

基于 DNA 分子标记的潘氏闭壳龟 遗传多样性分析

李妹妹^① 罗平钊^② 陈德辉^① 史海涛^① 林柳^{①*}

^① 海南师范大学生命科学学院, 热带岛屿生态学教育部重点实验室,
海南省热带动植物生态学重点实验室 海口 571158; ^② 西南山地 成都 610000

摘要: 潘氏闭壳龟 (*Cuora pani*) 是中国特有种, 国家二级重点保护野生动物。由于非法贸易加之栖息地破坏等, 其野外种群数量十分稀少。本研究旨在利用线粒体基因与核基因标记揭示潘氏闭壳龟的遗传多样性和遗传结构, 以期为中国潘氏闭壳龟的种群保护和管理提供科学依据。本次共研究 14 只潘氏闭壳龟个体, 其中, 6 只原产地为四川广元, 8 只产地未知。结果表明, 在 14 只潘氏闭壳龟样本中鉴定出 Cyt *b* 单倍型、ND4 单倍型和 R35 单倍型各 2 个, 且均有 1 个新单倍型; Cyt *b*、ND4 和 R35 基因单倍型多样性分别为 0.440、0.143 和 0.154, 核苷酸多样性分别为 0.000 41、0.000 19 和 0.000 63; 各单倍型的平均遗传距离 (p) 均小于 0.01。基于三个基因联合数据集的系统发育分析表明, 潘氏闭壳龟与金头闭壳龟 (*C. aurocapitata*) 互为单系进化支, 且中性检测和核苷酸错配分析显示, 潘氏闭壳龟群体近期历史上可能未经历群体扩张事件。潘氏闭壳龟群体遗传多样性低, 种内变异小, 群体应对环境变化的能力低, 建议应加强对中国潘氏闭壳龟野外种群的基础研究和保护力度, 同时规范人工繁殖, 以避免近亲繁殖和种群衰退。

关键词: 潘氏闭壳龟; 线粒体 Cyt *b* 基因; ND4 基因; R35 基因; 遗传多样性

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 01-126-09

Genetic Diversity Analysis of Pan's Box Turtle *Cuora pani* Based on DNA Molecular Markers

LI Mei-Mei^① LUO Ping-Zhao^② CHEN De-Hui^① SHI Hai-Tao^① LIN Liu^{①*}

^① Ministry of Education Key Laboratory for Ecology of Tropical Islands, Key Laboratory of Tropical Animal and Plant Ecology of Hainan Province, College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158; ^② Southwest Wild Studio, Chengdu 610000, China

Abstract: [Objectives] The Pan's Box Turtle (*Cuora pani*) is endemic to China and listed under level-II protection on the "List of Wildlife under Special State Protection". Due to illegal trade and habitat destruction, its wild population is quite small. The aim of this study was to reveal the genetic diversity and genetic

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31960101, 32170532);

* 通讯作者, E-mail: kylelinliu@163.com;

第一作者介绍 李妹妹, 女, 硕士; 研究方向: 动物生态学; E-mail: 18876818506@163.com.

收稿日期: 2022-08-31, 修回日期: 2022-11-12 DOI: 10.13859/j.cjz.202301012

structure of *C. pani* by using mitochondrial and nuclear gene markers, so as to provide suggestions on population protection and management for *C. pani* in China. **[Methods]** In this study, *Cyt b*, ND4 and R35 genes were sequenced from 14 individuals, including 6 from Guangyuan, Sichuan and 8 of unknown origin. Nucleotide and haplotype diversity and group history dynamics of the samples were determined using DnaSP 5.0 software. The MEGA-X software was used to calculate the variable site, parsimony information site, genetic distance and base content of the sequence, and all haplotypes based on the Kimura 2-parameter model to build maximum likelihood tree. **[Results]** Results showed that two *Cyt b*, ND4 and R35 haplotypes were identified in the 14 samples and one new haplotype was identified in each gene (Table 3). The haplotype and nucleotide diversity of each gene marker were *Cyt b* (haplotype diversity 0.440, nucleotide diversity 0.000 41), ND4 (0.143, 0.000 19) and R35 (0.154, 0.000 63) (Table 4). The average genetic distance (p) of each haplotype was less than 0.01. Phylogenetic analysis based on the three combined gene datasets showed that *C. pani* and *C. aurocapitata* were monophyletic clades. Neutral detection and nucleotide mismatch analysis showed that *C. pani* populations may not have experienced population expansion events in recent history (Fig. 2). **[Conclusion]** The population of *C. pani* has low genetic diversity, small intraspecific variation and low ability to cope with environmental changes. Therefore, it is suggested that the basic research and protection of the wild population of *C. pani* in China should be strengthened, and artificial breeding should be regulated to avoid inbreeding and population recession.

Key words: *Cuora pani*; mtDNA *Cyt b* gene; ND4 gene; R35 gene; Genetic diversity

由于人类活动干扰严重, 野生动物的生存环境不断丧失或片段化, 龟类种群正在急剧下降。亚洲龟类因人为的大量非法捕猎, 其种群危机更为突出 (Gong et al. 2009, 张艳云等 2011, Wang et al. 2021), 闭壳龟属 (*Cuora*) 是其中最为濒危的类群, 爬宠市场对其需求量大, 在中国香港和内地以及东南亚的市场上能够卖出极高的价格 (张艳云等 2011)。潘氏闭壳龟 (*C. pani*) 是中国特有种, 1981 年首次在陕西平利县发现 (宋鸣涛 1984), 此后陆续在四川广元县 (李东 2000)、河南信阳 (黄斌等 2011) 以及云南南部 (疑似) (周婷等 2009) 有发现的记录, 但野外种群数量十分稀少 (李东 2000, 黄斌等 2011)。目前潘氏闭壳龟已被列入世界自然保护联盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 濒危物种红色名录的极危级 (critically endangered, CR) 和《濒危野生动植物国际种贸易公约》附录 II, 我国于 2021 年将其由“三有”动物提升为国家二级重点保护野生动物, 但仅限野生种群 (国

家林业与草业局 2021)。

除上述分布记录外, 有关潘氏闭壳龟的研究很少, 且主要围绕潘氏闭壳龟与其他闭壳龟之间的系统进化关系及其分类地位。由于潘氏闭壳龟与金头闭壳龟 (*C. aurocapitata*) 和三线闭壳龟 (*C. trifasciata*) 的形态相似, 遗传分化小, 曾一度认为潘氏闭壳龟与金头闭壳龟是同一个物种, 亦或潘氏闭壳龟与金头闭壳龟和三线闭壳龟是来自同一个母系的杂交产物 (McCord et al. 1991, Honda et al. 2002, Spinks et al. 2004, Stuart et al. 2004, Blanck et al. 2005)。但后期结合线粒体基因和核基因分析, 明确了潘氏闭壳龟、金头闭壳龟和三线闭壳龟各自为独立种的地位 (Spinks et al. 2007, 2012, Li et al. 2015)。

遗传多样性是一个物种的重要特征, 反映其适应环境变化的潜力。但目前针对潘氏闭壳龟的遗传多样性尚无报道, 该物种的生存状况和进化潜力未知。本研究利用线粒体基因和核基因分子标记对近期采集的潘氏闭壳龟样本进

行遗传多样性、遗传分化和历史动态分析，以期为中国潘氏闭壳龟的种群保护和管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

本研究中潘氏闭壳龟的样本共计 14 份，分别于 2018 至 2020 年期间采自上海、四川南充和成都的养殖户（均有水生野生动物驯养繁殖许可证，属于合法饲养范畴），其中，6 只原产地为四川广元，其余 8 只产地未知，样本编号为 CP1 ~ CP14。个体背甲长 10.5 ~ 22.0 cm，背甲宽 7.8 ~ 15.5 cm，体重 0.155 ~ 1.350 kg。采用非损伤式取样方法，即用口腔取样拭子（SW-FS740, Swwip）采集潘氏闭壳龟的口腔唾液样本，置于 -20 °C 冰箱中保存。

1.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增和序列测定

使用专用口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司，DP362）提取所有样本的 DNA。分别使用 3 对引物扩增线粒体基因 *Cyt b*、ND4 和核基因 R35 的目标序列（表 1）。无菌去离子水溶解引物于离心管，于 -20 °C 下保存。

线粒体基因 *Cyt b* 和 ND4 的 PCR 扩增体系为 25 μ l：2 \times *Taq* Mix（RN03001S，MonAmpTM）6.2 μ l，模板 DNA 1 μ l，10 μ mol/L 的正反向引物各 1 μ l，用无菌去离子水补足至 25 μ l。*Cyt b* 基因 PCR 反应条件为：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 45 s，46 °C 退火 45 s，72 °C

延伸 80 s，循环 35 次；72 °C 延伸 7 min。ND4 基因 PCR 反应条件为：95 °C 预变性 10 min；95 °C 变性 30 s，60 °C 退火 45 s，72 °C 延伸 45 s，循环 35 次；72 °C 延伸 10 min。

核基因 R35 的 PCR 扩增体系为 50 μ l：2 \times *Taq* Mix 25 μ l，模板 DNA 2 μ l，10 μ mol/L 的正反向引物各 2 μ l，用无菌去离子水补足至 50 μ l。PCR 反应条件为：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 45 s，58 °C 退火 45 s，72 °C 延伸 60 s，循环 40 次；72 °C 延伸 7 min。

目的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后，将获得的 PCR 产物送至广州艾基生物技术有限公司纯化并测序。

1.3 数据分析

所得序列用 DNASTar 7.0 软件的 SeqMan 处理，结合峰图进行人工校对，确保每一个位点准确。采用分子进化遗传分析软件 MEGA-X，计算不同序列间的可变位点、简约信息位点、遗传距离及各碱基含量。使用 DnaSP 5.0 软件确定样本的核苷酸和单倍型多样性；为探究其种群历史动态，进行 Fu's *F_s* 和 Tajima's *D* 中性检验及错配分布分析，以评估其群体是否发生种群扩张。为了解潘氏闭壳龟的系统发生关系，基于 *Cyt b*、ND4 和 R35 三个基因联合数据集的单倍型，利用 MEGA-X 软件以最大似然法（maximum likelihood, ML），基于 Kimura 双参数（Kimura 2-parameter）模型构建系统发育树，由 1 000 次自举重复检测最大似然树各分枝的置信度。

表 1 潘氏闭壳龟线粒体基因及 R35 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of mitochondrial gene and R35 gene in *Cuora Pani*

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	基因 Gene	产物长度 Product length (bp)	参考文献 Reference
Cyt <i>b</i> G	AACCATCGTTGT (A/T) ATCAACTAC	<i>Cyt b</i>	1 140	Shaffer et al. 1997
THR-8	GGTTTACAAGACCAATGCTT			
L-ND4	GTAGAAGCCCCAATCGCAG	ND4	890	Stuart et al. 2004
H-Leu	ATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA	R35	1 000	郑将臣等 2011 Zheng et al. 2011
R35Ex1	ACGATTCTCGCTGATTCTGC			
R35Ex2	GCAGAAAAGTGAATGTCTCAAAGG			

2 结果

2.1 序列组成

除了 CP14 样本 R35 基因序列扩增失败外, 其他样本均扩增出了所需目标序列。经序列对齐, 共获得潘氏闭壳龟的 14 条 *Cyt b* 序列 (1 071 bp)、14 条 ND4 序列 (760 bp) 和 13 条 R35 序列 (979 bp)。

各基因变异位点数及碱基组成见表 2。 *Cyt b* 和 ND4 基因的 A + T 碱基平均含量均高于 C + G 碱基平均含量, 表现出较强的 A/T 碱基偏倚性, 符合脊椎动物线粒体 DNA 序列特征。在

Cyt b、ND4 和 R35 序列中共发现 6 个变异位点, 变异率为 0.63%。

2.2 单倍型及遗传多样性分析

在 14 个样本中鉴定出 *Cyt b* 单倍型、ND4 单倍型以及 R35 单倍型各 2 个 (表 3)。3 个基因的单倍型多样性范围在 0.143 ~ 0.440 之间, 核苷酸多样性范围在 0.000 19 ~ 0.000 63 之间; 分析 *Cyt b*、ND4 和 R35 三个基因的联合数据集 (2 810 bp), 共鉴定出 4 种单倍型, 单倍型多样性为 0.654, 核苷酸多样性为 0.000 44 (表 4)。

表 2 3 个基因变异位点数及碱基组成

Table 2 Number of mutation sites and base composition of 3 genes

基因 Gene	简约信息位点数 Number of parsimony - informative site	单一变异位点数 Number of single variant site	碱基含量 Base content (%)			
			T	C	A	G
<i>Cyt b</i>	1	0	27.54	32.03	27.57	12.86
ND4	0	1	25.79	26.18	35.65	12.38
R35	0	4	32.48	17.69	27.87	21.96

表 3 潘氏闭壳龟采样点信息、样本数目、单倍型

Table 3 The localities, numbers and haplotypes of *Cuora pani*

采样地点 Locality	样本数 Sample number (ind)	样本编号 Sample ID	原产地 Place of origin	性别 ♀ ♂	基因单倍型 Haplotypes		
					<i>Cyt b</i>	ND4	R35
上海 Shanghai	4	CP2	四川广元 Guangyuan, Sichuan	♀	CPC1	CPN1	CPR1
		CP3	未知产地 Unknown origin	♀	CPC1	CPN1	CPR1
		CP4	四川广元 Guangyuan, Sichuan	♀	CPC2*	CPN1	CPR1
		CP5	四川广元 Guangyuan, Sichuan	♂	CPC1	CPN1	CPR1
四川南充 Nanchong, Sichuan	2	CP1	四川广元 Guangyuan, Sichuan	♀	CPC2*	CPN1	CPR1
		CP6	四川广元 Guangyuan, Sichuan	♂	CPC2*	CPN1	CPR1
四川成都 Chengdu, Sichuan	8	CP7	未知产地 Unknown origin	♀	CPC1	CPN1	CPR1
		CP8	未知产地 Unknown origin	♂	CPC1	CPN1	CPR1
		CP9	可能四川广元 May be Guangyuan, Sichuan	♂	CPC1	CPN1	CPR1
		CP10	可能四川广元 May be Guangyuan, Sichuan	♂	CPC1	CPN1	CPR2*
		CP11	可能湖北郧西 May be Yunxi, Hubei	♀	CPC1	CPN1	CPR1
		CP12	四川广元 Guangyuan, Sichuan	♀	CPC2*	CPN1	CPR1
		CP13	未知产地 Unknown origin	♂	CPC1	CPN2*	CPR1
		CP14	未知产地 Unknown origin	♀	CPC1	CPN1	—

* 为新单倍型, — 代表缺失。* stands for the new haplotype, — stands for missing.

表 4 潘氏闭壳龟遗传多样性参数

Table 4 Genetic diversity parameters of *Cuora pani*

基因 Gene	样本数 Sample number (ind)	单倍型数 Number of haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	平均核苷酸差异数 Average nucleotide difference number (<i>k</i>)
Cyt <i>b</i>	14	2	0.440	0.000 41	0.440
ND4	14	2	0.143	0.000 19	0.143
R35	13	2	0.154	0.000 63	0.615
Cyt <i>b</i> + ND4 + R35	13	4	0.654	0.000 44	1.231

Cyt *b* 基因最常见的单倍型是 CPC1 单倍型, 10 只个体为此单倍型, 有 4 只原产地为四川广元的潘氏闭壳龟个体拥有单倍型 CPC2, 且该单倍型为本次调查新发现。ND4 基因最常见的单倍型是 CPN1 单倍型, 13 只个体为此单倍型, 单倍型 CPN2 为本次调查新发现。R35 基因最常见的单倍型是 CPR1 单倍型, 12 只个体为此单倍型 ($n = 13$), 单倍型 CPR2 为本次调查新发现, 并未在 GenBank 中找到相同序列。

结合本研究及 NCBI 上已发表的潘氏闭壳龟 Cyt *b*、ND4 和 R35 基因序列, 目前潘氏闭壳龟的线粒体 Cyt *b* 基因有 2 个单倍型, 共 16 只个体, 其中 12 只个体为 CPC1 单倍型, 4 只个体为 CPC2 单倍型; ND4 基因有 3 个单倍型, 共 18 只个体, 其中 15 只个体为 CPN1 单倍型、1 只个体为 CPN2 单倍型、2 只个体为 CPN3 单倍型; 核基因 R35 有 3 个单倍型, 共 17 只个体, 其中 15 只个体为 CPR1 单倍型, CPR2 和 CPR3 单倍型各 1 只个体 (表 5)。

表 5 中国潘氏闭壳龟的各基因单倍型和个体数量

Table 5 Gene haplotypes and individual numbers of *Cuora pani*

基因 Gene	单倍型数 Number of haplotypes	单倍型 Haplotype	个体数 Individual number (ind)	登记号 Register number	标本号 The specimen number	参考文献 References
Cyt <i>b</i>	2	CPC1	1	AY434574	HBS38393	Spinks et al. 2004
			1	JN860651	ANUM26080313	张艳云等 2011 Zhang et al. 2011
			10	OP320724	No	本研究 This study
		4	OP320725	No		
ND4	3	CPN1	1	EF011367	HBS41890	Spinks et al. 2007
			1	EF011368	HBS41896	
			13	OP320726	No	本研究 This study
		1	OP320727	No		
		1	AY364607	MVZ230512	Spinks et al. 2007	
		1	AY590461	MVZ230513		
R35	3	CPR1	1	EF011441	HBS41890	Spinks et al. 2007
			1	EF011442	HBS41896	
			1	MT961258	HBS117865	Spinks et al. 2012
			12	OP320728	No	本研究 This study
		1	OP320729	No		
		CPR3	1	JN860584	ANUM26080313	张艳云等 2011 Zhang et al. 2011

2.3 群体遗传分化

Cyt *b* 基因 2 个单倍型之间的遗传距离为 0.000 935; ND4 基因 2 个单倍型之间的遗传距离为 0.001 32; R35 基因 2 个单倍型之间的遗传距离为 0.004 10。说明 R35 单倍型间的遗传分化程度较 Cyt *b* 和 ND4 单倍型高。

基于三个基因联合数据集(表 6)构建最大似然树(图 1), 本研究的 4 种单倍型(LH-Hap1、LH-Hap2、LH-Hap3 和 LH-Hap4)和 Spinks 等(2004, 2007)已确定的潘氏闭壳龟单倍型共同聚成单独一个支系, 潘氏闭壳龟与金头闭壳龟和三线闭壳龟的关系最近, 随

后依次与周氏闭壳龟(*C. zhoui*)、百色闭壳龟(*C. mccordi*)和马来闭壳龟(*C. amboinensis*)相聚。

2.4 群体动态历史

基于 Cyt *b*、ND4 和 R35 三个基因联合数据集的潘氏闭壳龟 Fu's *F_s* 值为 -0.063 ($P > 0.05$), Tajima's *D* 值为 -1.342 09 ($P > 0.05$), Fu's *F_s* 和 Tajima's *D* 值均为负值但无显著差异。潘氏闭壳龟三个基因联合数据集的核苷酸错配分布图(图 2)呈现双峰。结合中性检测和核苷酸错配分布图, 表明潘氏闭壳龟群体历史上可能未经历群体扩张事件。

表 6 构建系统进化树所用物种序列

Table 6 Species sequences numbers used to construct the phylogenetic tree

物种 Species	Cyt <i>b</i>	ND4	R35
三线闭壳龟 <i>Cuora trifasciata</i>	AY434627	EF011370	EF011445
马来闭壳龟 <i>C. amboinensis</i>	JN232524	EF011357	EF011429
金头闭壳龟 <i>C. aurocapitata</i>	AY434626	AY364606	EF011430
百色闭壳龟 <i>C. mccordi</i>	AY434568	EF011363	EF011438
周氏闭壳龟 <i>C. zhoui</i>	AY434584	EF011401	EF011463
潘氏闭壳龟 <i>C. pani</i>	AY434574	EF011367	EF011441
马来鳖 <i>Dogania subplana</i>	AY259551	AY259601	AY259576

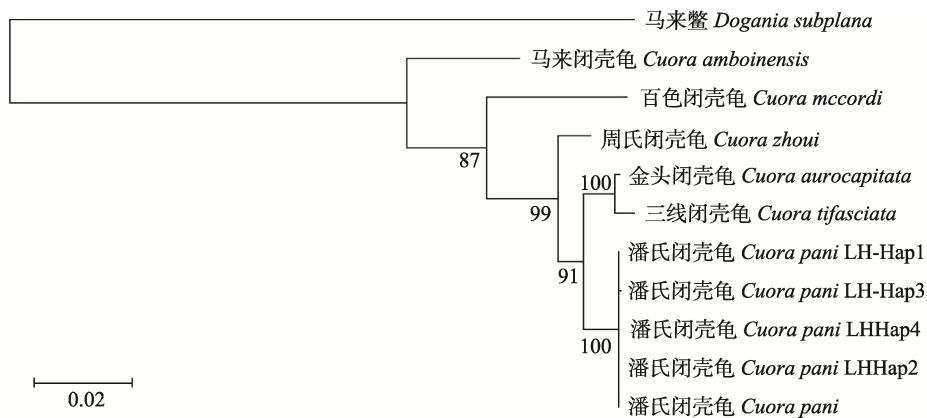


图 1 基于 Cyt *b*、ND4 和 R35 三个基因联合数据集(2 766 bp)构建的最大似然树

Fig. 1 A maximum likelihood tree based on the combined Cyt *b*, ND4 and R35 data set (2 766 bp)

图中“LH-Hap”表示本次研究发现的潘氏闭壳龟单倍型, 其后的编号代表单倍型的编号; 各分支上数字为对应节点的 Bootstrap 支持率(1 000 次重复)。

In the figure, “LH-Hap” represents the haplotype of *Cuora pani* found in this study, and the subsequent numbers represent the haplotype numbers. The number on each branch is the bootstrap support rate of the corresponding node (1 000 repetitions).

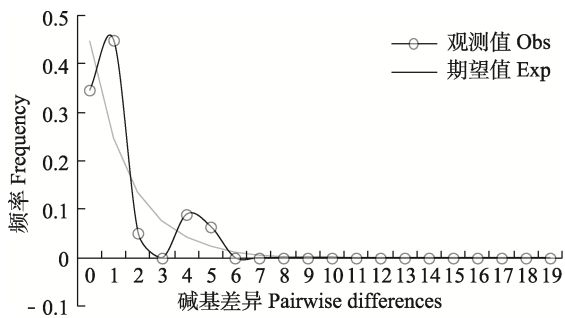


图2 基于 *Cyt b*、ND4 和 R35 三个基因联合数据集的潘氏闭壳龟核苷酸错配分布图

Fig. 2 Nucleotide mismatch distribution of *Cuora pani* based on the combined *Cyt b*, ND4 and R35 data set

3 讨论

Spinks 等 (2012) 基于核基因, 发现潘氏闭壳龟和金头闭壳龟互为单系进化支; Li 等 (2015) 基于 12 个蛋白质编码基因, 发现潘氏闭壳龟和金头闭壳龟在其系统发育上形成了单独的进化支, 且互为姐妹群。本研究基于线粒体基因 *Cyt b*、ND4 和核基因 R35 联合数据集, 发现潘氏闭壳龟与金头闭壳龟互为单系进化支, 与前人的研究结论一致, 支持潘氏闭壳龟是独立物种并与金头闭壳龟是相互单系的姐妹群。

遗传多样性是揭示物种适应环境压力的内在指标, 总体上, 高遗传多样性代表着对环境变化的适应能力较高, 低遗传多样性则可能预示着种群有衰退甚至灭绝的风险 (Richardson et al. 2014)。单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π) 是衡量物种或种群线粒体 DNA 变异程度的 2 个重要指标, 其值越大, 表明群体的遗传多样性就越高 (Hughes et al. 2008)。本研究中, 潘氏闭壳龟的 *Cyt b*、ND4 和 R35 三个基因均展现出低的单倍型多样性和核苷酸多样性, 其单倍型遗传距离为 0.000 935 ~ 0.004 100; 在这三个基因联合数据集的分析中, 也发现了较低的核苷酸多样性 (0.000 440), 表明目前中国潘氏闭壳龟群体的遗传多样性处于低水平,

种群存在衰退现象, 面临较高的灭绝风险。这与其野外种群数量十分稀少, 可获得样本数量小有关。非法贸易和生境破坏是造成潘氏闭壳龟数量显著下降的主要原因 (张艳云等 2011), 尽管国际上很早就将潘氏闭壳龟列为 IUCN 极危级物种, 但在中国长期作为“三有”物种, 得不到足够的重视和有效保护。昂贵的价格导致其遭受严重的非法捕猎, 加之栖息地生境因河道挖沙、水质污染等因素被严重破坏, 在野外几乎绝迹 (巫嘉伟等 2004, 黄斌等 2011)。因此迫切需要加强对潘氏闭壳龟种群资源及其遗传多样性的保护研究。本文建议后续应开展针对性的野外种群及其生境调查, 扩大调查范围, 增加样本数量, 以全面掌握潘氏闭壳龟的种群生存现状及主要威胁因素。此外, 加大对潘氏闭壳龟个体及其制品非法贸易的监管和打击力度, 加强对人工繁育的审批和监管, 避免对野外种群的持续捕捉。

在本研究采集的 14 个潘氏闭壳龟样本中, 有 6 只确定来自于四川省广元市, 余下的 8 只个体, 虽然产地未知, 但多数与来自广元的个体共享 *Cyt b* 单倍型 CPC1, ND4 单倍型 CPN1 (除了 CP13 样本) 及 R35 单倍型 CPR1 (除 CP10 样本)。因此, 未知产地的潘氏闭壳龟个体, 可能也来自四川广元及其周边地区, 或虽然来自其他地区, 但其基因单倍型种类与广元种群相同, 如 CP11 个体, 可能产自湖北郧西县, 其三种基因单倍型种类与产自广元的 CP2 和 CP5 相同。已知潘氏闭壳龟模式产地为陕西平利县 (宋鸣涛 1984), 而湖北郧西县与陕西平利县相距约 100 km, 因此不同地理种群的潘氏闭壳龟可能遗传差异不大, 后续仍需补充更多确切来源地的样本以揭示其遗传多样性特点和种群差异。

潘氏闭壳龟自命名后在陕西省平利县再无野外发现记录, 而河南信阳自 2011 年发现野生个体后也再无新的发现报道 (黄斌等 2011), 仅四川广元市有 1999 年和 2002 年的两次调查记录并证实潘氏闭壳龟在广元地区曾经比较常

见(李东 2000, 巫嘉伟等 2004)。因此, 结合本研究的样本来源及基因型, 我们认为四川广元及其周边区域可能是中国潘氏闭壳龟最主要的分布区, 后期应尽快对这一区域开展系统深入的野外调查, 确认其野外分布地和种群现状, 并及时采取针对性的保护措施。此外, 进一步调查陕西平利县和河南信阳及其周边地区, 明确潘氏闭壳龟在中国的野外分布及种群资源现状, 为更好地保护该濒危物种提供科学依据。

因野外数量稀少, 潘氏闭壳龟的现有个体多在养殖户手中。周婷等(2009)的调查数据表明, 至 2006 年 6 月, 中国潘氏闭壳龟人工驯养繁育种群仅 49 只, 年繁育龟苗 50 只以内。近年来潘氏闭壳龟的繁殖数量已有显著增加, 本研究初步了解表明, 每年在四川、陕西、湖北、江苏、上海以及浙江等地部分养殖户(均有水生野生动物驯养繁殖许可证)繁殖的潘氏闭壳龟数量已达 270 只, 且均已成功繁育出子二代, 加之还有不少省市数据未调查, 估计全国年繁育幼苗可能达 500 只。但目前潘氏闭壳龟人工繁殖的主要问题是未区分产地进行混养, 可能导致基因污染。为避免此问题, 本文建议后期在开展潘氏闭壳龟人工繁育时, 应区分产地进行养殖, 并选择遗传距离较远的个体或不同单倍型进行配对, 以保持潘氏闭壳龟群体的遗传多样性; 后续研究应针对潘氏闭壳龟人工繁殖种群开展系统研究, 掌握其人工繁育现状及其种群遗传多样性, 为该物种有效保护管理提供科学依据。

致谢 感谢李东、张建春、陈治、金瑶和殷剑在样品采集中提供的帮助。

参 考 文 献

- Blanck T, Tang M. 2005. Ein neuer fundort von *Cuora pani* Song, 1984 mit Diskussion über den taxonomischen Status von *Cuora pani* und *Cuora aurocapitata*. *Sacalia*, 20(3): 16–37.
- Gong S, Chow A T, Fong J J, et al. 2009. The chelonian trade in the largest pet market in China: scale, scope and impact on turtle conservation. *Oryx*, 43(2): 213–216.
- Honda M, Yasukawa Y, Hirayama R. 2002. Phylogenetic relationships of the Asian box turtles of the genus *Cuora* sensu lato (Reptilia: Bataguridae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zoological Science*, 19(11): 1305–1312.
- Hughes A R, Inouye B D, Johnson M T J, et al. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6): 609–623.
- Li W, Zhang X C, Zhao J, et al. 2015. Complete mitochondrial genome of *Cuora trifasciata* (Chinese Three-striped Box Turtle), and a comparative analysis with other box turtles. *Gene*, 555(2): 169–177.
- McCord W P, Iverson J B. 1991. A new box turtle of the genus *Cuora* (Testudines: Emydidae) with taxonomic notes and a key to the species. *Herpetologica*, 47(4): 407–420.
- Shaffer H B, Meylan P, McKnight M L. 1997. Tests of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. *Systematic Biology*, 46(2): 235–268.
- Spinks P Q, Shaffer H B. 2007. Conservation phylogenetics of the Asian box turtles (Geoemydidae, *Cuora*): mitochondrial introgression, numts, and inferences from multiple nuclear loci. *Conservation Genetics*, 8(3): 641–657.
- Spinks P Q, Shaffer H B, Iverson J B, et al. 2004. Phylogenetic hypotheses for the turtle family geoemydidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1): 164–182.
- Spinks P Q, Thomson R C, Zhang Y, et al. 2012. Species boundaries and phylogenetic relationships in the critically endangered Asian box turtle genus *Cuora*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(3): 656–667.
- Stuart B L, Parham J F. 2004. Molecular phylogeny of the critically endangered Indochinese Box Turtle (*Cuora galbinifrons*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(1): 164–177.
- Wang J, Parham J F, Shi H T. 2021. China's turtles need protection in the wild. *Science*, 371(6528): 473.
- 国家林业与草业局. 2021. 国家重点保护野生动物名录. [EB/OL]. [2022-11-07]. http://www.gov.cn/xinwen/2021-02/09/content_5586227.htm.
- 黄斌, 黄勇. 2011. 河南省龟类分布新记录: 潘氏闭壳龟. *信阳师范学院学报*, 24(1): 71–72.
- 李东. 2000. 潘氏闭壳龟在四川省的首次发现. *四川动物*, 19(3):

- 156.
- Richard B P, 马克平, 蒋志刚. 2014. 保护生物学(译). 北京: 科学出版社, 231-255.
- 宋鸣涛. 1984. 闭壳龟属一新种. *动物分类学报*, 9(3): 330-332.
- 巫嘉伟, 李东. 2004. 四川产潘氏闭壳龟繁殖一例及其面临的问题. *四川动物*, 23(1): 15.
- 张艳云, 毕婷婷, 宋娇莲, 等. 2011. 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. *生物学杂志*, 28(1): 22-26, 45.
- 郑将臣, 万全, 程起群, 等. 2011. 基于两个核基因序列研究龟鳖类的系统进化特征. *大连海洋大学学报*, 26(5): 452-457.
- 周婷, 王伟. 2009. 中国龟鳖养殖原色图谱. 北京: 中国农业出版社.