北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

油松响应松材线虫侵染的m^{6}A甲基化修饰特征分析及关键基因功能验证

桑悦 栗宇鹏 王美玲 焦志远 李伟

Characteristics of m^{6}A methylation modification of *Pinus tabuliformis* in response to *Bursaphelenchus xylophilus* infection and functional verification of key genes

Sang Yue, Li Yupeng, Wang Meiling, Jiao Zhiyuan, Li Wei

引用本文:
桑悦, 栗宇鹏, 王美玲, 焦志远, 李伟. 油松响应松材线虫侵染的m^{6}A甲基化修饰特征分析及关键基因功能验证[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(6):152–163. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260175
Sang Yue, Li Yupeng, Wang Meiling, Jiao Zhiyuan, Li Wei. Characteristics of m^{6}A methylation modification of *Pinus tabuliformis* in response to *Bursaphelenchus xylophilus* infection and functional verification of key genes[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6):152–163. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260175

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20260175

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

油松*SAUR*基因家族鉴定及其干旱胁迫表达模式分析
Identification of *SAUR* gene family in *Pinus tabuliformis* and analysis on its expression patterns under drought stress
北京林业大学学报, 2024, 46(8): 57–67. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230333

油松*PtDof*基因家族鉴定与*PtDof*1基因响应低温胁迫的功能分析
Identification of *PtDof* gene family and functional analysis of *PtDof*1 gene in response to low temperature stress in *Pinus tabuliformis*
北京林业大学学报, 2025, 47(10): 84–95. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250179

松材线虫细胞色素*cyp*–13*A*11基因RNA干扰载体的构建及其功能分析
Construction and its function analysis of RNA interference vector of cytochrome *cyp*–13*A*11 gene in *Bursaphelenchus xylophilus*
北京林业大学学报, 2021, 43(1): 96–102. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200025

松材线虫效应因子基因筛选及*Bx–Hh–grl*功能研究
Screening of effector genes of *Bursaphelenchus xylophilus* and the function of *Bx–Hh–grl*
北京林业大学学报, 2021, 43(9): 87–93. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210002

‘84K’杨组氨酸激酶基因*PaHK*3*a*的表达及功能分析
Expression and function analysis of histidine kinase gene *PaHK*3*a* of poplar ‘84K’
北京林业大学学报, 2021, 43(2): 46–53. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200070

松材线虫P糖蛋白在药物代谢过程中的功能研究
Functional analysis of P–glycoprotein in drug metabolism of *Bursaphelenchus xylophilus*
北京林业大学学报, 2021, 43(11): 71–78. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200387

DOI:10.12171/j.1000−1522.20260175

油松响应松材线虫侵染的 m^{6}A 甲基化修饰特征分析及关键基因功能验证

桑 悦[1] 栗宇鹏[2] 王美玲[1] 焦志远[1] 李 伟[1]
（1. 北京林业大学生物科学与技术学院，林木遗传育种全国重点实验室，林木育种与生态修复国家工程研究中心，北京 100083；2. 山西省关帝山国有林管理局吴城种子园，山西 吴城 033099）

摘要:【目的】松材线虫病已经对我国油松林的生态系统构成了严重威胁。目前，针叶树响应病原侵染的表观转录调控机制尚不清晰。本研究旨在探究松材线虫侵染下油松 m^{6}A 甲基化修饰谱的动态变化规律，筛选受其调控的关键 *R* 基因并验证抗病功能，进而阐明 m^{6}A 修饰调控 *R* 基因表达的分子机制，初步构建“甲基化酶−m^{6}A 修饰−*R* 基因−抗病性”的调控模型，以期为针叶树抗病分子育种提供理论依据和基因资源。**【方法】**以 3 年生油松实生苗为材料，接种松材线虫 14 d 后，利用 Oxford Nanopore 直接 RNA 测序技术对油松茎段进行全转录组与 m^{6}A 修饰谱测序。通过多组学联合分析筛选关键候选基因 *PtLRR-XI*1，并利用农杆菌介导法将其异源转化至拟南芥中，结合侵染发病率及抗氧化生理指标测定，验证其抗病功能。通过烟草共表达验证 *PtLRR-XI*1 是否受到 m^{6}A 甲基化修饰的调控。**【结果】**松材线虫侵染后，油松茎段共鉴定出 4 527 个差异表达基因，其中甲基转移酶基因表达量下调，去甲基化酶基因表达量上调。全基因组水平共鉴定到 62 787 个差异甲基化位点，主要富集于 3′UTR 区域，且呈现“RRACH”保守基序。联合分析筛选出 268 个同时发生表达与甲基化显著变化的转录本，富集于植物−病原互作和 MAPK 信号通路。从中鉴定到 *LRR-RLK* 家族基因 *PtLRR-XI*1，其启动子含有多种激素及胁迫响应元件，在针叶树中高度保守。该基因异源过表达后，转基因拟南芥的松材线虫发病率由野生型的 72.9% 降至 25.0%～39.6%。进一步对 *PtLRR-XI*1 3′UTR 区两个差异 m^{6}A 修饰位点进行定点突变后，瞬时转化本氏烟叶片后，突变序列的 GFP 荧光强度较未突变对照显著减弱，表明 *PtLRR-XI*1 基因表达受到 m^{6}A 修饰的调控。**【结论】**松材线虫侵染可诱导油松 m^{6}A 甲基化修饰系统重编程，*PtLRR-XI*1 是受其调控的关键抗病基因，过表达后可通过提高拟南芥对松材线虫的抗性，该基因 3′UTR 区的 m^{6}A 修饰位点能够正向调控其表达。研究结果为油松抗病分子育种提供了具有潜力的基因靶点。

关键词：油松；松材线虫；m^{6}A 甲基化；*R* 基因；抗病分子育种；基因表达
中图分类号：S791.254；S722 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2026)06−0152−12
引文格式：桑悦，栗宇鹏，王美玲，等. 油松响应松材线虫侵染的 m^{6}A 甲基化修饰特征分析及关键基因功能验证［J］. 北京林业大学学报，2026，48(6)：152−163. Sang Yue, Li Yupeng, Wang Meiling, et al. Characteristics of m^{6}A methylation modification of *Pinus tabuliformis* in response to *Bursaphelenchus xylophilus* infection and functional verification of key genes［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6): 152−163.

Characteristics of m^{6}A methylation modification of *Pinus tabuliformis* in response to *Bursaphelenchus xylophilus* infection and functional verification of key genes

Sang Yue[1] Li Yupeng[2] Wang Meiling[1] Jiao Zhiyuan[1] Li Wei[1]
(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Wucheng Seed Orchard of Guandi Mountain State-owned Forest Administration Bureau, Wucheng 033099, Shanxi, China)

收稿日期: 2026−04−13 **修回日期:** 2026−05−28
基金项目: 科技创新 2030 重大项目课题（2022ZD0401605）。
第一作者: 桑悦。主要研究方向：森林遗传与树木改良。Email: Sang13965711430@163.com 地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。
责任作者: 李伟，教授。主要研究方向：针叶树遗传改良。Email: bjfuliwei@bjfu.edu.cn 地址：同上。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn；https://journal.bjfu.edu.cn

Abstract: ［**Objective**］Pine wilt disease has posed a serious threat to the *Pinus tabuliformis* forest ecosystem in China. Currently, the epitranscriptomic regulatory mechanisms of conifers in response to pathogen infection remain unclear. This study aimed to investigate the dynamic changes of the m^{6}A methylation landscape in *P. tabuliformis* upon *B. xylophilus* infection, screen and validate key m^{6}A-regulated *R* genes, elucidate the molecular mechanism of m^{6}A-mediated *R* gene regulation, and construct a "methylase-m^{6}A-R gene-resistance" regulatory model, thereby providing theoretical foundations and genetic resources for molecular breeding of disease-resistant conifers. ［**Method**］Three-year-old *P. tabuliformis* seedlings were used as materials. Fourteen days after inoculation with *B. xylophilus*, the stem segments were subjected to whole-transcriptome and m^{6}A modification profiling using Oxford Nanopore direct RNA sequencing. Multi-omics integrative analysis was performed to screen the key candidate gene *PtLRR-XI*1, which was then heterologously transformed into *Arabidopsis thaliana* via Agrobacterium-mediated transformation. Its disease resistance function was validated by assessing infection incidence and antioxidant physiological indicators. The methylation modification was validated by co-expression in tobacco. ［**Result**］After *B. xylophilus* infection, a total of 4 527 differentially expressed genes were identified in the stem segments of *P. tabuliformis*, with downregulated expression of methyltransferase genes and upregulated expression of demethylase genes. A total of 62 787 differentially methylated sites were identified at the genome-wide level, predominantly enriched in the 3′UTR regions, exhibiting a conserved "RRACH" motif. Integrative analysis identified 268 transcripts with simultaneous significant changes in expression and methylation, which were enriched in the plant-pathogen interaction and MAPK signaling pathways. Among these, *PtLRR-XI*1, a gene belonging to the *LRR-RLK* family, was identified. Its promoter contains multiple hormone- and stress-responsive elements, and it is highly conserved in conifers. Heterologous overexpression of this gene reduced the incidence of pine wilt disease in transgenic *A. thaliana* from 72.9% in the wild type to 25.0%−39.6%. Furthermore, after site-directed mutagenesis of two differential m^{6}A modification sites in the 3′UTR of *PtLRR-XI*1, transient transformation in *Nicotiana benthamiana* leaves showed that the GFP fluorescence intensity of the mutated sequence was significantly weaker than that of the unmutated control, indicating that the expression of *PtLRR-XI*1 is regulated by m^{6}A modification. ［**Conclusion**］*B. xylophilus* infection induces reprogramming of the m^{6}A methylation modification system in *P. tabuliformis*. *PtLRR-XI*1 is a key resistance gene regulated by this modification, and its overexpression enhances the resistance of *A. thaliana* to *B. xylophilus*. The m^{6}A modification sites in the 3′UTR region of this gene positively regulate its expression. This study offers a potential gene target for molecular breeding of disease resistance in *P. tabuliformis*.

Key words: *Pinus tabuliformis*; *Bursaphelenchus xylophilus*; m^{6}A methylation; *R* gene; molecular breeding for disease resistance; gene expression

松材线虫病是由松材线虫（*Bursaphelenchus xylophilus*）引起的毁灭性森林病害，已成为我国乃至全球松林生态系统面临的最严重威胁之一[1]。我国于 1982 年在南京中山陵首次发现该病，短短数十年间，病害已从南方扩散至暖温带地区，最北已延伸至辽宁省，并发现了新的传播媒介—云杉花墨天牛（*Monochamus saltuarius*）[2−3]。截至目前，全国松材线虫病发生面积已超过 180 万 hm^2，累计致死松树近 2 000 万株，造成的直接经济损失和生态服务功能损失高达上千亿元，成为我国近年来发生最为严重、防控最为困难的林业病害[4]。

m^{6}A RNA 甲基化是真核生物 mRNA 上最丰富、研究最深入的转录后修饰形式[5−6]。该修饰由甲基转移酶复合物、去甲基化酶和结合蛋白协同调控，动态可逆地影响 mRNA 的稳定性、剪接、出核转运及翻译效率等关键过程[7−8]。在植物中，m^{6}A 修饰已被证实广泛参与胚胎发生、根系发育、开花时间、果实成熟等生长发育过程，并响应干旱、盐碱、高温等非生物胁迫[9−11]。此外，m^{6}A 修饰作为调控 mRNA 命运的关键机制，在动物和植物中已被证实可调控多种免疫相关基因的表达。近年来，其在植物抗病中的作用逐渐受到关注。在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中，m^{6}A 甲基转移酶复合物成员 *FIP*37 的突变会影响病原相关分子模式触发的免疫反应，m^{6}A 缺失的植

物对细菌和真菌病原体感染表现出更强的抗性[12−13]。在水稻(*Oryza sativa*)中，病毒侵染后 m^{6}A 甲基化水平显著升高，差异甲基化基因富集于 RNA 沉默、植物激素代谢及抗病相关通路[14]。这些研究表明，m^{6}A 修饰在植物与病原互作中发挥着重要的调控作用。然而，现有研究多集中于草本植物或农作物，在木本植物尤其是针叶树种中，m^{6}A 修饰如何响应病原侵染、其在抗病过程中的动态变化特征及调控机制，目前仍属空白。

R 基因是植物先天免疫系统的核心组件，其编码的受体蛋白能够直接或间接识别病原分泌的效应因子，激活效应触发免疫，引发活性氧(ROS)爆发、细胞壁加固、防御相关基因上调表达及局部细胞程序性死亡等防御反应，有效限制病原的侵染与扩散[15−16]。在针叶树抗松材线虫研究中，近年来取得了重要进展。在马尾松(*Pinus massoniana*)中鉴定到的 *LRR-RLK* 家族基因 *PnRLKs*32 与拟南芥 *AtFLS*2 高度同源，瞬时过表达可引发 ROS 爆发并激活 PTI 通路下游基因表达[17]。另一项研究从马尾松中分离了抗性基因 *PmHs*1*pro*-1，其可直接识别松材线虫分泌的效应蛋白 BxSCD1，激活 ROS 代谢相关酶的表达，从而有效抵御线虫侵染[18]。最新研究[19]在油松中鉴定了 *CrRLK*1*L* 家族成员 *PtTHE*1，其胞外结构域可直接识别松材线虫效应蛋白 BxEF1，激活水杨酸信号通路，增强寄主抗性。上述研究从不同角度揭示了针叶树 *R* 基因在抗松材线虫中的关键作用。然而，*R* 基因的精确表达对于维持植物免疫稳态至关重要—过高的 R 蛋白水平可能导致 ETI 过度激活，引发剧烈的过敏性坏死反应，反而对健康组织造成损伤[20]。因此，*R* 基因的表达必然受到多层次、多水平的精细调控。

油松(*Pinus tabuliformis*)是我国特有的常绿针叶树种，广泛分布于北方半干旱地区，具有抗旱、耐贫瘠、水土保持能力强等特点，是该区域的主要造林树种和用材林树种，具有极高的生态和经济价值[21]。然而，油松对松材线虫高度敏感，室内接种实验[22−23]表明，接种后油松幼苗表现出典型的感病症状，包括针叶黄化、萎蔫、树脂分泌减少，最终整株枯萎死亡，死亡率可达 80% 以上。组织病理学研究[8]发现，侵染后油松木质部管胞发生空穴化，水分输导受阻，薄壁细胞变形坏死，叶绿体结构破坏，光合作用能力显著下降。尽管已有研究从生理生化层面描述了油松的感病特征，但其响应松材线虫侵染的分子机制，尤其是转录后水平的调控机制，仍知之甚少。

基于上述背景，本研究以油松为对象，利用 Oxford Nanopore 直接 RNA 测序技术，系统解析松材线虫侵染后油松的转录组与 m^{6}A 甲基化修饰谱，联合分析筛选受 m^{6}A 调控的候选 *R* 基因，通过拟南芥异源过表达验证其功能，初步探究 m^{6}A 修饰通过调控 *R* 基因表达参与抗病的新模式。研究结果将为揭示油松响应松材线虫侵染的分子机制奠定基础，也为油松抗病遗传改良提供潜在的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 植物材料与松材线虫接种

为了探究松材线虫侵染后油松茎段的转录组与 m^{6}A 甲基化修饰变化，以 3 年生油松实生苗为材料，所使用松材线虫由辽宁沈阳自然感病的红松经分离得到，经灰葡萄孢扩繁培养后，用无菌水冲洗收集，3 000 r/min 离心 5 min 弃上清，0.2% 硫酸链霉素浸泡 3 min 后离心弃上清，在光学显微镜下计数，采用皮接法[22]接种(2 000 条/株)，接种部位选择油松主茎分支下方 2 cm 处，对照组同样创伤处理后接种无菌水，实验组、对照组各接种 9 株油松苗。所有幼苗置于相同环境下常规管理，于接种后第 14 天采集茎段样品，3 株混为 1 个样本，每种处理做 3 次生物学重复，处理组样本记为 BX1、BX2、BX3，对照组样本记为 CK1、CK2、CK3。液氮速冻后于−80 ℃ 保存，用于 RNA 提取与测序。

1.2 直接 RNA 测序与数据分析

为获得油松茎段的全长转录组表达谱及 m^{6}A 甲基化修饰谱，提取油松茎段总 RNA，使用 Oxford Nanopore Direct RNA Sequencing Kit 构建文库，在 PromethION 平台进行测序。原始数据经 Dorado 进行 Base Calling 与质量过滤($Q \geqslant 10$)，获得高质量 clean reads。通过 minimap2 将 reads 比对至油松参考基因组，利用 Flair 构建一致性转录本，采用 salmon 进行基因表达定量(TPM)。差异表达基因筛选阈值为$|\log_2 FC| \geqslant 1$(FC 为差异倍数)且 $p_{adj} < 0.01$。

为了验证测序数据的准确性，将 RNA 样本反转成 cDNA，随机选取 3 个差异表达基因进行荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析，根据基因序列在生工官网设计并合成引物(表 1)，以 *PtActin*12 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量。

M^{6}A 修饰位点采用 Dorado 内置修饰检测模型(rna004_130bps_sup@v5.0.0)进行识别，计算每个位点的甲基化比例分数。使用 modkit 内置的贝叶斯校正(Jeffrey's prior)和覆盖度截断(max-depth = 100)来获得低覆盖位点的稳定的修饰比例估计值，同时结合严格的差异阈值($|effect_size| \geqslant 0.1$ 且 $p < 0.05$)，过滤掉背景波动导致的假阳性位点。功能富集分析使用 clusterProfiler 软件包完成。

表 1　qRT-PCR 引物序列

Tab. 1　qRT-PCR primer sequences

引物名称	引物序列(5′—3′)
*PtActin*12-F	GGCTGACACCATCACCAGAAC
*PtActin*12-R	GTTGGTCGCCCTCGTCATACT
*PtFIP*37-F	AATTGACAGAAGGCAAGAAACAGAAAG
*PtFIP*37-R	TGCTCCATCAACGACATTTCCAC
PtHAKAI-F	AATGAGGCACAAGAGAAGGATGTTC
PtHAKAI-R	ACACTGAAGGAGAGGGAGACAATAC
*PtMETTL*4-F	CATTGATTCTGCTGCGATTCTTAGG
*PtMETTL*4-R	CAAGTTCAACGAGAGTGTTCTTATCTG

为直观展示差异表达基因的整体表达模式，基于差异表达分析结果，采用 R 软件中的 ggplot2 包绘制火山图，横坐标表示基因表达差异倍数($\log_2$FC)，纵坐标表示差异显著性水平($-\lg p_{adj}$)，以$|\log_2 FC| \geqslant 1$ 且 $p_{adj} < 0.01$ 为阈值，分别以红色和蓝色标记上调和下调的显著差异表达基因。采用 R 软件中的 pheatmap 包绘制层次聚类热图。基于差异表达基因的 TPM 表达量矩阵，采用 *Z*-score 方法对每行基因的表达值进行标准化处理，采用欧氏距离计算样本间和基因间的相似性，采用 Ward.D2 算法进行层次聚类。

为分析 m^{6}A 修饰位点的基因组分布特征，基于鉴定的 m^{6}A 位点信息，以 50 kb 为滑动窗口统计每条染色体上 m^{6}A 位点的密度，采用 R 软件 circlize 包绘制染色体分布图。利用基因组注释文件，将 m^{6}A 位点注释到基因的 5′UTR、CDS、3′UTR 及内含子等区域，统计各区域的位点数量及比例，并计算各区域的位点密度(每千碱基的位点数)，绘制分布比例图与密度图。使用 R 软件 ggseqlogo 包提取每个 m^{6}A 位点上下游各 2 个碱基(共 5 bp 序列)，进行多序列比对和可视化，生成序列标志图，识别保守基序。差异甲基化位点与差异甲基化转录本的统计结果基于 modkit 软件输出，使用 R 软件 ggplot2 包绘制柱状图展示上调和下调位点/转录本的数量分布。

为解析 m^{6}A 修饰与基因表达之间的关联，将差异甲基化转录本($|\log_2 FC| \geqslant 1$ 且 score > 3)与差异表达基因($|\log_2 FC| \geqslant 1$ 且 $p_{adj} < 0.01$)进行整合，以基因表达差异倍数为横坐标、甲基化差异倍数为纵坐标，使用 R 软件 ggplot2 包绘制九象限图，展示转录本在两个维度上的变化。采用 R 软件 clusterProfiler 包对共调控转录本进行 GO 与 KEGG 通路富集分析，以 $p_{adj} < 0.05$ 为显著性阈值。

1.3　系统进化与启动子分析

为明确 *PtLRR-XI*1 的进化关系及启动子调控特征，从联合分析结果中筛选 *PtLRR-XI*1(PtQG33030)为候选基因。基因功能注释显示该基因属于 RLK-Pelle_LRR-XI-1 蛋白激酶家族，从 NCBI 数据库下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、月季(*Rosa chinensis*)、云南松(*Pinus yunnanensis*)、红豆杉(*Taxus chinensis*)、侧柏(*Thuja plicata*)、日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)及小杉兰(*Diphasiastrum complanatum*)物种的 RLK-Pelle_LRR-XI-1 蛋白序列，利用 MEGA 11 软件，采用邻接法(Bootstrap 重复 1 000 次)构建 PtLRR-XI1 与其他物种 RLK 蛋白的系统进化树。提取起始密码子上游 2 000 bp 序列，提交至 PlantCARE 数据库进行启动子顺式作用元件预测，结果在 TBtools 进行可视化。

1.4　候选基因克隆与功能验证

为验证 *PtLRR-XI*1 的抗病功能，根据油松基因序列，设计特异性引物(表 2)。以油松茎段 cDNA 为模板，PCR 扩增 *PtLRR-XI*1 的全长 CDS 序列。采用无缝克隆技术将目的片段插入 PBI121-eGFP 载体，转化大肠杆菌后经测序验证，获得重组质粒 PBI121-*PtLRR-XI*1-eGFP。将重组质粒转化至 GV3101 农杆菌感受态细胞，采用蘸花法[24]转化拟南芥 Col-0。收获 T_0 代种子后，通过卡那霉素筛选，使用 CTAB 法[25]提取拟南芥叶片 DNA，经 PCR 鉴定获得阳性植株，保留培养至收获种子。

为评估 *PtLRR-XI*1 过表达对松材线虫抗性的影响，将收获的阳性苗种子春化处理后播种于 MS 固体培养基，在长日照条件(16 h 光照/8 h 黑暗)下培养至 3 周龄。选取生长一致的幼苗，每株选取 3 片成熟莲座叶，用灭菌镊子在叶片中部制造轻微伤口。用无菌水配制成 600 条/10 μL 的松材线虫悬浮液。接种时，每株拟南芥选取 3 片叶片，共滴加 10 μL 线虫悬浮液，接种后覆膜保湿以维持高湿度环境，WT

表 2　*PtLRR-XI*1 无缝克隆引物序列

Tab. 2　*PtLRR-XI*1 seamless cloning primer sequence

引物名称	引物序列(5′—3′)
*PtLRR-XI*1-F	CTTCGAATTCTGCAGTCGACATGAGCTGCCAAAGGAATAT
*PtLRR-XI*1-R	CGGGCCCGCGGTACCGTTGTTCGTCGCGCTCAAAA

与转基因每个株系各接种 48 株。接种后第 5 天统计各株系的发病情况，发病标准为叶片出现黄色病斑或萎蔫。

1.5 *PtLRR-XI*1 3′UTR 区 m^{6}A 修饰位点的定点突变与瞬时表达分析

为验证 *PtLRR-XI*1 3′UTR 区 m^{6}A 修饰位点对基因表达的影响，以野生型拟南芥 Col-0 基因组 DNA 为模板，扩增 *PtLRR-XI*1 基因的 3′UTR 区域（全长 157 bp），引物序列见表 3（F：GFP-*PtLRR-XI*1-F，R：pGD-*PtLRR-XI*1-R）。PCR 产物经测序验证正确后，连接至 pGD 载体，获得 pGD-*PtLRR-XI*1-3′UTR -GFP 重组质粒。以该质粒为模板，针对目标 m^{6}A 修饰位点（第 66 位和第 75 位腺苷酸）设计定点突变引物（F：*PtLRR-XI*1-6675AG-F，R：pGD-*PtLRR-XI*1-R），采用重叠延伸 PCR 法将靶点腺苷酸（A）突变为鸟嘌呤（G），以消除 m^{6}A 修饰能力。突变后，包含靶位点的 5 bp 基序由“GTATT”变为“GTGTT”，由“AAACA”变为“AAGCA”。测序验证突变成功后，将突变后的 *PtLRR-XI*1-3′UTR -mut 片段分别与 *GFP* 报告基因融合，构建 pGD-GFP-*PtLRR-XI*1-3′UTR 和 pGD-GFP-*PtLRR-XI*1-3′UTR -mut 重组质粒，转化至 GV3101 农杆菌感受态细胞。

为观察突变对基因表达的影响，将上述重组质粒及 P19 沉默抑制子质粒分别转化农杆菌 GV3101，挑取阳性单菌落接种于含卡那霉素（50 mg/L）和利福平（50 mg/L）的 LB 液体培养基中，28 ℃ 振荡培养至 OD_{600} = 0.8 ~ 1.0。室温下 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，用侵染缓冲液（10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L MES、200 μmol/L 乙酰丁香酮，pH 5.6）重悬，将 P19 菌液与重组质粒菌液分别调整至 OD_{600} = 0.2 和 0.4，按 1∶1 体积比混合，室温静置 3 h。

选取生长状态一致的 4 ~ 6 周龄本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）叶片，使用 1 mL 无针注射器将混合菌液从叶片背面浸润注射。为控制实验变量，在同一叶片主脉两侧分别注射未突变和突变载体，每侧注射面积约 1 cm^2。每个处理注射 3 片叶片，作为 3 次生物学重复。注射后 48 h，剪取注射区域叶片，置于激光共聚焦显微镜下观察 GFP 荧光信号（激发波长 488 nm，发射波长 510 ~ 530 nm），采集荧光图像。以空载体 pGD-GFP 作为阴性对照，比较未突变和突变序列的荧光强度差异。

1.6 数据统计

所有实验设 3 次生物学重复，数据以平均值 ± 标准差表示。转基因株系和野生型之间差异显著水平分别为 $p < 0.05$（*）、$p < 0.01$（**）、$p < 0.001$（***）、$p < 0.000\ 1$（****），ns 表示无显著差异，统计分析在 Microsoft Excel、GraphPad Prism 中完成，采用独立样本 *t* 检验进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 油松响应松材线虫侵染的甲基化相关基因表达变化

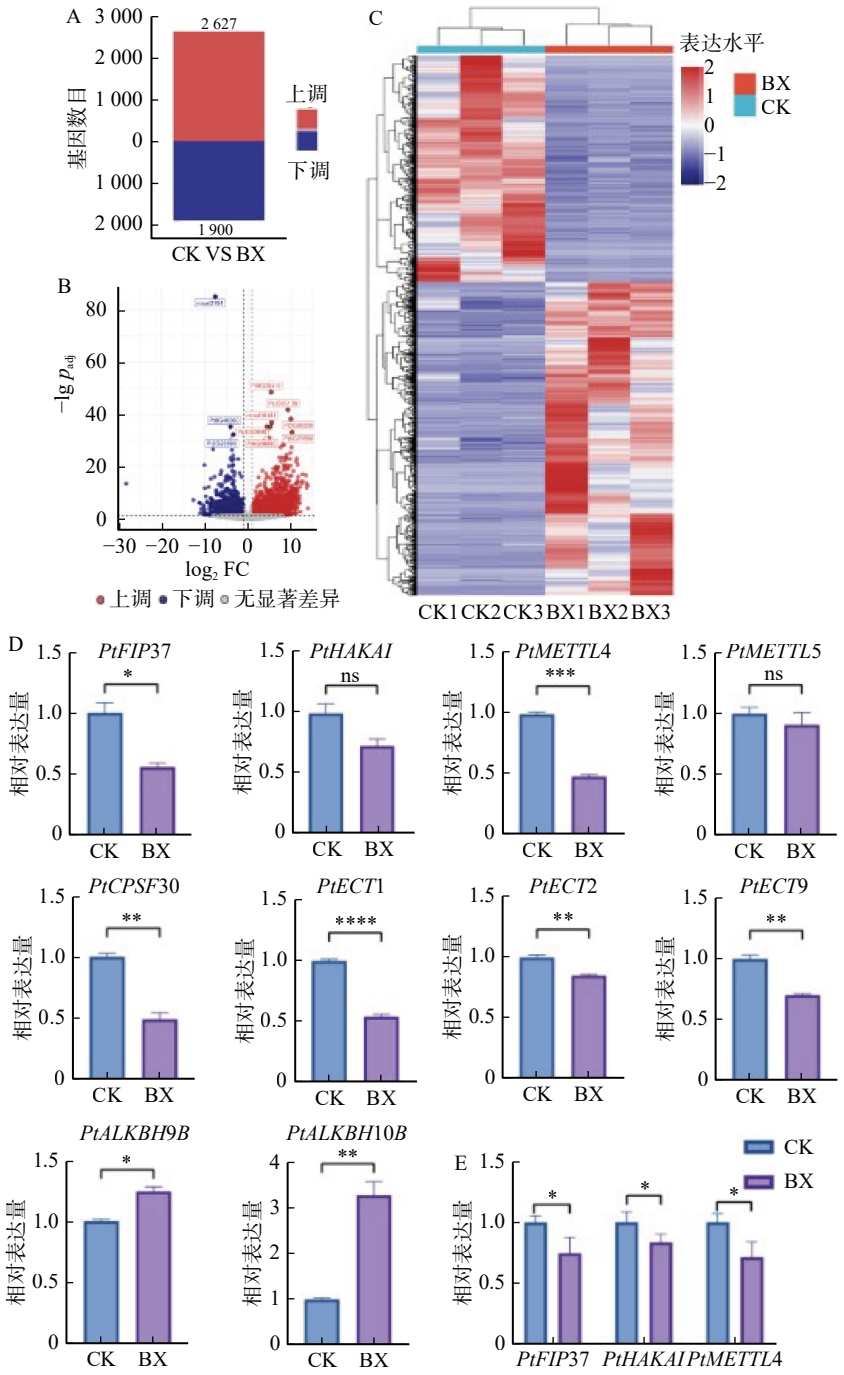
松材线虫侵染后，油松茎段差异表达基因分析表明，接种 14 d 后，处理组（BX1、BX2、BX3）与对照组（CK1、CK2、CK3）之间共鉴定出 4 527 个差异表达基因，其中 2 627 个基因显著上调，1 900 个基因显著下调（图 1A ~ B）。层次聚类分析显示，这些差异表达基因在两组间具有明显的表达模式区分（图 1C）。

通过转录组数据对比松材线虫侵染后甲基化相关基因相对表达量的变化，结果（图 1D）显示：与对照组相比，接种松材线虫后，甲基转移酶基因 *PtHAKAI* 和 *PtFIP*37 的表达显著下调；去甲基化酶基因 *PtALKBH9B* 和 *PtALKBH*10*B* 的表达均显著上调；在阅读蛋白基因中，*PtCPSF*30、*PtECT*1、*PtECT*2 和 *PtECT*9 的表达均显著上调。qRT-PCR 结果显示出与转录组基因表达量一致的变化趋势（图 1E）。以上结果表明，松材线虫侵染诱导了油松 m^{6}A 甲基化修饰系统的重编程，主要表现为甲基转移酶基因的下调、去甲基化酶及阅读蛋白基因的上调，这种表达模式的变化可能导致了 m^{6}A 甲基化水平的下降或修饰识别模式的改变。

表 3 *PtLRR-XI*1 3′UTR 克隆引物序列

Tab. 3 3′UTR of *PtLRR-XI*1 cloning primer sequence

引物名称	引物序列（5′—3′）
pGD-GFP-F	GAGATCTCGAGCTCAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
GFP-R	TCAAAGATCTACCATGTACA
GFP-*PtLRR-XI*1-F	TGTACATGGTAGATCTTTGAGTTCAGTTCATTTATTTCAT
pGD-*PtLRR-XI*1-R	TATCTAGATCCGGTGGATCCCATCATCATCGGTATAAGTT
PtLRR-XI1-6675AG-F	TGTACATGGTAGATCTTTGAGTTCAGTTCATTTATTTCATAATTATTATTAT AAAAAATAGGGAATTTATATGAGATGATTAAGTGTTATGTAAGC



A 为差异表达基因数目统计；B 为差异表达基因火山图；C 为差异表达基因层次聚类热图；D 为甲基化相关基因相对表达量。FC 为差异倍数。*、**、***、****分别表示在 $p < 0.05$、$p < 0.01$、$p < 0.001$、$p < 0.000\,1$ 水平上差异显著。下同。

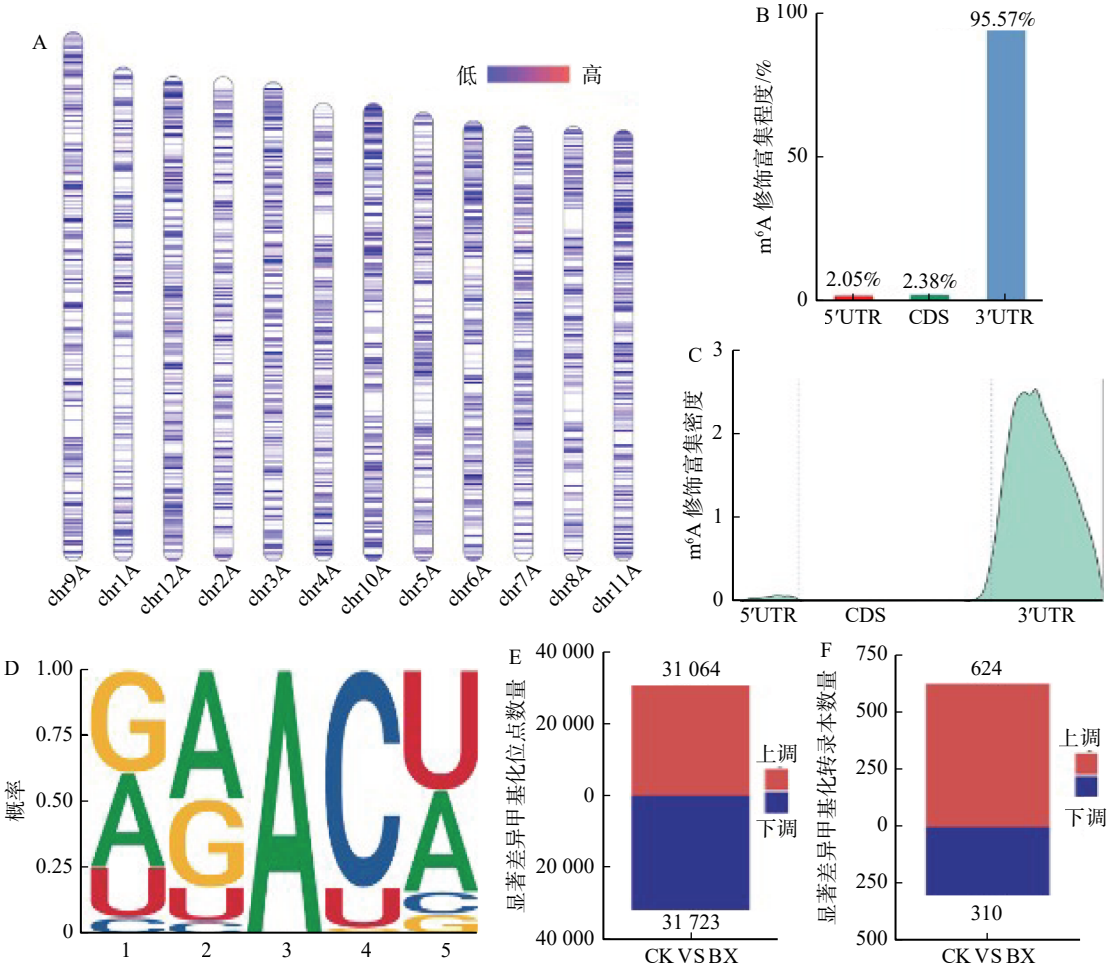
图 1　松材线虫侵染后油松茎段差异表达基因及甲基化相关基因表达变化

Fig. 1　Differential expression of genes and methylation-related genes in stem segments of *P. tabuliformis* after *B. xylophilus* infection

2.2　油松响应松材线虫侵染的 m^{6}A 修饰特征

对鉴定到的高置信度 m^{6}A 位点进行系统性注释与统计，发现油松 m^{6}A 修饰具有明确的分布特征。m^{6}A 位点在基因组层面呈现非均匀分布，以 50 kb 为窗口的染色体密度分析显示，甲基化修饰在基因富集区或特定功能域呈现明显的聚集现象。以 BX1 为例，m^{6}A 甲基化位点在基因组中呈非均匀分布，主要富集于 3′UTR 区域，占比超过 95%，（图 2A ~ C）。保守基序分析结果（图 2D）显示，油松 m^{6}A 位点显著富集于“RRACH”序列，其中 R 代表嘌呤 A/G，H 代表 A/C/U，而甲基化发生在中间的腺苷 A 上。

分别对差异转录本和差异甲基化位点进行分析，在位点水平，接种组与对照组间共鉴定出 62 787 个显著差异甲基化位点，其中 31 064 个位点甲基化修饰上调，31 723 个位点甲基化修饰下调，上调与下调位点数基本相当（图 2E）；在转录本水平，两组间共鉴定出 934 个显著差异甲基化转录本，其中 624 个转录本甲基化修饰上调，310 个转录本甲基化修饰



A 为 m⁶A 修饰在染色体上的分布；B 为 m⁶A 修饰在基因功能区的分布比例；C 为 m⁶A 修饰在基因功能区的分布密度；D 为 m⁶A 修饰富集的保守基序；E 为差异甲基化位点数目统计；F 为差异甲基化转录本数目统计。

图 2 松材线虫侵染后油松茎段 m⁶A 甲基化修饰特征

Fig. 2 Characteristics of m⁶A methylation modification in stem segments of *P. tabuliformis* after *B. xylophilus* infection

下调，上调数量显著多于下调（图 2F）。

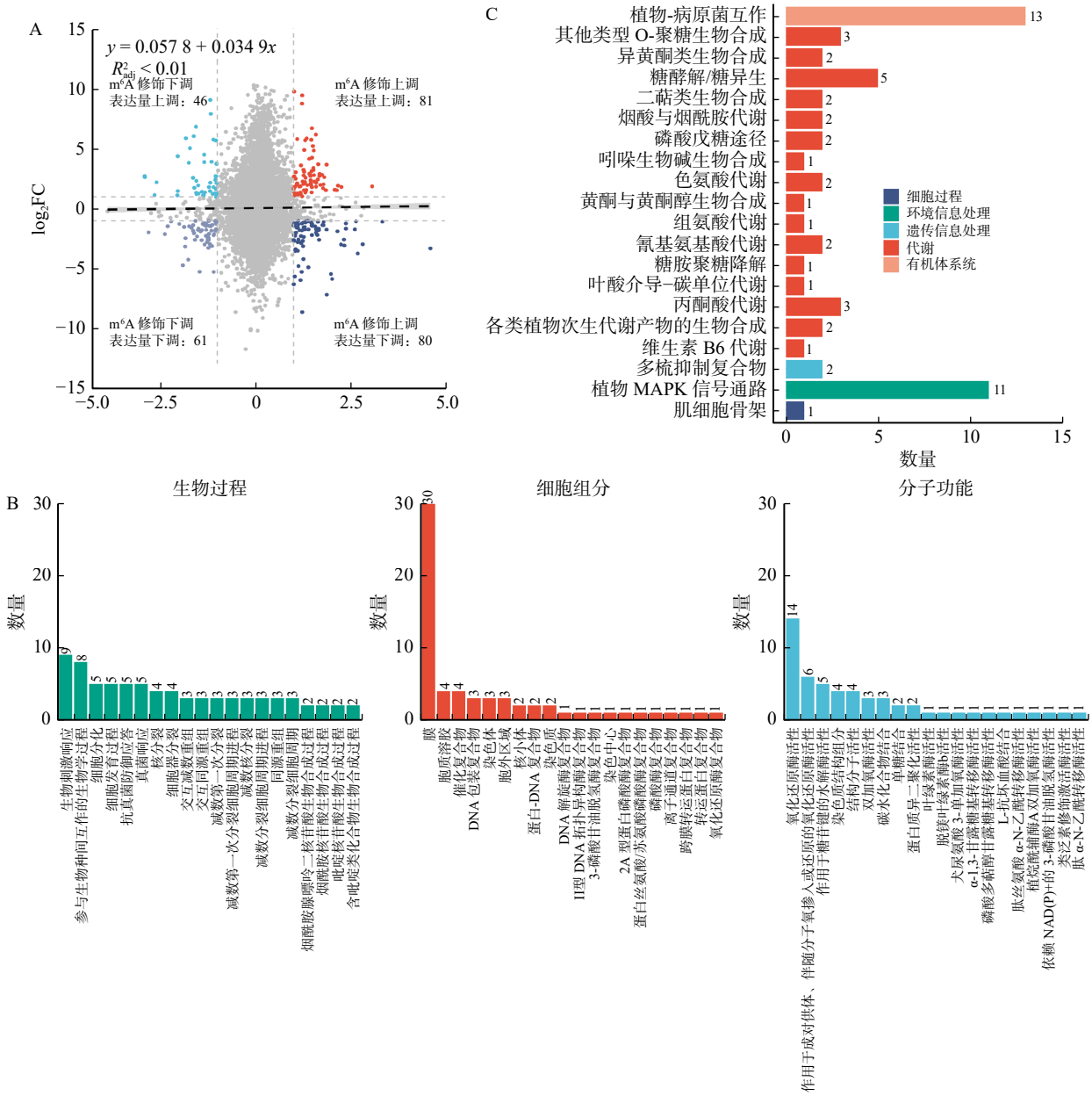
2.3 转录组与 m⁶A 甲基化组联合分析筛选共差异基因

通过整合油松响应松材线虫侵染的差异表达基因与差异甲基化转录本数据，筛选出同时发生表达变化和 m⁶A 甲基化修饰变化的基因，根据变化趋势可划分为 9 类，由九象限图呈现（图 3A）。其中，显著差异表达且显著差异 m⁶A 甲基化的转录本共 268 个，可分为 4 类：m⁶A 修饰下调、表达量上调的 46 个；m⁶A 修饰上调、表达量上调的 81 个；m⁶A 修饰下调、表达量下调的 61 个；m⁶A 修饰上调、表达量下调的 80 个。

GO 功能富集分析显示，差异基因显著富集于对生物刺激的响应、真菌防御响应等防御相关生物过程，以及氧化还原酶活性、水解酶活性等分子功能，细胞定位以细胞膜为主，这表明油松在侵染后可能通过强化病原识别、氧化还原稳态调控及蛋白互作等途径启动了抗病防御反应（图 3B）。KEGG 通路富集进一步明确，差异基因显著富集的通路中，以植物–病原互作通路和 MAPK 信号通路最为关键，构成油松识别侵染、启动防御的分子骨架；同时，能量代谢重编程、次生代谢物合成及表观调控相关通路的富集，共同参与抗病防御过程（图 3C）。

2.4 候选抗病基因 *PtLRR-XI*1 分子特征与功能分析

通过对差异基因进一步注释，发现 9 个 RLK 家族 *R* 基因的表达与 m⁶A 修饰呈多种变化模式，综合筛选选定差异最大的 *PtLRR-XI*1（PtQG33030）为目标基因（图 4A）。启动子顺式作用元件预测显示，其启动子区分布有 ABA、MeJA、SA、GA 及乙烯等激素响应元件，低温、干旱、缺氧等非生物胁迫元件，以及生物胁迫防御相关元件（图 4B）。进化分析表明，PtLRR-XI1 蛋白与红豆杉、侧柏、日本柳杉等针叶树的 RLK 蛋白聚为一支，在针叶树中高度保守（图 4C）。为验证其功能，构建 pBI121-*PtLRR-XI*1-eGFP 过表达载体并转化拟南芥，经 PCR 鉴定可获得与目的基因大小一致的条带，保留阳性植株收获种子获得 4 个独立阳性株系（图 4D）。松材线虫接种



A 为差异表达基因与差异甲基化转录本联合分析的九象限图；B 为差异基因 GO 功能富集分析；C 为差异基因 KEGG 通路富集分析。

图 3　松材线虫侵染后油松差异表达基因与差异甲基化转录本的联合分析

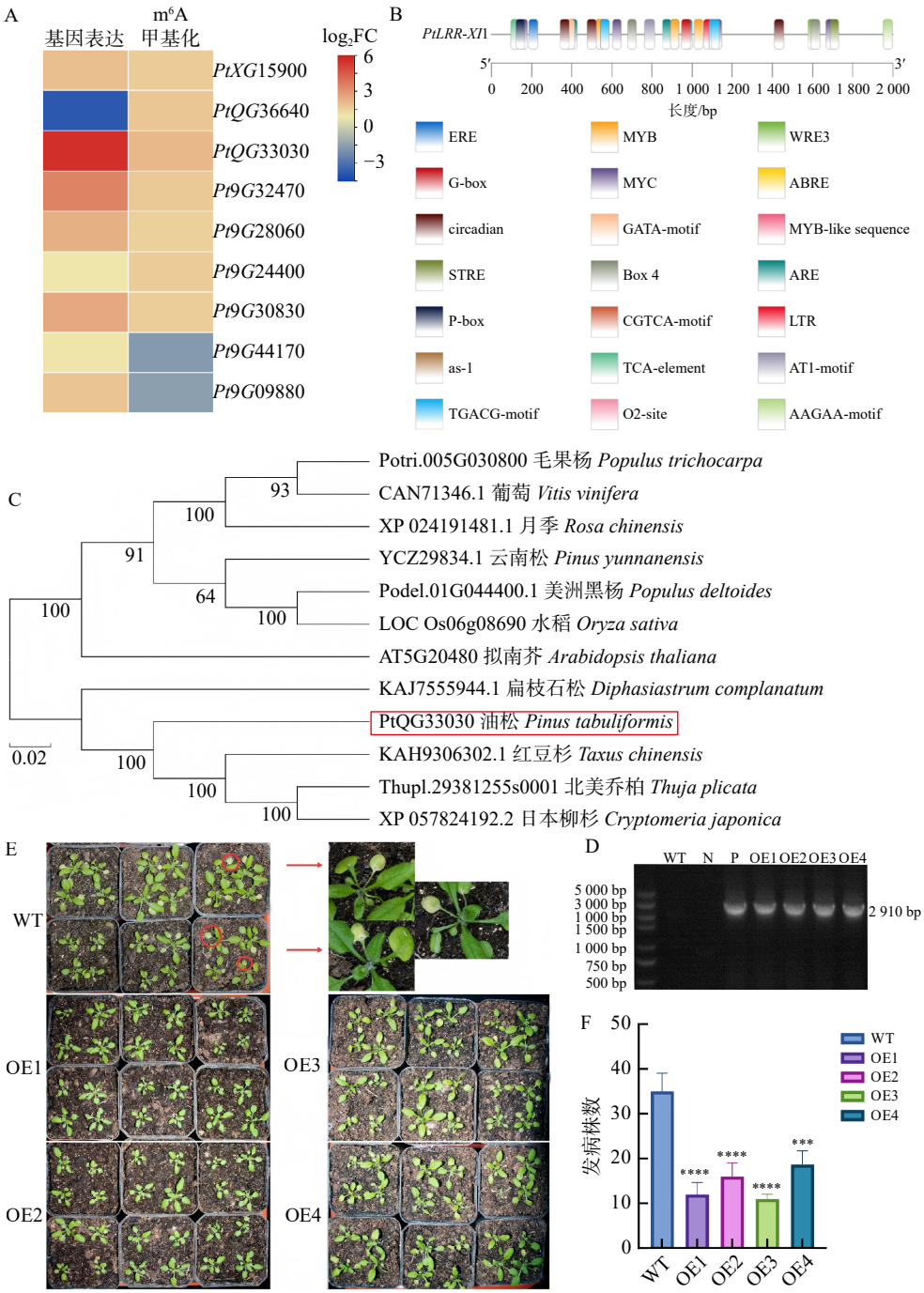
Fig. 3　Integrative analysis of differentially expressed genes and differentially methylated transcripts in *P. tabuliformis* after *B. xylophilus* infection

后第 5 天，野生型发病率约 72.9%，而过表达株系发病率显著降至 22.9% ~ 39.6%，表明 *PtLRR-XI*1 过表达可显著增强拟南芥对松材线虫病的抗性（图 4E ~ F）。

2.5　*PtLRR-XI*1 基因 m^{6}A 修饰位点的功能验证

为验证 *PtLRR-XI*1 基因差异 m^{6}A 修饰位点的功能，对目标位点进行了定点突变并开展瞬时表达分析。经查询，该基因的主要 m^{6}A 修饰差异位点在 3′UTR 区域，该 3′UTR 序列全长为 157 bp，其中第 66 位和第 75 位的腺苷酸（A）被鉴定为差异 m^{6}A 修饰位点。为消除 m^{6}A 修饰能力，将这两个位点的 A 突变为鸟嘌呤（G）。突变后，包含靶位点的 5 bp 基序序列由“GTATT”变为“GTGTT”，由“AAACA”变为“AAGCA”（图 5A）。测序结果证实目标位点已成功突变，获得了 *PtLRR-XI*1-3′UTR-mut 定点突变载体。

将未突变和定点突变的 3′UTR 序列分别与 GFP 报告基因融合，构建 pGD-GFP-*PtLRR-XI*1-3′UTR 和 pGD-GFP-*PtLRR-XI*1-3′UTR-mut 载体，瞬时转化本氏烟叶片。激光共聚焦显微镜观察结果（图 5B）显示，未突变序列（GFP-*PtLRR-XI*1-3′UTR）的叶片中检测到较强的绿色荧光信号，而突变序列（GFP-*PtLRR-XI*1-3′UTR-mut）的荧光强度明显减弱。这表明该 3′UTR 区域的差异 m^{6}A 位点是功能性修饰位点，其甲基化修饰可促进基因表达；突变后该位点失去修饰能力，导致表达水平显著下降。



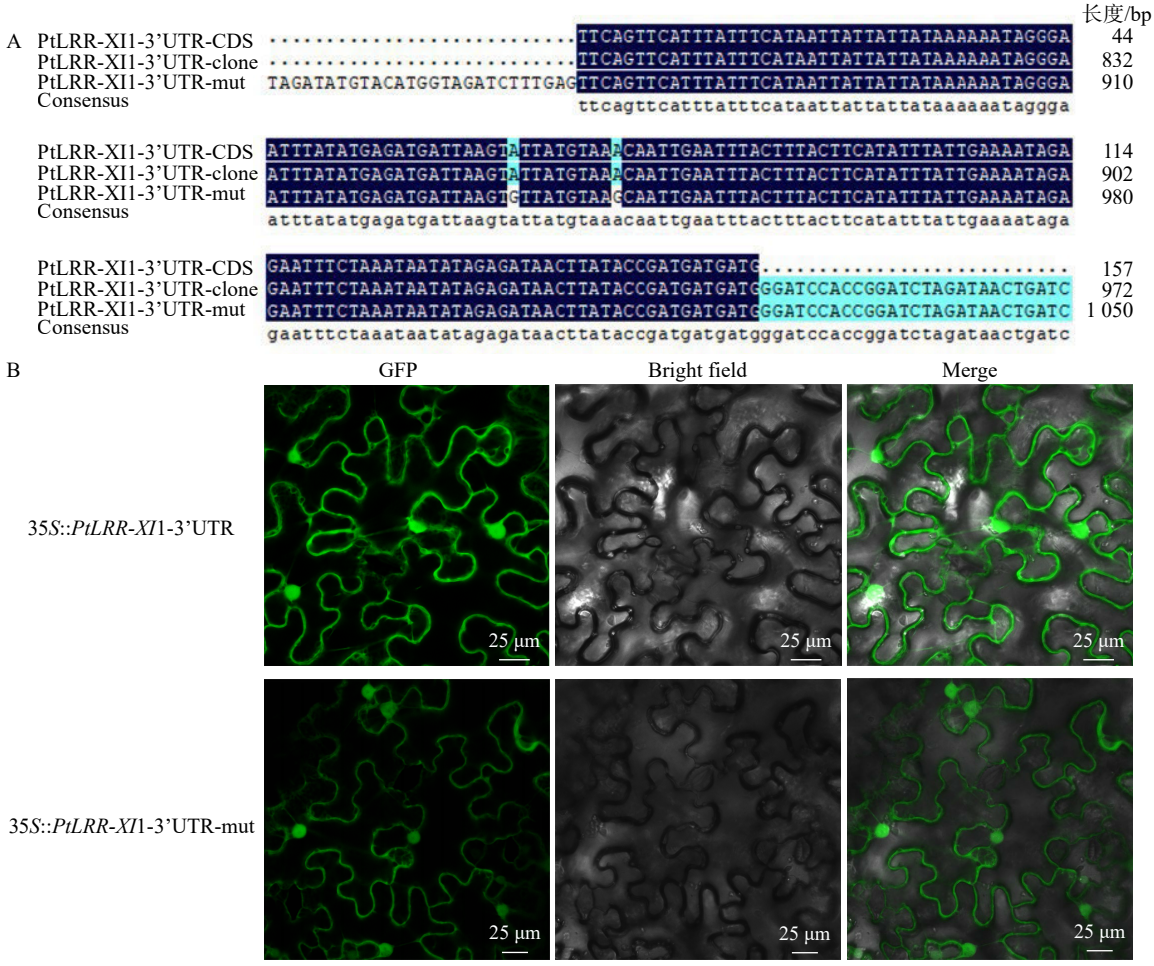
A 为差异 RLK 家族基因的表达与甲基化变化热图；B 为 *PtLRR-XI*1 启动子顺式作用元件预测；C 为系统进化树分析；D 为过表达株系的 PCR 鉴定电泳图（WT：野生型植株；N：阴性对照（ddH_2O）；P：阳性对照（含目的基因的重组质粒）；OE1～OE4：独立的转基因候选株系）；E 为接种后第 5 天的拟南芥表型；F 为接种第 5 天的发病率。

图 4 油松 *PtLRR-XI*1 基因的分子特征与功能分析

Fig. 4 Molecular characterization and functional analysis of *PtLRR-XI*1 gene in *P. tabuliformis*

3 讨 论

m^{6}A RNA 甲基化是真核生物中最为普遍的转录后修饰形式，在植物生长发育及逆境响应中发挥着关键调控作用[14, 26]。本研究通过对油松中甲基化酶的表达量分析发现，侵染后油松甲基转移酶基因 *PtHAKAI* 和 *PtFIP*37 显著下调，而去甲基化酶基因 *PtALKBH*9*B* 和 *PtALKBH*10*B* 及多个阅读蛋白基因显著上调。通过进一步对 m^{6}A 差异修饰转录本分析发现，修饰下调的转录本数量显著多于上调数量，表明寄主可能通过降低整体 m^{6}A 甲基化水平或改变修饰识别模式来调控防御反应。这一趋势与拟南芥中病原相关分子模式触发免疫反应后 m^{6}A 水平下调的现象相一致[13]：m^{6}A writer 缺陷或去甲基化酶过表达导致 m^{6}A 整体水平显著降低的拟南芥植株，对病原菌表现出更强的抗性，且侵染后免疫相关转录本的



A 为 *PtLRR-XI*1 3'UTR 定点突变位点测序比对；B 为瞬时转化本氏烟叶片中 GFP 荧光信号检测（仅展示 GFP 绿色荧光通道，未叠加叶绿体自发荧光或红色荧光标记）

图 5　*PtLRR-XI*1 差异 m^{6}A 修饰位点的定点突变及功能验证

Fig. 5　Site-directed mutagenesis and functional validation of m^{6}A modification sites in the *PtLRR-XI*1

m^{6}A 沉积减少，暗示降低 m^{6}A 甲基化水平可能是植物激活免疫应答的保守策略之一。这种“转录组−表观转录组”的协同变化说明，m^{6}A 修饰不仅是转录水平的被动反映，更主动参与了防御基因表达的协同调控。因此，油松可能通过“全局下调、局部上调”的 m^{6}A 修饰策略，在降低能量消耗的同时精准激活关键防御模块。

进一步分析发现，差异甲基化位点主要富集于 3′UTR 区域，且呈现“RRACH”保守基序，这与拟南芥、水稻等物种中 m^{6}A 的分布特征一致，表明 m^{6}A 修饰机制在植物中具有进化保守性[12]。值得注意的是，油松 m^{6}A 位点在 3′UTR 和 CDS 区的占比（95% 以上）高于拟南芥（约 70%），这可能与针叶树基因组庞大、非编码区比例高有关，也可能反映了直接 RNA 测序避免了抗体富集偏倚的优势。染色体分布分析显示，m^{6}A 位点在 12 条染色体上呈非均匀分布。然而，本研究仅通过转录水平变化推测 m^{6}A 修饰系统的重编程，并未直接测定整体 m^{6}A 甲基化水平的变化，关键的甲基化酶表达变化是否真正反映在整体甲基化水平上，仍有待后续通过 LC-MS/MS 或 m^{6}A 斑点印迹等方法进行验证。

R 基因是植物先天免疫系统的核心组件，其编码的受体蛋白能够直接或间接识别病原分泌的效应因子，激活效应触发免疫[27]。本研究通过整合转录组与 m^{6}A 甲基化数据，筛选出 268 个同时发生表达和甲基化变化的转录本，其中包含 9 个 *RLK* 家族 *R* 基因。这一发现将 m^{6}A 修饰与针叶树 *R* 基因的表达调控联系起来，最终选定 m^{6}A 甲基化差异以及表达量差异均最显著的 *PtLRR-XI*1 作为目的基因，该基因属于 RLK-Pelle_LRR-XI-1 蛋白激酶家族，系统进化分析显示其与红豆杉、侧柏、日本柳杉等针叶树种的 RLK 蛋白聚为一支，进一步证实了其在针叶树中的保守性。

功能验证结果表明，过表达 *PtLRR-XI*1 显著增强了拟南芥对松材线虫的抗性，为进一步明确 m^{6}A 修饰对该基因表达的调控作用，对 *PtLRR-XI*1 3′UTR 区的两个差异 m^{6}A 修饰位点（第 66 位和第 75 位腺苷酸）进行了定点突变。瞬时表达分析显示，

突变后 GFP 荧光强度较未突变对照减弱，表明这两个位点的 m^{6}A 修饰具有促进基因表达的功能，结果直接证实了 m^{6}A 修饰通过 3′UTR 区域正向调控 *PtLRR-XI*1 的表达，且在侵染后 m^{6}A 修饰与表达量均发生显著变化，但二者之间的调控关系仍需在油松中通过 m^{6}A-IP-qPCR 或 CRISPR 定点突变等手段进一步确认。在瞬时表达分析中，初步比较了野生型与突变型 3′UTR 融合载体的荧光信号，未使用 ImageJ 等软件进行荧光强度/面积比的定量统计，后续研究可通过 qPCR 定量测定 GFP 的 mRNA 表达水平，以更客观地验证突变对 3′UTR 调控功能的影响。

本研究将 m^{6}A RNA 甲基化修饰分析应用于针叶树与病原互作研究，从表观转录层面揭示了油松响应松材线虫侵染的 m^{6}A 修饰谱特征及其与基因表达的潜在关联。通过转录组与甲基化组的联合分析，筛选到受 m^{6}A 修饰调控的候选 *R* 基因 *PtLRR-XI*1，并初步验证了其抗松材线虫功能。这一研究思路为挖掘林木抗病关键基因提供了新的策略。然而，m^{6}A 修饰水平的验证、修饰关系的建立和调控功能的确认等方面仍存在一定局限性，未来研究可结合 LC-MS/MS，m^{6}A 免疫沉淀结合定量 PCR 等技术，验证具体参与修饰的甲基化酶对 *PtLRR-XI*1 的直接调控作用，以及利用油松遗传转化体系在本体中验证候选基因的抗性功能。这些研究的深入开展，将有助于系统阐明 m^{6}A 修饰在油松免疫调控网络中的核心作用，为林木抗病育种提供理论依据与基因资源。

4 结　　论

本研究针对油松响应松材线虫侵染的分子机制，从转录组和 m^{6}A 表观修饰水平探究了油松的防御响应特征。利用测序数据开展了转录组与 m^{6}A 修饰谱的联合分析，挖掘了受 m^{6}A 调控的关键 *R* 基因 *PtLRR-XI*1 并进行了异源功能验证。研究得到以下结论。

（1）松材线虫侵染诱导油松 m^{6}A 甲基化修饰谱发生重编程，表现为甲基转移酶、去甲基化酶、阅读蛋白基因的差异表达及全基因组甲基化位点的显著变化，表明 m^{6}A 修饰参与油松对病原胁迫的响应。

（2）转录组与 m^{6}A 修饰联合分析揭示，发生差异表达与差异甲基化的重叠基因高度富集于植物−病原互作、MAPK 信号通路及次生代谢等抗病相关通路。从中成功筛选出受表观调控的 *LRR-RLK* 家族候选抗病基因 *PtLRR-XI*1。*PtLRR-XI*1 异源过表达显著提高了转基因拟南芥对松材线虫的抗性，发病率由野生型的 72.9% 大幅降至 25.0%～39.6%。

（3）*PtLRR-XI*1 基因 3′UTR 区的两个 m^{6}A 修饰位点（第 66 位和第 75 位腺苷酸）具有促进基因表达的功能，定点突变后导致报告基因荧光强度显著下降，证实了 m^{6}A 修饰对该基因表达的正向调控作用。

本研究初步验证了油松能够通过 m^{6}A 表观修饰系统精细调控 *PtLRR-XI*1 等 *R* 基因的表达，进而驱动下游抗氧化和次生代谢途径的激活，以抵御松材线虫侵染。研究结果为深入理解木本植物表观转录调控的抗病机制提供了新证据，也为油松松材线虫病研究提供了新的视角。

参 考 文 献

[1] Wingfield M J, Bedker P J, Blanchette R A. Pathogenicity of *Bursaphelenchus xylophilus* on pines in Minnesota and Wisconsin [J]. Journal of Nematology, 1986, 18(1): 44−49.

[2] 孙永春. 南京中山陵发现松材线虫 [J]. 江苏林业科技, 1982(4): 27−47.
Sun Y C. Discovery of *Bursaphelenchus xylophilus* in Zhongshanling, Nanjing [J]. Jiangsu Forestry Science and Technology, 1982(4): 27−47.

[3] 顾建锋, 方亦午, 刘乐乐, 等. 一种雌虫具尾尖突松材线虫的鉴定 [J]. 植物保护学报, 2021, 48(2): 434−441.
Gu J F, Fang Y W, Liu L L, et al. Identification of a *Bursaphelenchus xylophilus* with female tail tip process [J]. Journal of Plant Protection, 2021, 48(2): 434−441.

[4] 理永霞, 温晓健, 王璇, 等. 松材线虫病防控技术研究进展及防控对策建议 [J]. 中国森林病虫, 2025, 44(6): 1−7.
Li Y X, Wen X J, Wang X, et al. Research progress and countermeasures of pine wilt disease prevention and control technology [J]. Forest Pest and Disease, 2025, 44(6): 1−7.

[5] Boulias K, Greer E L. Biological roles of adenine methylation in RNA [J]. Nature Reviews Genetics, 2023, 24(3): 143−160.

[6] Delaunay S, Helm M, Frye M. RNA modifications in physiology and disease: towards clinical applications [J]. Nature Reviews Genetics, 2024, 25(2): 104−122.

[7] Zhang J, Wu L, Mu L L, et al. Evolution and post-transcriptional regulation insights of m^{6}A writers, erasers, and readers in plant epitranscriptome [J]. The Plant Journal, 2024, 120(2): 505−525.

[8] Gao Y, Bian H X, Wang H Q, et al. The m^{6}A reader SlYTH1 regulates flavor-related volatiles biosynthesis via affecting mRNA stability and translation in tomato fruit [J]. Plant Physiology, 2025, 198(3): kiaf245.

[9] Huang X Y, Zhang H, Liao H P, et al. The m^{6}A writer complex function in main stem apex development by promoting mRNA stability of GIF3, HDA6, and KNAT2/6 in *Gossypium hirsutum* [J]. New Phytologist, 2025, 248(2): 721−740.

[10] Kennedy T D, Lane B G. Wheat embryo ribonucleates. XIII. Methyl-substituted nucleoside constituents and 5′-terminal dinucleotide sequences in bulk poly(AR)-rich RNA from imbibing wheat embryos [J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1979, 57(6): 927−931.

[11] Haugland R A, Cline M G. Post-transcriptional modifications of oat coleoptile ribonucleic acids. 5′-terminal capping and methylation of internal nucleosides in poly(A)-rich RNA [J]. European Journal of Biochemistry, 1980, 104(1): 271−277.

[12] Luo G Z, Macqueen A, Zheng G, et al. Unique features of the m^{6}A methylome in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature Communications, 2014, 5: 5630.

[13] Prall W, Sheikh A H, Bazin J, et al. Pathogen-induced m^{6}A dynamics affect plant immunity [J]. The Plant Cell, 2023, 35(11): 4155−4172.

[14] Chen T Y, Greene G H, Motley J, et al. m^{6}A modification plays an integral role in mRNA stability and translation during pattern-triggered immunity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2024, 121(33): e2411100121.

[15] 理永霞, 王璇, 刘振凯, 等. 松材线虫致病机理研究进展 [J]. 中国森林病虫, 2022, 41(3): 11−20.
Li Y X, Wang X, Liu Z K, et al. Research progress on pathogenic mechanism of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Forest Pest and Disease, 2022, 41(3): 11−20.

[16] Ali S, Tyagi A, Mir Z A. Plant immunity: at the crossroads of pathogen perception and defense response [J]. Plants, 2024, 13(11): 1434.

[17] Nie Z, Li W, Deng L, et al. Comprehensive analysis of LRR-RLKs and key gene identification in *Pinus massoniana* resistant to pine wood nematode [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1043261.

[18] Xie Y N, Liu B, Zhou Z C, et al. *PmHs*1(*pro*-1) monitors *Bsursaphelenchus xylophilus* infection and activates defensive response in resistant *Pinus massoniana*[J]. Plant, Cell & Environment, 2024, 47(11): 4369−4382.

[19] Song L M, Liu W Y, Zhao R Z, et al. Comprehensive identification of CrRLK1Ls family genes in *Pinus tabulaeformis* and functional characterization of *PtTHESEUS*1 in response to *Bursaphelenchus xylophilus* infestation[J]. Plant, Cell & Environment, 2026, 49(5): 2825−2838.

[20] Ikram A U, Khan M S S, Islam F, et al. All roads lead to Rome: pathways to engineering disease resistance in plants [J]. Advanced Science, 2025, 12(5): 2412223.

[21] 苏靖茸, 肖生春, 彭小梅, 等. 油松径向生长对气候响应的区域分异特征 [J]. 中国沙漠, 2024, 44(5): 60−72.
Su J R, Xiao S C, Peng X M, et al. Regional differentiation characteristics of radial growth response of *Pinus tabuliformis* to climate [J]. Journal of Desert Research, 2024, 44(5): 60−72.

[22] 王建国, 王建军, 马静怡, 等. 松材线虫侵染对油松的生理生化影响 [J]. 中国森林病虫, 2024, 43(3): 21−26.
Wang J G, Wang J J, Ma J Y, et al. Physiological and biochemical effects of *Bursaphelenchus xylophilus* infection on *Pinus tabuliformis* [J]. Forest Pest and Disease, 2024, 43(3): 21−26.

[23] 李德斌, 王伟韬, 李志鹏, 等. 松材线虫对红松、油松和日本落叶松苗木的致病性初探 [J]. 中国森林病虫, 2025, 44(5): 23−28.
Li D B, Wang W T, Li Z P, et al. Preliminary study on the pathogenicity of *Bursaphelenchus xylophilus* to seedlings of *Pinus koraiensis*, *Pinus tabuliformis* and *Larix kaempferi* [J]. Forest Pest and Disease, 2025, 44(5): 23−28.

[24] 齐雯雯, 宫晓琳, 王洋, 等. 蘸花法在植物遗传转化上的应用研究进展 [J]. 现代农业科技, 2014(24): 9−10.
Qi W W, Gong X L, Wang Y, et al. Research progress on application of floral dip method in plant genetic transformation [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2014(24): 9−10.

[25] 沙丽萍. 例谈植物 DNA 粗提取的 CTAB 法、SDS 法与盐析法 [J]. 中学生物教学, 2018(21): 65−67.
Sha L P. Discussion on CTAB method, SDS method and salting-out method for plant DNA extraction [J]. Biology Teaching in Middle School, 2018(21): 65−67.

[26] Zhang G, Lü Z, Diao S, et al. Unique features of the m^{6}A methylome and its response to drought stress in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* Linn.) [J]. RNA Biology, 2021, 18(2): 794−803.

[27] Ijaz S, Haq I U, Habib Z, et al. Genome-wide identification, and gene expression analysis of NBS-LRR domain containing R genes in *Chenopodium quinoa* for unveiling the dynamic contribution in plant immunity against *Cercospora* cf. *chenopodii* [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2024, 30(7): 1129−1144.

（责任编辑　赵田芸
责任编委　马履一）