

基于 SNP 标记的广东省松材线虫种群分化研究

黄金思,奚晓桐,丁晓磊,叶建仁*

(南京林业大学,南方现代林业协同创新中心,南京林业大学林学院,江苏 南京 210037)

摘要:【目的】运用 SNP 标记研究中国广东省松材线虫虫株 SNP 位点多样性,从分子角度探讨广东省不同地区松材线虫种群的亲缘关系,为松材线虫病的疫源追溯提供基础。【方法】收集来自于广东省各地区松材线虫虫株共 30 株,提取 DNA 并进行基因组重测序;利用生物信息学软件分析广东省松材线虫的 SNPs 位点信息及基因型类型,依据以上信息进行种群聚类分析。【结果】对 30 株松材线虫虫株 SNPs 数据进行统计分析,发现 GD01、GD09、GD12、GD20、GD22、GD24、GD25 这 7 株虫株的 SNP 数量、纯合子数量都明显少于其余 23 株虫株;对基因型类型进行统计分析发现,以上 7 株虫株出现频率较高的基因型为 A→G、C→G、G→C、T→C;其余 23 株虫株则是 A→G、C→T、G→A、T→C 这 4 种基因型出现的频率较高。而通过主成分和聚类分析可将这 30 株虫株分为 3 类。【结论】广东省松材线虫种群遗传多样性较高,聚类分析表明其具有不同的传播来源。

关键词:松材线虫;高通量测序;SNP;聚类分析;广东省

中图分类号:S763

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号:1000-2006(2019)06-0025-07



Study on the population differentiation of *Bursaphelenchus xylophilus* in Guangdong Province by SNP markers

HUANG Jinsi, XI Xiaotong, DING Xiaolei, YE Jianren*

(Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: 【Objective】This study is focused on the genetic variations and population structures among different *Bursaphelenchus xylophilus* strains isolated from Guangdong Province using single nucleotide polymorphisms (SNPs) as markers. This work provided fundamental information for the establishment of a *B. xylophilus* tracking system in China. 【Method】Thirty strains of *B. xylophilus* from different regions of the Guangdong Province were collected and sequenced. Genome-wide SNPs were analyzed using bioinformatics, and population splitting events were discovered based on previous SNP data. 【Result】Statistical analysis of SNPs across 30 *B. xylophilus* strains showed that the number of SNPs and homozygotes in seven of the 30 strains (GD01, GD09, GD12, GD20, GD22, GD24 and GD25) were less than the remaining 23 strains. The genotypes that occurred with a higher frequency in these seven strains were A→G, C→G, G→C, T→C, while the other 23 strains contained genotypes that were A→G, C→T, G→A, T→C. The strains from Guangdong Province could be divided into 3 populations based on PCA and hierarchical clustering. 【Conclusion】The genetic diversity of *B. xylophilus* population in Guangdong Province is relatively high; thus, it should have different sources through which genetic variation is introduced.

Keywords: *Bursaphelenchus xylophilus*; high-throughput sequencing; SNP; cluster analysis; Guangdong Province

松材线虫病(pine wilt disease)是林业上最具破坏性的病害之一,严重破坏生态系统且造成巨大的经济损失^[1]。由于该病害具有死亡率高及难以防治等特点,被称为“松树的癌症”,全球已有 52

收稿日期:2019-03-03 修回日期:2019-09-17
基金项目:国家重点研发计划(2018YFD0600203);国家自然科学基金项目(31800543)。

第一作者:黄金思(1608912717@qq.com),ORCID(0000-0001-6331-6334),测序数据的处理及分析、文章撰写;奚晓桐(617389974@qq.com),主要负责虫种的收集以及 DNA 的提取、焦磷酸测序验证。*通信作者:叶建仁(jrye@njfu.com.cn),教授,ORCID(0000-0001-5711-0516)。

引文格式:黄金思,奚晓桐,丁晓磊,等. 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), 2019,43(6):25-31.

个国家将其作为检疫性病害^[2]。由我国国家林业和草原局发布的 2019 年第 4 号公告可知,到目前为止,我国松材线虫病疫区已扩散至 18 个省(市),588 个县区,松材线虫病在我国的危害已愈发严重^[1-5]。

对物种种群遗传多样性的研究可以在分子水平上探讨物种亲缘关系^[3-5],揭示物种的来源。目前,学者们已经应用了 RAPD、ISSR 等分子标记技术^[6-9]来研究松材线虫的种间遗传变异性,但并不能很好地说明松材线虫种内的差异性。SNP (single nucleotide polymorphisms) 即单核苷酸多态性,主要是指由于单个核苷酸的变异而引起基因组水平上的 DNA 序列多态性,包括单碱基的缺失、插入、转换及颠换。SNP 分子标记技术由于其位点丰富、灵敏度高及遗传稳定等优点,已成为目前最具前景的分子标记技术^[10];随着新一代测序技术的不断发展,SNP 位点的挖掘变得更加简便快捷。目前,SNP 分子标记在中国松材线虫的相关研究方面还鲜见报道,因此,使用 SNP 标记研究我国松材线虫的种群遗传对于揭示其遗传多样性具有重要参考价值。广东省作为我国较早发现松材线虫的疫区,至 2019 年其省内疫点数达到 33 个。早在 2008 年,对广东省松材线虫种群的遗传多样性研究就有相关报道,Cheng 等^[11]利用 AFLP 分子标记研究松材线虫种群遗传多样性时,就推测广东省是我国松材线虫病的一个传播源头,但无法进行更加深入细化的种群划分。并且,其相关研究认为松材线虫在其发源地北美具有较高的多样性,而在入侵地区多样性较低^[12-13]。因此,以广东省为代表的种群分化研究将为阐明中国境内松材线虫是否具有较高的种群遗传多样性提供可靠的理论基础。

本研究通过 Illumina 基因组重测序,利用 SNP 分子标记分析广东省各地区松材线虫种群遗传多样性,从分子生物学角度探讨广东省松材线虫种群的遗传分化,为该病害防控策略的制订提供基本的理论依据。

1 材料与方法

1.1 松材线虫虫株的收集和保存

本研究收集了广东省不同地区松材线虫病疫木。利用贝尔曼漏斗法分离疫木中的线虫,收集线虫液于 15 mL 离心管中,按照文献[14]中松材线虫的鉴定特征在显微镜下进行形态学鉴定。挑取鉴定后的松材线虫雌雄成虫 30~50 条,接入长满灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的 PDA 平板中,25 ℃ 培

养至灰葡萄孢全部被吃完(10 d 左右)。若虫液里几乎都是幼虫(幼虫无法进行种类鉴定),可先将幼虫接到灰葡萄孢中培养至成虫(5 d 左右),用贝尔曼漏斗法分离后再进行形态学鉴定。

之后同样用贝尔曼漏斗法将培养好的线虫收集于 15 mL 离心管中,3 500 r/min 离心 3 min;去掉上清液,等体积加入 0.1% 硫酸链霉素,摇匀,静置 5~10 min,离心,去上清;用无菌水反复洗涤 3 次,将得到的线虫液置 4 ℃ 冰箱中保存备用,共收集到 30 株松材线虫,其编号及来源见表 1。

表 1 供试松材线虫虫株来源
Table 1 Geographic origins of *B. xylophilus*

序号 No.	虫株编号 strains No.	来源 origin	寄主 host
1	GD01	广东省肇庆市封开县	马尾松(<i>Pinus massoniana</i>)
2	GD02	广东省清远市清城区	马尾松
3	GD03	广东省广州市增城市	马尾松
4	GD04	广东省惠州市惠阳区 惠阳新圩 1 号	马尾松
5	GD06	广东省惠州市惠东县	马尾松
6	GD07	广东省惠州市龙门县龙门麻榨镇 3 林班 3 小班/平陵镇小塘村	马尾松
7	GD08	广东省惠州市博罗县罗浮山 1 号	马尾松
8	GD09	广东省韶关市武江区	马尾松
9	GD10	广东省广州市黄埔区	马尾松
10	GD11	广东省河源市紫金县	马尾松
11	GD12	广东省汕头市	马尾松
12	GD13	广东省惠州市惠城区汝湖镇上围村	马尾松
13	GD14	广东省东莞市樟木头镇丰门社区	马尾松
14	GD15	广东省东莞市樟木头镇丰门社区	马尾松
15	GD16	广东省东莞市樟木头镇丰门社区	马尾松
16	GD17	广东省广州市天河区龙眼洞林场 1 号	马尾松
17	GD18	广东省广州市天河区龙眼洞林场 2 号	马尾松
18	GD19	广东省广州市天河区龙眼洞林场 3 号	云南松 (<i>P. yunnanensis</i>)
19	GD20	广东省梅州市梅县区雁洋镇	马尾松
20	GD22	广东省韶关市曲江区马坝	马尾松
21	GD23	广东省梅州市梅江区五里亭	马尾松
22	GD24	广东省广宁县州仔镇社区三林班	马尾松
23	GD25	广东省广宁县州古水镇太和二林班	马尾松
24	GD26	广东省丰顺县北斗镇庆瑶村	马尾松
25	GD27	广东省蕉岭县 5 号	马尾松
26	GD28	广东省蕉岭县 6 号	云南松
27	GD30	广东省海丰县	马尾松
28	GD31	广东省河源市东源县黄田镇	马尾松
29	GD32	广东省河源市东源县黄田镇	马尾松
30	GD33	广东省东莞市樟木头镇丰门社区	马尾松

1.2 松材线虫 DNA 的提取

参照陈凤毛等^[15]的方法提取线虫 DNA。取保存的 200 μL 线虫液于 Eppendorf 管中,加入 200 μL 线虫裂解液(200 mmol/L Tris-HCl,200 mmol/L NaCl,100 mmol/L EDTA,2% SDS,2% β-mercaptoethanol,200 μg/mL 蛋白酶 K),混匀;在 65 ℃ 水浴中处理 1 h,每隔 10 min 摇荡 1 次;冷却至室温后,用等体积(400 μL)的酚抽提,4 ℃ 条件下,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液;用等体积(400 μL)酚:氯仿:异戊醇(体积比 25:24:1)抽提,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液;用等体积(400 μL)氯仿:异戊醇(24:1),13 000 r/min 离心 10 min,取上清液;在上清液中加入 1/10 体积 3 mmol/L 的乙酸钠(pH 为 4.6)和 2 倍体积的无水乙醇(-20 ℃),于-80 ℃ 条件下冷冻 20 min;13 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 70%的乙醇(-20 ℃ 预冷)洗涤两次,65 ℃ 烘干 10 min;加入 100 μL TE 重新悬浮沉淀,取其中 5 μL 用无菌水稀释 200 倍,用紫外分光光度计测定 DNA 浓度,再通过 1%琼脂糖凝胶电泳来检测 DNA 质量,之后-20 ℃ 条件下保存备用。

1.3 松材线虫高通量测序

将检测合格的松材线虫 DNA 送至武汉未来组生物公司进行高通量基因组测序。

测序使用平台为 Illumina HiSeq 4000,测序方法为非链特异性、150 bp 双末端测序,测序深度>40×。

1.4 数据分析

1.4.1 松材线虫 SNP 位点信息统计

1)下机数据质量控制。使用 FastQC(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)软件查看测序数据 fastq 格式的基本信息、每条 reads 的质量值、每条序列中碱基的组成、重复序列出现频率等数据。若测序质量存在接头未去除及区域质量过低则用后续软件对原 fastq 文件进行处理

2)原始数据预处理。用 CutAdapt 软件去除测序接头(Adapters)污染序列为,低质量数据过滤则使用 PERL 脚本完成。

3)基因组比对。用 BWA(Burrows-wheeler Aligner)软件与本实验室组装的松材线虫全基因组进行比对,BWA 默认输出文件为未经过排序的 SAM 文件,用 SAMtools(<http://samtools.sourceforge.net/samtools.shtml>)软件将 SAM 文件转换为 BAM 文件进行后续分析。

用 Picard(<http://broadinstitute.github.io/picard/>)软件过滤比对后的在 PCR 过程中可能产生的冗余片段;参数设置为“REMOVE_DUPLICATES=true I=input.bam O=output_sort.bam AS=false CREATE_INDEX=true”。

4)SNP 位点挖掘。经由上一步处理的 BAM 文件可作为筛选不同样本间松材线虫 SNP 位点的输入文件,使用 Freebayes 进行基因组水平的 SNP 挖掘,输出文件格式为 VCF。参数设置为“-i -u -C 5 -e 50 --standard-filters --min-coverage 10”。只有当某一个 SNP 位点的支持 reads 达到 10 以上,序列质量(phred quality score)在 20 以上,比对分数在 30 以上才认为是一个可靠的 SNP 位点,保证结果的准确度与可靠性。

5)SNP 位点统计分析。SNP 位点的相关信息均保存在 VCF 文件中,具体描述信息可参考(<http://www.internationalgenome.org/wiki/Analysis/vcf4.0/>)。可以使用 VCFtools 软件(<http://vcftools.sourceforge.net/>)结合 PERL 脚本对 VCF 文件进行处理,获得每个样本中的 SNP 数量、纯合子数量、单个样本所特有的 SNP 数量及突变基因型等信息,之后将这些信息汇总到 excel 中进行分析。

1.4.2 松材线虫 SNP 主成分分析

使用基于 R 语言开发的用于大规模 SNP 数据进行聚类分析以及基因组关联分析的软件包 SNP-Relate,对上述的 VCF 文件中的 SNP 位点进行低等位基因频率、连锁不平衡和缺失 SNP 过滤,并将过滤后的位点进行主成分分析(PCA)。

1.4.3 松材线虫种群分化树的构建

基于上述 SNP 位点使用 Treemix 软件构建系统发育树。由于 Treemix 是基于等位基因频率作为遗传距离计算依据,所以预先使用 Plink-freq 命令对所有 SNP 位点进行等位基因频率计算,之后使用参数为“treemix-noss-global-bootstrap”进行系统发育树构建。

1.5 特异性 SNP 位点验证

1.5.1 特异性引物设计

运用 PyroMark Assay Design Software 2.0 软件针对选取的广东位点(scaffold01226;2299)设计特异性上游引物 GDF、特异性下游引物 GDR 和 SNP 分型引物 GDS,其序列详见表 2。其中 GDR 引物在 5'端用生物素进行标记,采用 HPLC 纯化;GDF 和 GDS 引物采用 PAGE 纯化,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 2 焦磷酸测序引物序列

Table 2 The primer sequence of pyrophosphate sequencing

引物 primer	序列(5'→3') sequence(5'→3')	长度/bp length	GC 占比/% GC percentage
GDF	GTGACAACGGATA TTGAATCAGT	24	37.5
GDR	GAAGTGCAGCTCC TTTATATCACA	24	41.3
GDS	TTAAATACGAATAGGCCA	18	33.3
待分析序列	TA/GTGCTAATAATTG AGGTGGGAGTAAG		

1.5.2 PCR 反应扩增体系及程序

反应体系:总体积为 50 μL,其中包含 Etaq pre-Mix25 μL、DNA 模板 2 μL、正向引物 2 μL、反

表 3 松材线虫 SNPs 位点统计结果

Table 3 Statistical results of SNPs of *B. xylophilus*

虫株 编号 strains No.	SNP 数量 SNP quantity	纯合子 数量 homozygote quantity	虫株 编号 strains No.	SNP 数量 SNP quantity	纯合子 数量 homozygote quantity	虫株 编号 strains No.	SNP 数量 SNP quantity	纯合子 数量 homozygote quantity	虫株 编号 strains No.	SNP 数量 SNP quantity	纯合子 数量 homozygote quantity
GD01	78 245	42 428	GD10	1 158 658	366 254	GD18	1 427 897	354 404	GD27	1 133 600	789 063
GD02	1 364 867	1 191 744	GD11	1 355 706	1 093 659	GD19	1 470 913	1 286 806	GD28	945 849	729 929
GD03	1 259 223	1 065 554	GD12	187 905	75 659	GD20	224 466	131 091	GD30	1 539 952	979 216
GD04	1 211 458	930 327	GD13	1 316 302	994 812	GD22	109 422	27 868	GD31	1 635 962	1 310 817
GD06	1 267 277	1 052 581	GD14	1 519 325	1 088 515	GD23	1 491 737	1 337 158	GD32	1 582 278	1 218 619
GD07	1 218 974	1 034 847	GD15	1 366 426	912 553	GD24	422 928	61 051	GD33	1 579 436	1 040 948
GD08	1 488 095	824 213	GD16	1 250 553	1 078 640	GD25	219 873	32 207			
GD09	212 640	165 757	GD17	1 365 708	1 100 247	GD26	1 021 216	694 699			

从表 3 可以看出,SNP 数量最多的是 GD31(1 635 962),来自于河源市东源县;最少的是 GD01(78 245),来自于肇庆市封开县。纯合子数量最多的是 GD23(1 337 158),来自于梅州市梅江区,最少的是 GD22(27 868),来自于韶关市曲江区。从总体来看, GD01、GD09、GD12、GD20、GD22、GD24 和 GD25 这 7 株虫株的 SNP 数量明显少于其余 23 株虫株,由此可以看出广东省松材线虫在 SNPs 位点上差异明显,可以通过该分子标记进行种群类的区分。

2.2 松材线虫 SNPs 基因型种类及数量统计分析

通过统计 SNP 位点的突变基因型种类及数量,发现共有 T→C、C→T、A→G、G→A、G→T、T→G、C→G、G→C、T→A、A→T、A→C、C→A 这 12 种基因型。其中 GD01、GD09、GD12、GD20、GD22、GD24 和 GD25 这 7 株虫株出现频率较高的基因型为 A→G、C→G、G→C、T→C,最高的是 T→C,其次是 A→G(图 1A);其余 23 株虫株则是 A→G、C→T、G→A、T→C 这 4 种基因型出现的

向引物 2 μL、ddH₂O 19 μL

反应程序:首先在 94 ℃ 预变性 5 min;其次 94 ℃ 变性 30 s,51 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,此过程共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。

1.5.3 上机验证

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测结果符合试验要求后,按照 QIAGEN PyroMark Q96 ID 实时定量焦磷酸序列分析仪配套说明书进行上机验证。

2 结果与分析

2.1 松材线虫 SNPs 位点数量统计分析

利用生物信息学软件对上述 30 株松材线虫虫株 SNPs 位点进行统计分析,结果见表 3。

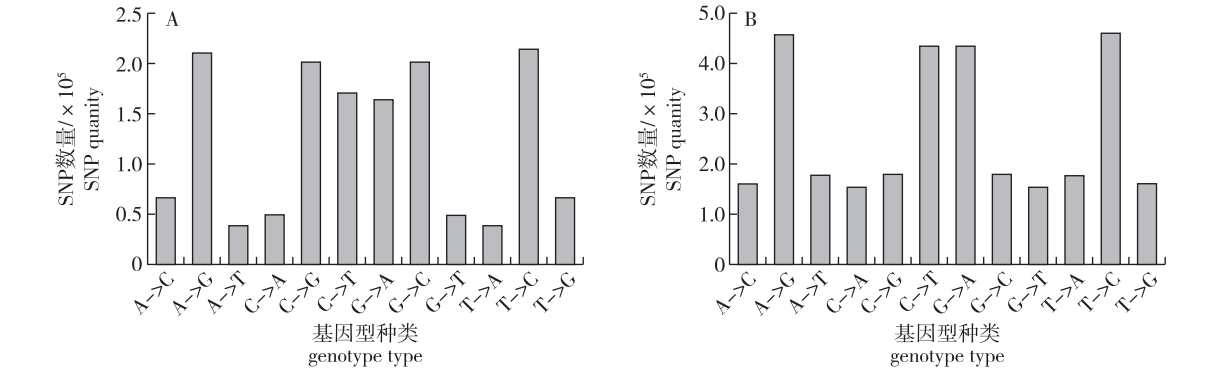
频率较高,最高的是 T→C,其次是 A→G(图 1B)。这两类相比,出现频率最高和第二的突变基因型均相同,都是 T→C 和 A→G;但第三和第四峰度的突变基因型完全不同,此结果也能表明广东省松材线虫种群间具有遗传差异性。

2.3 焦磷酸测序结果分析

为了验证重测序获得 SNP 位点的准确性,笔者选取了位于 Contig007:3 426 052 的 SNP 位点进行焦磷酸测序验证。这一位点的突变类型为 A→G,由焦磷酸测序结可知, GD01、GD09、GD12、GD20、GD22、GD24、GD25 这 7 株虫株在该位点为 A,且均为纯合突变(100%);而 GD02、GD03 等其余 23 株虫株在该位点均为 G,也均为纯合突变。焦磷酸测序结果与前期重测序分析结果完全一致,结果真实可靠,可进行进一步的分析研究。

2.4 松材线虫群体聚类分析

基于广东省松材线虫虫株的 SNP 位点数据绘制主成分分析(PCA)图(图 2A)。由图 2 可知,广东省松材线虫种群可被划分为 3 个类群(a 类群、



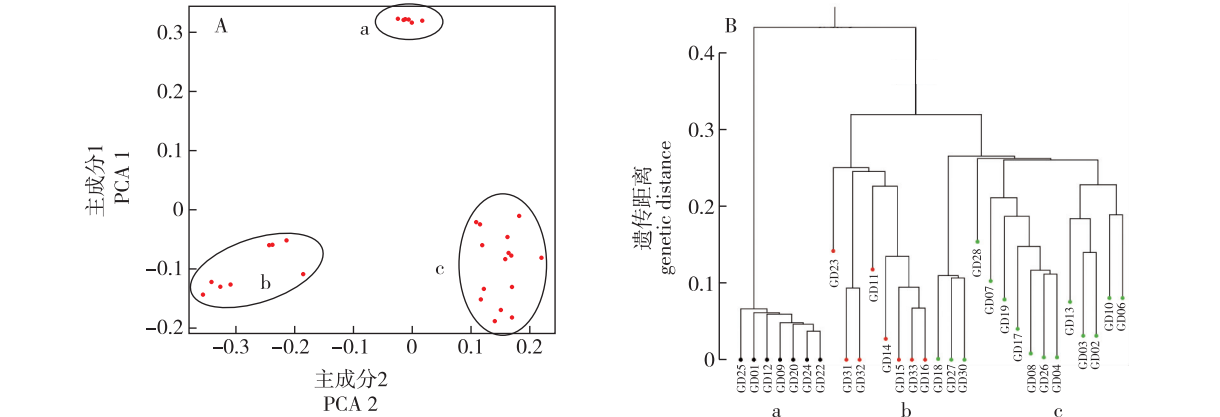
A. GD01 等 7 株虫株 SNP 信息统计 SNP information statistics of 7 strains such as GD01; B. 其余 23 株松材线虫虫株 SNP 信息统计 SNP information statistics of the remaining 23 strains.

图 1 松材线虫虫株 SNP 突变基因型种类及数量统计

Fig. 1 Statistics of SNP mutations genotypes and quantities of *B. xylophilus* strains

b 类群和 c 类群), 其中 a 类群虫株为 GD01、GD09、GD12、GD20、GD22、GD24、GD25 这 7 株虫株, 与上述结果一致; 而另外 23 株虫株又被分为 2 个类群, b 类群为 GD11、GD14、GD15、GD16、GD23、GD31、GD32、GD33 这 8 株虫株, c 类群为 GD02、GD03、GD04、GD06、GD07、GD08、GD10、GD13、GD17、GD18、GD19、GD26、GD27、GD28、GD30 这 15 株虫株。为进一步说明以上结果, 又将所有广东松材线

虫虫株以 Identity-By-State (IBS) 遗传距离作为标准, 进行种群分化树的构建(图 2B)。由图 2 可知, 种群分化树的结果与 PCA 分类结果完全一致, 黑色类群与 PCA 中的 a 类群完全一致, 红色和绿色类群则分别对应 b、c 类群。两种分析结果都表明, 广东省松材线虫虽然可以分为 3 个类群, 但 a 类群与其他两类亲缘关系更远, b 类群与 c 类群亲缘关系相对较近。



A. PCA 主成分分析图 principal component analysis; B. 系统发育树 phylogenetic tree.

图 2 广东省松材线虫主成分分析及聚类分析

Fig. 2 Principal component analysis and cluster analysis of *B. xylophilus* in Guangdong Province

3 讨论

近年来, SNP 标记作为第 3 代分子标记技术得以迅速发展, 被广泛应用于医学^[16-18]、农学^[19-24]等各个领域。相较于其他分子标记技术, SNP 分子标记在松材线虫种群遗传多样性方面的研究极少。

2011 年, Kikuchi 等^[25]对松材线虫进行基因组

测序, 在全基因组水平上分析其生物学特性。2013 年 Figueiredo 等^[26]使用 SNP 分子标记方法研究来自葡萄牙、韩国、中国、日本和美国松材线虫虫株的遗传多样性, 结果显示葡萄牙虫株与韩国虫株聚为一类, 中国、美国和日本的虫株分别形成独立的群集, 这也是 SNP 标记首次应用于研究松材线虫种群遗传多样性。

Zhou 等^[9]运用 ISSR 研究中国松材线虫种群

的遗传多样性时,将不同地理分布的松材线虫聚为一类,没有表明松材线虫种间的遗传多样性。Pereira 等^[27]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。与上述研究相比,本研究基于 SNP 分子标记将广东省 30 株松材线虫虫株分为 3 个类群,表明广东省松材线虫种群间具有遗传差异性;说明利用 SNP 标记进行松材线虫种群分化研究较其他分子标记而言更为可行。

本研究结果表明,a 类群和 b、c 类群在 SNPs 数量、纯合子数量和频率较高的 SNP 突变基因型种类等方面都有较大差异,焦磷酸测序结果和聚类分析结果也对此进行了印证,由此可推测 a 类群虫株与 b、c 类群虫株应该具有不同的传播来源;而 b、c 类群在 SNPs 数量等方面并没有明显差异,只有 PCA 主成分分析图和系统发育树结果显示可分为两个类群,但 PCA 主成分分析结果主要以纵坐标之间的差距为主要差异,横坐标之间的差距产生的差异较小;从系统发育树中也可以看出,b、c 类群的遗传距离相差很小,显示亲缘关系较近,结合上述 SNP 数量等数据分析,推测其具有相同的传播来源,而其被划分为两个种群,推测其应该没有或是极少存在交叉入侵,从而慢慢形成了建立者效应。本研究收集的虫株都集中在广东省东北部,且疫点之间距离相对较近,大部分都是邻县,在此情况下,其松材线虫种群依旧存在较大的遗传差异性,说明这些年广东省的疫区管理相对较好,控制了疫木的流通。

本研究表明了运用 SNP 标记对松材线虫病进行疫源追溯的可行性;后续应继续收集中国不同地理位置的松材线虫虫株,扩充样本数据库;进一步研究中国松材线虫种群的遗传多样性,为研究松材线虫病在我国的传播途径提供理论基础,也为检疫部门制定相关的病害防控策略提供了依据。

参考文献(reference):

[1] PROENÇA D N, GRASS G, MORAIS P V. Understanding pine wilt disease: roles of the pine endophytic bacteria and of the bacteria carried by the disease-causing pinewood nematode. [J]. Microbiology Open, 2017, 6(2): 1–20. DOI: 10.1002/mbo3.415.

[2] MOTA M M, VIEIRA P. Pine wilt disease: a worldwide threat to forest ecosystems[M]. Berlin: Springer Netherlands, 2008.

[3] COURTOIS B, FROUIN J, GRECO R, et al. Genetic diversity and population structure in a European collection of rice [J]. Crop Science, 2012, 52(4): 1663–1657. DOI:10.2135/cropsci2011.11.0588.

[4] SINGH N, CHOUDHURY D R, SINGH A K, et al. Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84136. DOI:10.1371/journal.pone.0084136.

[5] HAYDEN M J, TABONE T L, NGUYEN T M, et al. An informative set of SNP markers for molecular characterisation of Australian barley germplasm [J]. Crop and Pasture Science, 2010, 61(1): 70–83. DOI:10.1071/CP09140.

[6] 张路平,孔繁璐,杨宝君. 松材线虫和拟松材线虫不同株系线粒体 DNA RAPD 分析[J]. 林业科学研究, 2002, 15(1): 7–12. DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2002.01.002.

ZHANG L P, KONG F Y, YANG B J. Intra-and interspecific variation in *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* revealed by mtDNA polymorphism [J]. Forest Research, 2002, 15(1): 7–12.

[7] VIEIRA P, CASTAGNONE C, MALLEZ S, et al. Sequence variability of the MspI satellite DNA family of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* at different geographic scales [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2014, 70(1): 120–129. DOI:10.1016/j.ympev.2013.09.017.

[8] FILIPIAK A, HASIŁOW-JAROSZEWSKA B. The use of real-time polymerase chain reaction with high resolution melting (real-time PCR-HRM) analysis for the detection and discrimination of nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* [J]. Molecular and Cellular Probes, 2016, 30(2): 113–117. DOI:10.1016/j.mcp.2016.02.003.

[9] ZHOU L F, CHEN F M, XIE L Y, et al. Genetic diversity of pine-parasitic nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* in China [J]. Forest Pathology, 2017, 47(4): e12334. DOI:10.1111/efp.12334.

[10] 唐立群,肖恩林,王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(12): 154–158. DOI:10.3969/j.issn.1000-6850.2012.12.028.

TANG L Q, XIAO C L, WANG W P. Research and application progress of SNP markers [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(12): 154–158.

[11] CHENG X Y, CHENG F X, XU R M, et al. Genetic variation in the invasive process of *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae) and its possible spread routes in China [J]. Heredity, 2008, 100(4): 356–365. DOI:10.1038/sj.hdy.6801082.

[12] MALLEZ S, CASTAGNONE C, ESPADA M, et al. Worldwide invasion routes of the pinewood nematode: what can we infer from population genetics analyses? [J]. Biological Invasions, 2015, 17(4): 1199–1213. DOI:10.1007/s10530-014-0788-9.

[13] MALLEZ S, CASTAGNONE C, ESPADA M, et al. First insights into the genetic diversity of the pinewood nematode in its native area using new polymorphic microsatellite loci [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59165. DOI:10.1371/journal.pone.0059165.

[14] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.

[15] 陈凤毛,叶建仁,吴小芹,等. 松材线虫 SCAR 标记与检测技术 [J]. 林业科学, 2012, 48(3): 88–94. DOI:10.11707/j.1001-7488.20120314.

CHEN F M, YE J R, WU X Q, et al. SCAR marker and detection technique of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2012, 48(3): 88–94.

[16] CHUANG L, CHANG H, LIN M, et al. Chaotic particle swarm optimization for detecting SNP-SNP interactions for CXCL12-re-

- lated genes in breast cancer prevention[J]. *European Journal of Cancer Prevention*, 2012, 21(4): 336–342. DOI:10.1097/CEJ.0b013e32834e31f6.
- [17] LIU Y, LI M, CHEUNG Y M, et al. SKM-SNP: SNP markers detection method[J]. *Journal of Biomedical Informatics*, 2010, 43(2): 233–239. DOI:10.1016/j.jbi.2009.11.004.
- [18] BASCIANO P A, MATAKAS J, PECCI A, et al. β -1 tubulin R307H SNP alters microtubule dynamics and affects severity of a hereditary thrombocytopenia[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2015, 13(4): 651–659. DOI:10.1111/jth.12824.
- [19] REN J, CHEN L, SUN D, et al. SNP-revealed genetic diversity in wild emmer wheat correlates with ecological factors[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2013, 13(169): 1–15. DOI:10.1186/1471-2148-13-169.
- [20] REN J, SUN D, CHEN L, et al. Genetic diversity revealed by single nucleotide polymorphism markers in a worldwide germplasm collection of durum wheat[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(4): 7061–7088. DOI:10.3390/ijms14047061.
- [21] BALOCH F S, ALSALEH A, SHAHID M Q, et al. A Whole genome DArTseq and SNP analysis for genetic diversity assessment in durum wheat from central fertile crescent[J]. *PloS One*, 2017, 12(1). DOI:10.1371/journal.pone.0167821.
- [22] LIU Z, LI J, FA X, et al. Assessing the numbers of SNPs needed to establish molecular IDs and characterize the genetic diversity of soybean cultivars derived from *Tokachi nagaha*[J]. *Crop Journal*, 2017, 5(4): 326–336. DOI:10.1016/j.cj.2016.11.001.
- [23] AI X, LIANG Y, WANG J, et al. Genetic diversity and structure of elite cotton germplasm (*Gossypium hirsutum* L.) using genome-wide SNP data[J]. *Genetica*, 2017, 145(4–5): 409–416. DOI:10.1007/s10709-017-9976-8.
- [24] INGHELANDT D V, MELCHINGER A E, LEBRETON C, et al. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2010, 120(7): 1289–1299. DOI:10.1007/s00122-009-1256-2.
- [25] KIKUCHI T, COTTON J A, DALZELL J J, et al. Genomic insights into the origin of Parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. *PloS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002219. DOI:10.1371/journal.ppat.1002219.
- [26] FIGUEIREDO J, SIMOES M J, GOMES P, et al. Assessment of the geographic origins of pinewood nematode isolates via single nucleotide polymorphism in effector genes[J]. *PloS One*, 2013, 8(12): e83542. DOI:10.1371/journal.pone.0083542.
- [27] PEREIRA F, MOREIRA C, FONSECA L, et al. New insights into the phylogeny and worldwide dispersion of two closely related nematode species, *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*[J]. *PloS One*, 2013, 8(2): e56288. DOI:10.1371/journal.pone.0056288.

(责任编辑 刘昌来)