

落叶松抗感落叶松枯梢病的分子机制解析

张瑞芝¹ 陈欣妍¹ 夏蕤¹ 王佳楠¹ 陈嘉睿¹ 张爽¹ 王峰^{1,2*}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江省外来林木病虫害监测与防控重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学林学院, 林木遗传育种全国重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 为解析落叶松 *Larix* spp. 抗感落叶松枯梢病的机理, 揭示落叶松枯梢病灾变的驱动因子, 通过形态学和系统发育分析鉴定落叶松枯梢病原真菌, 采用室内人工接种鉴定落叶松抗病、感病性, 同时结合多组学技术解析抗病、感病机制。结果表明: 1) 通过对落叶松新壳梭孢 *Neofusicoccum laricinum* (Sawada) Hattori & C. Nakash. 的鉴定, 可有效区分落叶松枯梢病与其他因素导致枯梢的病害。2) 人工接种发现, 落叶松不同家系对落叶松新壳梭孢存在抗性差异。感病植株持续性的强烈活性氧 (ROS) 信号导致新梢迅速死亡; 而抗病植株仅在初期表现出轻微的 ROS 信号。3) 多组学分析表明, 抗病植株通过莽草酸—苯丙烷代谢途径驱动奎宁酸和香兰素等 6 种植保素的积累, 抑制病原真菌生长。相反, 感病植株 ROS 信号过载, 植保素未能有效积累, 促进病害发展。结合野外调查和人工接种发现, 高比例的感病落叶松分布驱动病害灾变。研究发现, 感病个体的广泛分布导致落叶松群体抗病性薄弱, 是引起落叶松枯梢病灾变的关键因素。挖掘寄主的抗性资源可为防控此类入侵性病害提供系统化解决方案。

关键词: 落叶松新壳梭孢; 落叶松枯梢病; 抗病分子机理; 植保素

中图分类号: S763.11 文献标识码: A 文章编号: 2097-5279(2025)04-0021-09

Molecular mechanism underlying the resistance and susceptibility of larch to larch shoot blight

ZHANG Ruizhi¹ CHEN Xinyan¹ XIA Rui¹ WANG Jianan¹ CHEN Jiarui¹ ZHANG Shuang¹ WANG Feng^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Alien Forest Pest Detection and Control-Heilongjiang Province, College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: To elucidate the molecular mechanisms underlying the resistance and susceptibility of larch to larch shoot blight, as well as to uncover the driving factors behind this disease, the responsible pathogen was identified through comprehensive morphological and phylogenetic analyses. The resistance and susceptibility of larch were further evaluated via artificial inoculation. Moreover, multi-omics analyses were employed to elucidate the mechanisms of resistance and susceptibility. The findings revealed that: 1) *Neofusicoccum laricinum* (Sawada) Hattori & C. Nakash. was identified as the causal agent of larch shoot blight, effectively distinguishing it from other pathogens responsible for shoot blight. 2) Artificial inoculation demonstrated varying levels of resistance among different larch families to *N. laricinum*. Larches susceptible to the pathogen exhibited consistently elevated reactive oxygen species (ROS) signaling, leading to a rapid onset of new shoot blight. Conversely, resistant larches displayed only mild ROS signaling during the initial stages of infection. 3) Multi-omics analyses have demonstrated that resistant larches accumulated 6 phytoalexins, including quinic acid and vanillin, via the shikimate-phenylpropanoid metabolic pathway, thereby inhibiting pathogen growth. In contrast, susceptible larches exhibited excessive ROS production and failed to synthesize sufficient phytoalexins, which facilitated disease progression. Furthermore, field monitoring and artificial inoculation showed that the widespread distribution of susceptible larches significantly contributed to larch shoot blight outbreaks. The results revealed that the wide distribution of susceptible individuals led to the vulnerability of larch population, which was the driving factor of larch withering disease. Underscoring the importance of investigating host resistance resources as a comprehensive strategy for managing invasive fungal pathogens.

Keywords: *Neofusicoccum laricinum* (Sawada) Hattori & C. Nakash.; larch shoot blight; disease resistance mechanism; phytoalexin

收稿日期: 2025-05-25; 修回日期: 2025-07-07。

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1400300)。

* 通信作者: 王峰(E-mail: fengwang@nefu.edu.cn), 教授。

落叶松 *Larix* spp. 广泛分布于亚洲及欧洲, 是我国天然乔木林及人工乔木林的主要优势树种之一, 是“天然林保护工程”(natural forest protection project, NFPP)后我国北温带适合木材生产的速生人工针叶林树种(国家林业和草原局, 2019)。落叶松是北半球特有的针叶树种, 是我国东北及华北地区具有重要生态功能的林业生产树种, 经济价值极高, 是“国储林+林草碳汇”生态产品价值实现的重要支撑树种(魏亚伟等, 2015; 曾伟生, 2022), 但在实际种植过程中很容易受到病害威胁。引起松枯梢病的松球壳孢 *Sphaeropsis sapinea* (Fr.: Fr.) Dyko & B. Sutton (Stanosz et al., 1997)、引起落叶松尖枯病的假鲜壳孢 *Pseudozythia* sp.、引起落叶松芽枯病的极细枝孢 *Cladospodium tenuissimum* Cook(苑健羽, 1990)和引起落叶松枯梢病(larch shoot blight)的落叶松新壳梭孢 *Neofusicoccum laricinum* (Sawada) Hattori & C. Nakash.(尚衍重, 1987; 尚衍重, 1991; Hattori et al., 2021; Hattori et al., 2024)等多种病原真菌以及早春干旱等气候因素均会导致落叶松发生枯梢。其中, 落叶松新壳梭孢引起的落叶松枯梢病造成的危害最大。

全球气候变化与国际贸易的快速增长共同推动了外来入侵性病害(invasive alien disease)的传播与扩散, 并对森林生态系统构成严重威胁(Seidl et al., 2018; Thakur et al., 2019; Santini and Migliorini, 2022)。这类病害相较于本土病害往往具有更强的破坏力(Pyšek et al., 2020)。落叶松枯梢病起源于日本, 自上世纪70年代传入我国后, 十几年间即从东北蔓延至华北的广大林区, 成为一种危害严重、蔓延迅速的外来入侵性病害(尹光文和王自江, 1979; 项存梯, 1979; 张广臣等, 1999)。落叶松新壳梭孢现已被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》和《全国林业检疫性有害生物名单》(Liu et al., 2024)。如果不采取有效措施, 病害的蔓延将导致大量落叶松死亡, 影响木材生产, 破坏生态平衡, 进而破坏森林生态系统的稳定性, 给国家木材供应和生态环境带来不利影响(于文志等, 2008)。在“七五”至“九五”期间, 我国针对落叶松枯梢病开展了深入研究, 并提出了有效的综合防治技术(何平勋和王永民, 1979; 孙宝贵等, 1979; 王永民等, 1992; 张广臣等, 1999; 于文志等, 2008)。然而, 近20 a以来, 落叶松新壳梭孢的致病力、落叶松枯梢病的分布状况及灾变程度等均发生了新的变化, 而相关研究尚显匮乏。病原真菌与寄主植物间在长期协同进化中能够建立相对稳定的适应关系(Shang et al., 2016; Wang et al., 2022), 而我

国本土落叶松缺乏与落叶松新壳梭孢的协同进化过程, 难以有效阻止病害的迅速扩散和灾变。尽管该病害已入侵50 a, 但目前落叶松与落叶松新壳梭孢协同进化程度仍未明确, 对于落叶松枯梢病的流行规律和灾变机制的认知尚不充分, 这在很大程度上制约了我国对该病害的防治效能。因此, 揭示落叶松枯梢病的发生规律及灾变机制, 科学配置抗性资源, 对降低病害风险、提高森林的生物安全性以及保障林业生产的可持续性具有重要意义。随着无人机遥感、多组学分析和AI图像识别等技术的广泛应用, 有望精准探究落叶松枯梢病的扩散流行规律, 阐明其时空蔓延新机理, 揭示其暴发规律与灾变新机制, 进而锁定关键控制新节点, 为研发绿色防控新技术和新产品提供理论依据。

落叶松新壳梭孢属于半活体营养型病原真菌(hemibiotrophic pathogens), 具有复杂的寄生策略, 其既能利用寄主植物活细胞中的营养物质, 也能利用死亡细胞中的营养物质生长(Hiruma et al., 2013; Seybold et al., 2020)。这种特性使得植物应对此类病原真菌时免疫反应复杂化。植物对不同类型病原真菌的抗病机制不同, 对半活体营养型病原真菌的防御机制更为复杂, 不仅涉及水杨酸(salicylic acid, SA)信号通路, 还包括茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号通路和植保素(phytoalexins)的积累等多重途径, 共同抑制病原真菌的生长(Coles et al., 2022; 王丽平等, 2025)。落叶松新壳梭孢通过活体—死体阶段转换策略有效突破落叶松的免疫防线, 导致高感病率。在活体营养阶段, 落叶松中的植保素会抑制病原真菌生长。植保素可以直接破坏病原真菌细胞膜的完整性(如干扰麦角甾醇合成), 或抑制病原真菌毒性因子产生(如效应因子分泌系统), 从而抑制病原真菌侵染。抗病植株依赖于植保素介导的化学防御, 在关键感染窗口期抑制病原真菌的活体营养生长, 同时结合数量抗性, 延缓病害的发生和流行。前期研究表明, 抗病落叶松均表现出植保素介导的化学防御(Bruda et al., 2024; 王皓茹, 2024), 体现为数量抗病性(quantitative resistance)。寄主群体中缺乏质量抗病性(qualitative resistance)个体的大面积分布, 是导致外来入侵性病害灾变的关键因素。

本研究综合运用病理生理学与多组学进行比较分析, 旨在系统解析落叶松对落叶松枯梢病的抗病与感病分子机制, 揭示病害灾变过程中的关键驱动因子。在此基础上, 重点探讨寄主抗病性在灾变过程中的作用, 并从抗性资源挖掘与利用的角度, 探索

落叶松枯梢病的有效防治途径。研究将为深入理解落叶松枯梢病的灾变机制提供新见解,并为以抗病树种选育为核心的可持续防控策略奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

不同家系(品系)抗病、感病长白落叶松 *Larix olgensis* A. Henry(365、477、C1、C2和省464等41个家系)、兴安落叶松 *L. gmelinii* (Rupr.) Kuzen.(X5、LC6、X4、ZL3、ZL1和X3等15个家系)、日本落叶松 *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.(YT1、YT2、WH、QD1和QD2等13个家系)由东北林业大学黑龙江省外林木病虫害监测与防控重点实验室提供。杂交种落叶松(*L. gmelinii* 9×*L. kaempferi* 76、*L. gmelinii* 5×*L. gmelinii* 9、*L. kaempferi* 5×*L. gmelinii* 12、*L. gmelinii* 6×He 61、1316和*L. olgensis* 73-11共6个)由东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 野外调查及落叶松枯梢病病原真菌鉴定

2021—2024年,在内蒙古自治区牙克石林场和库都尔镇,黑龙江省哈尔滨市、尚志市、七台河市、佳木斯市和大兴安岭地区加格达奇,吉林省敦化市,辽宁省抚顺市,山东省药乡、泰山、徂徕山、蒙山、鲁山、沂山、昆嵛山和崂山以及四川省凉山彝族自治州等地,开展落叶松枯梢病的野外调查工作。通过无人机监测与人工踏查相结合,调查落叶松枯梢病的严重程度,基于顶部新梢的颜色变化区分同一片林地内落叶松抗性差异。感病落叶松个体的症状表现为新梢逐渐褪绿,最终呈现浅棕色或棕黑色。顶梢出现弯曲并伴有树脂渗出,枯萎后出现收缩现象。随后,受感染区域的针叶脱落,有部分枝条上部针叶则长时间保持不脱落。

对呈现枯梢症状的罹病枝条进行病原真菌分离与纯化培养,观察并记录病原真菌的形态特征。提取黑龙江省尚志市的落叶松新壳梭孢 HLJ001 株系基因组 DNA,扩增 ITS(引物 V9G 和 ITS4)、*rpb2*(引物 RPB2bot6F 和 RPB2bot7R)、*tefl-α*(引物 EF1-728F 和 EF1-986R)和 *tub2*(引物 BT2A 和 BT2B)序列(表 1)并测序,PhyloSuite 1.3 使用最大似然法将各菌株的 ITS、*rpb2*、*tefl-α* 和 *tub2* 序列串联构建系统发育树(Zhang et al., 2020; Hattori et al., 2021)。利用柯赫氏法则验证落叶松新壳梭孢的致病性(宋淑梅等, 1997)。

1.2.2 落叶松接种试验

将落叶松新壳梭孢 HLJ001 株系接种于 75 个落

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列(5' -3') Primer sequences(5' -3')
V9G	TTACGTCCTGCCCTTTGTA
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
RPB2bot6F	GGTAGCGACGTCACCTCCC
RPB2bot7R	GGATGGATCTCGCAATGCG
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
EF1-986R	TACTTCAAGGAACCCCTTACC
BT2A	GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTC
BT2B	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC

叶松家系 202 个单株的 1 a 生枝条,具体操作方法如下:使用 75% 酒精对枝条表面进行消毒处理,随后用无菌水冲洗 3 次,切取面积为 0.5 cm×0.5 cm 的 HLJ001 菌苔备用。实验组将菌苔块置于预先制备的微伤口进行接种,对照组则用 ddH₂O 模拟接种。每个单株设置 6 个重复。接种后的枝条置于培养室(室内温度 25℃,相对湿度 80%~90%)连续观察,出现落叶松枯梢病的症状后拍照记录。同时,根据症状对病株进行分级,分级标准如下:0 级,植株健康;I 级,枝条基部褪绿,少量针叶脱落;II 级,枝条基部黄褐色,半数针叶脱落,梢头略微下垂;III 级,枝条基部褐色,大部分针叶脱落,梢头下垂;IV 级,枝条基部黑褐色,梢头下垂,除梢头一丛紫灰色枯死针叶外,其余针叶全部脱落。

计算病情指数(disease index, DI),进而计算相对抗病指数(relative resistance index, RRI)(Bruda et al., 2024)。公式如下:

$$DI = \frac{0n_0 + 1n_I + 2n_{II} + 3n_{III} + 4n_{IV}}{4n} \times 100 \quad (1)$$

$$RRI(\%) = 1 - (DI_x/DI_y) \times 100 \quad (2)$$

式中: $n_0 \sim n_{IV}$ 是相应病级下的株数, n 是调查总株数; DI_x 是所测单株感病指数, DI_y 是发病最重单株感病指数。

根据 RRI 对不同家系落叶松抗病、感病性进行分类,RRI>75% 鉴定为抗病落叶松,RRI<50% 鉴定为感病落叶松。

1.2.3 多组学分析

分别提取接种落叶松新壳梭孢 8 d 和对照组抗病(X4)和感病(X1)落叶松的总 RNA。RNA 经 Bioanalyzer 2100(Agilent, CA, USA)检测合格后,委托华大基因(The Beijing Genomics Institute, BGI)进行转录组测序。利用 FPKM(Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments,外显子每千碱基片段百万比)进行表达量的均一化,FDR(false discovery rate,

adjusted *P*-value, 伪发现率)进行校正。

蛋白质组,委托 BGI 完成蛋白提取、质控、肽段分离、质谱检测和蛋白质鉴定等试验。鉴定后的数据通过 iTRAQ(isobaric tag for relative and absolute quantitation, 同位素标签相对和绝对定量)技术进行定量分析。基于 Mascot Percolator 法对 PSM-level FDR(peptide-spectrum match level false discovery rate, 肽段-谱图匹配水平的错误发现率)和 Protein-level FDR(protein-level false discovery rate, 蛋白质水平的错误发现率)2次过滤后进行定量值归一化、缺失值补全、蛋白定量值计算和统计检验分析。依据 fold change(倍数变化)和 *Q*-value(*Q*值,表示 *P*-value 产生假阳性的概率)筛选差异表达蛋白,下调蛋白: fold change<0.83 和 *Q*-value<0.05,上调蛋白: fold change>1.20 和 *Q*-value<0.05。

非靶向代谢组,委托 BGI 完成 LC-MS/MS 检测。根据 Pearson 相关性筛选与相对抗病指数相关性最高的差异代谢物。

1.2.4 落叶松枯梢病病原菌生物量测定

使用 RT-qPCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, 实时荧光定量聚合酶链式反应)技术,利用落叶松 ITS 和落叶松新壳梭孢 ITS 区域的特异引物(Larix-ITS-F: 5'-CTTTGTTGATGGGTGCCAAT-3' and Larix-ITS-R: 5'-GGAAATCTCGAGGCAAGAAGA-3';NL-ITS-F: 5'-CTTGTTTCTCAGACTGCGACG-3' and NL-ITS-R: 5'-CTCGACTCTCCCACCCAT-3')测定接种后表现出枯梢病症状的落叶松样本的病原菌生物量(刘秀

徽等,2009)。

1.2.5 活性氧水平检测

为系统评估寄主病组织中与抗病相关的过氧化反应及过敏反应相关程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)程度,本研究通过量化检测 ROS(reactive oxygen species, 活性氧)水平。具体方法为:采用石蜡切片法(王跃华等,2018)制备病组织切片,分别用 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine, DAB)避光染色 8 h 和氯化硝基四氮唑蓝(Nitrotetrazolium Blue chloride, NBT)避光染色 2 h,随后通过显微拍照记录染色结果,观察局部抗病反应期间 ROS 的积累。

2 结果与分析

2.1 落叶松枯梢病野外调查结果

对内蒙古、黑龙江、吉林、辽宁和山东等省区的野外调查结果显示,随着寄主树龄的增长和感病单株的自然淘汰,老疫区的病害发生状况有所减轻;然而,在部分新区仍发现了病害发生情况,如山东省荣成市,这表明该病害仍具有扩散的潜在可能性(图1)。落叶松作为承灾体,其种群抗病能力的单一性使其在面对入侵性病害时显得尤为薄弱。落叶松枯梢病的发生不仅对落叶松造成了直接损害,还进一步诱发了天牛和木腐菌等次生性灾害,进而形成灾害的连锁效应。野外调查还发现,6月中旬在黑龙江省哈尔滨市和尚志市落叶松人工林内的落叶松枯梢病,会导致9月份落叶松早落病发病率的增高。



图1 各地落叶松枯梢病自然发病症状

Fig. 1 Symptoms of larch shoot blight in different regions

注: A. 内蒙古牙克石; B. 黑龙江尚志; C. 吉林敦化; D. 山东荣成; E. 辽宁抚顺。

Notes: A. Yakeshi, Inner Mongolia Zizhiq; B. Shangzhi, Heilongjiang Province; C. Dunhua, Jilin Province; D. Rongcheng, Shandong Province; E. Fushun, Liaoning Province.

2.2 落叶松枯梢病病原真菌鉴定结果

经形态学鉴定和系统发育分析确认,在内蒙古自治区、黑龙江省、吉林省和山东省等地采集的标本中的致病病原真菌均为落叶松新壳梭孢。培养结

果显示,病原真菌在3d左右生长出白色疏松菌丝,7d后菌丝变为暗灰绿色或灰褐色,基质菌丝呈灰绿色至灰黑色(图2A),这些特征符合落叶松新壳梭孢的培养性状。

对 HLJ001 菌株 rDNA ITS、*rpb2*、*tefl-α* 和 *tub2* 基因序列进行 PCR 扩增, 产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2B。多基因联合建树结果表明, 菌株 HLJ001 与落叶松新壳梭孢同一分支, 支持率为 100%, 可以与其他物种区分开(图 2C)。同样对其他落叶松新壳梭孢菌株检测发现, 内蒙古自治区牙克石林场和库都尔镇, 黑龙江省哈尔滨市、尚志市和加格达奇, 吉林省敦化市, 山东省荣成市都有落叶松新壳梭孢入侵。

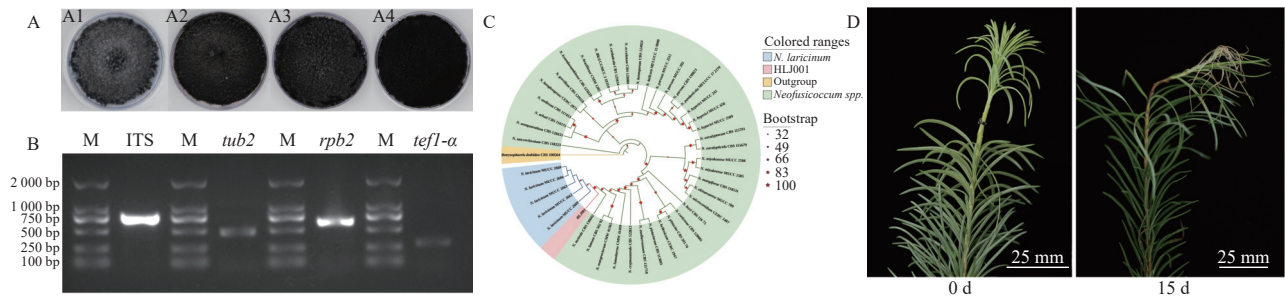


图 2 落叶松新壳梭孢培养鉴定
Fig. 2 Culture and identification of *N. laricinum*

注: A. 落叶松新壳梭孢培养: A1. 内蒙古牙克石株系、A2. 黑龙江尚志 HLJ001 株系、A3. 吉林敦化株系、A4. 山东荣成株系; B. HLJ001 株系 rDNA ITS、*tub2*、*rpb2* 和 *tefl-α* 基因序列 PCR 扩增产物基因凝胶电泳检测图(M: DNA Marker DL2000); C. 多基因序列构建的落叶松新壳梭孢系统发育树; D. 落叶松接种落叶松新壳梭孢 15 d 后的症状。

Notes: A. Culture of *N. laricinum*: A1. Yakeshi strain from Inner Mongolia, A2. HLJ001 strain from Shangzhi, Heilongjiang, A3. Dunhua strain from Jilin, A4. Rongcheng strain from Shandong; B. Gel electrophoresis of PCR products from rDNA ITS, *tub2*, *rpb2*, and *tefl-α* gene sequences of HLJ001 strain (M: DNA Marker DL2000); C. Phylogenetic tree of *N. laricinum* based on multi-gene sequences; D. Symptoms of larch after inoculation with *N. laricinum* at 15 d.

2.3 落叶松抗病性鉴定

根据野外调查, 通过观察落叶松新梢的颜色变化(发病的落叶松新梢呈黄褐色), 成功区分了野外发病和未发病的落叶松(图 3A)。本研究选择 75 个落叶松家系(202 个落叶松单株), 涵盖兴安落叶松、长白落叶松、杂交种落叶松及日本落叶松, 进行室内人工接种试验, 评估各家系的抗病、感病性, 并综合评价兴安落叶松、长白落叶松和日本落叶松的抗病性。结果表明, 通过野外调查和接种试验, 成功筛选了 21 个抗病落叶松种质资源。根据兴安落叶松、长白落叶松和日本落叶松中不同家系的 RRI 分别计算各对应物种落叶松的 RRI(表 2), 发现不同落叶松树种的抗病性存在显著差异, 抗病性排序为: 日本落叶松, 长白落叶松, 兴安落叶松。

通过验证兴安落叶松家系(X5、LC6、X4、ZL3、ZL1、X3、LC4、ZL2、X1、LC1、LC7、X2、LC2、LC5 和 LC3)的抗病性, 发现 15 个落叶松家系中有 3 个抗病家系: X5、LC6 和 X4; 7 个感病家系: X1、LC1、LC7、X2、LC2、LC5 和 LC3。接种后 15 d, 感病落叶松的新梢表现出弯曲、干枯和缢缩的现象。新梢颜色从绿

接种 HLJ001 菌株 15 d 后, 落叶松表现出典型的落叶松枯梢病症状。接种部位呈现暗褐色病变, 病斑向上扩展, 发病区域收缩变细并弯曲下垂呈钩状, 针叶脱落, 仅顶端保留一丛针叶(图 2D)。从发病组织重新分离病原菌培养并进行分子生物学鉴定, 菌落形态及 ITS、*rpb2*、*tefl-α* 和 *tub2* 序列与接种所用菌株 HLJ001 一致。根据柯赫氏法则, 证明分离到的落叶松新壳梭孢是引起落叶松枯梢病的病原真菌。

色变为紫灰色或黑棕色, 针叶完全脱落(图 3B)。对照组(CK)中所有新梢和针叶均保持绿色。落叶松新壳梭孢进入死体营养阶段, 感病落叶松死亡细胞中仍可检测到落叶松新壳梭孢, 经 qPCR 分析发现死亡细胞上落叶松新壳梭孢生物量仍有增加。而抗病落叶松仅出现少量可控的细胞死亡, 病原真菌终止在活体营养阶段。

ROS 检测结果表明, 感病落叶松在病原真菌侵染后 8 d 检测到强烈的 ROS 信号, 而抗病落叶松在病原真菌侵染后 8 d 检测到轻微 ROS 信号(图 3C、D)。

2.4 多组学数据解析抗病、感病落叶松防御特征

多组学数据分析显示, 感病落叶松在落叶松新壳梭孢侵染时存在不及时的代谢防御。与抗病落叶松相比, 感病植株的关键次生代谢路径受到系统性抑制, 莽草酸途径基因(如 *DXR*)、苯丙烷代谢途径基因(如 *C4H* 和 *PAL* 等)及萜类合成的相关基因(如 *GPPS*)表达水平显著下调。代谢组检测显示, 感病植株的酚类化合物含量显著低于抗病植株, 无法形成有效的化学防御屏障(图 4)。病原真菌侵染触发 ROS 信号通路的异常持续激活, *NPR1-TGA* 调控模块

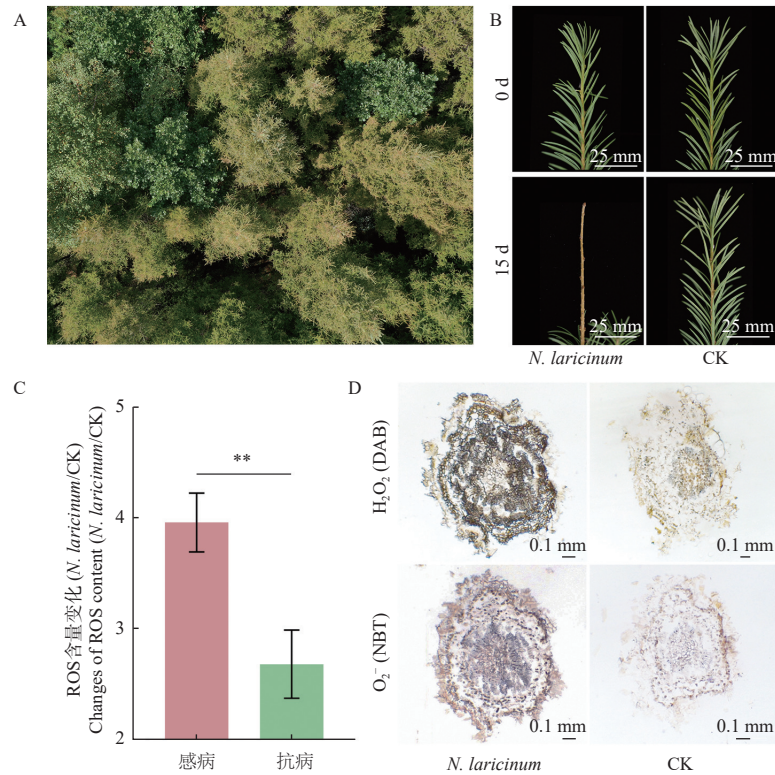


图3 感病落叶松发病症状及生理特征

Fig. 3 Symptoms and physiological characteristics of susceptible *L. gmelinii*

注: A. 落叶松枯梢病野外调查, 无人机航拍落叶松枯梢病症状; B. 感病兴安落叶松接种 *N. laricinum* 15 d 后的症状, CK: 感病兴安落叶松 ddH₂O 模拟接种 15 d 后的症状; C. 感病和抗病兴安落叶松接种 *N. laricinum* 8 d 后 ROS 含量, **表示 $P < 0.01$; D. 感病兴安落叶松接种 *N. laricinum* 8 d 后的 ROS 信号, CK: 感病兴安落叶松 ddH₂O 模拟接种 8 d 后的 ROS 信号。

Notes: A. Field survey of larch shoot blight, UAV aerial photography of disease symptoms; B. Symptoms of disease-susceptible *L. gmelinii* inoculated with *N. laricinum* at 15 d, CK: Symptoms of disease-susceptible *L. gmelinii* mock-inoculated with ddH₂O at 15 d; C. Changes of ROS content in susceptible and resistant *L. gmelinii* after inoculation with *N. laricinum* at 8 d, ** represents $P < 0.01$; D. The ROS signals of disease-sensitive *L. gmelinii* inoculated with *N. laricinum* at 8 d, CK: The ROS signals of disease-sensitive *L. gmelinii* mock-inoculated with ddH₂O at 8 d.

表2 不同落叶松 RRI

Tab. 2 The RRI of different *Larix* spp.

种 Species	相对抗病指数/% RRI
兴安落叶松	54.64±15.71 b
长白落叶松	57.62±27.39 b
日本落叶松	86.67±5.70 a

注: 数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey's posthoc 检验进行分析, 不同字母表示在 95% 置信度下具有统计学显著差异。表中数据为平均值±标准差。

Notes: Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's posthoc test, with different letters indicating statistically significant differences at 95% confidence. The data in the figure are means ± SE.

过度响应, 导致 H₂O₂ 浓度急剧升高, 氧化还原稳态失衡, 引发不可逆的氧化损伤。此外, 病原真菌分泌效应因子干扰寄主代谢调控网络, 特异性抑制 HMGR 和 GPPS 等防御相关酶活性, 使萜类合成减少, 直接削弱了植保素的合成能力。GO 与 KEGG 分析证实, 感病植株的防御缺陷源于代谢失衡: DEGs (differential expressed genes, 差异表达基因) 主要富集在氧化应激

响应 (GO: 0006979) 和跨膜转运 (GO: 0055085) 等被动防御过程, 而次生代谢合成 (GO: 0044550) 等主动防御通路显著缺失。植保素合成不足与 ROS 信号过载导致感染位点细胞死亡, 为病原真菌创造有利的微环境。

与感病落叶松不同, 抗病落叶松通过关键防御路径与次生代谢产物的协同抑菌机制有效抵御病原真菌。多组学数据表明, 抗病落叶松通过精准调控莽草酸路径、苯丙烷路径及系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 路径, 在落叶松新壳梭孢活体营养阶段高效抑制其生长繁殖。转录组分析发现, 莽草酸路径中的基因 (*DXR* 和 *SK*)、苯丙烷路径相关基因 (*PAL* 和 *C4H*) 及 SAR 标记基因 (*PR1* 和 *PR5*) 在侵染后显著上调。蛋白组结果与转录组一致, HMGR、GPPS 等限速酶增加, 直接驱动防御代谢物的合成。代谢组检测显示, 在落叶松新壳梭孢侵染后, 抗病落叶松中的奎宁酸 (FC: 1.76)、柚皮素 (FC: 3.97)、香兰素 (FC: 2.12)、吴茱萸苦素 (FC: 11.81)、杜鹃素 (FC:

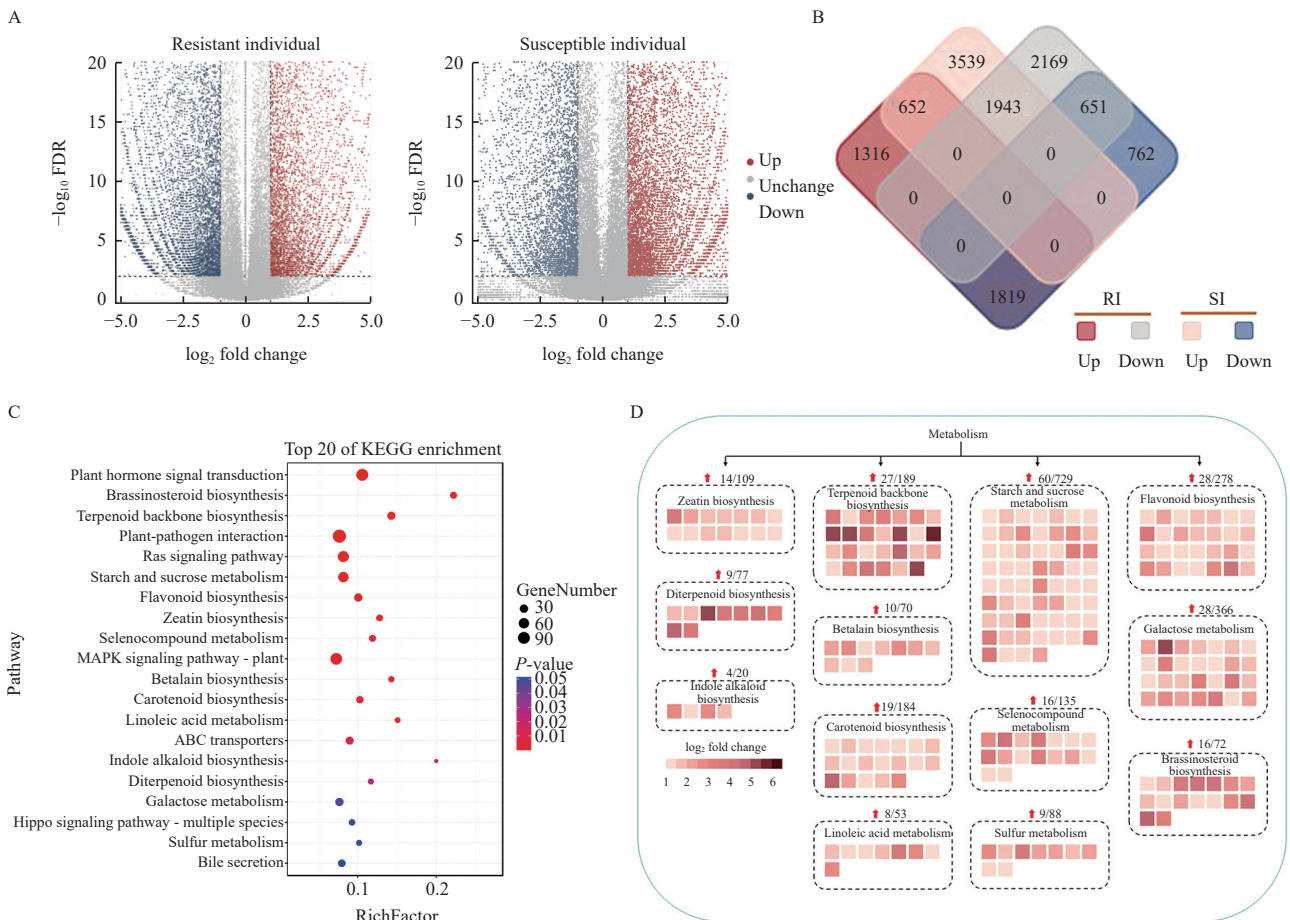


图 4 落叶松感病机制多组学分析

Fig. 4 Multi-omics analysis of susceptibility mechanisms in larch

注: A. 抗病、感病落叶松差异表达基因火山图; B. 抗病、感病落叶松差异表达基因韦恩图; C. 抗病、感病落叶松差异表达次生代谢产物 KEGG 路径富集分析; D. 基于转录组、蛋白质组和代谢组的联合分析的感病落叶松生理和代谢特征。

Notes: A. Volcano plot of differentially expressed genes in resistant vs. susceptible larch; B. Venn diagram of differentially expressed genes in resistant vs. susceptible larch; C. KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed secondary metabolites in resistant vs. susceptible larch; D. Joint analysis of transcriptomics, proteomics, and metabolomics reveals the disease-resistant physiological and metabolic characteristics of susceptible larch.

2.26) 和秦皮素 (FC: 5.51) 等植保素的含量显著增加。而在感病落叶松中, 这些植保素的含量变化则无显著差异。抗病落叶松通过莽草酸-苯丙烷代谢轴与 SAR 路径的时空协同, 在病原真菌活体营养阶段构建多层次化学防御屏障, 其核心植保素通过靶向病原真菌膜系统、能量代谢及效应因子, 实现高效抑菌, 为抗病育种提供了精准的代谢工程靶点。

以上研究结果表明, 感病落叶松接种病原真菌后转向氧化应激; 而抗病落叶松则以代谢防御为主导, 通过植保素的时空积累精准抑制病原真菌, 显示出次生代谢调控在抗病中的关键作用。

3 讨论

落叶松枯梢病在局部地区暴发流行。在老疫区, 伴随感病单株的淘汰以及寄主树龄的增长, 病情有减轻趋势, 然而仍有新疫区出现。基于野外调查结

果和室内人工接种验证, 发现不同家系落叶松对落叶松新壳梭孢的抗性存在显著差异, 且感病家系占比较高。感病家系落叶松的广泛分布致使落叶松群体抗病能力薄弱, 这是落叶松枯梢病灾变的主要驱动因子。本研究运用多组学分析方法, 揭示抗病落叶松和感病落叶松响应落叶松新壳梭孢的分子机制差异。ROS 的过度暴发导致感病落叶松细胞死亡, 为病原真菌提供了适宜的生长环境; 而抗病落叶松则通过激活莽草酸路径、苯丙烷代谢路径等次生代谢途径, 迅速积累植保素, 并精确调控植保素的时空积累, 有效阻断病原真菌的关键发育。这一结果证实了代谢防御在抗病机制中的决定性作用。本研究不仅为理解落叶松枯梢病的灾变机制提供了重要线索, 也为未来的病害防控和抗病树种选育提供了理论基础和科学依据。

在应对半活体营养型病害的过程中, 植物与病

原体之间的相互作用呈现出复杂的动态平衡。本研究发现,感病落叶松 ROS 过度积累,为落叶松新壳梭孢侵染的死体阶段提供了适宜的营养环境和生长条件。与此形成鲜明对比的是抗病落叶松则通过有效调控 ROS 水平来抑制细胞过度死亡,从而限制半活体营养型病原菌扩散。例如,小麦 *Triticum aestivum* L. 在抵抗镰刀菌 *Fusarium* spp. 侵染时,通过上调过氧化氢酶活性显著清除 H_2O_2 抑制 PCD 的发生(Yang et al., 2025)。此外,在芝麻 *Sesamum indicum* L. 抗炭疽病的研究中也观察到类似机制:抗病品种在受感染后产生的 H_2O_2 较少,同时具有更高的 ROS 清除能力,有效延缓了病害的进展(Chowdhury et al., 2017)。这进一步支持了 ROS 动态调控在植物抗病反应中的关键作用。这表明,植物在面对半活体营养型病原真菌时,ROS 的动态平衡成为决定抗感性的关键节点。

选育抗落叶松枯梢病良种是防控该病害的关键。落叶松枯梢病是寄主主导型病害,寄主的抗病能力直接影响病害的暴发和蔓延。结合野外监测和室内人工接种,抗病性排序为:日本落叶松>长白落叶松>兴安落叶松。不同地区落叶松抗病性评估结果表明,地域环境差异对落叶松抗病能力具有显著影响,进一步验证了遵循“适地适树”原则在抗病品种筛选与推广应用中的重要性。由于东北北部地区冬季寒冷且漫长,除了考虑抗病性外,选择具有较强耐寒性的落叶松品种至关重要。松花江以北适宜栽种兴安落叶松及杂交种的抗病家系。松花江以南至山海关适宜栽种兴安落叶松、长白落叶松、杂交种落叶松和日本落叶松的抗病家系。山海关以南适宜栽种适生的日本落叶松抗病家系。考虑到东北南部地区幅员辽阔,不同区域的栽种条件有所差异,可结合多品种混交种植,提升森林生态系统的稳定性。为加强落叶松枯梢病防控,建议从以下几方面强化科技支撑:1)建立全国性病原真菌监测网络,实时监控病原真菌变异和流行趋势。2)开展抗性资源鉴定与评估研究,为不同地区选择适合的抗病树种提供科学依据。3)加快抗病育种进程,利用分子标记、基因编辑等技术加速抗病树种的培育,并储备多样化的抗病种质资源。通过加强基础研究和储备,深入理解病原真菌的致病性变异机制与寄主互作,为抗病育种提供理论支持,有效应对落叶松枯梢病防控面临的挑战。

本研究揭示了落叶松枯梢病灾变的主要驱动因子是感病落叶松的广泛分布导致的落叶松群体抗病性薄弱。针对感病家系落叶松的广泛分布和落叶松

群体的抗病性薄弱,在未来的防治工作中可以采用以代谢工程关键靶点(如 *GPPS* 和 *PAL*)为核心的干预策略,应用抗性资源将成为有效防控落叶松枯梢病的重要途径。应结合分级防控措施(包括检疫清理、混交林种植以及 CRISPR 育种技术)来阻断致灾链,为从根本上防控落叶松枯梢病提供可行的策略和技术支持。

4 结论

落叶松枯梢病灾变的核心驱动因子是群体抗病性薄弱。落叶松对落叶松枯梢病的抗病、感病性主要受植保素积累能力与 ROS 调控平衡的共同影响。在林业生产中,遵循“适地适树”原则对于抗病品种的筛选与推广应用具有重要意义。未来应融合杂交育种与分子育种技术,重点选育具有较强植保素积累能力和稳定 ROS 调控平衡的落叶松品种,以突破抗病育种瓶颈,实现对落叶松枯梢病灾害的源头防控。

参 考 文 献

- 国家林业和草原局. 2019. 中国森林资源报告(2014—2018)[M]. 北京: 中国林业出版社.
- National Forestry and Grassland Administration. 2019. China Forest Resources Report (2014—2018)[M]. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 何平勋, 王永民. 1979. 关于落叶松枯梢病及其防治的研究[J]. 吉林林业科技, 8(2): 102—111.
- He P X, Wang Y M. 1979. Study on larch shoot blight and its control[J]. Forestry Science and Technology, 8(2): 102—111. (in Chinese)
- 刘秀徽, 王峰, 刘雪峰. 2009. 落叶松枯梢病分子检测初步研究[J]. 植物检疫, 23(2): 1—4.
- Liu X W, Wang F, Liu X F. 2009. The molecular diagnosis of the larch shoot blight[J]. Plant Quarantine, 23(2): 1—4. (in Chinese)
- 尚衍重. 1987. 落叶松枯梢病菌分类地位的探讨[J]. 真菌学报, 6(4): 248—249.
- Shang Y Z. 1987. Taxonomic study on the pathogen fungus of shoot blight of larch[J]. Mycosystema, 6(4): 248—249. (in Chinese)
- 尚衍重. 1991. 落叶松枯梢病菌的学名变更[J]. 森林病虫通讯, 10(2): 17.
- Shang Y C. 1991. Change of scientific name of larch shoot blight pathogen[J]. Forest Pest and Disease, 10(2): 17. (in Chinese)
- 宋淑梅, 马德兰, 原贵生, 等. 1997. 华北落叶松枯梢病症状特点及病原菌研究[J]. 山西农业大学学报(2): 27—30, 111—112.
- Song S M, Ma D L, Yuan G S, et al. 1997. Study on symptoms and pathogens of shoot blight of *Larix principis-rupprechtii*[J]. Journal of Shanxi Agricultural University, (2): 27—30, 111—112. (in Chinese)
- 孙宝贵, 魏作全, 李业木, 等. 1979. 落叶松枯梢病及其防治的研究[J]. 林业科技通讯(9): 22—24.
- Sun B G, Wei Z Q, Li Y M, et al. 1979. Study on larch shoot blight and its control[J]. Forest Science and Technology, (9): 22—24. (in Chinese)
- 王皓茹. 2024. 香兰素破坏细胞膜抑制落叶松壳梭孢的效果研究[D]. 哈

- 尔滨: 东北林业大学.
- Wang H R. 2024. Study on the effect of vanillin inhibiting *Neofusicoccum laricinum* by destroying cell membrane [D]. Harbin: Northeast Forestry University. (in Chinese)
- 王丽平, 傅竟也, 张仁, 等. 2025. 萜类植保素代谢调控研究进展[J/OL]. 植物病理学报: 1-16 (2025-04-30)[2025-05-09]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000977>.
- Wang L P, Fu J Y, Zhang R, et al. 2025. Progress of research on the metabolic regulatory mechanism of terpenoid phytoalexins[J/OL]. Acta Phytopathologica Sinica: 1-16 (2025-04-30) [2025-05-09]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000977>. (in Chinese)
- 王永民, 刘国荣, 王世君, 等. 1992. 落叶松枯梢病检疫技术的研究[J]. 林业科学研究(6): 652-658.
- Wang Y M, Liu G R, Wang S J, et al. 1992. Study of quarantine techniques for larch shoot dieback[J]. Forest Research, (6): 652-658. (in Chinese)
- 王跃华, 刘洪明, 刘鑫, 等. 2018. 红景天植物石蜡切片的制作和结构观察研究[J]. 种子, 37(7): 28-30, 34.
- Wang Y H, Liu H M, Liu X, et al. 2018. Study on preparation and structural observation of paraffin sections of three kinds of *Rhodiola*[J]. Seed, 37(7): 28-30, 34. (in Chinese)
- 魏亚伟, 周旺明, 周莉, 等. 2015. 兴安落叶松天然林碳储量及其碳库分配特征[J]. 生态学报, 35(1): 189-195.
- Wei Y W, Zhou W M, Zhou L, et al. 2015. Carbon storage and its distribution pattern in the natural *Larix gmelinii* forests on Daxing'an mountains[J]. Acta Ecologica Sinica, 35(1): 189-195. (in Chinese)
- 项存梯, 原树忠, 孟繁荣, 等. 1979. 落叶松枯梢病的研究[J]. 东北林学院学报(1): 32-43.
- Xiang C T, Yuan S Z, Meng F R, et al. 1981. Study on the larch shoot blight[J]. Journal of North-Eastern Forestry Institute, (1): 32-43. (in Chinese)
- 尹光文, 王自江. 1979. 落叶松枯梢病的研究初报[J]. 吉林林业科技, 8(4): 46-69.
- Yin G W, Wang Z J. 1979. Preliminary report on the study of larch shoot blight[J]. Forestry Science and Technology, 8(4): 46-69. (in Chinese)
- 于文志, 张静波, 王惠军, 等. 2008. 落叶松枯梢病损失量测定及防治指标研究: 病害对10年生以下幼龄人工林生长量的影响[J]. 林业科技, 33(1): 31-32.
- Yu W Z, Zhang J B, Wang H J, et al. 2008. Study on loss measurement and control index of larch shoot blight: Effect of disease on growth of young plantation under 10 years old[J]. Forestry Science & Technology, 33(1): 31-32. (in Chinese)
- 苑健羽. 1990. 落叶松真菌病害[M]. 北京: 科学出版社.
- Yuan J Y. Fungal diseases of larch[M]. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 曾伟生. 2022. 东北落叶松林碳储量生长模型研建及固碳能力分析[J]. 林业资源管理(1): 18-23.
- Zeng W S. 2022. Development of carbon growth models and analysis of carbon sequestration capacity for larch forest stands in the northeast of China[J]. Forest and Grassland Resources Research, (1): 18-23. (in Chinese)
- 张广臣, 楚立明, 于文喜, 等. 1999. 落叶松枯梢病发生规律及防治技术[J]. 森林病虫通讯, 18(1): 9-10, 21.
- Zhang G C, Chu L M, Yu W X, et al. 1999. Occurrence regularity and control techniques of larch shoot blight[J]. Forest Pest and Disease, 18(1): 9-10, 21. (in Chinese)
- Bruda E A, Xia R, Zhang R Z, et al. 2024. Evaluation on the efficacy of farrerol in inhibiting shoot blight of larch (*Neofusicoccum laricinum*)[J]. Plants, 13(21): 3004.
- Chowdhury S, Basu A, Kundu S. 2017. Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases[J]. Scientific Reports, 7(1): 17251.
- Coles D W, Bithell S L, Mikhael M, et al. 2022. Chickpea roots undergoing colonisation by *Phytophthora medicaginis* exhibit opposing jasmonic acid and salicylic acid accumulation and signalling profiles to leaf hemibiotrophic models[J]. Microorganisms, 10(2): 34.
- Hattori Y, Ando Y, Nakashima C. 2021. Taxonomical re-examination of the genus *Neofusicoccum* in Japan[J]. Mycoscience, 62(4): 250-259.
- Hattori Y, Nakashima C, Masuya H. 2024. Re-epitypification of *Neofusicoccum laricinum*[J]. Mycoscience, 65(2): 47-48.
- Hiruma K, Fukunaga S, Bednarek P, et al. 2013. Glutathione and tryptophan metabolism are required for *Arabidopsis* immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(23): 9589-9594.
- Liu Y Q, Han S J, Song L W, et al. 2024. Screening of bacterial endophytes of larch against *Neofusicoccum laricinum* and validation of their safety[J]. Microbiology Spectrum, 12(8): e0411223.
- Pyšek P, Hulme P E, Simberloff D, et al. 2020. Scientists' warning on invasive alien species[J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 95(6): 1511-1534.
- Santini A, Migliorini D. 2022. Invasive alien plant pathogens: the need of new detection methods[J]. Plant Pathology: Method and Protocols, 2536: 111-118.
- Seidl R, Klonner G, Rammer W, et al. 2018. Invasive alien pests threaten the carbon stored in Europe's forests[J]. Nature Communications, 9(1): 1626.
- Seybold H, Demetrowitsch T J, Hassani M A, et al. 2020. A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition[J]. Nature Communications, 11(1): 1910.
- Shang Y F, Xiao G H, Zheng P, et al. 2016. Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity[J]. Genome Biology and Evolution, 8(5): 1374-1387.
- Stanosz G R, Smith D R, Guthmiller M A. 1997. Pathogenicity of A and B morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* confirmed on American larch (tamarack) and European larch[J]. European Journal of Forest Pathology, 27(5): 301-307.
- Thakur M P, Van der Putten W H, Cobben M M P, et al. 2019. Microbial invasions in terrestrial ecosystems[J]. Nature Reviews Microbiology, 17(10): 621-631.
- Wang Y, Pruitt R N, Nürnberger T, et al. 2022. Evasion of plant immunity by microbial pathogens[J]. Nature Reviews Microbiology, 20(8): 449-464.
- Yang X, Zhang L, Wei J, et al. 2025. A *TaSnRK1α-TaCAT2* model mediates resistance to Fusarium crown rot by scavenging ROS in common wheat[J]. Nature Communications, 16(1): 2549.
- Zhang D, Gao F, Jakovlić I, et al. 2020. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies[J]. Molecular Ecology Resources, 20(1): 348-355.