直接与其探索性运动相关。Kodama 等^[25]报道,胰导素样信号通路中 INS-1 基因对线虫温度趋向性是必需的,且对抗 DAF-2 的信号通路,同时还发现,INS-1 和 HEN-1 对线虫的温度趋向性具有协同作用。最近 Biron 等^[26]报道称,嗅觉神经元对温度有反映,而且 AWC 神经元对温度表现出随机的钙信号事件,且信号事件的频率与线虫培养温度、刺激方式相关。Mori 等^[27]认为,有关线虫温度趋向性行为的研究,可从分子水平、细胞水平、神经环路等方面,为揭示温度感知和神经可塑性奠定基础。

2.2 化学物质趋向性

1973 年,Ward 等^[28]首次报道了线虫可以感知并区分多种水溶性物质和挥发性物质。现已鉴定出,线虫可感知 5 类水溶性化学物质和 7 种挥发性化学物质。目前发现,共有 12 类感觉神经元参与线虫的化学喜爱性和厌恶性行为。线虫的这种行为主

要包括以下几种:味觉学习(Taste learning)、嗅觉学习(Olfactory learning)、厌恶性学习(Aversive learning)、背景条件习惯化学习(Context condition in habituation)、情景依赖性学习(State-dependent learning)以及场合环境学习(Occasion setting)^[29]。以上 6 种学习形式对应的测定分析方法有以下几种。

2.2.1 味觉学习 线虫味觉学习是将水溶性化学物质和饥饿联系起来的学习行为。继 Ward 等^[28]发现线虫能够感知化学物质之后,Saeki 等^[30]进一步完善了用于分析线虫将化学物质和饥饿联想在一起的化学趋向性学习测定方法。野生型线虫对 NaCl 具有趋向性,在饥饿与 NaCl 2 种条件刺激后,线虫则躲避 NaCl。NaCl 趋向性分析实验装置是含有 NGM 培养基、直径为 9 cm (或 6 cm 培养皿)的普通培养皿,也称为趋向性检测皿(图 1)。味觉学习的具体过程包括将同步化培养的、食物充分的年轻成虫,用 M9 缓冲液洗脱干净后,转移至无任何食物的新鲜驯化皿或模拟条件驯化皿上,于 20℃驯化 4 h,接着将驯化的线虫洗脱转移至检测皿中。将线虫移入检测皿之前的 14~24 h,检测皿需经过如下处理:用一内径为 5 mm 的木塞打孔器,从含 100 mmol/L NaCl 的琼脂培养基上,切割下圆柱状琼脂块,转移到检测皿上 A 点,以便在培养基上产生连续的 NaCl 梯度。线虫放入检测皿前移走该琼脂块。为了防止动物移动,在此位置加入 1 μL 0.5 mol/L NaN₃,将检测皿置于 20℃条件下让线虫自由爬行 30 min,最后计算趋向指数(CL): $CL = (N_A - N_B) / (N_{ALL} - N_C)$ 。式中: N_A 、 N_B 、 N_C 、 N_{ALL} 分别表示 A 区、B 区、C 区和检测皿中所有线虫数目^[31]。此外,该测定方法也可用于其他水溶性物质的趋向性检测,如核苷酸(cAMP)、氨基酸(赖氨酸)等,且试验时仅需调整检测物的用量即可。

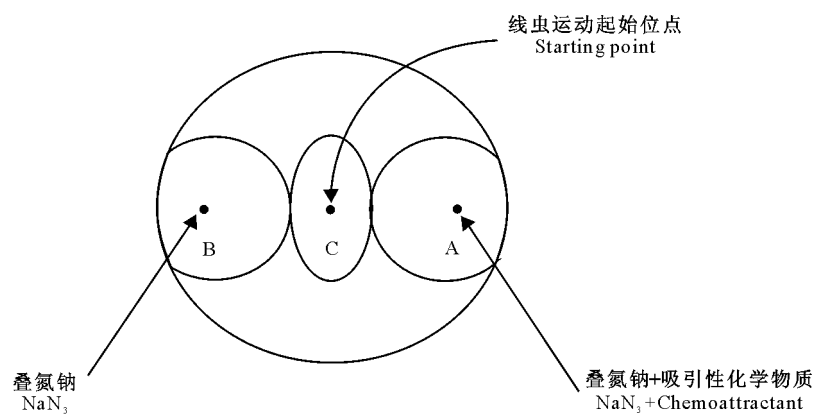


图 1 线虫化学趋向性检测皿示意图
Fig. 1 Diagram of chemotaxis

自从味觉学习研究方法建立以来,多数学者采用这种测定方法研究线虫的学习行为。Saeki 等^[30]利用该方法研究发现,线虫胰岛素样信号通路的 *ins-1*、*daf-2*、*age-1*、*pdk-1* 和 *akt-1* 基因参与线虫的化学趋向性学习。Kano 等^[32]研究发现,NMDA 离子型谷氨酸受体介导线虫的学习记忆行为。Suzuki 等^[33]报道,ASE 感觉神经元在线虫的化学趋向性行为中存在着功能不对称性。目前,味觉学习法已经成为一种比较成熟的、研究线虫对化学物质趋向性学习的经典方法,但该方法对试验环境温度比较敏感,环境温度应维持在 20 ℃,并保持试验环境安静。

2.2.2 嗅觉学习 线虫的挥发性物质学习研究方法,是以一种挥发性物质的嗅觉适应性为基础,将该物质的气味和食物联系起来的分析方法,由 Heather 和 Bargmann 于 1995 年建立^[34]。饥饿时,线虫对苯甲醛的喜爱性降低,即表现为对该物质的适应

性;有食物时,线虫对甲醛的适应性被抑制。试验时,首先对线虫进行适应性处理,将线虫在 NGM 培养基上,经充足的食物喂饲到成虫时,用缓冲液洗涤后转移到含有或不含食物的 NGM 培养基中,将化学物质添加于培养皿盖的琼脂块上后,将培养皿用封口膜密封,将线虫进行预适应处理 1 h 后,用缓冲液洗脱,转移到化学趋向皿中,参考对水溶性物质的检测方法进行趋向性检测^[35]。Heather 等^[34]利用此方法研究发现,*adp-1* 基因突变体对 AWC 神经元感知的气味没有适应性,但该突变基因影响适应性要求的钙依赖性通路;此外突变基因 *osm-9* 对适应性的影响与 AWC 神经元对气味的感知存在交叉过程。随后 Nuttley 等^[35]用此方法研究发现,5-羟色胺对线虫的挥发性学习记忆模式中的食物效应起作用。Tsui 等^[36]报道,老年线虫可通过 5-羟色胺介导增加对高浓度苯甲醛的吸引力记忆。

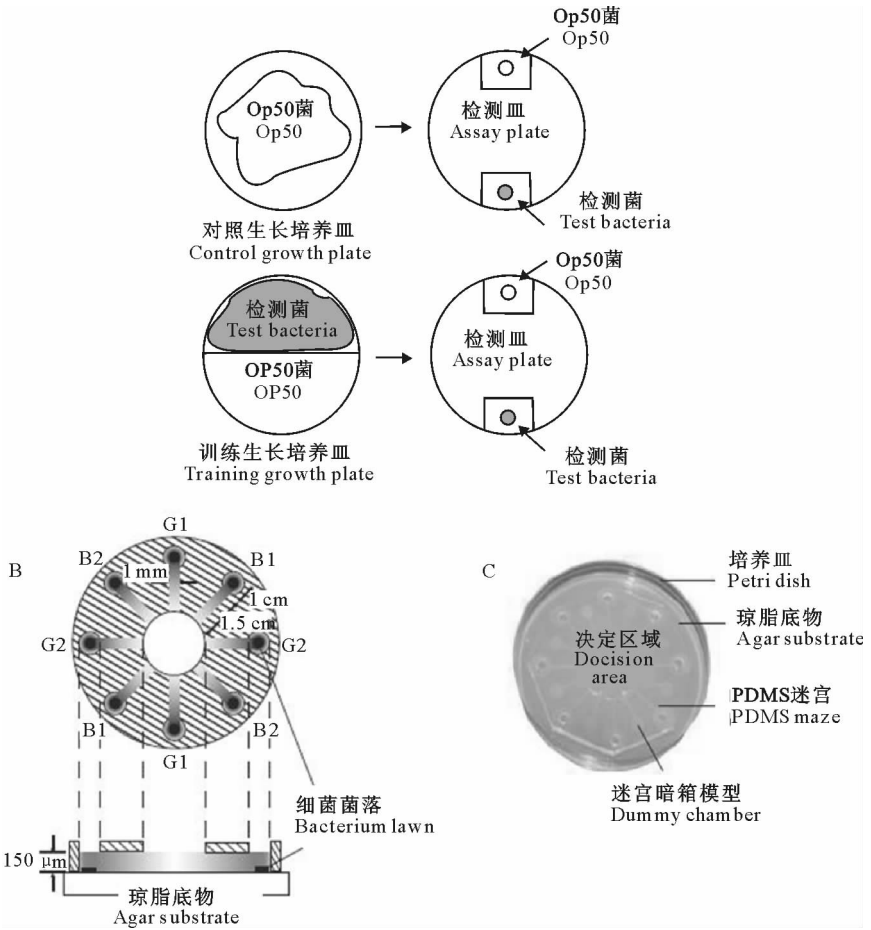


图 2 线虫嗅觉迷宫测试示意图

A. 二重选择测试; B,C. 嗅觉偏爱性四壁迷宫测试

Fig. 2 Diagram of olfactory maze assay

A. Diagram of the two-choice assay; B,C. Scheme and photograph of the four-choice maze assay for olfactory preference

2.2.3 厌恶性学习 厌恶性学习研究方法是将菌体及其气味联系起来的一种联合型学习测试方法。

该研究方法是 Zhang 等^[37]对线虫的化学趋向性方法进行改进后得到的。将线虫对化学物质的学习测试改为对细菌的学习测试,首次用于线虫对细菌偏好性学习的研究中。研究过程包括二重选择测试和四壁迷宫测试。二重选择测试研究线虫对菌体及其气味联想性学习的方法(图 2),试验时将 50~200 只线虫在某种菌上训练后,经缓冲液洗涤转移到检测皿两菌(经训练的致病菌和非致病菌 OP50)等距离的中间位置,动物自由爬行 1~2 h 后,计算选择指数和学习指数,通过其反映线虫对该测试菌的气味偏爱性学习能力。四壁迷宫测试试验主要用来测试线虫对菌体的偏好性,其装置见图 2,该装置中培养基上 8 个等距离承载菌液的小孔,对应着由 8 个通道连接在培养基中央放置线虫的位置。试验时致病菌和非致病菌相隔放置在不同小孔中,对角线位置放置同一种菌液,共计可放置 4 种菌液(2 种为二重选择测试菌,其他 2 种分别为致病菌和非致病菌)。首先在测试菌上培养训练线虫,将线虫放置在四壁迷宫检测皿中央位置后,迅速将四壁迷宫放在检测皿上方开始检测,其他操作与二重选择测试相

同。通过计算各种菌的学习指数可反映线虫的气味性学习行为。Zhang 等^[37]利用此方法研究发现,线虫对气味偏好性改变学习,包括喜爱性的提高及厌恶性的增强 2 个过程,而在中间神经元中,5-羟色胺通过一种 5-羟色胺门控氯离子通道因子(MOD-1)对该行为发挥作用。

2.2.4 其他研究方法 除上述研究方法外,已报道的其他研究线虫学习行为的方法还有许多,如 Bettinger 等^[38]研究线虫嗅觉适应性时,以酒精为背景条件,试验方法与经典的化学趋向性研究方法相似,在训练和检测线虫时向对应的 NGM 培养基中加入或不加入酒精,观察酒精在线虫对苯甲醛等气味性物质适应性中的作用;Law 等^[39]将水溶性盐(NaCH₃COO 和 NH₄Cl)加入 NGM 培养基中,作为一种背景条件,观察盐类物质在线虫对挥发性物质适应性中的作用;Rankin^[40]在研究线虫习惯化时,加入醋酸钠(NaCH₃COO)作为背景条件,首次发现线虫具有习惯化学习中联系背景条件的学习能力。为便于理解和比较,现将主要的研究线虫学习行为方法的优缺点及主要用途总结于表 1 中。

表 1 常用的线虫学习行为研究方法的优缺点及其应用范围

Table 1 Characteristics of the learning research methods in *C. elegans*

方法 Method	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	主要用途 Main purpose
机械刺激法 Mechanical stimuli	习惯化保持时间长 Habituation training long	仪器设备操作困难 Indrumentation manipulate hardly	非联合型学习行为,用于习惯化神经通路研究 Non-association learning; studying the neural circuit of habituation
温度趋向性学习法 Thermotaxis learning	易操作 Manipulate easily	受环境影响较大 Environment effecting more	联合型学习行为,用于温度敏感神经元介导的温度趋向性神经环路的研究,及胰岛素通路中温度趋向行为相关机制研究 Association lernning, study the neural circuit related of templatature-sensitive neuron and the mechanism of thermotaxis in insulin-like signaling
味觉学习法 Taste learning	易操作 Manipulate easily	受环境影响较大 Environment effecting more	联合型学习行为,用于化学趋向性相关 机制研究和嗅觉神经元相关机制研究 Association learning,study the mechanism of chemo-taxis and olfactory neuron related
嗅觉学习法 Olfactory learning	易操作 Manipulate easily	受环境影响较大 Environment effecting more	

3 结论与展望

综上所述,研究者既可根据研究目的、特定生理和病理过程中所参与的神经环路等,也可以根据试验的可操作性选择不同的方法,研究秀丽隐杆线虫学习行为。由于化学趋向性和温度趋向性学习具有易操作的特点,已成为研究者的首选方法。线虫学习行为研究方法的建立,都是基于其一些生理习性提出的,根据其机体对环境中熟悉的或不熟悉因素的感知而保护自身以求生存,因此还可据此发掘新的研究方法,为研究多种刺激引起的行为可塑性提

供更多行为评估依据,对了解高等动物的学习过程、机理及相关疾病研究提供重要线索。

[参考文献]

[1] Riddle D L,Blumenthal T,Meyer B J,et al. *Caenorhabditis elegans* II [M]. NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1997:1-2.

[2] Brenner S. The genetic of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genet-ics,1974,77,71-94.

[3] 秦峰松,杨崇林. 小线虫,大发现:*Caenorhabditis elegans* 在生命科学研究中的重要贡献 [J]. 生命科学,2006,18(5):419-424.

Qin F S, Yang C L. Worm into discoveries:*Caenorhabditis ele-*

- gans as a model organism of life science research [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2006, 18(5): 419-424. (in Chinese)
- [4] 王亚辉. 秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*)——一个研究神经系统的最简单模型 [J]. 中国神经科学杂志, 2000, 16(1): 60-64.
Wang Y H. *Caenorhabditis elegans*—a simplest model for the study of nervous system [J]. Chinese Journal of Neuro Science, 2000, 16(1): 60-64. (in Chinese)
- [5] 任长虹, 张成岗. 秀丽线虫: 低氧应答研究的模式生物 [J]. 生理科学进展, 2008, 39(1): 84-86.
Ren C H, Zhang C G. *Caenorhabditis elegans*: A good model for hypoxia response research [J]. Progress in Physiological Sciences, 2008, 39(1): 84-86. (in Chinese)
- [6] 任长虹, 张成岗. 秀丽隐杆线虫在神经科学研究中的应用 [J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(6): 575-578, 582.
Ren C H, Zhang C G. Application of *Caenorhabditis elegans* in neuroscience research [J]. Bulletin of The Academy of Military Medical Sciences, 2008, 32(6): 575-578, 582. (in Chinese)
- [7] Rankin C H, Beck C D O, Chiba C M. *Caenorhabditis elegans*: A new model system for the study of learning and memory [J]. Behav Brain Res, 1990, 37(1): 89-92.
- [8] Wicks S R, Rankin C H. Effects of tap withdrawal response habituation on other withdrawal behaviors: the localization of habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Behav Neurosci, 1997, 111(3): 342-353.
- [9] Rankin C H, Broster B S. Factors affecting habituation and recovery from habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Behav Neurosci, 1992, 106(2): 239-249.
- [10] Rose J K, Rankin C H. Analyses of habituation in *Caenorhabditis elegans* [J]. Learn Mem, 2001, 8(2): 63-69.
- [11] Chalfie M, Sulston J E, White J G, et al. The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Neurosci, 1985, 5(4): 956-964.
- [12] Hart A C, Sims S, Kaplan J M. Synaptic code for sensory modalities revealed by *Caenorhabditis elegans* GLR-1 glutamate receptor [J]. Nature, 1995, 378(6552): 82-85.
- [13] Wicks S R, Rankin C H. Integration of mechanosensory stimuli in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Neurosci, 1995, 15(3): 2434-2444.
- [14] Rankin C H, Wicks S R. Mutations of the *Caenorhabditis elegans* brain-specific inorganic phosphate transporter eat-4 affect habituation of the tap-withdrawal response without affecting the response itself [J]. J Neurosci, 2000, 20(11): 4337-4344.
- [15] Sanyal S, Wintle R F, Kindt K S, et al. Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans* [J]. EMBO, 2004, 23(5): 473-482.
- [16] 寿天德. 神经生物学 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 415.
Shou T D. Neurobiology [M]. 2nd edition. Beijing: Higher Education Press, 2006: 415. (in Chinese)
- [17] de Bono M, Maricq A V. Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans* [J]. Annu Rev Neurosci, 2005, 28: 451-501.
- [18] Hedgecock E M, Russell R L. Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72(10): 4061-4065.
- [19] Ito H, Inada H, Mori I. Quantitative analysis of thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. J Neurosci Meth, 2006, 154(12): 45-52.
- [20] William S R, Aravinthan D T. Thermotaxis in *Caenorhabditis elegans* analyzed by measuring responses to defined thermal stimuli [J]. J Neurosci, 2002, 22(13): 5727-5733.
- [21] Mori I, Ohshima Y. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1995, 376(6538): 344-348.
- [22] Mohri A, Kodama E, Kimura K D, et al. Genetic control of temperature preference in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2005, 169(3): 1437-1450.
- [23] Gomez M, DeCastro E, Guarín E, et al. Ca^{2+} signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *Caenorhabditis elegans* [J]. Neuron, 2001, 30(1): 241-248.
- [24] Clark D A, Gabel C V, Gabel H, et al. Temporal activity patterns in thermosensory neurons of freely moving *Caenorhabditis elegans* encode spatial thermal gradients [J]. Behavioral Systems Cognitive, 2007, 27(23): 6083-6090.
- [25] Kodama E, Kuhara A, Mori I, et al. Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in *Caenorhabditis elegans* [J]. Gene Dev, 2006, 20(21): 2955-2960.
- [26] Biron D, Wasserman S, Thoma J H, et al. An olfactory neuron responds stochastically to temperature and modulates *Caenorhabditis elegans* thermotactic behavior [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(31): 11002-11007.
- [27] Mori I, Sasakura H, Kuhara A. Worm thermotaxis: a model system for analyzing thermosensation and neural plasticity [J]. Curr Opin Neurobiol, 2007, 17(6): 712-719.
- [28] Ward S. Chemotaxis by the Nematode *Caenorhabditis elegans*: Identification of attractants and analysis of the response by use of mutants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70(3): 817-821.
- [29] Ye H Y, Ye B P, Wang D Y. Learning and learning choice in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Neurosci Bull, 2006, 22(6): 355-360.
- [30] Saeki S, Yamamoto M, Lino Y. Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. J Exp Biol, 2001, 204(10): 1757-1764.
- [31] Tomioka M, Adachi T, Suzuki H, et al. The insulin/PI 3-kinase pathway regulates salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans* [J]. Neuron, 2006, 51(5): 613-625.
- [32] Kano T, Brockie P J, Sassa T, et al. Memory in *Caenorhabditis elegans* is mediated by NMDA-type ionotropic glutamate receptors [J]. Curr Biol, 2008, 18(13): 1010-1015.
- [33] Suzuki H, Thiele T R, Faumont S, et al. Functional asymmetry in *Caenorhabditis elegans* taste neurons and its computational role in chemotaxis [J]. Nature, 2008, 454(7200): 114-

- 117.
- [34] Heather A C, Bargmann C I. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Neuron*, 1995, 14(4): 803-812.
- [35] Nottley W M, Atkinson-Leadbetter K P, Van Der Kooy D. Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19): 12449-12454.
- [36] Tsui D, Van Der Kooy D. Serotonin mediates a learned increase in attraction to high concentrations of benzaldehyde in aged *Caenorhabditis elegans* [J]. *Learn Mem*, 2008, 15(11): 844-855.
- [37] Zhang Y, Lu H, Bargmann C. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2005, 438(7065): 179-184.
- [38] Bettinger J C, McIntire S L. State-dependency in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genes Brain Behav*, 2004, 3(2): 266-272.
- [39] Law E, Nottley W M, Van Der Kooy D. Contextual taste cues modulate olfactory learning in *Caenorhabditis elegans* by an occasion-setting mechanism [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(14): 1303-1308.
- [40] Rankin C H. Context conditioning in habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Behav Neurosci*, 2000, 114(3): 496-505.

(上接第 54 页)

- [8] He L, Bailey J L, Buhr M M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential [J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(1): 69-79.
- [9] Kuster C E, Althouse G C. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and X-CELL extenders [J]. *Theriogenology*, 1999, 52(3): 365-376.
- [10] Medeiros C M, Forell F, Oliveira A T, et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? [J]. *Theriogenology*, 2002, 57(1): 327-344.
- [11] Vidament M, Daire C, Yvon J M, et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide [J]. *Theriogenology*, 2002, 58(2/4): 249-251.
- [12] Squires E L, Keith S L, Graham J K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa [J]. *Theriogenology*, 2004, 62(6): 1056-1065.
- [13] Gomes G M, Jacob J C F, Medeiros A S L, et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed [J]. *Theriogenology*, 2002, 58(2/4): 277-279.
- [14] Bianchi I, Calderam K, Maschio É F, et al. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation [J]. *Theriogenology*, 2008, 69(5): 632-638.
- [15] Ritar A J, and Salamon S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat [J]. *Aust J Biol Sci*, 1982, 35(3): 305-312.
- [16] Pursel V, Johnson L. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure [J]. *J Anim Sci*, 1975, 40(1): 99-102.
- [17] Zeng W X, Shimada M, Isobe N, et al. Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality [J]. *Theriogenology*, 2001, 56(3): 447-458.
- [18] Aziz D M. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay [J]. *Anim Reprod Sci*, 2006, 92(1/2): 1-8.
- [19] 龙 翔, 邵秀林. 不同冷冻保护剂在猪精液冷冻中的作用分析 [J]. *畜禽业*, 1999(9): 18-19.
- Long X, Tai X L. The effect of different cryoprotectants on the cryopreservation of boar semen [J]. *Livestock and Poultry Industry*, 1999(9): 18-19. (in Chinese)
- [20] 朱士恩, 曾申明, 吴通义, 等. OPS 法玻璃化冷冻牛卵母细胞的研究 [J]. *中国农业科学*, 2002(6): 18-19.
- Zhu S E, Zeng S M, Wu T Y, et al. Vitrification of bovine oocytes by open pulled straw [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002(6): 18-19. (in Chinese)
- [21] Holt W V. Basic aspects of frozen storage of semen [J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 62(1/3): 3-22.
- [22] Lukaszewicz E, Chrzanowska M, Jerysz A, et al. Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser* L.) gander semen [J]. *Anim Reprod Sci*, 2004, 80(1/2): 163-173.