

# 基于线粒体 CO I 基因的广西松墨天牛 种群遗传多样性和遗传结构研究\*

鲁进韬\*\* 邱峙嵩 许 原 杨梦君 何子婷 杨振德 胡 平\*\*\*

(广西大学林学院, 广西高校亚热带人工林培育与利用重点实验室, 广西森林生态与保育重点实验室, 南宁 530004)

**摘 要** 【目的】旨在解析广西壮族自治区的松墨天牛 *Monochamus alternatus* 遗传多样性和遗传结构特征, 深化对松墨天牛种群分化和生态适应规律的理解。【方法】基于线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (Cytochrome oxidase subunit I, CO I) 序列, 对广西 11 个松墨天牛群体的遗传多样性、遗传分化和遗传结构进行比较分析。利用 Bioedit 和 DnaSP 5.0 软件分析遗传多样性, 使用 Arlequin 3.5 软件进行中性检验与遗传分化分析, 采用 Ppopt 11 软件绘制单倍型网络图, 并结合国内外其他样本使用 MEGA 6 绘制系统进化树。【结果】分析了 167 头松墨天牛 635 bp 的 CO I 序列, 检测到 29 个变异位点, 占有位点的 4.57%。整体单倍型多样性为 0.858, 核苷酸多样性为 0.004 52。11 个地理种群间的遗传距离为 0.001–0.010, Mantel 检验结果表明, 遗传距离和地理距离没有显著相关性 ( $P > 0.05$ )。AMOVA 分析显示, 种群内遗传变异高于种群间 (60.09% > 39.91%), 固定系数  $F_{st}$  值为 -0.047–0.889, 各种群间存在不同程度的遗传分化。单倍型网络图将 32 个单倍型分为 3 个进化中心, 其中 Hap8 为原始单倍型, 共享单倍型占有所有单倍型的 34.38%。【结论】广西松墨天牛具有较高的遗传多样性, 遗传变异潜力和环境适应能力较强。人为活动、环境特点和社会特点等因素影响着广西松墨天牛的种群遗传结构, 使其能够存在远距离的基因交流。

**关键词** 松墨天牛; 遗传多样性; 种群遗传分化; 线粒体 CO I 基因

## Genetic diversity of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Ceratoideae) in Guangxi based on variation in the mitochondrial CO I gene

LU Jin-Tao\*\* QIU Zhi-Song XU Yuan YANG Meng-Jun HE Zi-Ting  
YANG Zhen-De HU Ping\*\*\*

(College of Forestry, Guangxi University, Key Laboratory of Forest Ecology and Conservation in Guangxi, Key Laboratory of Subtropical Artificial Forest Cultivation and Utilization in Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract** [Aim] Analyzing the genetic diversity and genetic structure characteristics of the pine sawyer beetle *Monochamus alternatus* in the Guangxi Zhuang Autonomous Region, to deepen the understanding of population differentiation and ecological adaptation patterns of the *M. alternatus*. [Methods] Variation in the sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (CO I) gene between specimens from 11 geographical populations in Guangxi was measured and compared. Bioedit and DnaSP 5.0 software were used to analyze the genetic diversity of *M. alternatus*, and Arlequin 3.5 software to perform a neutrality test and analyze genetic differentiation. Popart 11 software was used to draw a haplotype network diagram, and MEGA 6 to draw a phylogenetic tree including other domestic and foreign specimens. [Results] In the analysis of 635 bp CO I sequences from 167 individuals of *M. alternatus*, 29 variable sites were detected, accounting for

\*资助项目 Supported project: 中央引导地方科技发展专项 (桂科 ZY21195019)

\*\*第一作者 First author, E-mail: ljt6212@st.gxu.edu.cn

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: hupingcs@163.com

收稿日期 Received: 2023-06-04; 接受日期 Accepted: 2023-10-25

4.57% of all sites. The overall haplotype diversity was 0.858, and nucleotide diversity was 0.004 52. The genetic distances among the 11 geographic populations ranged from 0.001 to 0.010, and the Mantel test results indicated no significant correlation between genetic distance and geographic distance ( $P > 0.05$ ). AMOVA analysis showed that within-population genetic variation was higher than between-population variation (60.09% > 39.91%), with  $F_{st}$  values ranging from -0.047 to 0.889, indicating varying degrees of genetic differentiation among different populations. The haplotype network diagram divided 32 haplotypes into 3 evolutionary centers, with Hap8 being the ancestral haplotype, and shared haplotypes accounting for 34.38% of all haplotypes. **[Conclusion]** The *M. alternatus* in Guangxi exhibits high genetic diversity, strong potential for genetic variation, and environmental adaptability. Factors such as human activities, environmental characteristics, and social features influence the genetic structure of *M. alternatus* populations in Guangxi, enabling gene flow over long distances.

**Key words** *Monochamus alternatus*; genetic diversity; population genetic differentiation; mitochondrial CO I gene

松树为我国的主要造林树种之一,具有重大的生态和经济价值(黄小荣, 2018)。然而,自1982年南京首次发现松材线虫病(Pine wilt disease, PWD)以来,全国的松科植物受到前所未有的损害,造成了巨大经济损失(叶建仁, 2019)。根据2021年全国有害生物统计情况显示,松材线虫病在华南地区呈现出由点状分布向片状发展的趋势,重点生态区位防控形势严峻(孙红等, 2021)。在这种严峻形势下,作为松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 主要传播媒介的松墨天牛 *Monochamus alternatus* 成为了控制工作中的关键焦点(叶建仁, 2000)。随着松萎病的发生范围和严重程度不断加剧,对全球松林资源、自然景观和生态环境构成了重大威胁,寻找一种高效、环保且高度专业的防治策略变得日益迫切。

松材线虫与松墨天牛的遗传特性研究是当前对松材线虫病防控的热门研究之一(Shoda-Kagaya *et al.*, 2008; Togashi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2021; Kirino *et al.*, 2023)。Nguyen (2019) 利用全基因组重测序技术对我国广东、福建、云南以及越南凉山的49个松墨天牛种群样本进行了遗传分析,发现不同地理种群松墨天牛之间存在显著的遗传差异。李叶晨等(2020)研究表明,即使在县域的范围下,不同景观尺度的松墨天牛种群也存在着明显的遗传差异。这些结果都进一步证实了松墨天牛种群间有着较高的遗传多样性。在线粒体基因方面,线粒体 CO II 基因揭示了云南松墨天牛种群与其他省份种群之间存在着遗传分化的现象(Fu *et al.*, 2010)。Kawai 等(2006)

使用线粒体 CO II 基因和微卫星分别对日本松墨天牛进行遗传标记的联合分析,发现日本松墨天牛具有2个不同的世系,且遗传结构不会受到地理隔离影响。

本研究利用线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (Cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 基因对广西地区松墨天牛种群的遗传多样性进行了深入探究,阐明了广西地区松墨天牛种群遗传结构的时空变异、基因交流及遗传分化情况。研究结果有助于深入理解松墨天牛种群分化规律和生态适应规律,并为进一步探讨其与松材线虫的共同进化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

采样点位于广西壮族自治区范围内,以县级行政区划为单位划分种群。2019年3月至2022年5月,在11个县级行政区划的远离林缘的马尾松林内悬挂松墨天牛植物源引诱剂(诱捕器和诱芯均购自北京金益润农科技有限公司),悬挂7 d 后收集松墨天牛,共收集到松墨天牛成虫167头(表1)。样本取回后单头放入装有3 mL 无水乙醇的5 mL 冻存管中,置于-20℃保存。

### 1.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增和测序

在无菌环境下,采用手术剪取出松墨天牛成虫中胸肌肉,采用试剂盒 EasyPure® GenomicDNA Kit (北京全式金生物技术有限公司)提取基因组 DNA,使用微量紫外分光光度计 Nanodrop

表 1 广西 11 个松墨天牛地理种群样品信息表  
Table 1 Sample information of 11 geographical populations of *Monochamus alternatus* in Guangxi

| 种群代码<br>Population code | 采样点<br>Sampling site                                                | 海拔高度 ( m )<br>Altitude (m) | 样本数量<br>Number of samples |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| HZBB                    | 贺州市八步区 Babu District, Hezhou City,<br>( 24°42' N, 111°55' E )       | 117                        | 20                        |
| WZCW                    | 梧州市苍梧县 Cangwu County, Wuzhou City<br>( 23°65' N, 111°56' E )        | 79                         | 12                        |
| LZCZ                    | 柳州市城中区 Chengzhong District, Liuzhou City<br>( 24°32' N, 109°45' E ) | 102                        | 23                        |
| GGGP                    | 贵港市桂平市 Guiping County, Guigang City<br>( 23°15' N, 110°17' E ,      | 71                         | 19                        |
| BSJX                    | 百色市靖西县 Jingxi County, Baise City<br>( 22°96' N, 106°71' E )         | 145                        | 10                        |
| CZDX                    | 崇左市大新县 Daxin County, Chongzuo City<br>( 22°41' N, 107°35' E )       | 190                        | 7                         |
| NNXN                    | 南宁市兴宁区 Xingning District, Nanning City<br>( 23°05' N, 108°67' E , ) | 83                         | 24                        |
| GLQZ                    | 桂林市全州县 Quanzhou County, Guilin City<br>( 25°92' N, 111°11' E )      | 150                        | 16                        |
| YLRX                    | 玉林市容县 Rong County, Yulin City<br>( 22°79' N, 110°75' E )            | 226                        | 17                        |
| LZSJ                    | 柳州市三江县 Sanjiang County, Liuzhou City<br>( 25°87' N, 109°46' E )     | 294                        | 4                         |
| HCYZ                    | 河池市宜州区 Yizhou District, Hezhou City<br>( 24°45' N, 108°67' E )      | 182                        | 15                        |

种群代码为采样点的中文首字母简写。下表和下图同。  
The population code is the abbreviation of the first letter of the sampling point in Chinese. The same for the following tables and figures.

(赛默飞世尔科技公司)检测 DNA 的浓度和质量,合格样品放入 - 20 ℃冰箱保存。使用引物 LCO1490 ( 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATA-TTGG-3') 与 HCO2198 ( 5'-TAAACTTCAGGG-TGACCAAAAAATCA-3') ( Folmer *et al.*, 1994 ) 对所有地理种群的松墨天牛样本进行 PCR 扩增。PCR 总反应体系为 25 μL, 包括 2×Taq Plus PCR Master Mix ( 北京睿博兴科生物技术有限公司 ) 12.5 μL, 正反引物各 1.0 μL, 模板 DNA 2.0 μL, 无菌水补至 25 μL。PCR 反应程序为 94 ℃预变性 2 min; 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 ℃延伸 2 min。

1.3 线粒体 CO I 序列片段分析及进化树构建

使用 Chromas 2.0 软件观察序列峰图,使用 Bioedit 7.0( Ahmed, 2011 )进行碱基比对与拼接。

使用 DNAsp 6.0 ( Rozas *et al.*, 2017 ) 分析碱基组成和序列变异位点, 计算单倍型多样性 ( $H_d$ )、核苷酸多样性 ( $P_i$ ) 及平均核苷酸差异系数 ( $k$ )。利用 SPSS version 11.5.0 分析不同种群样本数量与遗传多样性系数的相关系数, 及种群间地理距离与遗传距离的相关性。采用 Arlequin 3.5 ( Excoffier *et al.*, 2010 ) 计算群体分化指数 ( $F_{st}$ ), 基因流 ( $N_m$ ) 由公式  $N_m = (1 - F_{st}) / 4F_{st}$  得出, 并进行群体内和群体间的分子方差分析 ( Analysis of molecular variance, AMOVA ) 及中性检验分析。使用 MEGA 6.0 ( Tamura *et al.*, 2013 ) 中的 Kimura 2-parameter ( K2P ) 模型计算种群间遗传距离, 并使用 ArcGIS 10.2 软件计算采样点之间的地理距离。在构建系统发育树时, 以云杉花墨天牛 *M. saltuarius* ( GenBank 登录号为 MT580675、MT580700 和 MT580674 )

作为外群, 通过从 NCBI 上下载的世界各地松墨天牛的 CO I 序列进行比较 ( <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> ), 采用邻接法( Neighbor-joining, NJ ) 构建广西松墨天牛单倍型的系统发育树。使用 Popart 1.7 ( Leigh and Bryant, 2015 ) 绘制 COI 基因序列单倍型网络图。

2 结果与分析

2.1 广西松墨天牛遗传多样性

所得序列去除两端不稳定部分后, 最终保留 635 bp 长度的 CO I 基因序列用于后续分析。广西松墨天牛 CO I 基因碱基组成显示, 所有位点 A+T 含量均高于 G+C 的含量 ( 表 2 ), 表现出 A+T 偏倚性, 符合昆虫线粒体基因碱基组成规

律。在各碱基位置中, 第三位点的 A+T 偏倚性最明显, A+T 的平均含量高达 96.9%。

在 CO I 序列片段的 635 个位点中 ( 表 3 ), 保守位点 606 个, 变异位点 29 个, 其中, 5 个位点发生了碱基颠换, 24 个位点发生了碱基转换, 转换远比颠换多, 无插入和缺失; 简约信息位点 16 个, 自裔位点 13 个。广西松墨天牛整体的单倍型多样性为 0.858, 核苷酸多样性为 0.004 52, 平均核苷酸差异系数为 2.870。各个种群的样本数量与单倍型多样性、核苷酸多样性以及平均核苷酸差异系数的 Pearson 系数分别为 0.241 (  $P = 0.474$  )、0.396 (  $P = 0.227$  ) 和 0.397 (  $P = 0.227$  ), 表明种群间的遗传多样性差异与样本数量不存在相关性 (  $P > 0.05$  )。

Tajima's  $D$  中性分析结果显示 ( 表 3 ), 广西

表 2 广西 11 个松墨天牛地理种群 CO I 基因碱基组成

| Table 2 Composition of CO I gene bases of 11 geographical populations of <i>Monochamus alternatus</i> in Guangxi |       |       |       |       |         |         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|
| 碱基含量 Base content                                                                                                | T (%) | C (%) | A (%) | G (%) | A+T (%) | C+G (%) |
| 第一位点 The first position                                                                                          | 24.9  | 17.1  | 29.7  | 28.3  | 54.6    | 45.4    |
| 第二位点 The second position                                                                                         | 43.9  | 24.1  | 14.6  | 17.4  | 58.5    | 41.5    |
| 第三位点 The third position                                                                                          | 48.8  | 2.3   | 48.1  | 0.7   | 96.9    | 3.1     |
| 平均含量 ( % ) Average content (%)                                                                                   | 39.2  | 14.5  | 30.8  | 15.5  | 70.0    | 30.0    |

表 3 广西 11 个地理种群松墨天牛 CO I 基因遗传多样性及中性检验

| Table 3 Genetic diversity and neutrality test of CO I genes in 11 geographical population of <i>Monochamus alternatus</i> in Guangxi |                            |                                       |                           |                                        |                                      |                                                             |                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 种群代码<br>Population code                                                                                                              | 多态性位点<br>Polymorphic sites | 简约信息位点<br>Parsimony informative sites | 单倍型数量<br>Haplotype number | 单倍型多样性<br>$H_d$<br>Haplotype diversity | 核苷酸多样性 $P_i$<br>Nucleotide diversity | 平均核苷酸<br>差异数 $k$<br>Average number of nucleotide Difference | 中性检验<br>Tajima's $D$<br>Neutrality test |
| HZBB                                                                                                                                 | 7                          | 2                                     | 6                         | 0.705                                  | 0.002 44                             | 1.547                                                       | - 1.312                                 |
| WZCW                                                                                                                                 | 8                          | 2                                     | 7                         | 0.864                                  | 0.002 82                             | 1.788                                                       | - 1.298                                 |
| LZCZ                                                                                                                                 | 11                         | 6                                     | 8                         | 0.771                                  | 0.002 98                             | 1.889                                                       | - 1.451                                 |
| GGGP                                                                                                                                 | 8                          | 0                                     | 8                         | 0.614                                  | 0.001 33                             | 0.842                                                       | - 2.162**                               |
| BSJX                                                                                                                                 | 3                          | 0                                     | 3                         | 0.378                                  | 0.000 94                             | 0.600                                                       | - 1.562                                 |
| CZDX                                                                                                                                 | 5                          | 4                                     | 4                         | 0.810                                  | 0.003 60                             | 2.286                                                       | 0.594                                   |
| NNXN                                                                                                                                 | 11                         | 8                                     | 7                         | 0.678                                  | 0.005 97                             | 3.790                                                       | 0.615                                   |
| GLQZ                                                                                                                                 | 4                          | 2                                     | 5                         | 0.533                                  | 0.001 10                             | 0.700                                                       | - 1.311                                 |
| YLRX                                                                                                                                 | 2                          | 2                                     | 3                         | 0.588                                  | 0.001 04                             | 0.662                                                       | 0.296                                   |
| HCYZ                                                                                                                                 | 9                          | 5                                     | 5                         | 0.629                                  | 0.004 44                             | 2.819                                                       | - 0.317                                 |
| LZSJ                                                                                                                                 | 1                          | 0                                     | 2                         | 0.500                                  | 0.000 79                             | 0.500                                                       | - 0.612                                 |
| ALL                                                                                                                                  | 29                         | 16                                    | 32                        | 0.858                                  | 0.004 52                             | 2.870                                                       | - 1.311                                 |

\*\*表示差异显著 (  $P < 0.01$ , Tajima's  $D$  )。 \*\* indicates significant difference (  $P < 0.01$ , Tajima's  $D$  )。

松墨天牛总体 Tajima's *D* 为负值 ( - 1.312 ), 且结果不显著 ( *P* > 0.05 )。贵港市桂平市松墨天牛种内中性检验 Tajima's *D* 为 - 2.161 99, 达到极显著水平 ( *P* < 0.01 ), 其余种内中性检验均无显著性 ( *P* > 0.05 )。

2.2 广西松墨天牛遗传分化

基于邻接法计算得到广西 11 个松墨天牛地理种群之间的遗传距离为 0.001-0.010 ( 表 4 )。Mantel 检验结果显示, 11 个松墨天牛地理种群之间的地理距离和遗传距离不存在显著相关性 ( *R* = 0.346, *P* = 0.124 )。对广西所有地理种群样品进行 AMOVA 分析, 11 个地理种群间 CO I 基因遗传变异率为 39.91%, 种群内的个体变异为 60.09% ( 表 5 )。各种群之间的固定系数 *F*<sub>st</sub>

值围在 - 0.047-0.889 之间, 大部分地理种群的固定系数 *F*<sub>st</sub> 大于 0.25。11 个地理种群间存在着不同程度的遗传分化, 其中百色靖西种群与其他种群的遗传分化程度最高, 除河池宜州种群外, 与其他种群的固定系数均达到了显著水平 ( *P* < 0.05 ); 同时, 南宁兴宁种群与崇左大兴种群基因流较大 ( *N*<sub>m</sub> = 22.728 ), 表明 2 个种群的松墨天牛间有着频繁的基因交流现象 ( 表 6 )。

2.3 广西松墨天牛种群遗传结构

广西松墨天牛的单倍型网络图主要分为 3 个进化主支, 第 1 支以 Hap8 为中心节点, 为主要单倍型, 其余 2 支分别以 H2 和 H15 为中心节点 ( 图 1 )。Hap2 与 Hap8 都包含了 73% 的地理种

表 4 广西 11 个松墨天牛地理种群之间的遗传距离和地理距离  
Table 4 Genetic distance and geographical distance between 11 geographical populations of *Monochamus alternatus* in Guangxi

| 种群代码<br>Population code | HZBB  | WZCW   | LZCZ    | GGGP    | BSJX    | CZDX    | NNXN    | GLQZ    | YLRX    | LZSJ    | HCYZ    |
|-------------------------|-------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| HZBB                    |       | 85.572 | 212.858 | 199.017 | 518.515 | 482.992 | 330.151 | 172.461 | 198.607 | 264.878 | 291.389 |
| WZCW                    | 0.003 |        | 226.793 | 152.259 | 500.860 | 452.037 | 302.287 | 256.306 | 126.395 | 325.201 | 306.442 |
| LZCZ                    | 0.003 | 0.003  |         | 149.226 | 317.230 | 301.554 | 161.918 | 243.938 | 215.504 | 172.247 | 80.256  |
| GGGP                    | 0.002 | 0.002  | 0.002   |         | 354.404 | 300.396 | 153.724 | 322.146 | 71.567  | 310.666 | 210.066 |
| BSJX                    | 0.009 | 0.008  | 0.008   | 0.007   |         | 89.673  | 200.731 | 553.403 | 414.056 | 426.584 | 259.197 |
| CZDX                    | 0.005 | 0.006  | 0.005   | 0.005   | 0.010   |         | 152.846 | 545.328 | 351.351 | 439.994 | 263.633 |
| NNXN                    | 0.006 | 0.007  | 0.006   | 0.006   | 0.008   | 0.005   |         | 403.218 | 214.841 | 323.398 | 155.575 |
| GLQZ                    | 0.002 | 0.002  | 0.002   | 0.002   | 0.008   | 0.006   | 0.007   |         | 349.725 | 165.039 | 294.760 |
| YLRX                    | 0.002 | 0.002  | 0.002   | 0.001   | 0.007   | 0.005   | 0.006   | 0.002   |         | 366.334 | 280.841 |
| LZSJ                    | 0.002 | 0.002  | 0.002   | 0.001   | 0.007   | 0.005   | 0.006   | 0.002   | 0.001   |         | 176.673 |
| HCYZ                    | 0.007 | 0.006  | 0.006   | 0.006   | 0.003   | 0.008   | 0.007   | 0.006   | 0.006   | 0.005   |         |

表中左下角为种群间遗传距离, 右上角为采样点间的地理水平距离。  
The lower left corner of the table represents the genetic distance between populations, while the upper right corner represents the geographic horizontal distance between sampling points.

表 5 广西 11 个松墨天牛地理种群线粒体 CO I 基因分子方差分析  
Table 5 Molecular variation analysis of mitochondrial CO I gene in 11 geographical population of *Monochamus alternatus* in Guangxi

| 变异来源<br>Variation source | 自由度<br>Degree of freedom | 平方和<br>Quadratic sum | 变异组成<br>Variation composition | 变异百分比 (%)<br>Percentage variation (%) | 固定系数<br>Fixation index |
|--------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| 种群间 Inter-population     | 10                       | 95.342               | 0.586 98                      | 39.91                                 |                        |
| 种群内 In-population        | 154                      | 136.113              | 0.883 85                      | 60.09                                 | 0.399 08               |
| 总计                       | 164                      | 231.455              | 1.470 83                      | 100.00                                |                        |

表 6 广西 11 个松墨天牛地理种群之间的固定系数 ( $F_{st}$ ) (下三角) 和基因流 ( $N_m$ ) (上三角)

Table 6 Fixation index ( $F_{st}$ ) and gene flow ( $N_m$ ) among 11 geographical populations of *Monochamus alternatus* in Guangxi

| 种群代码<br>Population code | HZBB   | WZCW    | LZCZ    | GGGP    | BSJX   | CZDX   | NNXN   | GLQZ   | YLRX   | LZSJ     | HCYZ  |
|-------------------------|--------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|-------|
| HZBB                    |        | 9.117   | 4.232   | 0.797   | 0.072  | 0.307  | 0.530  | 0.864  | 0.776  | 1.108    | 0.264 |
| WZCW                    | 0.027  |         | - 9.125 | 3.890   | 0.079  | 0.337  | 0.568  | 1.283  | 3.796  | - 42.338 | 0.341 |
| LZCZ                    | 0.056* | - 0.028 |         | 3.686   | 0.106  | 0.441  | 0.663  | 1.633  | 4.262  | - 62.285 | 0.385 |
| GGGP                    | 0.239* | 0.060*  | 0.064*  |         | 0.047  | 0.185  | 0.407  | 0.345  | 2.787  | - 5.607  | 0.239 |
| BSJX                    | 0.776* | 0.760*  | 0.701*  | 0.842*  |        | 0.068  | 0.278  | 0.034  | 0.038  | 0.031    | 1.600 |
| CZDX                    | 0.449* | 0.426*  | 0.362*  | 0.574*  | 0.786* |        | 22.728 | 0.140  | 0.163  | 0.288    | 0.270 |
| NNXN                    | 0.321* | 0.306*  | 0.274*  | 0.381*  | 0.473* | 0.011  |        | 0.314  | 0.392  | 0.706    | 0.716 |
| GLQZ                    | 0.224* | 0.163*  | 0.133*  | 0.420*  | 0.879* | 0.641* | 0.443* |        | 0.315  | 0.278    | 0.203 |
| YLRX                    | 0.244* | 0.062   | 0.055   | 0.082*  | 0.869* | 0.605* | 0.389* | 0.442* |        | 2.462    | 0.524 |
| LZSJ                    | 0.184  | - 0.006 | - 0.004 | - 0.047 | 0.889* | 0.464* | 0.262* | 0.473* | 0.092  |          | 0.385 |
| HCYZ                    | 0.486* | 0.423*  | 0.393*  | 0.511*  | 0.135  | 0.481* | 0.259* | 0.552* | 0.524* | 0.395    |       |

\*表示分子方差分析结果差异显著 ( $P < 0.05$ )。  
\* indicate results of the molecular analysis of variance is significant difference ( $P < 0.05$ ).

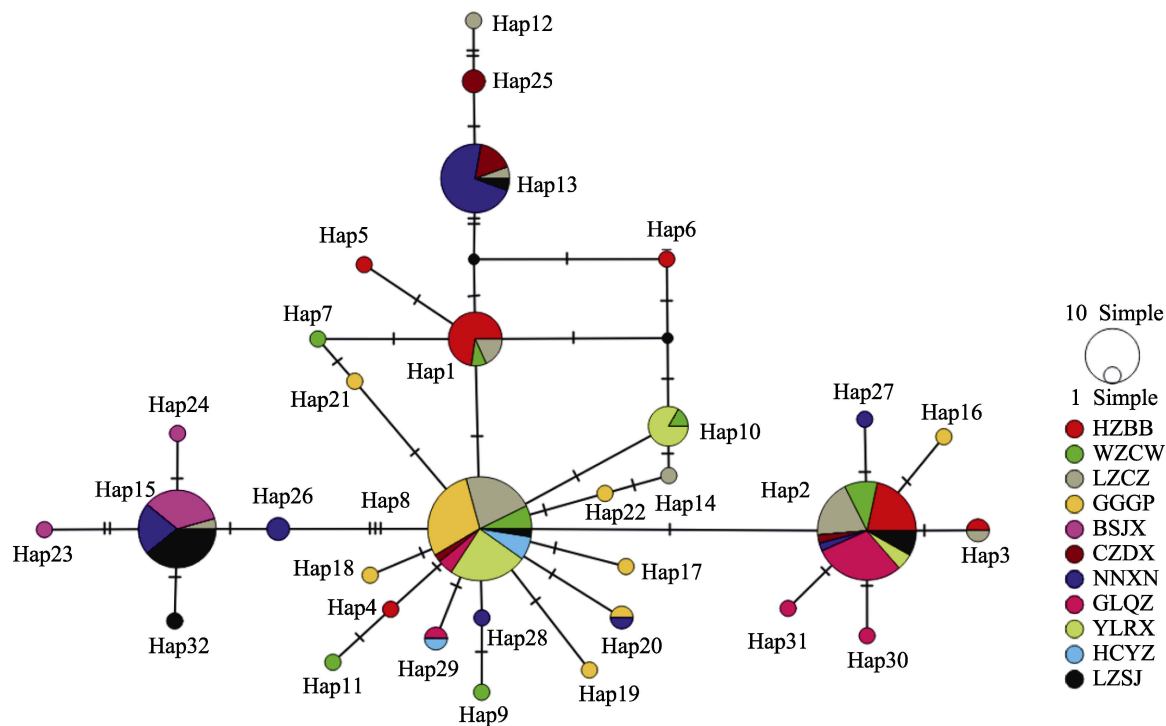


图 1 基于邻接法绘制的广西松墨天牛单倍型网络图

Fig. 1 The haploid network diagram of Guangxi *Monochamus alternatus* based on Neighbor-joining method

图中各圆圈之间连接线上的黑色短线个数表示相差的碱基数; Hap1 与 Hap13 黑色圆圈为与其他相邻的 2 种单倍型之间的“节点”, 可能为本研究中未被检测到的其他单倍型。

The number of black short lines on the connecting lines between the circles in the figure represents the difference in the number of bases; The black circles of Hap1 and Hap13 represent the “nodes” between two adjacent haplotypes, which may be other haplotypes that not detected in this study.



### 3 讨论

物种在漫长的进化过程中无法避免发生碱基变异, 从而为物种的进化提供理论依据, 对于研究种内与种间的遗传差异具有重要的意义。本研究通过分析广西地区松墨天牛 CO I 基因上的位点变异情况, 进而探究广西 11 个地理种群松墨天牛的遗传多样性和遗传分化模式, 有助于理解松墨天牛在广西的分布模式和生态适应情况。结果表明, 不同地理种群内单倍型多样性为 0.378-0.864, 核苷酸多样性为 0.000 79-0.005 97, 大部分种群呈现出 Grant 等 (1998) 提出的高  $H_d$  低  $k$  类型。 $F_{st}$  与  $N_m$  揭示种群间遗传分化的重要指标 (Rousset, 1997), 较高的  $F_{st}$  值 ( $F_{st} > 0.25$ ) 表明种群间存在较高水平的遗传分化; 较高的  $N_m$  值 ( $N_m > 1$ ) 表明种群间存在着频繁的基因交流。AMOVA 分析表明, 广西松墨天牛 60.09% 的变异来自种群内, 39.91% 来自种群间。整体  $F_{st}$  值为 0.399 ( $P < 0.01$ ), 说明广西松墨天牛整体种群间基因交流较少, 且由于遗传背景不同而存在明显的遗传分化。总体上, 广西松墨天牛具有较高的遗传多样性, 反映了该物种在广西具有较高的遗传变异潜力和环境适应能力, 但也会因不同种群的遗传背景不同或种群间样本量不一致而导致各个种群内的遗传多样性存在差异 (赵丽, 2018; 吕琳等, 2023)。

遗传分化由种群内的遗传漂变与种群间的基因交流决定, 天然的地理隔离是影响基因交流的重要屏障, 可以很大程度的影响物种的种群遗传分化。而广西松墨天牛种群间的地理距离和遗传距离并无显著相关性, 这与我们对地理隔离在基因交流中的传统认知不同, 其基因交流超越了地理距离的限制。研究表明, 松墨天牛成虫的自然扩散速度相对缓慢, 每年约为 2 km (张连芹等, 1992)。说明广西松墨天牛种群中的基因交流可能并非完全依赖于自然扩散。如玉林容县与柳州三江间地理距离相距较远 (366.334 km), 而遗传却仅有 0.001, 且发现距离较远的贺州八步与柳州城中之间 (212.858 km) 也存在频繁的基因交流 ( $N_m > 4$ ), 说明 2 个种群间松墨天牛具

有一定的相似性, 存在着基因交流现象。王曦苗等 (2018) 表明, 非法疫木流通或使用未经检疫的松木制品可能是促进松墨天牛种群间基因交流的重要途径 (王曦苗等, 2018)。Hu 等 (2013) 对松墨天牛种群分布的研究也证实了人为迁移的存在。受人类活动的影响, 松墨天牛的种群遗传结构受到非自然因素的改变。目前的观点普遍支持, 松墨天牛的长距离传播主要源于包装材料的运输, 部分跨洋运输实现了世界各地种群间的基因交流 (Kawai *et al.*, 2006)。因此, 广西松墨天牛间存在类似木材交流导致的跨距离传播, 这种传播可能是形成跨距离基因交流的主要原因。另外, 源自山地地区的河池宜州和百色靖西, 及木材流通较发达的崇左大新的种群与其他种群间均存在较高水平的遗传分化 ( $P < 0.05$ ) (郑新宇, 2016; 梁航佳, 2019; 马睿, 2022)。当松墨天牛依靠自然传播扩散种群时, 高山和山地等自然因素可往往会形成生态屏障, 阻碍其基因交流 (Fu *et al.*, 2010); 当松墨天牛依靠人为传播扩散种群时, 木材流通频率会阻碍其基因交流。河池宜州经济处于较低水平, 货物流通少, 来自该地区的种群与其他种群间表现出显著的遗传分化。

广西松墨天牛单倍型网络图呈星状拓扑结构, 形成 3 个辐射进化中心。其中, Hap8 和 Hap2 分布最广, 覆盖了 72% 的地理种群。由于 Hap8 分化出最多的单倍型, 推测 Hap2 由 Hap8 分化而来, 进一步推断 Hap8 可能是广西地区松墨天牛最原始的单倍型。11 个地理种群共存在 32 种单倍型, 包括 21 种独享单倍型和 11 种共享单倍型。独享单倍型是生物适宜环境的结果, 通过减少物种间的基因交流, 保持稳定的种群遗传多样性 (Johns *et al.*, 1998)。贵港桂平种群存在的独享单倍型最多 (6 个), 且 Tajima's  $D$  检验结果极显著, 表明该种群在近期存在大型扩张事件。Lee 等 (2020) 基于 CO I 序列对多个国家桃红颈天牛 *Aromia bungii* 的遗传结构分析发现, 同一单倍型存在于不同国家, 表明人为活动对于天牛种群遗传结构产生了显著影响。基于邻接法构建的系统进化树显示, 广西松墨天牛的 2 个分支与

世界上其他地理松墨天牛种群聚为一支。结合单倍型网络图可知, Hap7、Hap20 和 Hap21 与全球松墨天牛种群亲缘关系紧密, 这 3 种单倍型存在于梧州苍梧、贵港桂平与南宁兴宁种群。总的来说, 广西松墨天牛同一单倍型在地理距离相距较远的种群之间有共享现象, 进一步说明人为活动对松墨天牛有较大的影响。与部分昆虫研究一致(王红等, 2014; 张鹏飞等, 2017), 种群单倍型数量与样本数量没有明确关联, 如崇左大兴种群仅有 7 个样本, 但是却存在 4 种单倍型; 玉林容县有 17 个样本, 但仅存在 3 种单倍型。后续研究应增加单倍型多样性较多种群的样本量, 以获得更为全面的单倍型信息。

广西松墨天牛种群的遗传结构受到非自然条件的显著影响, 人为活动的影响使得基因交流超越了地理距离的限制。部分种群间也存在着明显的遗传分化, 特别是在河池宜州和百色靖西山地地区, 以及崇左大新木材贸易地区。本研究结果对理解松墨天牛在广西区域内的遗传结构和分布模式具有重要意义, 并为制定有效的防控策略提供了重要参考。后续研究将结合松材线虫的种群遗传结构、经济发展状况及松树面积等要素进行相关性分析, 从而揭示更多的细节, 以便更深入理解广西松墨天牛种群的遗传动态及其与环境因素的相互作用。

## 参考文献 (References)

- Ahmed MA, 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *Genetic Engineering and Biotechnology Bulletin*, 2(1): 74.
- Chen QL, Zhang RZ, Li DL, Wang F, 2021. Genetic characteristics of *Bursaphelenchus xylophilus* third-stage dispersal juveniles. *Scientific Reports*, 11(1): 3908.
- Excoffier L, Lischer HEL, 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 564–567.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- Fu DY, Hu SJ, Ye H, Haack RA, Zhou PY, 2010. Pine wilt disease in Yunnan, China: Evidence of non-local pine sawyer *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) populations revealed by mitochondrial DNA. *Insect Science*, 17(5): 439–447.
- Grant W, Bowen B, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5): 415–426.
- Hu SJ, Ning T, Fu DY, Haack RA, Zhang Z, Chen DD, Ma XY, Ye H, 2013. Dispersal of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), in China's mainland as inferred from molecular data and associations to indices of human activity. *PLoS ONE*, 8(2): e57568.
- Huang XR, 2018. Relationship between plant functional diversity and productivity of *Pinus massoniana* plantations in Guangxi. *Biodiversity Science*, 26(7): 690–700. [黄小荣, 2018. 广西马尾松林植物功能多样性与生产力的关系. 生物多样性, 26(7): 690–700.]
- Johns GC, Avise JC, 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15(11): 1481–1490.
- Kawai M, Shoda-Kagaya E, Maehara T, Zhou ZH, Lian CL, Iwata R, Yamane A, Hogetsu T, 2006. Genetic structure of pine sawyer *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) populations in northeast Asia: Consequences of the spread of pine wilt disease. *Environmental Entomology*, 35(2): 569–579.
- Kirino H, Maehara N, Shinya R, 2023. How did Bursaphelenchus nematodes acquire a specific relationship with their beetle vectors, *Monochamus*? *Frontiers in Physiology*, 14: 1209695.
- Lee S, Lee S, 2020. Multigene phylogeny uncovers oviposition-related evolutionary history of *Cerambycinae* (Coleoptera: Cerambycidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 145: 106707.
- Leigh JW, Bryant D, 2015. Popart: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110–1116.
- Li YC, Guo YJ, Weng XQ, Lin XY, Chi JL, Chen HY, Wu SQ, Zhang FP, 2020. Influence of landscape patterns on population density of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Scientia Silvae Sinicae*, 56(8): 80–88. [李叶晨, 郭雅洁, 翁小倩, 林先云, 池金良, 陈红英, 吴松青, 张飞萍, 2020. 景观格局对松褐天牛种群密度的影响. 林业科学, 56(8): 80–88.]
- Liang HJ, 2019. Study on rural development types and rural nature at county scale in Guangxi. Master dissertation. Nanning: Nanning Normal University. [梁航佳, 2019. 广西县域尺度乡村发展类型与乡村性研究. 硕士学位论文. 南宁: 南宁师范大学.]
- Lv L, Li YY, Huo LX, Liang HY, Zhang HH, Zhou JC, Zhang LS,

- Dong H, 2023. Reproductive phenotype of two wolbachia-infected thelytokous line of *Trichogramma dendrolimi* matsumura. *Chinese Journal of Biological Control*, 39(2): 245–253. [吕琳, 李媛媛, 霍梁霄, 梁洪宇, 张欢欢, 周金成, 张礼生, 董辉, 2023. 孤雌产雌松毛虫赤眼蜂种群间生殖表型的比较. 孤雌产雌松毛虫赤眼蜂种群间生殖表型的比较. 中国生物防治学报, 39(2): 245–253.]
- Ma R, 2022. Analysis on the promotion of Guangxi border port tourism development to new urbanization construction. Master dissertation. Guilin: Guilin University of Technology. [马睿, 2022. 广西边境口岸旅游促进新型城镇化发展研究. 硕士学位论文. 桂林: 桂林理工大学.]
- Nguyen VT, 2019. Comparative research on population dynamics and genetic diversity of *Monochamus alternatus* in Vietnam and China. Master dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [Nguyen VT, 2019. 越南与中国松墨天牛种群动态和遗传多样性的比较研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.]
- Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145(4): 1219–1228.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A, 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12): 3299–3302.
- Manuel MM, VIEIRA P, 2008. Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems. Dordrecht: Springer. 235–242.
- Sun H, Zhou YT, Li XD, Zhang YZ, Wang Y, 2021. The occurrence of major forestry pests in China in 2020 and the prediction of the occurrence trend in 2021. *Forest Pest and Disease*, 40(2): 45–48. [孙红, 周艳涛, 李晓冬, 张玉洲, 王越, 2021. 2020 年全国主要林业有害生物发生情况及 2021 年发生趋势预测. 中国森林病虫, 40(2): 45–48.]
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Togashi K, Miyauchi O, Kusumoto D, Matsushita N, 2016. Commensal relation between *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) and *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) within pine trees. *Applied Entomology and Zoology*, 51(1): 53–62.
- Wang H, Xu ZX, Han LL, Wang KQ, Zhao KJ, 2014. Analysis of the genetic diversity in geographic populations of *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Olethreutidae) from northeastern China based on mitochondrial DNA CO I gene sequences. *Acta Entomologica Sinica*, 57(9): 1051–1060. [王红, 徐忠新, 韩岚岚, 王克勤, 赵奎军, 2014. 基于线粒体 CO I 基因序列的大豆食心虫中国东北地理种群遗传多样性分析. 昆虫学报, 57(9): 1051–1060.]
- Wang XZ, Cao YF, Wang LF, Piao CG, Li CL, 2018. Current status of pine wilt disease and its control status. *Journal of Environmental Entomology*, 40(2): 256–267. [王曦苗, 曹业凡, 汪来发, 朴春根, 李成录, 2018. 松材线虫病发生及防控现状. 环境昆虫学报, 40(2): 256–267.]
- Ye JR, 2000. Current status and perspective on forest pests control in China. *Journal of Nanjing Forestry University (Sciences Edition)*, 24(6): 1–5. [叶建仁, 2000. 中国森林病虫害防治现状与展望. 南京林业大学学报(自然科学版), 24(6): 1–5.]
- Ye JR, 2019. Epidemic status of pine wilt disease in China and its prevention and control techniques and counter measures. *Scientia Silvae Sinicae*, 55(9): 1–10. [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. 林业科学, 55(9): 1–10.]
- Zhang LQ, Huang HH, Song SH, Liu DL, Liang XF, Ruan X, Xie RC, 1992. Study on the diffusion distance of *Monochamus alternatus* population, the vector of pine wood nematode disease. *Forest Science and Technology*, 1992(12): 26–27. [张连芹, 黄焕华, 宋世涵, 刘德禄, 梁雄飞, 阮雄, 谢汝常, 1992. 松材线虫病传播媒介—松墨天牛种群扩散距离的研究. 林业科技通讯, 1992(12): 26–27.]
- Zhang PF, Zhou XR, Pang BP, Tan Y, Tian S, 2017. Population genetic diversity and differentiation of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) from Inner Mongolia based on mitochondrial DNA CO I gene sequences. *Journal of Environmental Entomology*, 39(2): 332–341. [张鹏飞, 周晓榕, 庞保平, 谭瑶, 田帅, 2017. 基于线粒体 CO I 基因序列的内蒙古沙葱萤叶甲种群遗传多样性及遗传分化. 环境昆虫学报, 39(2): 332–341.]
- Zhao L, 2018. Study on population genetic diversity of Andrew's toad (*Bufo andrewsi*). Master dissertation. Nanchong: China West Normal University. [赵丽, 2018. 华西蟾蜍种群遗传多样性研究. 硕士学位论文. 南充: 西华师范大学.]
- Zheng XY, 2016. Study on the development of forestry industry in Hechi city. Master dissertation. Nanning: Guangxi University. [郑新宇, 2016. 河池市林业产业发展研究. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学.]