

# 基于 SNP 标记的山东省松材线虫种群分化研究

熊雄<sup>2</sup> 李杰<sup>1</sup> 赵星<sup>3</sup> 黄婕<sup>3</sup> 高锋<sup>3</sup> 于成明<sup>1</sup> 刘会香<sup>1\*</sup>

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2. 山东农业大学林学院, 山东 泰安 271018; 3. 山东省泰安市徂徕山林场, 山东 泰安 271029)

**摘要:** 由松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*(Steiner & Buhrer)Nickle 引起的松材线虫病是毁灭性的重大生物灾害, 自 1982 年我国首次发现以来, 疫情不断蔓延, 对松林资源、自然景观和生态环境造成严重破坏, 导致了严重的经济和生态损失。本研究使用 SNP(单核苷酸多态性)标记研究山东省松材线虫的遗传特征, 以北方辽宁省松材线虫种群、被广泛研究的广东省松材线虫种群, 以及日本松材线虫种群作为参考, 对收集的 41 株松材线虫样本进行了全基因组重测序, 观察不同种群间基因组水平的变异程度, 从分子角度寻找山东省松材线虫的遗传特征, 探究山东、广东以及辽宁 3 省松材线虫种群的亲缘关系。结果表明: 山东省内松材线虫为同一种群, 与辽宁省松材线虫种群亲缘关系较近, 但与广东省松材线虫种群有较大差异; 在山东省, 沿海地区存在严重的交叉感染, 没有明显的地区聚类特征; 山东省和辽宁省松材线虫种群具有显著奠基者效应。研究结果为松材线虫病的传播路径、生态适应以及病害防控等方面的研究和实践提供了理论基础。

**关键词:** 松材线虫; 基因组重测序; 种群结构; 系统发育

中图分类号: S763.19 文献标识码: A 文章编号: 2097-5279(2025)04-0062-09

## Population differentiation of *Bursaphelenchus xylophilus* in Shandong Province based on SNP markers

XIONG Xiong<sup>2</sup> LI Jie<sup>1</sup> ZHAO Xing<sup>3</sup> HUANG Jie<sup>3</sup> GAO Feng<sup>3</sup> YU Chengming<sup>1</sup> LIU Huixiang<sup>1\*</sup>

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 3. Culai Mountain Forest Farm of Tai'an City, Tai'an 271029, China)

**Abstract:** Pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*(Steiner & Buhrer)Nickle is a devastating major biological disaster. Since introduced into China in 1982, it has caused severe damage to pine forest resources, natural landscapes, and ecological environment, resulting in significant economic and ecological losses. In this study, SNP markers were used to investigate the genetic characteristics of *B. xylophilus* in Shandong Province. *B. xylophilus* populations from Liaoning Province (the northernmost region), Guangdong Province (a widely studied region), and Japan (a foreign region) were used as references. A total of 41 collected *B. xylophilus* samples were subjected to whole-genome resequencing. The degree of genomic variation among different populations was observed, the genetic characteristics of *B. xylophilus* in Shandong Province were explored from a molecular perspective, and the genetic relationships among *B. xylophilus* populations in Shandong, Guangdong, and Liaoning Provinces were investigated. The results showed that the *B. xylophilus* within Shandong Province belongs to the same population, which has a close genetic relationship with the population in Liaoning Province but exhibits significant differences from the population in Guangdong Province. Within Shandong Province, severe cross-infection occurs in coastal areas, with no obvious regional clustering characteristics. Additionally, the *B. xylophilus* populations in Shandong and Liaoning provinces are those with a significant founder effect. The results provide a theoretical basis for the transmission path, ecological adaptation, and disease prevention and control of pine wilt disease.

**Keywords:** *Bursaphelenchus xylophilus*(Steiner & Buhrer)Nickle; genome resequencing; population structure; phylogeny

松材线虫病(pine wilt disease, PWD)是由入侵物种松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*(Steiner & Buhrer)

Nickle 引起的松树毁灭性病害(叶建仁, 2019)。松材线虫原产自北美洲, 对美国本土松树并未造成严重

收稿日期: 2025-06-19; 修回日期: 2025-08-20。

基金项目: 泰安市科技创新发展项目(2022NS125)。

\* 通信作者: 刘会香(E-mail: hxliu@sdau.edu.cn), 教授。

危害,但对中国、日本、韩国、葡萄牙、西班牙等入侵地的松林造成极大危害(Mamiya, 1983)。根据中国国家林业和草原局公告(2025年第4号),山东省自1990年发现松材线虫病以来,至2025年3月,病害已扩散至5市12县,疫情不仅从胶东半岛地区向内陆、鲁东、鲁中扩散,还从一般林区向重点林区、风景名胜区分区扩散,带来了灾难性的经济和生态损失。

随着测序技术的发展,基因组学研究在探究入侵物种传播路径和扩散格局等方面取得进展。基于高质量基因组的单核苷酸多态性(SNP, single nucleotide polymorphisms)技术已成为现代遗传学研究的核心工具之一。该技术能够精准检测基因组中单个核苷酸的变异,广泛应用于生物进化、遗传育种、医学诊断等多个领域(Nasu et al., 2002)。通过全基因组SNP分析,可精确识别入侵种群的原产地或亲本种群,解决传统分子标记分辨率不足的问题,对揭示其遗传多样性具有重要参考价值(Aparo et al., 2024)。

例如,悬铃木方翅网蝽 *Corythucha ciliate* Say、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner、福寿螺 *Pomacea canaliculata* Lamarck 均通过高质量基因组重测序描绘了其入侵历史及适应性机制(Du et al., 2025; Jin et al., 2023; Lu et al., 2024)。在利用SNP技术研究松材线虫种群结构的相关报道中,汪青桐等(2022)利用全基因组测序的SNP分子标记技术,对中国松材线虫病发生最早的4个省区(江苏、浙江、安徽、山东)的67个虫株进行了种群遗传多样性和分化研究。结果显示,华东地区虫株分为3个类群,其中类群1包含的虫株数量最多,涵盖了华东地区的大部分虫株,主要SNP基因型均相同,种群间具有相同的传播来源,以苏、皖为中心向外传播扩散。黄金思等(2019)对广东省松材线虫虫株进行SNP标记分析,发现广东省松材线虫种群间具有遗传差异性,将该省松材线虫虫株分为3个类群,并认为第1类群和其他两类群具有不同的传播来源。Ding等(2022)在松材线虫新的染色体级别基因组基础上,对来自中国和美国的181个虫株进行了重测序分析,发现了约780万个SNPs位点,并将中国松材线虫种群细分为4个类群,预测了可能的3条传播路径,且发现不同类群线虫与地理来源关系密切,不同地区间存在严重的交叉感染现象。由此可见,以松材线虫全基因组为基础数据,结合SNP分子标记技术,能够有效探究松材线虫的种群遗传结构及传播路径。

目前,我国有关松材线虫种群结构研究主要聚焦于入侵时间较早且入侵范围较广的南方地区,松

材线虫在北方地区的遗传结构、传播路径尚不明确;山东、辽宁等北方疫区的全基因组数据不足,需要在进一步的研究中扩充北方松材线虫的基因组数据。松材线虫的扩散格局是否导致其遗传结构发生改变,北方线虫种群与南方线虫种群是否一致,目前还未得出准确的推论。本文主要研究了松材线虫在山东省的种群遗传结构,以北方辽宁省松材线虫种群、广泛研究的广东省松材线虫种群,以及日本松材线虫种群作为参考,从分子生物学角度探讨山东省松材线虫种群的遗传分化,为优化完善松材线虫病防控策略提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 松材线虫虫株的收集及培养

本研究从中国北方(山东省、辽宁省)和中国南方(广东省)松材线虫病疫区采集罹病松木,采用贝尔曼漏斗法(刘维志, 2004)分离疫木中的线虫,将其置于1.5 mL离心管中,在显微镜下进行形态学鉴定。采用特异性引物进行分子生物学鉴定(PX-1: GATGATGCGATTGGTGACT; PX-2: CAGTGCGTAGA-AGATATTGGT)。挑取鉴定后的雌雄成虫各20条,采用线虫表面消毒液(0.002%的放线菌酮+0.1%的硫酸链霉素)进行虫体消毒,接入含有长满灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* Pers. Fr.的PDA平板中,25℃培养7~10 d至灰葡萄孢全部被吃光。采用贝尔曼漏斗法将培养好的线虫收集于1.5 mL的离心管中,在台式离心机中12 000 r/min离心2 min去除上清液;再用0.1 mol/L NaCl对线虫进行冲洗,700 r/min离心2 min,吸打重悬;重复2~3次,去除少量杂质。采用蔗糖梯度离心法(Kikuchi et al., 2007)获得纯线虫溶液,将线虫悬浮在0.1 mol/L NaCl中,并与等体积4℃保存的60%(w/v)蔗糖混合,700 r/min离心5 min,采用移液枪将漂浮的线虫从离心管壁上吸出,移到一个新的离心管中,通过离心清洗线虫2次,重复2次,将得到的线虫储存于4℃冰箱备用。野外共收集到36株松材线虫;日本及中国南京松材线虫虫株由中国科学院动物研究所惠赠。结合NCBI(National Center for Biotechnology Information)公开数据库测序数据,用于分析的松材线虫共计41株(表1)。

### 1.2 松材线虫DNA的提取

采用CTAB法(Cetyltrimethylammonium Bromide, 十六烷基三甲基溴化铵法)提取线虫DNA(刘裕兰, 2007)。在200 μL松材线虫溶液中加入400 μLDNA提取液,混匀后65℃水浴30 min,随后12 000 r/min离心

表1 松材线虫虫株来源

Tab. 1 Sources of *B. xylophilus* Strains

序号 Number	虫株编号 Strains	来源 Source	寄主树种 Host tree species	地理位置 Geographical location
1	GDJY	广东揭阳	马尾松 <i>Pinus massoniana</i> Lamb.	—
2	GDQY	广东清远	马尾松 <i>P. massoniana</i>	—
3	GDSG	广东韶关	马尾松 <i>P. massoniana</i>	—
4	GDST	广东汕头	马尾松 <i>P. massoniana</i>	—
5	JPS10P3	日本 Shimane, Hirose (NCBI: DRR067233)	—	35.37°N, 133.16°E
6	JPS10P9	日本 Shimane, Hirose (NCBI: DRR067234)	—	35.37°N, 133.16°E
7	JP_Bx2	日本 (NCBI: SRR11012124)	赤松 <i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	—
8	NJNJ	南京	黑松 <i>Pinus thunbergii</i> Parl.	—
9	V10	日本	—	—
10	X116	日本	—	—
11	SDZF_6	山东烟台芝罘区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	—
12	CNLN_3	辽宁大连沙河口区 (NCBI: SRR17137430)	黑松 <i>P. thunbergii</i>	—
13	CNLN_5	辽宁大连甘井子区 (NCBI: SRR17137432)	油松 <i>Pinus tabuliformis</i> Carr.	—
14	LNFS_Y	辽宁抚顺	油松 <i>P. tabuliformis</i>	41.85°N, 124.18°E
15	LNFS_Z	辽宁抚顺	樟子松 <i>Pinus sylvestris</i> var. <i>mongolica</i> Litv.	41.84°N, 124.24°E
16	QLS_1	山东青岛崂山区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	36.11°N, 120.47°E
17	QLS_2	山东青岛崂山区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	36.12°N, 120.58°E
18	SDCD_1	山东烟台长岛县	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.93°N, 120.74°E
19	SDCS_1	山东威海成山林场	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.38°N, 122.54°E
20	SDCY_1	山东烟台莱山区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	36.21°N, 120.46°E
21	SDFS_3	山东烟台福山区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.38°N, 121.28°E
22	SDZF_5	山东烟台芝罘区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.44°N, 121.36°E
23	SDHC_6	山东威海环翠区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.39°N, 122.03°E
24	SDHD_4	山东青岛黄岛区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	35.92°N, 119.94°E
25	SDJM_1	山东青岛即墨区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	36.33°N, 120.58°E
26	SDJM_4	山东青岛即墨区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	36.33°N, 120.58°E
27	SDJM_5	山东青岛即墨区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	36.33°N, 120.58°E
28	SDKYS_3	山东烟台坤云山	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.26°N, 121.73°E
29	SDLS_3	山东日照岚山区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.37°N, 121.42°E
30	SDLIC_6	山东青岛李沧区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	36.20°N, 120.50°E
31	SDMP_10	山东烟台牟平区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.44°N, 121.72°E
32	SDMP_2	山东烟台牟平区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.44°N, 121.72°E
33	SDZF_2	山东烟台芝罘区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.44°N, 121.36°E
34	SDQX_2	山东烟台栖霞市	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.28°N, 121.23°E
35	SDQX_3	山东烟台栖霞市	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.28°N, 121.23°E
36	SDRS_3	山东威海乳山市	黑松 <i>P. thunbergii</i>	36.91°N, 121.60°E
37	SDTS_2	山东泰安徂徕山林场	赤松 <i>P. densiflora</i>	36.06°N, 117.41°E
38	SDWD_2	山东烟台文登区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.26°N, 122.19°E
39	SDWD_5	山东烟台文登区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.26°N, 122.19°E
40	SDYLS38	山东烟台莱山区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	37.51°N, 121.44°E
41	SDYLS_3	山东烟台莱山区	黑松 <i>P. thunbergii</i>	35.20°N, 119.29°E

注：“—”表示未获得此项信息。

Notes: “—” indicates that this specific piece of information was not obtained.

10 min。再加入 300  $\mu$ L 的无水乙醇, 冰浴 5 min, 全部转入吸附柱中, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃废液; 然后加入 300  $\mu$ L 75% 乙醇, 12 000 r/min 离心 1 min, 离心 2 次; 将吸附柱再次离心 (12 000 r/min, 1 min), 保证除去残留的乙醇; 加 50  $\mu$ L 的 TE 缓冲液静置 5 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集滤液, 获得松材线虫总 DNA 溶液。通过琼脂糖电泳凝胶检测 DNA 质量, 采用 NanoDrop 微体积分光光度计评估 DNA 的纯度和浓度。将检测合格的松材线虫 DNA 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存 (王焱等, 2007; 马跃等, 2014)。

### 1.3 松材线虫高通量测序及变异检测

将质量合格的松材线虫 DNA 送至山东开亿基因公司进行高通量测序。测序使用平台为 Illumina HiSeq 4 000, 测序方法为非链特异性、150 bp 双末端测序, 测序深度  $>50\times$ 。采用 Trimmomatic (v0.39) 对原数下机数据进行质控 (Bolger et al., 2014); 采用 bwa (v 0.7.17) 将 clean reads 比对到参考基因组 TS-1 (分离自山东省泰安市泰山区泰山) 上 (Li and Durbin, 2009; Li et al., 2023); 用 SAMtools 软件将 SAM 文件转换为 BAM 文件进行后续分析 (Li et al., 2009); 用 Picard (<https://guides.github.com/activities/citable-code/>) 软件过滤比对后的在 PCR 过程中可能产生的冗余片段; 利用 GATK (v4.2.2.0) 中的 gatk SelectVariants 进行变异选择, 并提取所有的 SNP 变异, 再利用 gatk VariantFiltration 对变异位点进行过滤, 去除低质量变异, 过滤条件为: 变异置信度与深度的比值 (QD)  $<2.0$ , Fisher 检验值 (FS)  $>60.0$ , 量化链偏向值 (SOR)  $>3.0$ , 质量的均方根值 (MQ)  $<40.0$ , 曼惠特尼秩 MQRankSum  $<-12.5$  (McKenna et al., 2010)。利用 VCFtools (v0.1.17) 对 VCF 文件进行数据再过滤和重编码, 以筛选高质量的 SNP 变异。筛选条件为: 过滤缺失率 max-missing 0.8, 过滤最小等位基因频率 maf 0.01, 最低测序深度 minDP 4, 保留双等位点 max-alleles 2 (Danecek et al., 2011)。采用 SnpEff (v 4.5) 对筛选后的 SNP 进行注释, 并筛选四倍兼并位点 (4DTV) (Cingolani et al., 2012)。

### 1.4 群体遗传结构分析

针对所有样品 4dtv 数据, 采用 EIGENSOFT (v3.0) 的 smartpca 进行 PCA 分析 (Patterson et al., 2006)。为研究群体的遗传结构, 使用 VCF2Dis (v1.51) 生成距离矩阵 (Xu et al., 2025), 将距离矩阵上传至 FastMe2.0, 配置成 NJ tree 的格式文件 (Lefort et al., 2015), 使用 iTOL 对文件进行可视化处理, 得到进化树 (Letunic and Bork, 2024)。利用 Admixture (v 1.3.0) 软件对转换格式后的 VCF 文件进行计算, 再通过交叉验证误差

法 (CV-error) 判断最优分群, 设置遗传组数 (K 值) 范围为 1~9, 每个 K 值进行 20 次独立运行, 找出最优 K 值 (Alexander et al., 2009); 使用 TBtools 中的对种群结构结果进行可视化 (Chen et al., 2023)。SNP 位点统计分析使用 Vcftools 软件结合 awk 脚本对 VCF 文件进行处理, 获得每个样本的 SNP 数量、纯合子数量、突变基因型等信息 (Danecek et al., 2011)。

### 1.5 松材线虫群体遗传多样性分析

使用 Vcftools (v0.1.17) 进行核苷酸多样性 ( $\pi$ )、Tajima's D 中性检测及种群间固定系数 Fst (Fixation Index) 比较 (Danecek et al., 2011), 参数如下: --window-pi 50 000 --window-pi-step 25 000; --TajimaD 50 000; --fst-window-size 50 000 --fst-window-step 25 000。使用 R (v4.5.0) 绘制结果图。使用 PopLDdecay (v3.43) 对 SNP 进行连锁不平衡分析, 使用 Perl 脚本中的 Plot\_MultiPop 数据包绘制连锁不平衡衰减图 (Zhang et al., 2019)。

## 2 结果与分析

### 2.1 松材线虫 SNPs 位点数量

由表 2 可知, 松材线虫 SNP 位点数量最多的为 2 个日本虫株 JP\_Bx2 (1 064 020)、V10 (1 072 452), 其次为来自于广东省的虫株 GDJY (925 256)、GDQY (920 126) 和来自日本的虫株 X116 (819 790), 最少的为来自山东省乳山市的虫株 (SDRS\_3)。纯合子数量最多的为来自广东省的虫株 (GDJY、GDQY、GDST、GDSTG); 其次为日本虫株; 最少的为来自南京的虫株 (NJNJ)。从 SNP 数量上, 日本、广东省、山东省和辽宁省虫株之间差异明显, 可以通过该分子标记进行种群区分。通过统计 SNP 位点的突变基因型种类及数量, 发现共有 A->C、A->G、A->T、C->A、C->G、C->T、G->A、G->C、G->T、T->A、T->C、T->G 12 种基因型。

### 2.2 松材线虫种群结构及系统发育树

Admixture 结果表明, 随着 K 值的不断增大, CV 误差值也逐渐增大, CV 误差值越低, 可信度越高, 最低 CV 误差值出现在 K=2 时 (图 1C)。种群遗传结构分析如图 1A 所示, 每一竖列代表该群体的 1 个样本, 每种字体颜色代表 1 个祖先群, 松材线虫种群分为 2 个类群 (POP1 和 POP2)。POP1 为日本 (JPS10P3、JPS10P9、JP\_Bx2、V10、X116)、南京 (NJNJ)、广东 (GDJY、GDQY、GDSTG、GDST) 的虫株; POP2 为山东、辽宁的虫株。构建的系统发育树表明, 在 POP1 中, 仅观察到广东的 4 个虫株聚集为明显分支, 其他未观察到明显的群体聚类; 在 POP2 中, 所有虫株均聚在一起, 各群体遗传关系密切 (图 1A), 山东省内部的

表2 松材线虫 SNPs 位点统计结果

Tab. 2 Statistical results of SNPs of *B. xylophilus*

虫株编号 Strains	SNP数量/个 SNP quantity	纯合子数量/个 Homozygote quantity	虫株编号 Strains	SNP数量/个 SNP Quantity	纯合子数量/个 Homozygote quantity
GDJY	925 256	185 860	SDZF_5	5 188	263
GDQY	920 126	186 329	SDHC_6	3 369	268
GDSG	583 789	109 635	SDHD_4	3 062	285
GDST	553 468	105 831	SDJM_1	6 676	290
JPS10P3	263 884	45 410	SDJM_4	93 168	140
JPS10P9	257 530	45 349	SDJM_5	5 873	275
JP_Bx2	1 064 020	9 864	SDKYS_3	6 045	251
NJNJ	538 614	138	SDLS_3	5 614	285
V10	1 072 452	7 013	SDLiC_6	4 635	289
X116	819 790	2 400	SDMP_10	6 191	303
SDZF_6	4 023	246	SDMP_2	18 423	239
CNLN_3	15 177	262	SDZF_2	6 673	205
CNLN_5	6 953	262	SDQX_2	15 822	285
LNFS_Y	9 207	263	SDQX_3	55 601	279
LNFS_Z	4 893	267	SDRS_3	2 460	278
QLS_1	6 006	270	SDTS_2	7 758	295
QLS_2	6 417	257	SDWD_2	24 399	291
SDCD_1	6 601	277	SDWD_5	5 771	196
SDCS_1	3 641	173	SDYLS38	14 381	204
SDCY_1	6 239	259	SDYLS_3	3 580	163
SDFS_3	4 760	290			

松材线虫虫株并没有出现明显的遗传分化,遗传特征一致,且与来自辽宁省的松材线虫虫株混在一起。PCA 聚类也验证了此种分群,在 PCA 分析中,POP2 中的 31 株虫株全都聚类在一点(图 1B)。在分群后的 SNPs 位点数量中,POP1 种群 SNPs 位点数量明显大于 POP2 种群,这与分群之前的 SNPs 统计一致,两种群间 SNPs 突变基因型种类一致,且数量最多的基因型均为 A->G、C->T、G->A、T->C 4 种基因型(图 2)。

### 2.3 松材线虫种群遗传特征

种群间固定系数  $F_{st}$  分析显示,除 1 号染色体(chr1)和 5 号染色体(chr5)上 2 个种群的  $F_{st}$  值较低外,2 号、3 号、4 号、6 号染色体(chr2、3、4、6)上多数位点的  $F_{st}$  值大于 0.5(图 3C),且 2 个种群间平均  $F_{st}$  为 0.46,表明 2 个种群在遗传上已经出现了显著的分化,基因交流受到了强烈限制。核苷酸多样性( $\pi$ )分析显示( $\pi$  数值越高,种群内核苷酸变异越丰富,多样性越高),POP1 种群核苷酸多样性较高(图 3A),而 POP2 种群核苷酸多样性极低(图 3B)。用相邻 SNP 连锁不平衡测量等位基因相关系数的平方( $r^2$ )分析的群体中连锁不平衡(LD)衰减状况,与 POP1 种群相比,POP2 种群衰减速率极低,说明距离增加导致连锁不平衡程度降低,遗传多样性变小(图 3E)。结果与 POP2 种群核苷酸多样性低是一致的。

Tajima's D 检验发现,POP1 种群 Tajima's D 大多数均大于 0,为正值;而 POP2 种群 Tajima's D 大部分

小于 0,为负值(图 3D)。Tajima's D 小于 0 可能是瓶颈效应后迅速扩张、净化选择(负选择)或遗传搭车效应引起的。综合 POP2 种群的 3 项遗传特征,即低核苷酸多样性、与其他种群的高  $F_{st}$  比值和较低的 Tajima's D 值,本研究认为:POP2 种群,尤其是山东省内部的松材线虫种群,曾经历严重种群瓶颈。瓶颈事件后,该种群进入扩张阶段,期间产生的新突变以低频形式存在,积累了与其他种群的差异,导致了这种特定的进化事件。

### 3 讨论

Ding 等(2022)将中国松材线虫划分为 4 个种群,其中广东省和山东省虫株被划分在不同种群类群,本研究的结果与其一致。本研究首次采用重测序技术分析中国和日本松材线虫遗传结构的差异,发现广东省与日本松材线虫虫株亲缘关系较近;而马跃(2012)通过使用特异性引物分析,认为山东省松材线虫种群与日本亲缘关系较近。这一差异反映了随着测序技术的提升,与单片段的分子标记相比,SNP 分子标记可以精准地描述种群特征。为更深入探究种群结构,本研究采用了山东省泰安市泰山的松材线虫染色体水平基因组(TS-1)。作为中国北方唯一的松材线虫染色体水平的基因组,TS-1 在长读长利用效率及部分连续性指标上均优于其他已公布的基因组。因此,以其作为参考基因组,能更清晰地揭示

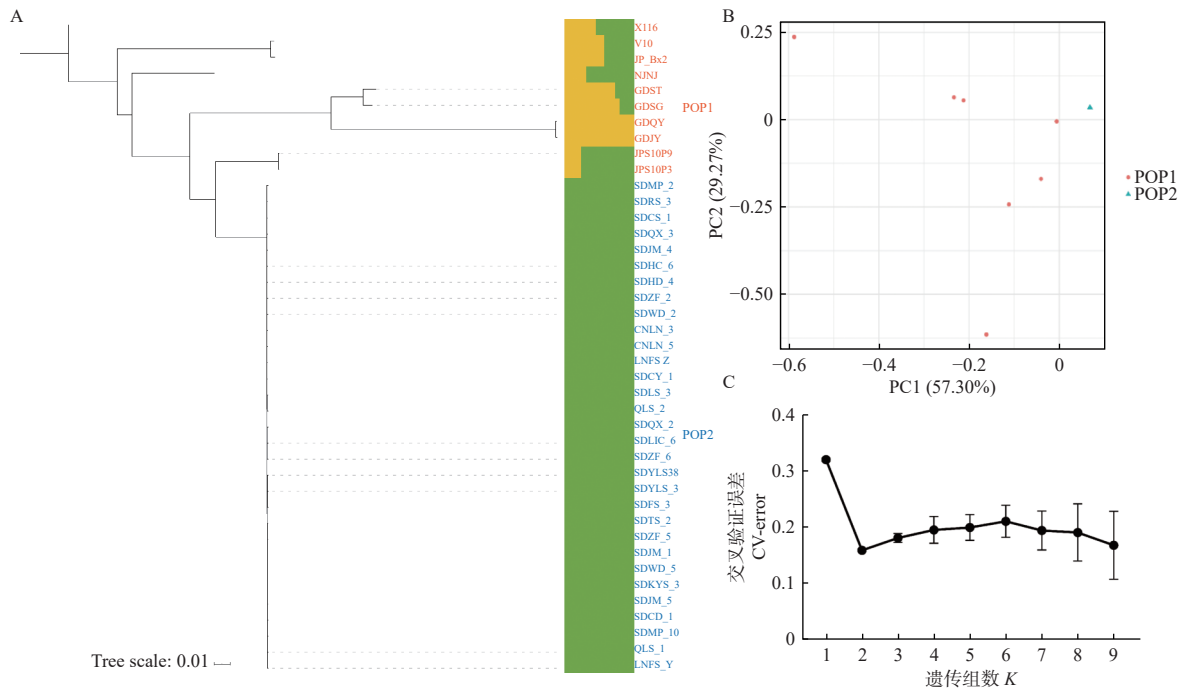


图 1 松材线虫系统发育及种群结构分析

Fig. 1 Phylogenetic and population structure analysis of *B. xylophilus*

注: A. 系统发育树及种群结构。左图为基于全基因组单核苷酸多态性(SNPs)构建的邻接系统发育树,展示了样本间的遗传关系;右图为 K=2 时的 Admixture 分析结果,每个竖条代表 1 个个体基因组,颜色表示推断出的祖先成分所占比例;B. 41 个虫株的全基因组 SNP 主成分分析。红色点代表 POP1 种群 10 个样本的分布,其中有 3 个样本 PCA 结果相似,聚成一点;蓝色三角代表 POP2 种群 31 个样本分布,31 个种群全部聚在一点,表现出高度一致性;C. 群体交叉验证误差(CV-error)结果,在遗传组数 K=2 时误差最小且稳定,误差棒代表相同 K 值运行 20 次的误差分布情况。

Notes: A. Phylogenetic tree and population structure. The left diagram is a neighbor-joining phylogenetic tree constructed based on genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs), showing the genetic relationships among samples. The right diagram presents the results of Admixture analysis when K=2, where each vertical bar represents an individual genome, and the colors indicate the proportion of the inferred ancestral components; B. Principal component analysis (PCA) of genome-wide SNPs from 41 nematode strains. Red dots represent the distribution of 10 samples from the POP1 population, among which 3 samples have similar PCA results and cluster into one point; blue triangles represent the distribution of 31 samples from the POP2 population, and all 31 samples cluster into one point, showing a high degree of consistency; C. Results of population cross-validation error (CV-error). The error is the smallest and stable when the number of genetic clusters K=2, and the error bars represent the error distribution of 20 runs with the same K value.

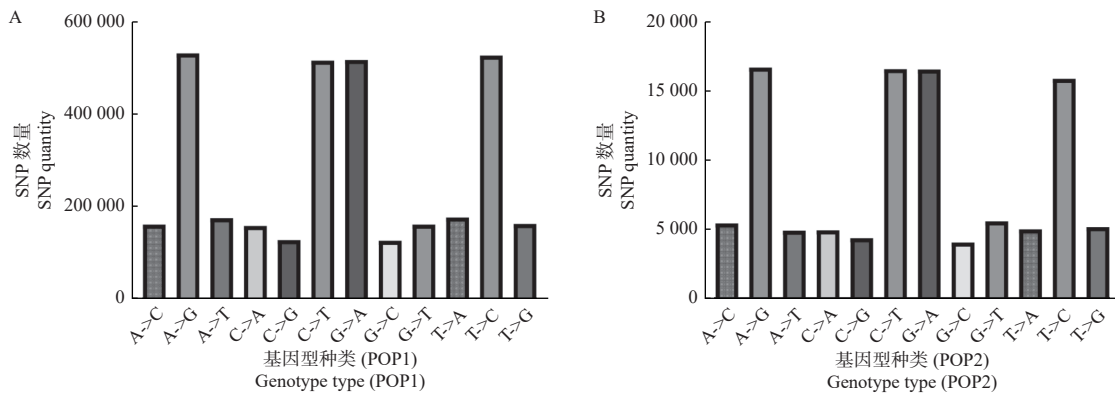


图 2 不同松材线虫种群 SNP 突变基因型种类及数量统计

Fig. 2 Statistics on the types and quantities of SNP mutation genotypes in different populations of *B. xylophilus*

注: A. POP1 种群 10 株虫株 SNP 信息统计;B. POP2 种群 31 株虫株 SNP 信息统计。

Notes: A. Statistics of SNP information for 10 nematode strains in the POP1 population; B. Statistics of SNP information for 31 nematode strains in the POP2 population.

中国北方松材线虫种群的分化特征。基于这一参考基因组的系统发育树和种群遗传结构分析显示,辽宁省虫株和山东省虫株聚类交叉,表明两地松材线

虫亲缘关系较近。进一步分析山东省内虫株发现,沿海地区存在着严重的交叉感染,未呈现明显的地理聚类特征,山东省新发生的内陆虫株 SDTS-2(来自

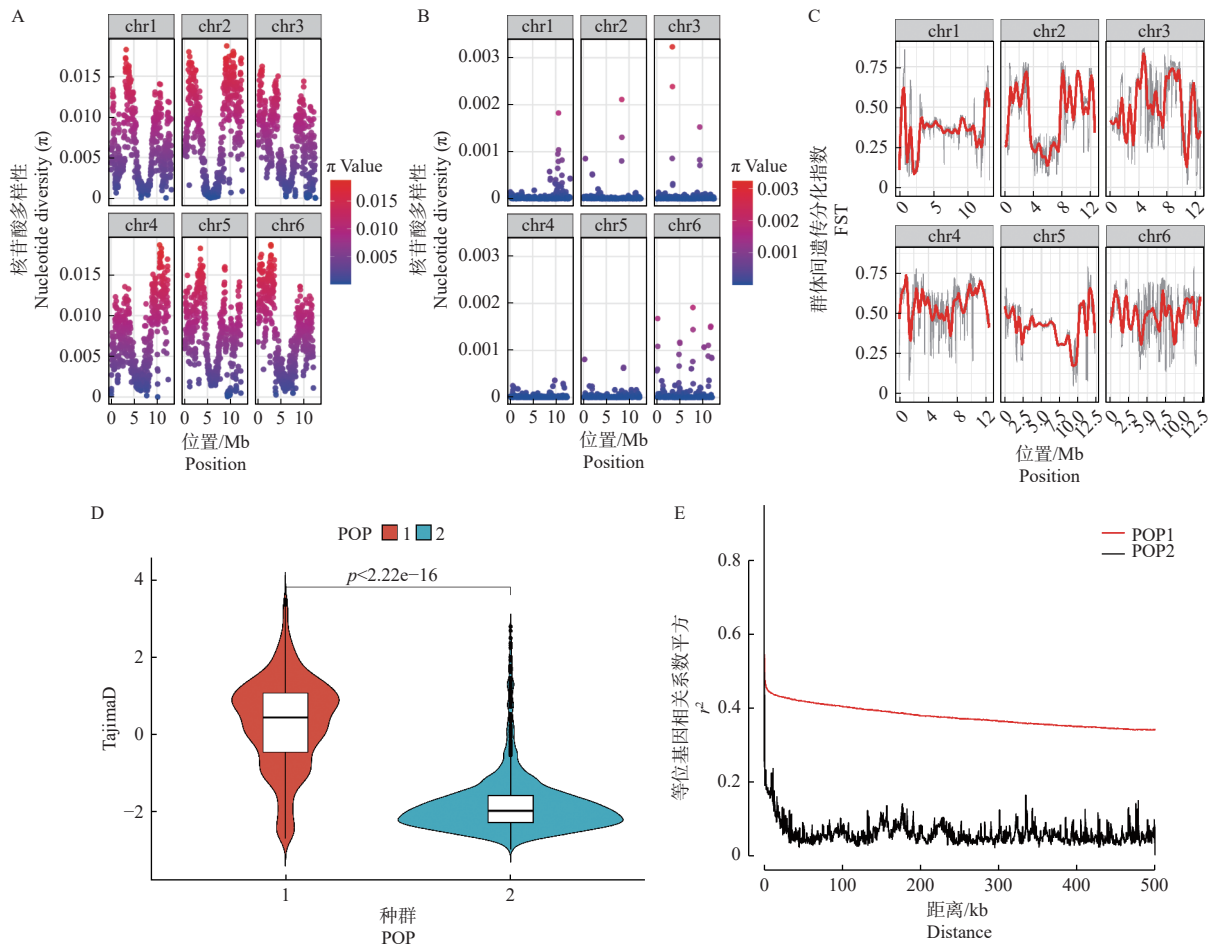


图3 不同松材线虫种群核苷酸多样性 ( $\pi$ )、Tajima's D、种群间固定系数 Fst、连锁不平衡衰减比较  
**Fig. 3 Comparison of nucleotide diversity ( $\pi$ ), Tajima's D, fixation index (Fst) between populations, and linkage disequilibrium decay among different *B. xylophilus* populations**

注: A. POP1 种群在不同染色体(chr)上的核苷酸多样性( $\pi$ ); B. POP2 种群在不同染色体(chr)上的核苷酸多样性( $\pi$ ); C. POP1 与 POP2 种群群体间的遗传分化指数 Fst; D. POP1 与 POP2 种群 Tajima's D 比较; E. 各群体的连锁不平衡衰减。

Note: A. Nucleotide diversity ( $\pi$ ) of the POP1 population across different chromosomes (chr); B. Nucleotide diversity ( $\pi$ ) of the POP2 population across different chromosomes (chr); C. Genetic differentiation index (Fst) between the POP1 and POP2 populations; D. Comparison of Tajima's D between the POP1 and POP2 populations; E. Linkage disequilibrium decay in each population.

徂徕山, 2021 年被列为松材线虫病疫区) 与来自烟台市的松材线虫虫株亲缘关系密切, 推测山东省内陆虫株并非来自南方等外部区域, 而更可能源于山东省沿海地区。

Zhou 等 (2017) 运用 ISSR 研究中国松材线虫种群的遗传多样性时, 发现不同地理分布的松材线虫聚为一类。Pereira 等 (2013) 研究松材线虫群体遗传时, 在松材线虫中检测到的较低水平的种内多样性。本研究基于 SNP 分子标记, 将山东省、辽宁省、广东省和日本的松材线虫分为了 2 个类群。在广东省和日本松材线虫种群中, 检测到了较高的核苷酸多样性; 在山东省和辽宁省的松材线虫种群中, 发现了明显的奠基者效应, 导致了种群遗传多样性丧失。据此推测, 山东省及辽宁省虫株可能具有强烈奠基者效

应的种群, 初期的定殖数量较少, 是由极小部分松材线虫种群入侵扩散而来。大部分入侵物种在入侵地会由于奠基者效应和遗传漂变, 导致遗传多样性减少。有研究也证实松材线虫也会因上述原因, 出现种群遗传多样性丧失及种群明显分化的现象 (黄族豪和刘迺发, 2008; 理永霞和张星耀, 2018; Cardoso et al., 2012)。本研究证实, 山东省和辽宁省的虫株是具有奠基者效应的种群, 这与前人研究结果相符。本研究还发现, 山东省和辽宁省松材线虫虫株的主要 SNP 基本型相同, 结合种群结构和系统发育分析, 山东省和辽宁省松材线虫种群应具有相同的传播来源。

虽然辽宁省和山东省的松材线虫种群具有奠基者效应, 出现基因组趋同现象, 但鉴于松材线虫长期在不同环境、不同寄主松树间传播, 可能存在潜在的

适应性位点并发生适应性进化。Yang 等(2023)通过全基因组关联分析,研究了辽宁省分离株和其他分离株潜在的适应性位点,证实了可能存在的适应性位点。未来将增加样本量,全面解析松材线虫不同地理种群的遗传多样性,为探讨松材线虫的传播路径及适应性进化提供参考。

#### 4 结论

本研究结果表明,山东省松材线虫种群之间没有明显的遗传分化,均为一个种群。松材线虫种群在广东省与山东省、辽宁省之间存在遗传分化现象,表现出较大的遗传差异。山东省和辽宁省的松材线虫种群存在明显的奠基者效应。本研究运用 SNP 标记技术,对山东省内以及山东省与其他地区的松材线虫种群的遗传结构展开研究,丰富了中国松材线虫种群的基因组数据,为松材线虫病传播路径、生态适应及病害防控等方面研究提供了理论依据。

#### 参 考 文 献

- 黄金思, 奚晓桐, 丁晓磊, 等. 2019. 基于 SNP 标记的广东省松材线虫种群分化研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 43(6): 25-31.
- Huang J S, Xi X T, Ding X L, et al. 2019. Study on the population differentiation of *Bursaphelenchus xylophilus* in Guangdong Province by SNP markers[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 43(6): 25-31. (in Chinese)
- 黄族豪, 刘迺发. 2008. 种群遗传学研究进展[J]. 安徽农业科学, 36(31): 13490-13491, 13499.
- Huang Z H, Liu N F. 2008. Advances in population genetics[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 36(31): 13490-13491, 13499. (in Chinese)
- 刘维志. 2004. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社.
- Liu W Z. 2004. Flora of Plant Nematodes [M]. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 刘裕兰. 2007. 松材线虫 PCR 快速检测方法的研究[D]. 重庆: 重庆大学.
- Liu Y L. 2007. Research on a Rapid PCR Detection Method for Pinewood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)[D]. Chongqing: Chongqing University. (in Chinese)
- 理永霞, 张星耀. 2018. 松材线虫入侵扩张趋势分析[J]. 中国森林病虫, 37(5): 1-4.
- Li Y X, Zhang X Y. 2018. Analysis on the trend of invasion and expansion of *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Forest Pest and Disease, 37(5): 1-4. (in Chinese)
- 马跃. 2012. 松材线虫病早期诊断技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学.
- Ma Y. 2012. Study on the Early Diagnosis Technology of Pine Wilt Disease[D]. Taian: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 马跃, 吕全, 于成明, 等. 2014. 松材线虫病早期诊断技术研究评述[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 45(1): 76, 153, 158-160.
- Ma Y, Lv Q, Yu C M, et al. 2014. Study on early diagnosis technology of pine wilt disease[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 45(1): 76, 153, 158-160. (in Chinese)
- 汪青桐, 丁晓磊, 叶建仁, 等. 2022. 基于 SNP 分子标记的华东地区松材线虫种群遗传分化研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 46(4): 21-28.
- Wang Q T, Ding X L, Ye J R, et al. 2022. Genetic differentiation of *Bursaphelenchus xylophilus* in East China based on single nucleotide polymorphisms (SNP) markers[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 46(4): 21-28. (in Chinese)
- 王焱, 季楠, 余本渊, 等. 2007. 3 种松材线虫分子检测技术的比较分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 31(4): 128-132.
- Wang Y, Ji L, Yu B Y, et al. 2007. Comparative analyses on three kinds of molecular detection technique of *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 31(4): 128-132. (in Chinese)
- 叶建仁. 2019. 松材线虫病在中国的流行现状、防治技术与对策分析[J]. 林业科学, 55(9): 1-10.
- Ye J R. 2019. Epidemic status of pine wilt disease in China and its prevention and control techniques and counter measures[J]. Scientia Silvae Sinicae, 55(9): 1-10. (in Chinese)
- Alexander D H, Novembre J, Lange K. 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals[J]. *Genome Research*, 19(9): 1655-1664.
- Aparo A, Bonnici V, Avesani S, et al. 2024. DiGAS: Differential gene allele spectrum as a descriptor in genetic studies[J]. Computers in Biology and Medicine, (179): 108924.
- Bolger A M, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 30(15): 2114-2120.
- Cardoso J M S, Fonseca L, Abrantes I. 2012. Genetic diversity of ITS sequences of *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 11(4): 4508-4515.
- Chen C J, Wu Y, Li J W, et al. 2023. TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. *Molecular Plant*, 16(11): 1733-1742.
- Cingolani P, Platts A, Wang L L, et al. 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; *Iso-2*; *Iso-3*[J]. *Fly*, 6(2): 80-92.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, et al. 2011. The variant call format and VCFtools[J]. *Bioinformatics*, 27(15): 2156-2158.
- Ding X L, Guo Y F, Ye J R, et al. 2022. Population differentiation and epidemic tracking of *Bursaphelenchus xylophilus* in China based on chromosome-level assembly and whole-genome sequencing data[J]. *Pest Management Science*, 78(3): 1213-1226.
- Du Z Y, Wang X, Duan Y G, et al. 2025. Global invasion history and genomic signatures of adaptation of the highly invasive sycamore lace bug[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 22(6): qzae074.
- Jin M H, North H L, Peng Y, et al. 2023. Adaptive evolution to the natural and anthropogenic environment in a global invasive crop pest, the cotton bollworm[J]. *The Innovation*, 4(4): 100454.
- Kikuchi T, Aikawa T, Kosaka H, et al. 2007. Expressed sequence tag (EST) analysis of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and *B.*

- mucronatus*[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 155(1): 9–17.
- Lefort V, Desper R, Gascuel O. 2015. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 32(10): 2798–2800.
- Letunic I, Bork P. 2024. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool[J]. *Nucleic Acids Research*, 52(1): 78–82.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 25(14): 1754–1760.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. *Bioinformatics*, 25(16): 2078–2079.
- Li J, Xiong X, Ma S C, et al. 2023. Genome assembly resource and annotation of *Bursaphelenchus xylophilus* TS-1, the causal agent of pine wilt disease[J]. *PhytoFrontiers™*, 3(4): 927–930.
- Lu Y, Luo F, Zhou A, et al. 2024. Whole-genome sequencing of the invasive golden apple snail *Pomacea canaliculata* from Asia reveals rapid expansion and adaptive evolution[J]. *GigaScience*, (13): giae064.
- Mamiya Y. 1983. Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. *Annual Review of Phytopathology*, (21): 201–220.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. 2010. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Research*, 20(9): 1297–1303.
- Nasu S, Suzuki J, Ohta R, et al. 2002. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers[J]. *DNA Research*, 9(5): 163–171.
- Patterson N, Price A L, Reich D. 2006. Population structure and eigenanalysis[J]. *PLoS Genetics*, 2(12): e190.
- Pereira F, Moreira C, Fonseca L, et al. 2013. New insights into the phylogeny and worldwide dispersion of two closely related nematode species, *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*[J]. *PLoS One*, 8(2): e56288.
- Xu L, He W M, Tai S S, et al. 2025. VCF2Dis: An ultra-fast and efficient tool to calculate pairwise genetic distance and construct population phylogeny from VCF files[J]. *GigaScience*, (14): giaf032.
- Yang A X, Ding X L, Feng Y, et al. 2023. Genetic diversity and genome-wide association analysis of pine wood nematode populations in different regions of China[J]. *Frontiers in Plant Science*, (14): 1183772.
- Zhang C, Dong S S, Xu J Y, et al. 2019. PopLDdecay: A fast and effective tool for linkage disequilibrium decay analysis based on variant call format files[J]. *Bioinformatics*, 35(10): 1786–1788.
- Zhou L F, Chen F M, Xie L Y, et al. 2017. Genetic diversity of pine-parasitic nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* in China[J]. *Forest Pathology*, 47(4): e12334.