



基于 *COI* 基因的浙江省内 黄缘闭壳龟遗传多样性研究

陈敏^{1,2}, 秦媛¹, 林业宏¹, 任思齐¹, 叶嘉政¹, 郑善坚^{1*}

(1. 浙江师范大学, 浙江省野生动物生物技术与保护利用重点实验室, 金华, 321004;

2. 浙江省永康市野生动植物保护管理站, 永康, 321300)

稿件运行过程

收稿日期: 2023-07-17

修回日期: 2023-08-14



关键词: 黄缘闭壳龟;

COI;

遗传多样性;

遗传结构;

浙江省

Key words: *Cuora flavomarginata*;

COI;

Genetic diversity;

Genetic structure;

Zhejiang Province

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-02-0367-11

DOI: 10.12375/ysdwxb.20240216

摘要

为了解浙江省内不同黄缘闭壳龟(*Cuora flavomarginata*)群体的种质资源现状,基于线粒体DNA *COI*序列对来自浙江省内野外和养殖场的8个黄缘闭壳龟群体的遗传多样性和遗传结构进行比较分析。结果表明:黄缘闭壳龟线粒体 *COI* 基因序列长度为1 040 bp, A=27.4%、T=30.5%、C=24.6%、G=17.5%,有较强的AT偏好性;共定义9个单倍型,单倍型多样性(H_d)为(0.799 00±0.210 00),核苷酸多样性(P_i)为(0.002 09±0.001 47),呈“高 H_d 低 P_i ”遗传分布;不同黄缘闭壳龟群体间的遗传距离为0~0.003,群体内部的遗传距离为0~0.004,其中磐安后阁村(YS)群体内部的遗传距离最大,为0.004;单倍型系统发育树并未呈现明显的谱系结构;群体间遗传分化指数(F_{ST})为-0.347 52~0.822 22,8个群体的遗传分化不显著($p>0.05$);中性检验(Tajima's $D=-0.366 27$, Fu's $F_s=-0.605$)与核苷酸错配分布均表明,浙江省内黄缘闭壳龟群体并未经历种群扩张事件,同时,由Mantel检验可知,遗传距离与地理距离没有显著的相关性($R=0.293 8, p>0.05$);AMOVA分子方差结果显示,群体内的遗传变异高于群体间(85.06%>14.94%)。研究表明,浙江省内黄缘闭壳龟群体之间为高单倍型多样性和低核苷酸多样性的遗传特征,并且存在一定水平的遗传分化,群体内存在明显的基因交流,根据 *COI* 基因分析显示,在磐安县获得的野生黄缘闭壳龟个体确定为黄缘闭壳龟浙江种,同时也发现存在浙江种与安徽种的杂交种,建议将分化程度不同的黄缘闭壳龟群体划分为不同单元保护。研究结果为浙江省内黄缘闭壳龟种质资源开发利用和合理制定保护措施提供了基础依据。

基金项目: 浙江省省级重点研发计划项目(2021C02044)

第一作者简介: 陈敏(1975—),男,林业工程师;主要从事野生动物保护与管理工作。E-mail: 200997211@qq.com

* 通信作者: 郑善坚, E-mail: zhengsj@zjnu.cn

Genetic Diversity Analysis of *Cuora flavomarginata* Based on *COI* Genes in Zhejiang Province

CHEN Min^{1,2}, QIN Yuan¹, LIN Yehong¹, REN Siqi¹, YE Jiazheng¹, ZHENG Shanjian^{1*}

(1. Key Laboratory of Wildlife Biotechnology and Conservation and Utilization of Zhejiang Province,
Zhejiang Normal University, Jinhua, 321004, China;

2. Yongkang Wildlife Protection and Management Station, Zhejiang Province, Yongkang, 321300, China)

Abstract: In order to understand the present situation of germplasm resources of different *Cuora flavomarginata* in Zhejiang Province, the genetic diversity and genetic structure of eight *C. flavomarginata* populations from wild and breeding farms in Zhejiang Province were compared based on mitochondrial DNA *COI* sequence. The results showed that the sequence length of *COI* gene of *C. flavomarginata* was 1,040 bp, and the average base content was A=27.4%, T=30.5%, C=24.6%, G=17.5%, with strong AT preference. Nine haplotypes were identified in the eight populations, and the haplotype diversity (H_d) was (0.79900±0.21000), and the nucleotide diversity (P_i) was (0.00209±0.00147), showing “high H_d and low P_i ” genetic distribution. The genetic distance between different populations ranged from 0 to 0.003. The genetic distance within populations was between 0 and 0.004, among which the genetic distance within Pan’an Houge Village (YS) population was the largest, which was 0.004. The haplotype phylogenetic tree did not show obvious pedigree structure. The genetic differentiation index (F_{ST}) interval was from -0.34752 to 0.82222, and the genetic differentiation was not significant ($p>0.05$) in eight populations. Tajima’s D and Fu’s F_s test values were either positive (Tajima’s $D=-0.36627$, Fu’s $F_s=-0.605$), but statistically insignificant. The distribution of nucleotide mismatches indicated that the population of the *C. flavomarginata* in Zhejiang Province did not experience a population expansion event. Mantel test showed that there was no significant correlation between genetic distance and geographical distance ($R=0.2938, p>0.05$). AMOVA analysis found that the genetic variation within populations was higher than that between populations (85.06%>14.94%). The results showed that the populations of *C. flavomarginata* in Zhejiang Province are characterized by high haplotype diversity and low nucleic acid genetic diversity, and there was a certain level of genetic differentiation, and there was obvious gene exchange among the populations. The wild *C. flavomarginata* obtained in Pan’an County was identified as Zhejiang species according to *COI* gene analysis. Moreover, it was also found that there were hybrids between Zhejiang species and Anhui species. It is suggested that the *C. flavomarginata* populations with different degrees of differentiation should be divided into different units for protection. This study uses genetic diversity analysis to provide a basis for the development and utilization of *C. flavomarginata* germplasm resources in Zhejiang Province and the formulation of reasonable protection measures.

黄缘闭壳龟(*Cuora flavomarginata*)别名夹板龟、克蛇龟、断板龟和黄缘盒龟,属地龟科(Geomydidae)闭壳龟属(*Cuora*),是水陆两栖性龟类。野生黄缘闭壳龟主要分布于我国河南省和安徽省,此外,浙江省、湖南省和台湾地区等地也有野生黄缘闭壳龟的报道^[1]。根据世界自然保护联盟(IUCN)记录,黄缘闭壳龟可分为台湾亚种(*C. f. flavomarginata*)、中国大陆南方亚种(*C. f. sinensis*)以及日本琉球亚种(*C. f. evelynae*)^[2]。由于黄缘闭壳龟具有极高的食用、药用价值,驯化性好,长相独特,观赏价值高,其

野生资源遭到严重破坏,已被IUCN列为濒危(EN)物种^[2],被《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录II收录^[3],被《中国生物多样性红色名录—脊椎动物卷(2020)》列为极危(CR)物种^[4],2016年被列入《浙江省重点保护陆生野生动物名录》^[5]。

目前,关于黄缘闭壳龟的研究主要集中在人工养殖与繁殖^[6-7]、形态与组织^[8]、遗传多样性^[9]及线粒体基因组^[10-11]等方面。荆胜利等^[12]和郭旭升等^[13]通过对黄缘闭壳龟保护遗传学等方面的分析,分别探究了大别山区人工驯养黄缘闭壳龟的遗传多样性和

河南信阳黄缘闭壳龟保护区的种群现状,为黄缘闭壳龟后续的保护提供了基础。潘冬冬等^[14]基于线粒体基因对安徽黄缘闭壳龟和台湾黄缘闭壳龟进行了研究,并对其在安徽省皖南山区、大别山区的野外生存情况进行了调查,结果发现黄缘闭壳龟的资源衰退,并存在种质混杂的情况。董传举等^[15]对黄缘闭壳龟种群进行分类时,描述了其生物学特性,但关于浙江省内黄缘闭壳龟种质资源现状、遗传多样性研究却未见报道。因此,本研究利用线粒体 *COI* 基因序列对浙江省内不同黄缘闭壳龟群体进行遗传结构和遗传多样性分析,以期了解其种质资源情况,从而

为浙江省内黄缘闭壳龟的合理利用、资源保护等研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用黄缘闭壳龟取自义乌宏富农业开发有限公司、东阳金雕养龟基地、东阳巍山养殖场、湖州菱湖龟鳖场、永康后项养龟场和永康下贵养龟场6家养殖场的养殖群体以及杭州清凉峰国家级自然保护区、磐安后阁村野外个体,共44个样本(表1)。

表1 黄缘闭壳龟的采样信息

Tab. 1 Sampling information of *Cuora flavomarginata*

编号 ID	代号 Code	采样点 Sampling location	经纬度 Longitude and latitude	样本数量 Sample size
1	DY1	东阳金雕	29°9' N, 120°13' E	2
2	DY2	东阳巍山	29°19' N, 120°25' E	5
3	HZ	杭州清凉峰	30°10' N, 119°12' E	8
4	HUZ	湖州菱湖	30°45' N, 120°5' E	6
5	YS	磐安后阁村	28°57' N, 120°35' E	9
6	YW	义乌宏富	29°10' N, 119°59' E	5
7	YK1	永康后项	28°51' N, 120°5' E	5
8	YK2	永康下贵	29°50' N, 120°11' E	4
总计 Total				44

1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA提取

使用无菌拭子擦拭黄缘闭壳龟口部黏液,置于含有200 μ L 0.01 mol/L磷酸缓冲盐溶液(PBS)的离心管中保存。采用上海生工Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒提取基因组DNA,使用NanoDrop 2000分光光度计测定提取的DNA纯度和浓度,将合格样品于冰箱中-20 $^{\circ}$ C保存。

1.2.2 PCR扩增及测序

根据GenBank数据库中公布的黄缘闭壳龟线粒体全基因组序列(登录号:EU708434.1),采用Primer Premier 5.0软件设计其线粒体 *COI* 序列特异性引物,送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物。引物序列为 *COI*-F: 5'-AGCCATCTTACCTGTGTTTT-3', *COI*-R: 5'-TTGCTCAAGTTTGGTGTA-GT-3'。PCR总反应体系为25 μ L,其中R *Taq* DNA Premix 10 μ L,基因组DNA 1 μ L,上、下游引物各

1 μ L, ddH₂O 补足至25 μ L。PCR扩增程序为94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 共5个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,送生工生物工程(上海)股份有限公司双向测序。

1.2.3 数据分析

利用SeqMan软件参照序列峰图对所测黄缘闭壳龟 *COI* 序列进行人工校正和修饰^[16]。使用MEGA 6.0软件进行多序列比对、碱基组成分析以及系统发育分析,采用邻接法(NJ)构建单倍型聚类树^[17],并计算群体间及单倍型间的遗传距离。使用DnaSP 6软件计算序列变异位点数,分析不同群体的单倍型数、群体单倍型多样性(H_d)以及核苷酸多样性(P_i)等遗传多样性指数^[18],绘制核苷酸不配对分布曲线。通过Tajiam's *D* 检验和Fu' F_s 中性检验明确黄缘闭壳龟群体在历史上是否发生群体扩张。由Arlequin 3.11软件计算群体遗传分化指数(F_{ST}),使用Mantel

检验,自展重复1000次,对黄缘闭壳龟群体的遗传距离与地理距离之间的相关性进行分析^[19],并基于分子方差分析(AMOVA)分析群体间的遗传变异^[20]。采用Network 5.0(Rohl 2003)软件基于中间连接法建立单倍型网络图^[21],以描述单倍型序列的系统发育关系以及地理关系。

2 结果

2.1 线粒体COI基因序列的碱基组成及变异特征

对测序后的序列进行比对,获得黄缘闭壳龟线粒体COI基因序列的长度为1040 bp,基因序列碱基A、T、C、G的平均含量分别为27.4%、30.5%、24.6%和17.5%,A+T的平均含量为57.9%,C+G的平均含

量为42.1%,表现出AT偏倚性。在44只黄缘闭壳龟个体线粒体COI序列中,共检测到保守位点1004个,多态性位点13个,单一信息位点4个,简约信息位点9个。

2.2 黄缘闭壳龟群体遗传多样性

基于线粒体COI基因序列共定义了9个单倍型,8个黄缘闭壳龟群体的单倍型多样性(H_d)为(0.42900±0.16900)~(1.00000±0.50000),核苷酸多样性为(0.00042±0.00016)~(0.00425±0.00121)。其中,YS群体的核苷酸多样性最高(0.00425±0.00121),DY1群体、HUZ群体和YW群体的单倍型多样性较高,分别为(1.00000±0.50000)、(1.00000±0.09600)和(1.00000±0.12600)(表2)。

表2 黄缘闭壳龟遗传多样性信息

Tab. 2 Genetic diversity information of *Cuora flavomarginata*

序号 ID	编号 Code	单倍型数量 Haplotype number	单倍型 Haplotype	单倍型多样性(H_d) Haplotype diversity	核苷酸多样性(P_i) Nucleotide diversity	平均核苷酸差异数(K) Average number of nucleotide differences
1	DY1	2	Hap1,4	1.00000±0.50000	0.00192±0.00096	2.00000
2	DY2	2	Hap3,4	0.60000±0.17500	0.00058±0.00017	0.60000
3	HZ	2	Hap3,4	0.42900±0.16900	0.00042±0.00016	0.42857
4	HUZ	4	Hap2,4,6,7	1.00000±0.09600	0.00205±0.00038	2.13333
5	YS	5	Hap2,3,5,8,9	0.83300±0.12700	0.00425±0.00121	4.38889
6	YW	3	Hap1,2,3	1.00000±0.12600	0.00385±0.00137	4.00000
7	YK1	3	Hap2,4,8	0.70000±0.21800	0.00288±0.00121	3.00000
8	YK2	1	Hap3	0.83300±0.22200	0.00080±0.00021	0.83333
总计 Total				0.79900±0.21000	0.00209±0.00147	2.17302

2.3 黄缘闭壳龟群体间的遗传距离和遗传分化

遗传距离分析可知,基于线粒体COI基因序列,两两群体间的遗传距离为0~0.003,其中YW、YS群体与其他群体间的遗传距离较远(0.002~0.003)。8个群体内的遗传距离为0~0.004,HZ和YK2群体内遗传距离最小,YS群体内遗传距离最大,达到0.004(表3)。

F_{ST} 分析结果显示,两两群体间的 F_{ST} 值在-0.34752~0.82222,DY1与YK2之间的遗传分化指数最大,为0.82222;其次为HUZ群体与YK2群体,遗传分化指数为0.61556,处于较高遗传分化水平。DY1和YK1群体间的遗传分化指数最小,为

-0.34752,表明两个群体间的遗传分化较弱(表3)。同时,Mantel检验结果显示,浙江省内不同黄缘闭壳龟群体间的遗传距离与地理距离之间没有显著的相关性($R=0.2938$, $p=0.134$),表明黄缘闭壳龟种群的遗传分化受地理因素的影响不显著。

利用分子方差分析和遗传分化系数对8个群体间的遗传变异和遗传进化进行分析。基于COI基因序列,群体间的分子变异率为14.94%,群体内的分子变异率为85.06%,分子变异主要发生在群体内部。群体总体遗传分化系数为0.14939($p>0.05$),总体分子变异处于中等水平(表4)。

表3 黄缘闭壳龟群体的遗传距离(下三角)与遗传分化指数(上三角)

Tab. 3 Genetic distance (lower triangle) and genetic differentiation index (upper triangle) of *Cuora flavomarginata* populations

编号 Code	YW	DY1	DY2	YS	HZ	HUZ	YK1	YK2
YW	0.003	-0.275 42	0.257 81	-0.022 73	0.397 87	0.014 93	-0.132 81	0.377 43
DY1	0.002	0.001	0.353 61	-0.095 45	0.567 57	-0.263 16	-0.347 52	0.822 22
DY2	0.003	0.001	0.001	-0.006 13	-0.132 08	0.418 56	0.200 00	0.194 63
YS	0.003	0.003	0.002	0.004	0.062 40	0.168 78	-0.009 32	0.005 41
HZ	0.003	0.001	0	0.002	0	0.551 40	0.372 95	0.020 41
HUZ	0.002	0.001	0.002	0.003	0.002	0.001	0.027 93	0.615 56
YK1	0.003	0.001	0.002	0.003	0.002	0.002	0.003	0.408 42
YK2	0.003	0.001	0	0.002	0	0.002	0.002	0

注：加粗字体代表群体内遗传距离。

Note: Bolded font represents within-population genetic distances.

表4 黄缘闭壳龟遗传变异的分子方差分析结果

Tab. 4 AMOVA analysis of genetic variation in populations of *Cuora flavomarginata*

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	遗传变异元素 Variance components	占总变异的比例(%) Percentage of variation	遗传分化系数 F_{ST}
群体间 Among population	7	12.730	0.164 09	14.94	
群体内 Within population	36	33.633	0.934 26	85.06	
总计 Total	43	46.364	1.098 34		0.149 39

2.4 黄缘闭壳龟群体间单倍型组成和分布

对9个单倍型进行分析,构建单倍型网络(图1)。在定义的9个单倍型中,共有5个共享单倍型,4个特有单倍型。共享单倍型分别为Hap1(在DY1和YW群体中共享)、Hap2(在YW、YS、HUZ和YK1

群体中共享)、Hap3(在YW、DY2、YS、HZ和YK2群体中共享)、Hap4(在DY1、DY2、HZ、HUZ和YK1群体中共享)和Hap8(在YS和YK1群体中共享),其余4个单倍型在不同群体中独有,Hap5和Hap9为YS群体独有,Hap6和Hap7为HUZ群体独有。

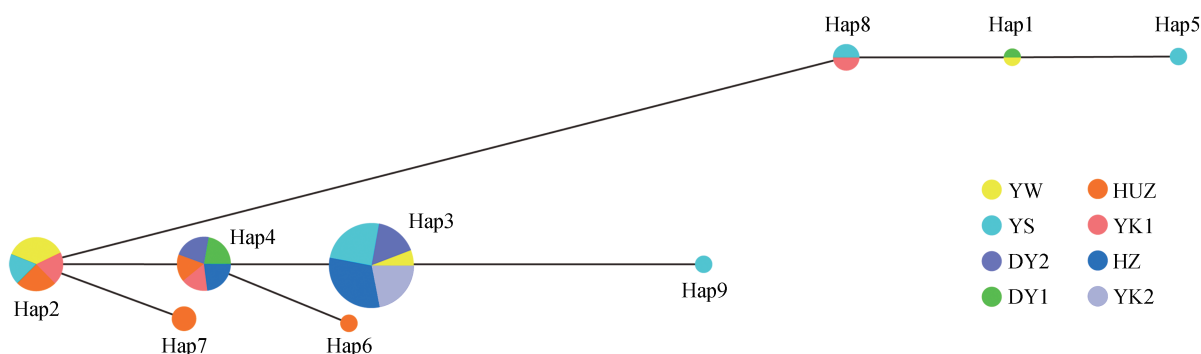


图1 基于线粒体DNA *COI*序列的黄缘闭壳龟单倍型网络关系

Fig. 1 Network of *Cuora flavomarginata* based on concatenated mtDNA *COI* sequences haplotypes

2.5 黄缘闭壳龟群体单倍型系统发育

基于线粒体 *COI* 基因序列的9个单倍型,以三

线闭壳龟(*C. trifasciata*)和潘氏闭壳龟(*C. pani*)为外群,构建NJ系统进化树。结果显示,8个黄缘闭壳龟

群体单倍型整体分为两个大分支,其中,Hap1、Hap5、Hap8和Hap7与黄缘闭壳龟(*C. flavomarginata*, KJ680321)线粒体基因组中的*COI*基因聚为一支;Hap3、Hap9、Hap6与NCBI数据库中的黄缘闭壳龟(*C. flavomarginata*, EU708434.1)线粒体基因聚为一

支(图2)。不同群体的单倍型混杂分布,并未呈现一定的地理规律。8个群体的单倍型遗传距离为0.001~0.011,其中Hap5和Hap9之间的遗传距离最大,为0.011(表5)。

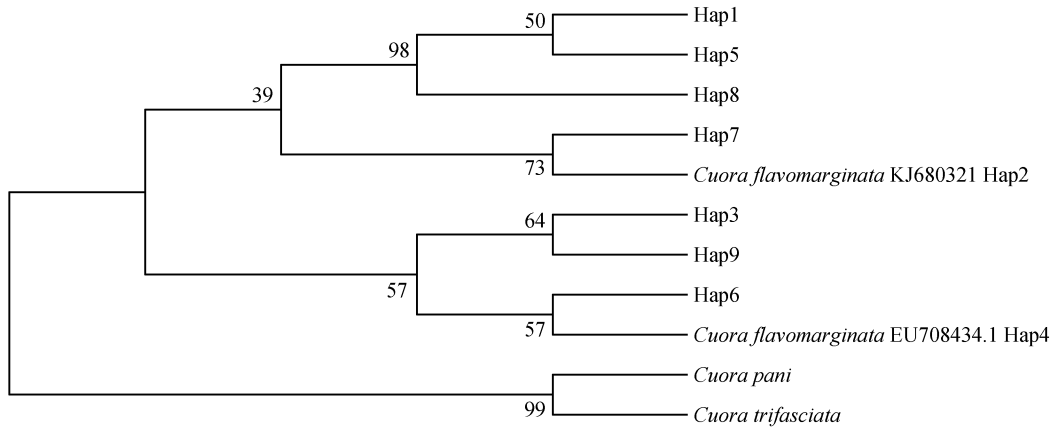


图2 基于*COI*序列构建的8个黄缘闭壳龟群体的单倍型NJ系统发育树

Fig. 2 Haplotype NJ phylogenetic tree of eight groups of *Cuora flavomarginata* constructed based on *COI* sequences

表5 基于*COI*基因序列黄缘闭壳龟群体单倍型间的遗传距离

Tab. 5 Genetic distance among eight haplotypes of *Cuora flavomarginata* population based on *COI* gene sequence

单倍型 Haplotype	Hap1	Hap5	Hap6	Hap7	Hap9	Hap3	Hap8	EU708434.1 (Hap4)	KJ680321 (Hap2)	<i>Cuora pani</i>
Hap1										
Hap5	0.001									
Hap6	0.008	0.009								
Hap7	0.007	0.008	0.003							
Hap9	0.010	0.011	0.004	0.005						
Hap3	0.008	0.009	0.002	0.003	0.002					
Hap8	0.001	0.002	0.007	0.006	0.009	0.007				
EU708434.1(Hap4)	0.007	0.008	0.001	0.002	0.003	0.001	0.006			
KJ680321(Hap2)	0.006	0.007	0.002	0.001	0.004	0.002	0.005	0.001		
<i>Cuora pani</i>	0.067	0.068	0.063	0.064	0.065	0.063	0.068	0.062	0.063	
<i>Cuora trifasciata</i>	0.058	0.060	0.054	0.055	0.056	0.054	0.060	0.053	0.054	0.028

2.6 黄缘闭壳龟种群历史动态

所有黄缘闭壳龟地理群体的中性检验(Tajiam's *D*和Fu' *F_s*)结果见表6。Tajiam's *D*检测中,除DY1、DY2和HZ群体外,其余群体的检测结果均为负值($p > 0.10$),且并未检测到种群扩张($p > 0.05$);Fu' *F_s*检测中,除DY1、DY2、YK1和HZ群体外,其余群体检测结

果均为负值($p > 0.05$)。核酸不匹配分布图(图3)显示,基于*COI*基因,8个浙江省内黄缘闭壳龟群体的错配分布曲线除DY1、DY2和YK2外,均未呈现明显的单峰模式,与中性检验结果大致吻合,表明检验结果偏离了中性模式,但并不显著($p > 0.05$)。总体上说,黄缘闭壳龟群体在历史上比较稳定,均未经历过种群扩张。

表6 黄缘闭壳龟群体的 Tajima' D 、Fu's F_S 结果Tab. 6 Tajima' D , Fu's F_S results of *Cuora flavomarginata* population

编号 Code	Tajima' D	Fu's F_S
YW	-1.192 67	-1.716
DY1	0	0
DY2	1.224 74	0.626
YS	-0.393 29	-0.292
HZ	0.333 50	0.536
HUZ	-0.144 27	-4.172
YK1	-0.746 82	1.342
YK2	-2.011 37	-1.162
合计 Total	-0.366 27	-0.605

3 讨论

3.1 黄缘闭壳龟线粒体 DNA *COI* 序列组成

本研究基于线粒体 *COI* 序列对浙江省 8 个黄缘闭壳龟群体的遗传多样性进行分析。在 44 条序列碱基组成中, A+T 碱基含量为 57.9%, G+C 碱基含量为 42.1%, 表现出明显的 AT 碱基偏倚性, 结果与王珏^[22]和张艳云等^[10]的研究相似, 而这也与大部分脊椎动物线粒体基因的编码模式^[23]一致。经本研究发现, 黄缘闭壳龟线粒体基因中的 A、T、C、G 分布呈现不均一性, 并且具有高含量 A+T 碱基的线粒体基因, 这也使得黄缘闭壳龟在进化中更具有优势^[24]。

3.2 黄缘闭壳龟群体遗传多样性分析

遗传多样性是物种进化和适应环境变化的基础, 遗传多样性水平越高, 种群对环境的适应能力越强, 种群则会有更好的发展^[25-26]。线粒体 DNA 的核苷酸多样性和单倍型多样性是衡量群体遗传多样性和遗传分化的重要指标^[27], 共同影响着种群进化历史。通过 Grant 等^[28]的研究可知, H_d 和 P_i 的临界值分别为 0.5 和 0.005, 数值越大, 表明一个群体的遗传多样性水平越高, 同时, 平均核苷酸差异数 (K) 越大, 遗传多样性也越丰富^[29]。本研究中, 8 个群体的平均单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 (0.799 00±0.210 00) 和 (0.002 09±0.001 47), 表明 8 个群体的遗传多样性水平处于中等。YS 群体的 H_d 和 P_i 分别为 (0.833 00±0.127 00) 和 (0.004 25±0.001 21), 在所有群体中 K 值最大, 为 4.388 89; 其次为 YW 群体, 其 H_d 和 P_i 分别为 (1.000 00±0.126 00) 和 (0.003 85±0.001 37), K 值为 4.000 00。由此可知, YS 群体的

遗传变异程度和遗传多样性水平在黄缘闭壳龟群体中最高, YW 群体次之。根据 Grant 等^[28]提出的关于单倍型多样性和核苷酸多样性的 4 种模式可知, 本研究中的 HZ 群体的 H_d 为 (0.429 00±0.169 00), P_i 为 (0.000 42±0.000 16), 属于低 H_d 低 P_i 模式, 由此可推知, 在 HZ 群体中可能发生了瓶颈效应或奠基者事件。除 HZ 群体, 本研究的其余群体均属于高 H_d 低 P_i 模式, 但在此 7 个群体中, 均未呈现明显的种群扩张, 意味着 7 个群体目前极有可能均处于瓶颈期。

3.3 黄缘闭壳龟群体遗传结构分析

基于线粒体 DNA *COI* 基因序列分析了浙江省内黄缘闭壳龟群体间的遗传距离和遗传分化。遗传距离在一定程度上影响着种群的遗传分化程度, 遗传距离大, 彼此亲缘关系远, 遗传分化程度就高^[30]。本研究中的 8 个黄缘闭壳龟群体中, 群体间遗传距离为 0~0.003, 而群体内的遗传距离为 0~0.004, 此结果意味着在不同的黄缘闭壳龟群体内部或已出现种的分化。其中, YS 群体内部的遗传距离最大, 为 0.004, 推测在 YS 黄缘闭壳龟群体内已经分化出黄缘闭壳龟浙江种。遗传分化系数 F_{ST} 作为群体遗传分化程度的重要衡量指标, 在群体遗传学中起到极为重要的作用, F_{ST} 可表示群体间分化程度^[31], 以 0.05、0.15 作为分化程度的标准, 本研究中的 AMOVA 分析结果表明, 8 个黄缘闭壳龟群体间的 F_{ST} 为 0.149 39, 小于 0.150 00, 为中等水平的遗传分化; 群体间变异仅占 14.94%, 而群体内变异为 85.06%, 即黄缘闭壳龟遗传变异主要来源于群体内部。此外, 本研究中的 8 个黄缘闭壳龟群体的 F_{ST} 指数为 -0.347 52~0.822 22, 其中 YS 群体与 HUZ 群体间存在较大遗传分化 ($F_{ST}=0.168 78$), 与 HZ 群体 ($F_{ST}=0.062 40$) 和 YK2 群体 ($F_{ST}=0.005 41$) 间遗传分化较小, 同时该群体与其他 4 个群体的 F_{ST} 值均小于 0, 表明 YS 群体内部个体间的遗传分化大于与其他群体间的遗传分化。

单倍型系统发育分析显示, 8 个黄缘闭壳龟群体并没有明显的地理聚群和谱系结构, 推测各群体内部存在广泛的基因交流, 没有形成明显的种群遗传结构。基于样本构建的 NJ 单倍型系统发育树 (图 2) 和单倍型遗传距离 (表 5) 显示, 安徽黄缘闭壳龟 (GenBank 登录号: EU708434.1) 与台湾黄缘闭壳龟 (GenBank 登录号: KJ680321) 之间的单倍型遗传距离为 0.001, 这与 2014 年潘冬冬^[32]的研究结果一致,

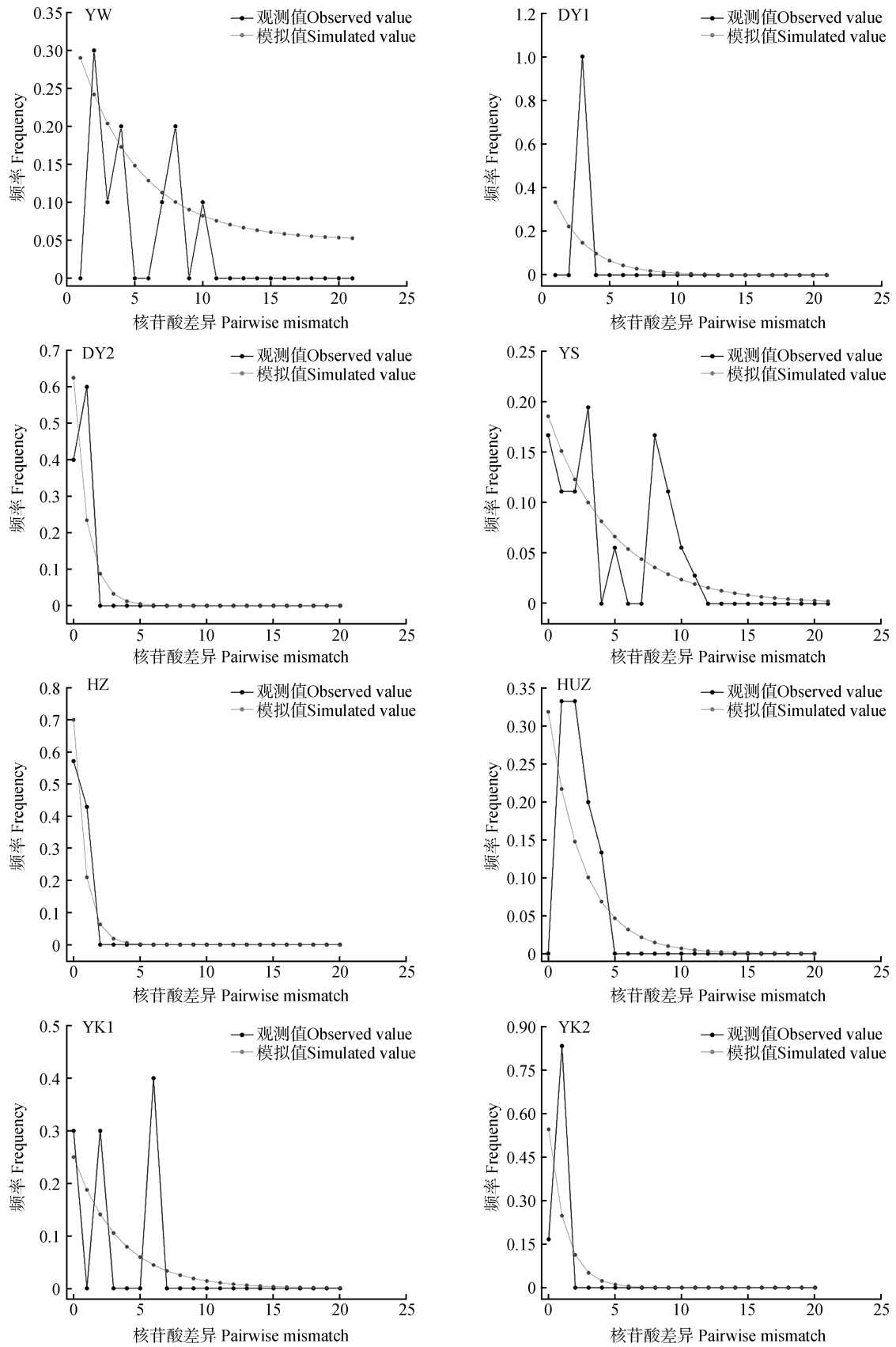


图3 基于COI基因的8个群体核苷酸不匹配分布

Fig. 3 Distribution of nucleotide mismatches in eight populations based on COI genes

同时根据该研究可知,虽然两者之间在遗传距离上并未产生显著分化,但在形态上已有显著差异,因此,极小的遗传距离可明确区分安徽黄缘闭壳龟与台湾黄缘闭壳龟。通过对黄缘闭壳龟种群进行Mantel相关性检验后,发现其 R 值小于0.7000($p > 0.05$),说明黄缘闭壳龟种群间的遗传分化并未有显著的地理隔离效应^[33]。

在本研究中,Hap1与Hap5、Hap1与Hap8之间的单倍型遗传距离均小于0.002,表明这3个单倍型个体间亲缘关系较近;Hap1、Hap5、Hap8与Hap7、台湾黄缘闭壳龟(KJ680321)聚为一支,而Hap7与台湾黄缘闭壳龟单倍型间的遗传距离小且仅为0.001,即二者亲缘关系较近,由此推测具有Hap1、Hap5和Hap8这3个单倍型之一的黄缘闭壳龟为台湾黄缘闭壳龟种群。Hap6与安徽黄缘闭壳龟(EU708434.1)聚为一支,且二者之间的单倍型遗传距离为0.001,即享有该单倍型的个体在很大程度上是来自安徽本地的黄缘闭壳龟。Hap9为YS群体的独有单倍型,且被YS群体中的1个个体独享,Hap9与Hap1、Hap5的单倍型遗传距离分别为0.010、0.011,同时,Hap9与安徽黄缘闭壳龟和台湾黄缘闭壳龟之间的单倍型遗传距离分别为0.003和0.004,均大于安徽黄缘闭壳龟与台湾黄缘闭壳龟之间的单倍型遗传距离,虽未达到根井正利^[34]所得出的亚种之间的遗传距离(0.02~0.20),但Hap9并未与其他单倍型聚为一支,且与其他单倍型的距离均较远,推测独享单倍型Hap9的YS黄缘闭壳龟为黄缘闭壳龟浙江种。此外,Hap3与Hap9聚为一小支,二者之间的遗传距离为0.002,且Hap3与Hap1、Hap5的遗传距离分别为0.008、0.009,由此表明单倍型为Hap3的黄缘闭壳龟群体可能为安徽黄缘闭壳龟与浙江黄缘闭壳龟的杂交种。

3.4 黄缘闭壳龟种群动态分析

核苷酸配对差异分析及中性检验是研究种群历史动态的有效检验方法^[35],可通过Tajima' D 和Fu's F_s 检验检测群体是否发生扩张,若检测结果为显著负值且核苷酸错配分布曲线呈单峰时,表明群体发生过扩张;若为双峰或多峰时,则表明群体一直保持相对稳定的状态,未经历过扩张^[26]。本研究基于COI序列的分析结果显示,黄缘闭壳龟8个群体中有5个群体的Tajima' D 和4个群体的Fu's F_s 为负值,但没有显著性差异($p > 0.05$),同时,除DY1、DY2和

YK2外,核苷酸错配分布图显示均为双峰或多峰形,DY2和HZ均为正值,DY1的Tajima' D 和Fu's F_s 均为0,上述研究结果表明,浙江省内8个黄缘闭壳龟群体没有经历过扩张,而是保持相对稳定的状态。

3.5 黄缘闭壳龟种质资源保护

黄缘闭壳龟具有较高的经济价值,近年来被大肆捕杀,导致野生种群数量急剧下降,黄斌等^[36]的研究结果显示,安徽省境内的野生黄缘闭壳龟分布面积日渐缩小,只在安徽大别山区存在少量野生个体。此外,由于黄缘闭壳龟繁殖力较低,同时对繁殖产卵的环境要求极高,随着山区旅游业和经济的发展,导致黄缘闭壳龟没有合适的繁衍环境,从根源上减少了野生黄缘闭壳龟的数量。目前,河南信阳已于2005年建立了黄缘闭壳龟救护中心,安徽省的黄缘闭壳龟繁育也已经形成较为成熟的生态技术模式^[32]。在本研究中,针对浙江省部分养殖场的黄缘闭壳龟群体和野生群体进行了遗传多样性调查,结果显示,黄缘闭壳龟整体遗传多样性较高,但部分群体遗传多样性仍旧较低,应更大力度加强对野生黄缘闭壳龟的保护。由于分布在不同地区的黄缘闭壳龟存在差异,所以应对不同地区的黄缘闭壳龟划分保护单元,防止种质混杂,对于野生黄缘闭壳龟可以进行栖息地保护,对种质资源进行合理利用,为黄缘闭壳龟的养殖及人工繁育提供理论指导。

参考文献:

- [1] 张方,周婷,黄成. 安徽黄缘闭壳龟(*Cuora flavomarginata*)野生种群的现状及其保护建议[J]. 生物学杂志, 2014, 31(2): 87-89.
ZHANG F, ZHOU T, HUANG C. The current status and protective measures on the wild yellow-margined box turtles in Anhui Province, China[J]. Journal of Biology, 2014, 31(2): 87-89.
- [2] Asian Turtle Trade Working Group. *Cuora flavomarginata*[J/OL]. [2024-01-21]. The IUCN red list of threatened species, 2000: e.T5960A97359069. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2000.RLTS.T5960A11965283.en>.
- [3] 国家林业局濒危物种进出口管理办公室. 濒危野生动植物种国际贸易公约附录I、附录II和附录III[EB/OL]. (2023-02-23)[2023-07-17]. http://www.cites.org/citesgy/fl/202302/t20230227_734178.html.
Office of Endangered Species Management. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora appendices I, II and III[EB/OL]. (2023-02-23)[2023-07-17]. http://www.cites.org/citesgy/fl/202302/t20230227_734178.html.

- [4] 生态环境部,中国科学院. 中国生物多样性红色名录: 脊椎动物卷(2020) [EB/OL]. [2024-01-21]. https://www.mee.gov.cn/xxgk/2018/xxgk/xxgk01/202305/t20230522_1030745.html. Ministry of Ecology and Environment, Chinese Academy of Sciences. China's red list of biodiversity: vertebrates (2020) [EB/OL]. [2024-01-21]. https://www.mee.gov.cn/xxgk/2018/xxgk/xxgk01/202305/t20230522_1030745.html.
- [5] 浙江省林业局. 浙江省重点保护陆生野生动物名录 [EB/OL]. [2023-07-17]. http://lyj.zj.gov.cn/art/2016/3/2/art_1275952_4795065.html. Zhejiang Forestry Department. Zhejiang Province terrestrial wild-life conservation list [EB/OL]. [2023-07-17]. http://lyj.zj.gov.cn/art/2016/3/2/art_1275952_4795065.html.
- [6] 黄勇. 黄缘闭壳龟繁殖孵化的研究 [J]. 水产养殖, 2020, 41(10): 38-40. HUANG Y. Study on breeding and hatching of *Cuora flavomarginata* [J]. Journal of Aquaculture, 2020, 41(10): 38-40.
- [7] 王立. 黄缘闭壳龟生态养殖技术探究 [J]. 农家参谋, 2018(5): 107. WANG L. Study on ecological culture technology of *Cuora flavomarginata* [J]. The Farmers Consultant, 2018(5): 107.
- [8] 杨贵强, 李文通, 林泉, 等. 黄缘闭壳龟主要形态性状与体质量的关系 [J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(6): 760-768. YANG G Q, LI W T, LIN Q, *et al.* Relationship between main morphometrics and body weight of Chinese box turtle *Cuora flavomarginata* with different ages [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(6): 760-768.
- [9] 张坤. 基于DNA分子标记的黄缘闭壳龟遗传多样性与种群遗传结构研究 [D]. 信阳: 信阳师范学院, 2017. ZHANG K. Genetic diversity and population genetic structure of *Cuora flavomarginata* based on DNA molecular markers [D]. Xinyang: Xinyang Normal University, 2017.
- [10] 张艳云, 毕婷婷, 宋娇莲, 等. 基于线粒体 *Cyt b* 基因的全长序列探讨闭壳龟类的系统进化 [J]. 生物学杂志, 2011, 28(1): 22-26; 45. ZHANG Y Y, BI T T, SONG J L, *et al.* Phylogenetic evolution of hinged turtles in China based on the complete mitochondrial cytochrome *b* gene sequences [J]. Journal of Biology, 2011, 28(1): 22-26; 45.
- [11] 郑将臣, 万全, 程起群, 等. 基于16S rRNA序列探讨龟鳖类的遗传分化和系统发生 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(2): 199-205. ZHENG J C, WAN Q, CHENG Q Q, *et al.* Genetic divergence and phylogeny of turtles inferred from mitochondrial DNA 16S rRNA sequence [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2011, 37(2): 199-205.
- [12] 荆胜利, 张坤, 黄小燕, 等. 黄缘闭壳龟微卫星分子标记的开发及遗传多样性分析 [J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2018, 31(4): 555-561. JING S L, ZHANG K, HUANG X Y, *et al.* Isolation and genetic diversity of microsatellite molecular markers in the yellow-margined box turtle (*Cuora flavomarginata*) [J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2018, 31(4): 555-561.
- [13] 郭旭升, 黄斌, 赵良杰, 等. 河南信阳黄缘闭壳龟省级自然保护区黄缘闭壳龟种群现状调查 [J]. 野生动物学报, 2017, 38(2): 280-284. GUO X S, HUANG B, ZHAO L J, *et al.* Population status of yellow-margined box turtle (*Cuora flavomarginata*) in Xinyang Provincial Nature Reserve, Henan [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2017, 38(2): 280-284.
- [14] 潘冬冬, 万全, 沈保平, 等. 安徽省黄缘盒龟资源现状及驯养繁育调查 [J]. 野生动物, 2013, 34(6): 349-354. PAN D D, WAN Q, SHEN B P, *et al.* Investigation on the status of resources, domestication and reproduction of yellow-margined box turtle in Anhui Province [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2013, 34(6): 349-354.
- [15] 董传举, 孔胜楠, 王蓉, 等. 黄缘闭壳龟生物学特性及种群分类研究进展 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2017, 45(4): 87-91. DONG C J, KONG S N, WANG R, *et al.* Research progresses of biological property and population classification of yellow-margined box turtle (*Cuora flavomarginata*) [J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2017, 45(4): 87-91.
- [16] 费潇鸣. 义乌小鲵种群资源调查、胚胎发育及遗传多样性研究 [D]. 金华: 浙江师范大学, 2020. FEI X M. *Hynobius yiwuensis* population resources investigation, embryonic development and genetic diversity research [D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2020.
- [17] 高嘉昕, 俞丹, 刘焕章. 基于 *Cyt b* 基因的长江中上游大鳞马口鱼遗传多样性及谱系生物地理学过程分析 [J]. 四川动物, 2021, 40(4): 361-373. GAO J X, YU D, LIU H Z. Genetic diversity and phylogeography of *Opsariichthys macrolepis* from the upper and middle Yangtze River based on cytochrome *b* sequences [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2021, 40(4): 361-373.
- [18] 赵良杰. 大眼华鲿遗传多样性和亲缘地理学研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012. ZHAO L J. Genetic diversity and phylogeographical pattern of *Sinibrama macrops* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [19] EXCOFFIER L, LISCHER H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 564-567.
- [20] 陈佳琪, 李潮, 张雯君, 等. 海南岛宽额鳊 (*Channa gachua*) 群体遗传变异与生物地理过程 [J]. 生态学报, 2019, 39(7): 2591-2602. CHEN J Q, LI C, ZHANG W J, *et al.* Genetic variation and phylogeography of *Channa gachua* in Hainan Island [J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(7): 2591-2602.

- [21] 任永丽. 基于 SSR 标记及 mt DNA 序列的塔里木裂腹鱼群体遗传多样性分析[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2020.
REN Y L. Genetic diversity of *Schizothorax biddulphi* based on SSR markers and mt DNA sequences[D]. Ala'ar: Tarim University, 2020.
- [22] 王珏. 基于线粒体基因组全序列的陆龟科分子系统学研究[D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2014.
WANG J. Molecular phylogenetic research for Testudinidae based on the mtDNA complete sequence[D]. Wuhu: Anhui Normal University, 2014.
- [23] MAYFIELD J E, MCKENNA J F. A-T rich sequences in vertebrate DNA. A possible explanation of q-banding in metaphase chromosomes[J]. *Chromosoma*, 1978, 67(2): 157-163.
- [24] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [25] MEYER A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes [J]. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 1993, 2: 1-38.
- [26] 赵文浩, 易少奎, 苏君晓, 等. 新疆塔里木河叶尔羌高原鳅遗传多样性研究[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(3): 364-374.
ZHAO W H, YI S K, SU J X, *et al.* Genetic diversity of *Triplophysa yarkandensis* populations in Tarim River Basin in Xinjiang [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(3): 364-374.
- [27] 闫华超, 高岚, 付崇罗, 等. 鱼类遗传多样性研究的分子学方法及应用进展[J]. *水产科学*, 2004, 23(12): 44-48.
YAN H C, GAO L, FU C L, *et al.* Molecular methods and advances on genetic diversity evaluation in fish [J]. *Fisheries Science*, 2004, 23(12): 44-48.
- [28] GRANT W, BOWEN B. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415-426.
- [29] 李芬, 陈绮萍, 何佩莹, 等. 北江大刺鳅 (*Mastacembelus armatus*) 的核型分析及线粒体 *Cyt b* 基因和 D-loop 的遗传多样性 [J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(2): 449-454.
LI F, CHEN Q P, HE P Y, *et al.* The karyotype pattern and genetic diversity of mitochondrial DNA *Cyt b* gene and D-loop sequence in *Mastacembelus armatus* Beijiang River, south China [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(2): 449-454.
- [30] 纪达, 许劲松, 姚俊杰, 等. 贵州省5个金背鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jinbei*) 地理种群的遗传多样性与遗传结构分析 [J]. *水产学杂志*, 2022, 35(5): 8-17.
JI D, XU J S, YAO J J, *et al.* Genetic diversity and genetic structure analysis of five geographical populations of Jinbei common carp (*Cyprinus carpio* var. *jinbei*) in Guizhou Province [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2022, 35(5): 8-17.
- [31] ARIS-BROUSO S, EXCOFFIER L. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13(3): 494-504.
- [32] 潘冬冬. 安徽黄缘盒龟资源现状调查、驯养繁育技术及线粒体 DNA 比较研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
PAN D D. Research in wildlife resources, breeding technology and comparative study of the complete mitochondrial genome of *Cistoclemmys flavomarginata* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2014.
- [33] DIXON P. VEGAN, a package of R functions for community ecology [J]. *Journal of Vegetation Science*, 2003, 14(6): 927-930.
- [34] 根井正利. 分子群体遗传学与进化论[M]. 王家玉, 译. 北京: 农业出版社, 1983: 169-201.
MASATOSHI N. Molecular population genetics and evolution [M]. WANG J Y, trans. Beijing: Agriculture Press, 1983: 169-201.
- [35] 任永丽, 代金彩, 赵年桦, 等. 基于线粒体 *COII* 和 *ND4* 基因序列的塔里木裂腹鱼群体遗传多样性分析 [J]. *水产学报*, 2022, 46(12): 2274-2285.
REN Y L, DAI J C, ZHAO N H, *et al.* Genetic diversity analysis of *Schizothorax biddulphi* based on mitochondrial DNA *COII* and *ND4* genes [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(12): 2274-2285.
- [36] 黄斌, 方宇森, 张丽. 野生黄缘闭壳龟资源分布与濒危机制研究 [J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2019, 32(1): 74-81.
HUANG B, FANG Y S, ZHANG L. Study on the resource distribution and endangered mechanism of wild *Cuora flavomarginata* [J]. *Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 32(1): 74-81.