

DOI: 10.12264/JFSC2023-0082

裂腹鱼亚科系统发育与适应性进化及祁连山裸鲤的分类地位

宋丹^{1,2}, 彭颀¹, 程起群¹

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 2013066

摘要: 裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)系统发育和适应性进化机制尚不明确, 且祁连山裸鲤(*Gymnocypris chilianensis*)的分类地位尚存争议。本研究基于所有已公开的裂腹鱼亚科 11 属 65 种鱼类的线粒体全基因组序列进行分析, 试图为阐明上述问题提供基因组学依据。结果如下: (1) 系统发育。研究表明裂腹鱼亚科鱼类不是单系群, 其分属于两个不同的支系, 每个支系包含若干属种, 其中原始类群的裂腹鱼聚为一支, 特化类群和高度特化类群的裂腹鱼聚为另一支。(2) 适应性进化。以裂腹鱼的分布海拔高度区间为划分标准, 分为低、中、高 3 组, 基于分支模型和位点模型的检测结果显示, 13 个蛋白编码基因的 ω 比值都 < 1, 均未检测到正选择位点。但是在氨基酸水平上, Atp6、ND2、ND3、ND4、ND5 中均检测出正选择位点, 正选择作用主要发生在呼吸链复合物 I (NADH-泛醌氧化还原酶) 中, 线粒体呼吸链又是生物活性氧(ROS)最主要的来源, 这可能解释了裂腹鱼亚科对高海拔缺氧环境的适应性进化机制。同时, 分歧时间估算结果显示, 原始类群裂腹鱼分化于 3.200 Ma 前, 特化类群裂腹鱼与高度特化类群裂腹鱼在 5.972 Ma 前至 5.320 Ma 前开始产生分化, 处于晚中新世时期。(3) 祁连山裸鲤分类地位。基于 Kimura 双参数模型计算遗传距离, 结果表明与祁连山裸鲤遗传距离最近的为柴达木裸裂尻鱼(*Schizopygopsis kessleri*), 遗传距离为 0.0015; 而祁连山裸鲤与花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*)的遗传距离为 0.0673, 大于 0.0600, 已经达到了种的分化。从分子水平上明确了祁连山裸鲤为裸鲤属的一个独立种, 并非花斑裸鲤的亚种, 为解决长期以来祁连山裸鲤分类地位的分歧提供了佐证。

关键词: 裂腹鱼亚科; 祁连山裸鲤; 系统发育; 适应性进化; 线粒体基因组

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)06-0685-14

裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae), 包括 12 个属, 有超过 100 个种和亚种, 其中我国分布有 11 属 76 种(亚种)^[1], 是一类能够适应青藏高原极端环境的特殊类群^[2]。裂腹鱼亚科在演变过程中, 所呈现的海拔阶梯状分布与高原隆升的过程也吻合, 因此它也是研究高原动物适应性进化和高原隆起的理想模型。McClelland^[3]在 1842 年建立了裂腹鱼亚科。长期以来, 对于裂腹鱼亚科鱼类的系统发育关系和适应性进化机制等尚不明确。在形态学研究方面, 武云飞^[4]认为裂腹鱼类是来自同一祖

先的自然类群, 演化上应为一个单系群, 并将裂腹鱼类群划分为 I、II、III 3 类。而 Mirza^[5]则分为 Schizothoracini、Diptychini 和 Schizopygopsini 3 个族, 与曹文宣等^[6]根据裂腹鱼亚科鱼类形态特征, 分为原始、特化、高度特化 3 个等级类群的结果相对应。在分子方面的研究, 主要基于线粒体细胞色素 b (Cyt b) 基因序列的分析, 其数据不完全支持形态学的研究结果。Yang 等^[7]否认了裂腹鱼类为一个单系群的观点。何德奎等^[8]分析了特化等级裂腹鱼类的分子发育关系, 发现特化等级裂腹鱼和高度特化等级裂腹鱼类均不构成单系群,

收稿日期: 2023-04-13; 修订日期: 2023-04-30.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32273140).

作者简介: 宋丹(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类种质资源和遗传育种. E-mail: 1623757058@qq.com

通信作者: 程起群, 研究员, 研究方向为鱼类种质资源和遗传育种. E-mail: chengqq@ecsf.ac.cn

裸鲤属(*Gymnocypris*)和裸裂尻属(*Schizopygopsis*)也不是单系群,但裂腹鱼属(*Schizothorax*)构成一个单系群。祈得林等^[9]则认为柴达木盆地格尔木河和托素湖的裸裂尻鱼(*Schizopygopsis kessleri*)与黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*)之间未达到种级分化水平,建议将柴达木裸裂尻鱼作为黄河裸裂尻鱼的一个亚种。赵凯等^[10]通过分析黄河和柴达木水系裸裂尻鱼的遗传多样性,也支持该观点。

关于裂腹鱼亚科种群的分类系统以及地位的研究就包括对祁连山裸鲤分类地位的讨论。祁连山裸鲤(*Gymnocypris chilianensis*)为仅分布于河西疏勒河、黑河、石羊河三大内陆河流域的特有鱼类,在传统形态学分类上,曹文宣等^[11]根据鱼体的形态特征,首次将其与花斑裸鲤(*Gymnocypris waddellii*)相区别,但未将其命名或鉴定为一个独立的种;李思忠等^[12]正式将其认定为裸鲤属的新品种,并命名为祁连山裸鲤;但赵凯等^[10]也以形态学为依据,认为裸鲤形态差异随产地接近而减小,建议将祁连山裸鲤作为黄河水系花斑裸鲤的亚种。在分子水平上,张艳萍等^[13]基于线粒体 DNA 的 Cyt *b* 序列构建的系统发育关系,应将祁连山裸鲤视为一个独立种。

上述研究对裂腹鱼亚科的分类地位的判定主要以少量裂腹鱼属种和单个基因分析为主要依据,还存在一些问题,鉴于此本研究利用线粒体全基因组序列进行更为系统的分析。线粒体基因组作为重要的核外遗传物质,因其基因缺乏重组、进化速度快、具有严格的母系遗传等优势被广泛用于鱼类系统进化研究中^[14-15]。很多动物系统发育关系的构建都基于中性学说和“分子钟”理论,且通过“标准线粒体时钟”作为校对^[16-17]。据报道,有许多研究利用线粒体基因组重建物种的系统发育关系^[18-20],在解决物种分歧时间的问题上也已提供了较好的遗传学证据。

适应性进化会增加蛋白质受到环境胁迫时的功能。目前,关于裂腹鱼类线粒体基因组的适应性进化研究较少。Tong 等^[21]研究结果表明,青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)的代谢、免疫系统和运输功能相关的基因都在发生适应性进化;

Yang 等^[7]通过高通量测序发现在厚唇裸重唇鱼中, *BYSL*、*HSF1*、*YES1* 等基因可能与低氧进化相关。在裂腹鱼类的分歧时间上,到目前为止依然没有确切的结果。这可能是由于选取的不同基因、采用不同的化石时间以及不同分支的进化速率变化等,导致裂腹鱼类的分歧时间估算上有误差。杨天燕等^[22]估测了裂腹鱼的分歧时间,原始类群的裂腹鱼属和扁吻鱼属(*Aspiorhynchus*)的分化时间大约为 8.18 Ma,新疆裸重唇鱼(*Gymnocypris pachycheilus*)和斑重唇鱼(*Gymnocypris pachycheilus weiheensis*)的分化时间大约为 7.67 Ma,均发生于晚中新世。何德奎等^[8]在 Cyt *b* 基因序列的研究中,认为特化等级鱼类可能起源于中新世大约 10 Ma。

本研究拟基于所有已公开的 65 种裂腹鱼亚科鱼类线粒体全基因组序列,对裂腹鱼亚科鱼类种群之间的系统发育关系和适应性进化开展研究,特别探讨祁连山裸鲤的分类地位;同时通过对 13 个蛋白编码基因(protein-coding genes, PCGs)进行选择压力分析以及分歧时间评估,以期对裂腹鱼亚科鱼类的种群划分、种质资源保护以及可持续发展提供支持。

1 材料和方法

1.1 线粒体全基因组序列数据来源与组成分析

利用 python 语言从 NCBI 公共数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中批量下载了所有已公开的 11 属 65 种裂腹鱼亚科的线粒体全基因组序列(相关信息见表 1),提取 13 个 PCGs 的基因序列进行串联分析。利用 MEGA11.0^[23]计算序列长度、碱基组成,同时统计保守位点(conserved sites)、变异位点(variable sites)、简约突变数(parsimony-informative sites)、单现突变数(singleton sites),并运用 EMBOSS 软件包^[24]中 CodonW 统计密码子使用频率(frequency)以及同义密码子相对使用频率(relative synonymous codon usage, RSCU)。

1.2 系统发育分析

本研究选取了 65 种裂腹鱼亚科鱼类的线粒体全基因组,采用 MAFFT v.7.0^[25]进行比对,获得了 13 个 PCGs 数据集。通过 IQ-TREE v.2.0.6^[26]构建基于 13 个 PCGs 的最大似然(maximum-likelihood, ML)系

统发育树, 在贝叶斯信息准则(bayesian information criterion, BIC)下得到核苷酸进化的最佳模型分别为 TIM3+I+G4+F 和 TPM2u+I+G4+F, 分支置信度采用

超快自展(ultrafast bootstrapping)法重复 5000 次。以裂腹鱼亚科亲缘关系最近的鲃亚科光唇鱼属的光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*) (KF781289)作为外群。

表 1 65 种裂腹鱼亚科鱼类线粒体全基因组序列
Tab. 1 The complete mitochondrial genome sequences of 65 species in Schizothoracinae

等级 group	亚科 sub family	属 genus	种(亚种) species (subspecies)	GenBank 登录号 GenBank accession no.	长度/bp length
原始等级 primitive	裂腹鱼亚科 Schizothoracinae	裂腹鱼属 <i>Schizothorax</i>	弧唇裂腹鱼 <i>S. curvilabiatus</i>	NC035994	16578
			灰裂腹鱼 <i>S. griseus</i>	NC046462	16586
			圆颌裂腹鱼 <i>S. rotundimaxillaris</i>	MW795354	16589
			塔里木裂腹鱼 <i>S. biddulphi</i>	NC017873	16585
			宽口裂腹鱼 <i>S. eurystomus</i>	NC036933	16588
			伊犁裂腹鱼 <i>S. pseudoaksaiensis</i>	NC024833	16582
			扁嘴裂腹鱼 <i>S. esocinus</i>	NC022867	16583
			四川裂腹鱼 <i>S. kozlovi</i>	NC027670	16585
			细鳞裂腹鱼 <i>S. chongi</i>	NC024621	16584
			重口裂腹鱼 <i>S. davidi</i>	NC026205	16576
			长丝裂腹鱼 <i>S. dolichonema</i>	NC023979	16583
			昆明裂腹鱼 <i>S. grahami</i>	NC029708	16584
			齐口裂腹鱼 <i>S. prenanti</i>	NC023829	16587
			怒江裂腹鱼 <i>S. nukiangensis</i>	NC027940	16585
			光唇裂腹鱼 <i>S. lissolabiata</i>	NC027162	16583
			澜沧裂腹鱼 <i>S. lantsangensis</i>	NC026294	16580
			巨须裂腹鱼 <i>S. macropogon</i>	NC020339	16588
			横口裂腹鱼 <i>S. plagiostomus</i>	NC023531	16576
			大理裂腹鱼 <i>S. taliensis</i>	NC037516	16578
			异齿裂腹鱼 <i>S. oconnori</i>	NC020781	16590
			拉萨裂腹鱼 <i>S. waltoni</i>	NC020606	16589
			保山裂腹鱼 <i>S. y. paoshanensis</i>	KP892531	16585
			前裂腹鱼 <i>S. progastus</i>	NC023366	16575
			全唇裂腹鱼 <i>S. labiatus</i>	KT833092	16531
			理氏裂腹鱼 <i>S. richardsonii</i>	NC021448	16592
			短须裂腹鱼 <i>S. wangchiachii</i>	NC020360	16593
			尼泊尔裂腹鱼 <i>S. nepalensis</i>	NC031537	16589
			墨脱裂腹鱼 <i>S. molesworthi</i>	NC037183	16585
			贡山裂腹鱼 <i>S. gongshanensis</i>	NC031803	16591
			完唇裂腹鱼 <i>S. integrilabiatus</i>	NC036746	16588
			黑身准裂腹鱼 <i>S. niger</i>	NC022866	16585
			特化等级 specialized		扁吻鱼属 <i>Aspiorhynchus</i>
叶须鱼属 <i>Ptychobarbus</i>	中甸叶须鱼 <i>P. chungtienensis</i>	NC034230			16970
	双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	NC024537			16787
	裸腹叶须鱼 <i>P. kaznakovi</i>	NC025303			16842
	锥吻叶须鱼 <i>P. conirostris</i>	KT833099			16612

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

等级 group	亚科 sub family	属 genus	种(亚种) species (subspecies)	GenBank 登录号 GenBank accession no.	长度/bp length	
特化等级 specialized		裸重唇属 <i>Gymnodiptychus</i>	厚唇裸重唇鱼 <i>G. pachycheilus</i>	NC023793	16586	
			新疆裸重唇鱼 <i>G. dybowskii</i>	NC028544	16677	
			厚唇裸重唇鱼渭河亚种 <i>G. pachycheilus weiheensis</i>	NC047411	16680	
高度特化 等级 highly- specialized		重唇鱼属 <i>Diptychus</i>	斑重唇鱼 <i>D. maculatus</i>	NC025650	16895	
			裸鲤属 <i>Gymnocypris</i>	兰格湖裸鲤 <i>G. chui</i>	MF459673	16646
		佩枯湖裸鲤 <i>G. dobula</i>		NC021419	16720	
		高原裸鲤 <i>G. waddellii</i>		NC047410	16674	
		花斑裸鲤 <i>G. eckloni</i>		NC019605	16686	
		硬刺松潘裸鲤 <i>G. p. frminspinatus</i>		NC031813	16680	
		青海湖裸鲤 <i>G. przewalskii</i>		NC008661	16682	
		甘子河裸鲤 <i>G. p. ganzihonensis</i>		NC019604	16682	
		祁连山裸鲤 <i>G. e. chilianensis</i>		KM879223	16667	
		纳木湖裸鲤 <i>G. namensis</i>		NC021420	16674	
		拉孜裸鲤 <i>G. scleracanthus</i>		NC036349	16679	
		色林错裸鲤 <i>G. selincuoensis</i>		MF787293	16728	
		尖裸鲤属 <i>Oxygymnocypris</i>		斯氏尖裸鲤 <i>O. stewartii</i>	NC022718	16646
		裸裂尻鱼属 <i>Schizopygopsis</i>		前腹裸裂尻鱼 <i>S. anteroventris</i>	NC029190	16620
				嘉陵裸裂尻鱼 <i>S. Kialingensis</i>	KM879226	16680
				软刺裸裂尻鱼 <i>S. malacanthus</i>	NC024880	16677
				大渡软刺裸裂尻鱼 <i>S. m. chengi</i>	KT270484	16688
				软刺裸裂尻鱼宝兴亚种 <i>S. m. baoxingensis</i>	KM593242	16787
				黄河裸裂尻鱼 <i>S. pylzovi</i>	NC026206	16664
			高原裸裂尻鱼 <i>S. stoliczkai</i>	NC032398	16833	
拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandi</i>	NC021409		16674			
温泉裸裂尻鱼 <i>S. thermalis</i>	NC021421		16676			
柴达木裸裂尻鱼 <i>S. kessleri</i>	NC045935		16767			
高原鱼属 <i>Herzensteinia</i>	小头高原鱼 <i>H. microcephalus</i>		NC033403	16726		
黄河鱼属 <i>Chuanchia</i>	骨唇黄河鱼 <i>C. labiosa</i>		NC029181	16705		
扁咽齿鱼属 <i>Platypharodon</i>	极边扁咽齿鱼 <i>P. extremus</i>	NC029171	16668			

1.3 适应进化分析

研究表明随着分布海拔高度的增加,裂腹鱼的分化水平呈递增趋势^[27]。本研究采用裂腹鱼在不同海拔高度区间的分布情况作为划分标准,将 65 个物种分别设置以高度特化类群、高度特化与特化类群以及原始类群中的裂腹鱼亚科为前景支。选择压力(selective pressure)是表征适应性进化机制的重要指标。选择压力的检测指标一般为氨基酸的非同义替代(non-synonymous substitution rate, dN)与同义替代(synonymous substitution rate, dS)的比值 ω (dN/dS)。如果 $\omega > 1$ 为正选择(positive

selection); $\omega < 1$ 为负选择(negative selection)或者纯化选择(purifying selection); 如果 $\omega = 1$ 为中性选择(neutral selection)^[28]。为了检测裂腹鱼在进化过程中所受的选择压力大小以及是否受到正选择作用,本研究采用 PAML4.7^[29]软件 Codeml 程序中的单比率(one ratio)和二比率(two ratio)两种分枝模型(Branch model)和 M0、M1a、M2a、M7、M8 位点模型(site model)进行分析。运用似然比率(likelihood ratio tests, LRTs)比较模型的拟合度,检测两两模型间是否差异显著,计算 $2\Delta\ln L$ 值与自由度之间的卡方分布,自由度为两个模型参数数

目的差值, 通过比较卡方分布来检验无效模型(null model)是否拒绝备择模型(alternative model)。在位点模型中, 以模型中经验贝叶斯(Bayes empirical Bayes, BEB)标准计算正向选择的后验概率(posterior probability, PP), 若 $PP \geq 0.85$, 则认为该位点是潜在的正选择位点。

1.4 遗传距离和分歧时间

利用 MEGA11.0, 基于 Kimura 双参数模型, 根据 65 种裂腹鱼亚科鱼类的 13 个 PCGs 数据集, 进行遗传距离计算; 并使用 BEAST v2.7.3^[30] 软件中的分子钟模型(fast relaxed clock log normal)进行分歧时间估算。树的先验分支进化速率使用 Yule 模型(Yuleprocess)。本研究以新生代高原隆升过程中的重大事件“昆黄运动”地质隔离时间, 即小头高原鱼(*Herzensteinia microcephalus*)和黄河裸裂尻鱼的分歧时间(1.1 Ma~0.6 Ma)作为校正点^[31], 以硬骨鱼 mtDNA 演化速率(1.3%/Ma)为先验^[32], MCMC 模拟设置为 2000 万代, 最后将 100 万代(10%)作为 burn-in 进行舍弃, 后验概率大于 50%。使用 Tracer v1.7.2^[33] 评估结果的稳定性, Figtree v1.4.4^[34] 进行树文件的查看。

2 结果和分析

2.1 裂腹鱼亚科鱼类线粒体全基因组结构及组成

裂腹鱼亚科 65 种鱼类的线粒体基因组全序列长度为 16531~16970 bp, 将比对后的 13 个 PCGs 序列串联后, 序列总长度为 10917~11385 bp, 其中有 7 个基因的编码区发生了序列插入缺失(insertion and deletion, indel), 保守位点 6779 个, 变异位点 4603 个, 简约突变数 3957 个, 单现突变数 646 个, 保守位点所占的比例为 59.4%。裂腹鱼 PCGs 相对同义密码子使用频率(relative synonymous codon usage, RSCU)最高的为甘氨酸(CGA)、组氨酸(CUA), RSCU 值在 0~3 之间(图 1), 其中编码亮氨酸(leucine, Leu1)的密码子使用频率最高, 在 11.87~13.31 之间(图 2)。

2.2 裂腹鱼亚科物种的系统发育关系

以 13 个 PCGs 串联数据集基于最大似然法构建的系统发育树拓扑结构具有很高的支持率(图 3), 结果表明, 65 种裂腹鱼类分为两个并系群, 原

始类群的裂腹鱼聚集成一个分支, 特化和高度特化类群的裂腹鱼聚集成另一分支; 且特化和高度特化类群的裂腹鱼中, 裸重唇属(*Gymnodiptychus*)和重唇鱼属(*Diptychus*)聚为一支, 叶须鱼属(*Ptychobarbus*)和其他高度特化类群的裂腹鱼聚为一支; 值得注意的是, 祁连山裸鲤未与花斑裸鲤聚为一支, 而是与柴达木裸裂尻鱼聚在一起后, 与嘉陵裸裂尻鱼(*Schizopygopsis kialingensis*)构成姐妹群。

2.3 裂腹鱼亚科 PCGs 的选择压力

运用分支模型, 裂腹鱼 PCGs 选择压力分析结果显示(图 4), 在单比率分枝模型中, 不同基因受到的选择压力大小差异显著, 但 ω 值均介于 0.01~0.20, 表明在线粒体基因组的进化中纯化选择是最主要的力量。在二比率分枝模型中, *Atp8* 基因进化速率最快, 其经历了弱的进化压力和功能约束; *CO I* 基因最为稳定, 其经历了强大的功能约束和强烈的进化压力。除此之外, *Atp8* 和 *ND3* 基因不论是在以高度特化类群为前景支、特化等级类群为前景支还是以原始类群裂腹鱼亚科鱼类为前景支中, ω 值均大于其他 11 个基因。

运用 PAML4.7^[29] 软件中的位点模型对 65 个裂腹鱼亚科物种的 13 个 PCGs 依次进行选择压力分析, 在 M0 模型下, ω 值均小于 1 (表 2)。在 *Atp8* 基因中, 比较 M1a 和 M2a, 似然比检验 $2\Delta\ln L = 0.24$ ($P = 0.88$), 说明 M1a 优于 M2 模型; 比较 M7 和 M8 模型, 似然比检验 $2\Delta\ln L = 0.23$ ($P > 0.5$), 说明 M7 优于 M8 模型, 综合表明 *Atp8* 基因在 13 个基因中受到最弱的净化选择约束, 其余基因也分别受到了不同程度的净化选择。在 M8 模型中, *Atp6*、*ND2*、*ND3*、*ND4*、*ND5* 基因中均检测出正选择位点, 但只有 *ND5* 基因中 M8 优于 M7 模型, 似然比检验 $2\Delta\ln L = 24.01887$ ($P < 0.001$), 受正向选择作用的位点是 *28Q*、*29Q*、*32N*、*35E*、*208N*、*270D*、*483T*, 其对应 BEB 的后验概率均大于 0.85。

2.4 裂腹鱼亚科鱼类的遗传距离和分歧时间

在裂腹鱼亚科部分高度特化类群裸鲤属和裸裂尻鱼属的遗传距离中(图 5), 与花斑裸鲤遗传距离最近的是青海湖裸鲤, 遗传距离为 0.002272, 其次为甘子河裸鲤, 遗传距离为 0.002936; 与祁

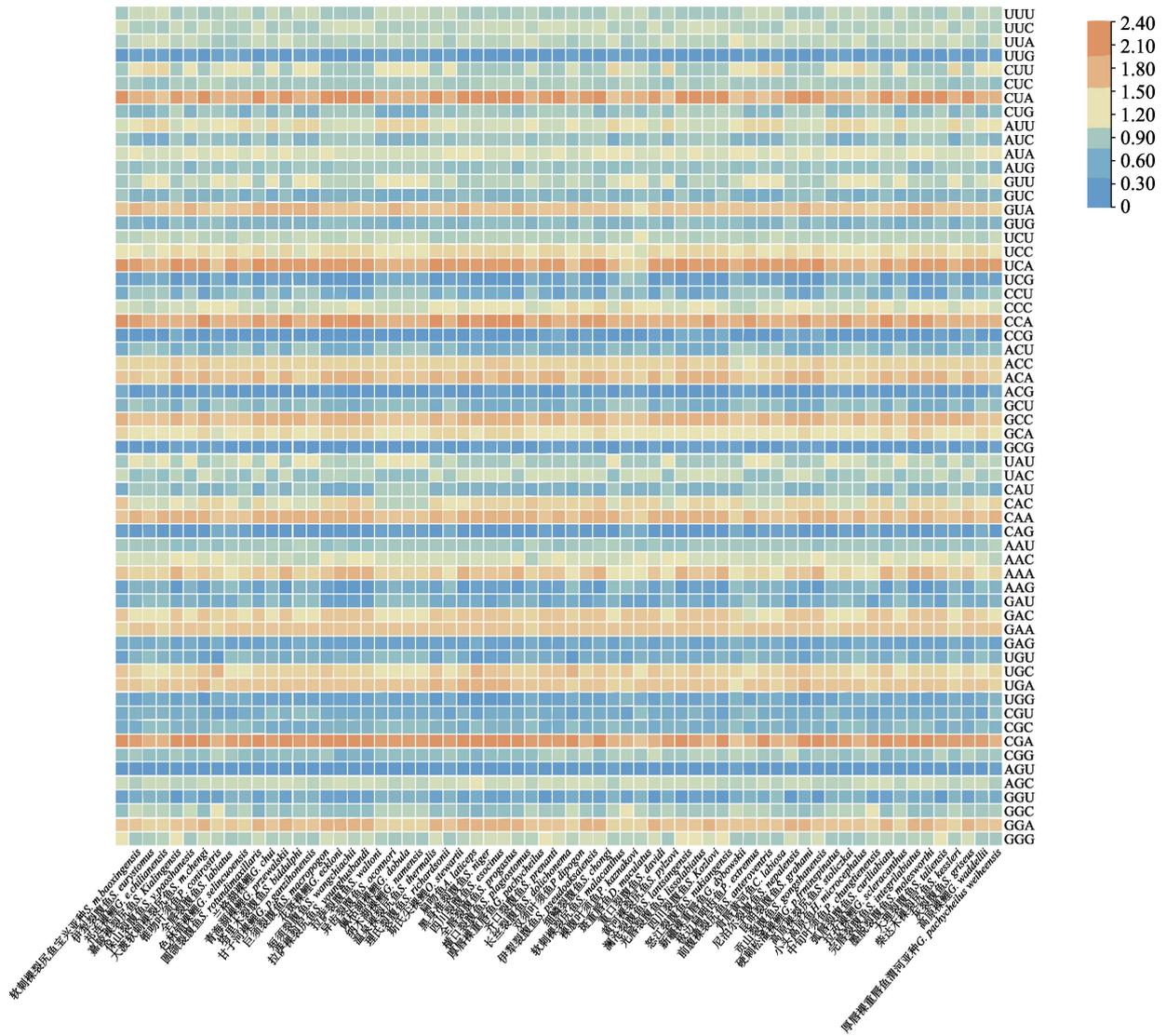


图 1 裂腹鱼亚科 65 种鱼类相对同义密码子使用频率
 Fig. 1 Relative synonymous codon usage in the 65 species of Schizothoracinae

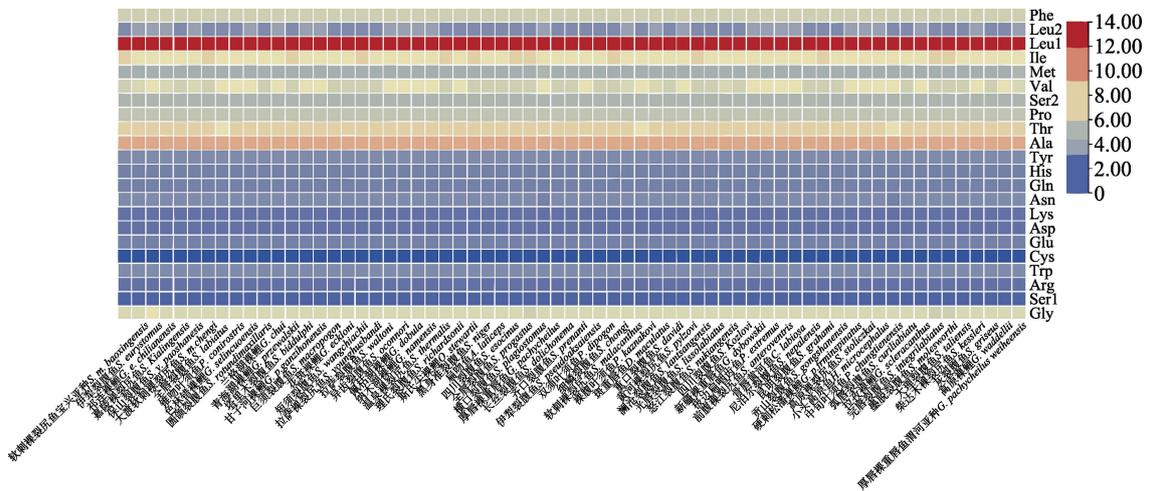


图 2 裂腹鱼亚科 65 种鱼类密码子编码的氨基酸热图
 Fig. 2 Heatmap based on codon usage of amino acids in the 65 species of Schizothoracinae

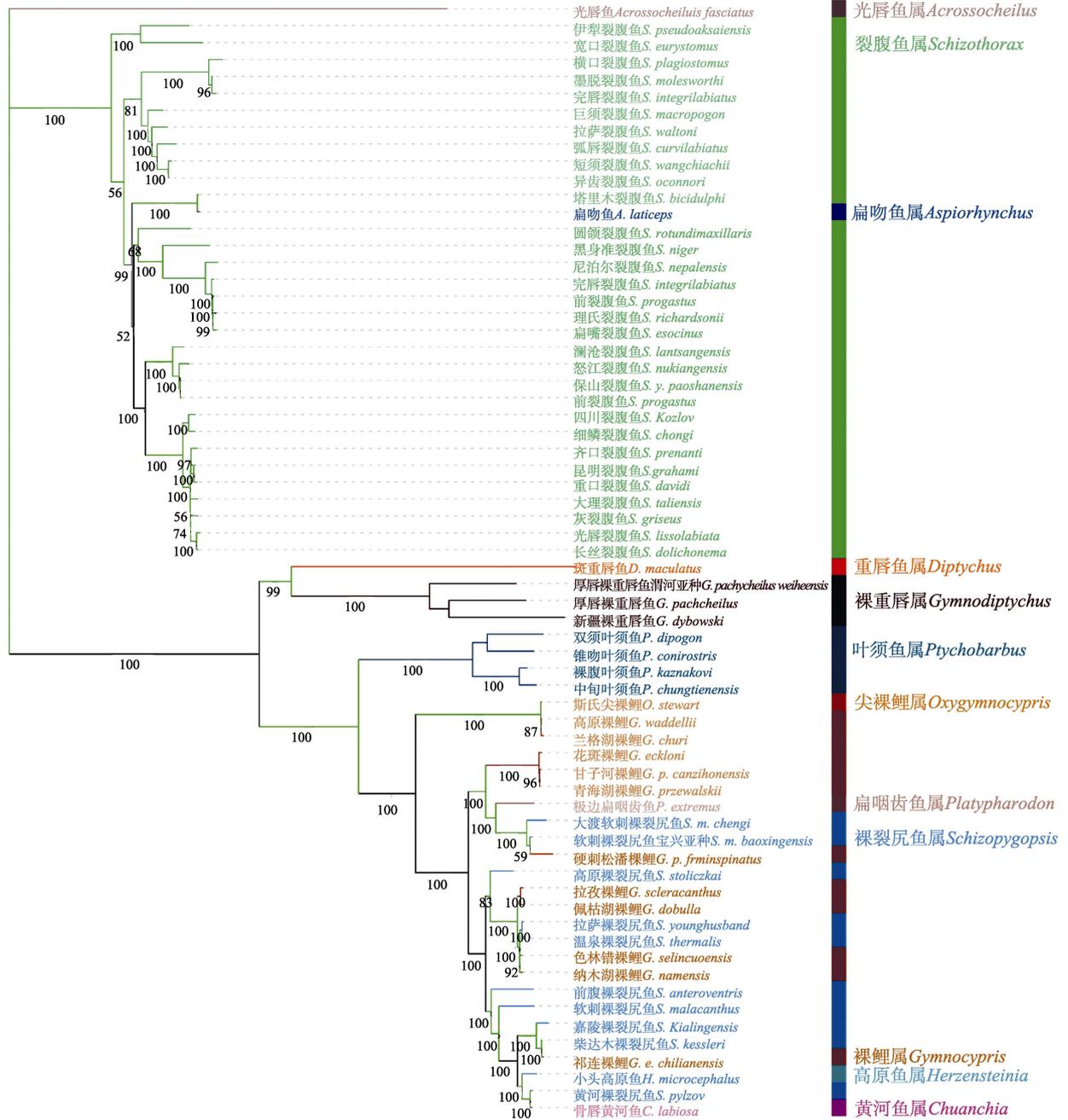


图 3 基于 13 个 PCGs 核苷酸序列的裂腹鱼亚科系统发育树
节点处数字表示自举检测值。

Fig. 3 Phylogenetic tree of Schizothoracinae based on nucleotide sequences of 13 PCGs
Numbers at nodes indicate bootstrap detection values.

连山裸鲤距离最近的是柴达木裸裂尻鱼, 遗传距离为 0.001513, 其次是嘉陵裸裂尻鱼, 其遗传距离为 0.012303; 而祁连山裸鲤与花斑裸鲤的遗传距离为 0.067300, 遗传距离与柴达木裸裂尻鱼相差近 45 倍。

分歧时间估算结果显示(图 6), 裂腹鱼亚科鱼类与鲃亚科光唇鱼属的分歧时间约在 8.008 Ma 前,

处于中新世时期; 原始类群裂腹鱼与鲃亚科光唇鱼属的分歧时间约在 5.604 Ma 前, 处于晚中新世时期; 原始类群裂腹鱼分化时间为距今 3.2 Ma 前, 处于上新世时期; 特化类群裂腹鱼与高度特化类群裂腹鱼在 5.972 Ma 前至 5.32 Ma 前开始产生分化, 处于晚中新世时期。

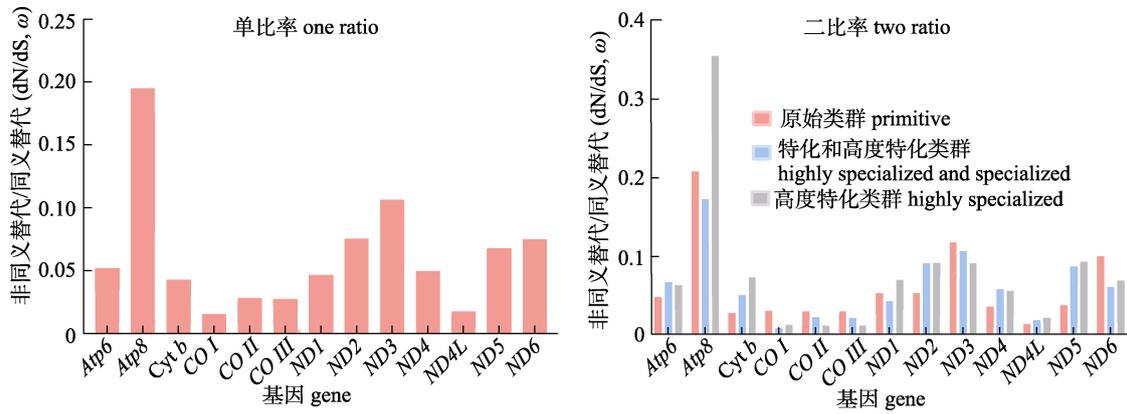


图 4 裂腹鱼亚科 13 个 PCGs 基因位点的选择压力
Fig. 4 Selection pressure based on 13 PCGs of Schizothoracinae

表 2 13 个 PCGs 基因的位点模型结果
Tab. 2 The results of site models on the 13 PCGs genes

基因 gene	M0 模型(单比率) M0 model (one ratio)	M1a 模型(近中性) M1a model (near neutral)	M2a 模型(正选择) M2a model (positive selection)	M7 模型(Beta 分布) M7 model (Beta distribution)	M8 模型(Beta & ω=1) M8 model (Beta & ω=1)
<i>Atp6</i>	ω=0.05210	p0=0.94549 p1=0.05451 ω0=0.02935 ω1=1.00000	p0=0.94549 p1=0.05451 p2=0.00000 ω0=0.02935 ω1=1.00000 ω2=43.81880	p=0.15582 q=2.03492	p0=0.98294 p=0.20514 q=3.77730 (p1=0.01706) ω=1.00000
<i>Atp8</i>	ω=0.19513	p0=0.86191 p1=0.13809 ω0=0.11087 ω1=1.00000	p0=0.86182 ω0=0.11084 p1=0.13818 ω1=1.00000 p2=0.00000 ω2=33.00207	p=0.38920 q=1.53646	p0=0.99999 p=0.38913 q=1.53588 (p1=0.00001) ω=3.61270
<i>CO I</i>	ω=0.03900	p0=0.96904 p1=0.03096 ω0=0.01818 ω1=1.00000	p0=0.96904 ω0=0.01818 p1=0.03096 ω1=1.00000 p2=0.00000 ω2=12.9600	p=0.06831 q=1.39394	p0=0.99999 p=0.06831 q=1.39396 (p1=0.00001) ω=2.65367
<i>CO II</i>	ω=0.07508	p0=0.94846 p1=0.05154 ω0=0.05347 ω1=1.00000	p0=0.94846 ω0=0.05347 p1=0.02317 ω1=1.00000 p2=0.02837 ω2=1.00000	p=0.33123 q=3.36167	p0=0.97800 p=0.44592 q=5.84606 (p1=0.02200) ω=1.00000
<i>CO III</i>	ω=0.02758	p0=0.97422 p1=0.02578 ω0=0.01430 ω1=1.00000	p0=0.97422 p1=0.02578 p2=0.00000 ω0=0.01430 ω1=1.00000 ω2=28.49175	p=0.06947 q=1.72478	p0=0.98910 p=0.08848 q=3.35399 (p1=0.01090) w=1.00000
<i>ND1</i>	ω=0.06396	p0=0.93392 p1=0.06608 ω0=0.03469 ω1=1.00000	p0=0.92215 p1=0.04047 p2=0.03738 ω0=0.3636 ω1=1.00000 ω2=2.41830	p=0.19897 q=2.58945	p0=0.99999 p=0.19251 q=2.51029 (p1=0.00001) ω=5.04289

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

基因 gene	M0 模型(单比率) M0 model (one ratio)	M1a 模型(近中性) M1a model (near neutral)	M2a 模型(正选择) M2a model (positive selection)	M7 模型(Beta 分布) M7 model (Beta distribution)	M8 模型(Beta & $\omega=1$) M8 model (Beta & $\omega=1$)
ND2	$\omega=0.07561$	$p0=0.92503$ $p1=0.07497$ $\omega0=0.04067$ $\omega1=1.00000$	$p0=0.92503$ $p1=0.06455$ $p2=0.01042$ $\omega0=0.04067$ $\omega1=1.00000$ $\omega2=1.00000$	$p=0.17712$ $q=1.78332$	$p0=0.98174$ $p=0.20665$ $q=2.73891$ ($p1=0.01826$) $\omega=1.00000$
ND3	$\omega=0.10627$	$p0=0.88370$ $p1=0.11630$ $\omega0=0.04103$ $\omega1=1.00000$	$p0=0.80526$ $p1=0.16963$ $p2=0.02511$ $\omega0=0.04168$ $\omega1=1.00000$ $\omega2=2.42705$	$p=0.12798$ $q=0.88801$	$p0=0.97306$ $p=0.15568$ $q=0.02694$ ($p1=0.04337$) $\omega=1.21440$
ND4	$\omega=0.04974$	$p0=0.95132$ $p1=0.04868$ $\omega0=0.02964$ $\omega1=1.00000$	$p0=0.95117$ $p1=0.04883$ $p2=0.00000$ $\omega0=0.02959$ $\omega1=1.00000$ $\omega2=4.63724$	$p=0.16305$ $q=2.45639$	$p0=0.99460$ $p=0.17774$ $q=3.02404$ ($p1=0.00540$) $\omega=1.17211$
ND4L	$\omega=0.01789$	$p0=0.98757$ $p1=0.01243$ $\omega0=0.01356$ $\omega1=1.00000$	$p0=0.98757$ $\omega0=0.01356$ $p1=0.01243$ $\omega1=1.00000$ $p2=0.00000$ $\omega2=1.00000$	$p=0.07585$ $q=2.85334$	$p0=0.99999$ $p=0.07585$ $q=2.85311$ ($p1=0.00001$) $\omega=2.63478$
ND5	$\omega=0.06776$	$p0=0.93385$ $p1=0.06615$ $\omega0=0.03099$ $\omega1=1.00000$	$p0=0.93393$ $p1=0.06455$ $p2=0.00151$ $\omega0=0.03111$ $\omega1=1.00000$ $\omega2=3.52911$	$p=0.10836$ $q=1.10707$	$p0=0.97177$ $p=0.15553$ $q=2.96538$ ($p1=0.02823$) $\omega=1.12551$
ND6	$\omega=0.07508$	$p0=0.94846$ $p1=0.05154$ $\omega0=0.05347$ $\omega1=1.00000$	$p0=0.94846$ $\omega0=0.05347$ $p1=0.02317$ $\omega1=1.00000$ $p2=0.02837$ $\omega2=1.00000$	$p=0.33123$ $q=3.36167$	$p0=0.97800$ $p=0.44592$ $q=5.84606$ ($p1=0.02200$) $\omega=1.00000$
Cyt b	$\omega=0.04302$	$p0=0.97840$ $p1=0.02160$ $\omega0=0.03346$ $\omega1=1.00000$	$p0=0.97840$ $p1=0.02160$ $p2=0.00000$ $\omega0=0.03346$ $\omega1=1.00000$ $\omega2=28.89479$	$p=0.21687$ $q=4.00350$	$p0=0.99999$ $p=0.21687$ $q=4.00343$ ($p1=0.00001$) $\omega=2.73114$

3 讨论

3.1 裂腹鱼亚科系统发育关系

系统发育关系的研究主要用于探索物种之间的亲缘关系,通过合理的等级系统将物种进行归类,从而重建生物的系统发生历史^[35]。在传统的形态学分类上,广为接受的观点认为,裂腹鱼类构成一个单系群,特化和高度特化类群的裂腹鱼都起源于原始类群的裂腹鱼^[36]。与形态学数据相

比,分子数据较为稳定,能够更加客观地反映裂腹鱼亚科鱼类地系统发育关系。

本研究基于线粒体基因组数据的分析结果显示,裂腹鱼亚科分属于两个不同的支系,其中原始类群的裂腹鱼亚科鱼类聚为一支,与鲃亚科系统发育关系更近,而特化类群和高度特化类群的裂腹鱼亚科鱼类聚为另一支,结果不支持裂腹鱼类为一个单系类群,这与杨天燕等^[22]的研究结果相一致。同时结果也显示,在原始类群中,扁吻鱼

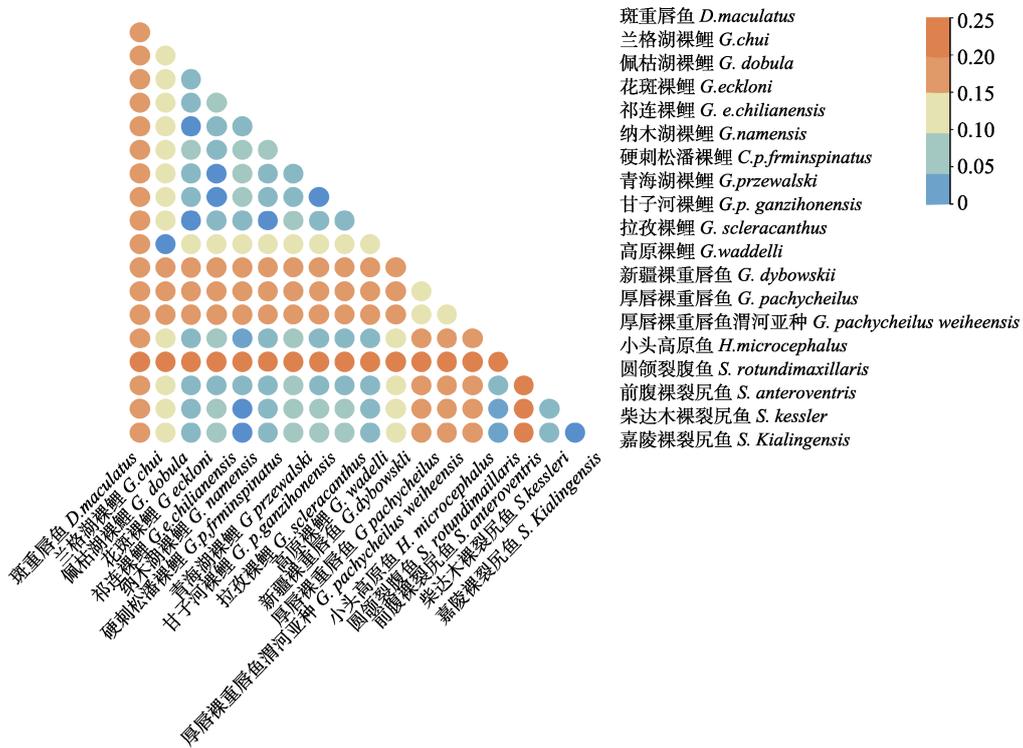


图 5 裂腹鱼亚科部分高度特化类群遗传距离

Fig. 5 Genetic distance of some highly specialized groups of Schizothoracinae

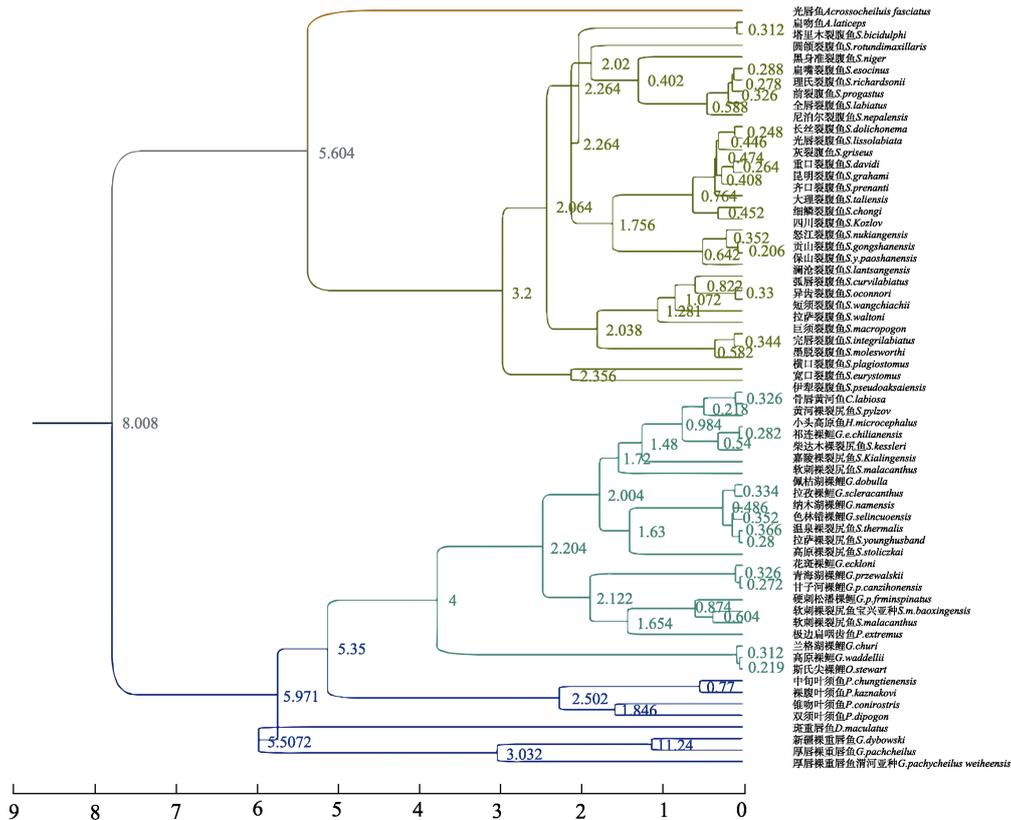


图 6 基于 13 个 PCGs 核苷酸序列的裂腹鱼亚科类群分歧时间节点处数字为类群分歧时间(Ma).

Fig. 6 Bifurcation time of Schizothoracinae based on nucleotide sequences of 13 PCGs. Numbers at nodes indicate bifurcation time (Ma).

属仅有的一种,扁吻鱼(*Aspiorhynchus laticeps*)与塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)的亲缘关系最近,支持扁吻鱼属可能与裂腹鱼属未达到属的分化水平的观点。在特化等级类群中,叶须鱼属和高度特化类群的裸鲤属、裸裂尻鱼属、扁咽齿鱼属(*Platypharodon*)、高原鱼属(*Herzensteinia*)、黄河鱼属(*Chuanchia*)、尖裸鲤属(*Oxygymnocypris*)聚在一起,而与同为特化类群的裸重唇鱼属距离较远。这与形态学的研究结果,即叶须鱼属和裸重唇鱼属关系较近,而后与重唇鱼属构成姐妹群的观点具有一定的差异。此外,笔者也发现裸重唇属和重唇鱼属聚为一支;裸鲤属与裸裂尻鱼属也不构成单系群。

3.2 裂腹鱼亚科的适应性进化

为探索裂腹鱼类适应性进化机制,本研究从对裂腹鱼类线粒体基因组中的 13 个 PCGs 进行了选择压力检测,结果 ω 值均介于 0.01~0.20,即裂腹鱼类可能并没有因特殊的生活习性而受到正选择作用,但是也存在少量发生正向选择的氨基酸位点,这也可能是裂腹鱼适应性进化的证据之一。同时,笔者发现生存在相对低海拔的原始类群的裂腹鱼进化速率较慢,高海拔的高度特化类群的裂腹鱼进化速率较快,总体上来说,随着海拔的升高,裂腹鱼的进化速率正在逐渐增快,与上文中提到的青藏高原快速隆起时期涌现出大量的物种正好对应,说明高海拔适应是逐步进化的过程,可能与裂腹鱼的线粒体蛋白编码基因受到的选择压力有关。

在线粒体蛋白编码基因中,正选择作用主要发生于呼吸链复合物 I (NADH-泛醌氧化还原酶)中^[37],而线粒体呼吸链是生物活性氧(ROS)最主要的来源^[38]。据报道,高原缺氧会导致超氧化物的存在,并且复合物是 I 线粒体中产生超氧化物的主要位点^[39]。而本研究中,裂腹鱼亚科线粒体基因组中潜在的正选择位点也出现在 *ND2*、*ND4*、*ND5* 基因中。这些发现与之前对高原动物的研究相似,Hassanin 等^[40]和 Wang 等^[41]对生活在高海拔地区哺乳动物乃至脊椎动物的线粒体功能基因序列进行检测,均发现线粒体基因组的功能基因经历了强烈的选择作用。在藏马^[42]、川金丝

猴^[43]等高原动物中也发现 *ND* 基因中非同义突变率高于其他基因。裂腹鱼亚科线粒体基因组的正选择位点可能反映了对高海拔缺氧环境的适应性进化。

3.3 祁连山裸鲤的分类地位及分化

在高度等级特化类群中,祁连山裸鲤先与柴达木裸裂尻鱼聚为一支后再与嘉陵裸裂尻鱼聚为一支,并未与花斑裸鲤聚为一支。花斑裸鲤则与青海湖裸鲤和甘子河裸鲤(*Gymnocypris przewalskii ganzihonensis*)聚为一支。基于 Kimura 双参数模型计算,与祁连山裸鲤遗传距离最近的为柴达木裸裂尻鱼,其遗传距离为 0.001513,其次是嘉陵裸裂尻鱼。而祁连山裸鲤与花斑裸鲤的遗传距离为 0.067300。通常来说,种内个体间的序列差异一般在 0~0.0406 之间,大于 0.0600 的个体间已有明显的亚种或种的分化^[13]。这表明祁连山裸鲤与花斑裸鲤、青海湖裸鲤的亲缘关系较远,达到了亚种或种的分化水平。基于以上结果,笔者认为对于裂腹鱼亚科的物种分类,特别是对祁连山裸鲤的分类地位,需要重新定义。

生命的早期起源与演化是生物进化过程中至为关键的历程^[44]。经前人研究发现裂腹鱼亚科的 3 个分化等级都与青藏高原新生代晚期的隆起阶段相符^[45]。整个青藏高原地区大规模的隆起时期一般认为发生在 10 Ma 前~8 Ma 前^[46],青藏高原已隆升到一定高度,北半球大部分地区发生了环境和气候的重大转型^[47-48],裂腹鱼亚科鱼类与鲃亚科光唇鱼属在这个时期开始分化,随后特化类群裂腹鱼与高度特化类群裂腹鱼在 5.972 Ma 前至 5.32 Ma 前开始产生分化,进入青藏高原快速隆升时期的早起阶段^[49],在 0.54 Ma 前,祁连山裸鲤与柴达木裸裂尻鱼和嘉陵裸裂尻鱼也开始产生分化。祁连山裸鲤的分化可能与青藏高原以及祁连山脉的抬升有一定关系,祁连山脉的东部边缘所分布的黄河水系及其支流因为青藏高原的突然抬升,很多古湖泊消失从而形成了古老的黄河,而祁连山脉西南区域的柴达木盆地因为祁连山脉的抬升导致柴达木盆地的古湖泊迅速发展成河流^[50],这种地质过程导致不同的河流水系在发育演变过程中曾经互相连通,比如黄河水系与柴

达木盆地水系^[51]。还有证据表明,石羊河最初向东南流,通过庄浪河与古黄河相连,这种连通的关系会使不同物种之间产生种群交流,出现共享单倍型。此外,尽管还有一些河流的分支似乎是完全隔离的,但基因流动是连续的^[52]。即使有些鱼类可能在孤立的栖息地生存,也依然可以通过遗传漂变和选择进行分化^[53]。系统发育分析的结果也暗示了这一观点,由此笔者推测祁连山裸鲤不同的种群有可能在冰川时期经历异域分化形成了新的物种,如与它亲缘关系接近的裸裂尻鱼属鱼类。

参考文献:

- [1] Yue P Q. Fauna Sinica · Osteichthyes · Cypriniformes: III[M]. Beijing: Science Press, 2000: 347-352. [乐佩琦. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目: 下卷[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 347-352.]
- [2] Fortelius M, Eronen J T, Kaya F, et al. Evolution of neogene mammals in Eurasia: Environmental forcing and biotic interactions[J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2014, 42: 579-604.
- [3] McClelland J. On the fresh-water fishes collected by William Griffith, Esq., FLS Madras Medical Service, during his travels under the orders of the Supreme Government of India, from 1835 to 1842[J]. Calcutta Journal of Natural History, 1842, 2: 560-589.
- [4] Wu Y F. Systematic studies on the cyprinid fishes of the subfamily Schizothorax from China[J]. Acta Biologica Plateau Sinica, 1984, 3: 119-140. [武云飞. 中国裂腹鱼亚科鱼类的系统分类研究[J]. 高原生物学集刊, 1984, 3: 119-140.]
- [5] Mirza M. A contribution to the systematics of the Schizothoracine fishes (Pisces: Cyprinidae) with the description of three new tribes[J]. Pakistan Journal of Zoology, 1991, 23(4): 339-341.
- [6] Cao W X, Chen Y Y, Wu Y F, et al. Origin and Evolution of Schizothoracine Fishes in Relation to The Uplift of The Xizang Plateau[M]. Beijing: Science Press, 1981: 118-130. [曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞, 等. 裂腹鱼类的起源和演化及其与青藏高原的隆起关系[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 118-130.]
- [7] Yang L D, Wang Y, Zhang Z L, et al. Comprehensive transcriptome analysis reveals accelerated genic evolution in a Tibet fish, *Gymnodiptychus pachycheilus*[J]. Genome Biology and Evolution, 2014, 7(1): 251-261.
- [8] He D K, Chen Y F, Chen Y Y, et al. Molecular phylogeny of specialized schizothorax fishes and uplift of Qinghai-Tibet Plateau[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(22): 2354-2362. [何德奎, 陈毅峰, 陈宜瑜, 等. 特化等级裂腹鱼类的分子系统发育与青藏高原隆起[J]. 科学通报, 2003, 48(22): 2354-2362.]
- [9] Qi D L, Li T P, Chao Y, et al. Taxonomic status of *Schizopygopsis kessleri* inferred from cyt b gene sequence[J]. Chinese Journal of Zoology, 2009, 44(4): 1-7. [祁得林, 李太平, 晁燕, 等. 利用 Cyt b 基因序列探讨柴达木裸裂尻鱼的分类学地位[J]. 动物学杂志, 2009, 44(4): 1-7.]
- [10] Zhao K, Yang G S, Li J B, et al. Phylogenetic structure of *Schizopygopsis pylzovi* populations from mitochondrial cytochrome b gene sequence variations[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(2): 129-133. [赵凯, 杨公社, 李俊兵, 等. 黄河裸裂尻鱼群体遗传结构和 Cyt b 序列变异[J]. 水生生物学报, 2006, 30(2): 129-133.]
- [11] Cao W X, Wu X W, Yi B L, et al. Cyprinidae Fishes of China[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1964. [曹文宣, 伍献文, 易伯鲁, 等. 中国鲤科鱼类志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1964.]
- [12] Li S Z, Zhang S Y. Two new species and one new subspecies of fishes from the northern part of Kansu Province, China[J]. Current Zoology, 1974, 20(4): 414-419. [李思忠, 张世义. 甘肃省河西走廊鱼类新种及新亚种[J]. 动物学报, 1974, 20(4): 414-419.]
- [13] Zhang Y P, Du Y Y, Lou Z Y, et al. Molecular phylogeny of schizothoracine fishes in Gansu Province based on mitochondrial cytochrome b gene sequences[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 2013, 49(5): 91-96, 102. [张艳萍, 杜岩岩, 娄忠玉, 等. 甘肃省几种裂腹鱼类系统发育关系探讨[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2013, 49(5): 91-96, 102.]
- [14] Bielawski J P, Gold J R. Phylogenetic relationships of cyprinid fishes in Subgenus *Notropis* Inferred from nucleotide sequences of the mitochondrially encoded Cytochrome b Gene[J]. Copeia, 2001, 2001(3): 656-667.
- [15] Pérez-Rodríguez R, Domínguez-Domínguez O, Pérez Ponce de León G, et al. Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Algansea* Girard (Cypriniformes: Cyprinidae) of central Mexico inferred from molecular data[J]. BMC Evolutionary Biology, 2009, 9: 223.
- [16] Klicka J, Zink R M. The importance of recent ice ages in speciation: A failed paradigm[J]. Science, 1997, 277(5332): 1666-1669.
- [17] Aleixo A. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: A phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification[J]. Evolution; International Journal of Organic Evolution, 2004, 58(6): 1303-1317.
- [18] Kappas I, Vittas S, Pantartzis C N, et al. A time-calibrated mitogenome phylogeny of catfish (teleostei: Siluriformes)[J]. PLoS ONE, 2016, 11(12): e0166988.

- [19] Kusuma W E, Ratmuangkhwang S, Kumazawa Y. Molecular phylogeny and historical biogeography of the Indonesian freshwater fish *Rasbora lateristriata* species complex (Actinopterygii: Cyprinidae): Cryptic species and west-to-east divergences[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2016, 105: 212-223.
- [20] Miya M, Takeshima H, Endo H, et al. Major patterns of higher teleostean phylogenies: A new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 26(1): 121-138.
- [21] Tong C, Fei T, Zhang C F, et al. Comprehensive transcriptomic analysis of Tibetan Schizothoracinae fish *Gymnocypris przewalskii* reveals how it adapts to a high altitude aquatic life[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2017, 17(1): 74.
- [22] Yang T Y, Meng W, Hai S, et al. Molecular phylogeny of schizothoracinae fishes in Xinjiang based on mitochondrial cytochrome b gene sequences[J]. *Arid Zone Research*, 2011, 28(3): 555-561. [杨天燕, 孟玮, 海萨, 等. 新疆几种裂腹鱼类系统发育关系探讨[J]. *干旱区研究*, 2011, 28(3): 555-561.]
- [23] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [24] Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: The European molecular biology open software suite[J]. *Trends in Genetics: TIG*, 2000, 16(6): 276-277.
- [25] Li M Z, Long H X, Wang H T, et al. Determination of optimal parameters of multiple sequence alignment based on MAFFT program[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(7): 1668-1674. [李满枝, 龙海侠, 王洪涛, 等. 基于 MAFFT 的多序列比对最优参数的确定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(7): 1668-1674.]
- [26] Minh B Q, Schmidt H A, Chernomor O, et al. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, 37(5): 1530-1534.
- [27] Lee W J, Kocher T D. Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: Early establishment of the vertebrate genome organization[J]. *Genetics*, 1995, 139(2): 873-887.
- [28] Kimura M. The neutral theory of molecular evolution[J]. *Scientific American*, 1979, 241(5): 98-126.
- [29] Yang Z H. PAML: A program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. *Bioinformatics*, 1997, 13(5): 555-556.
- [30] Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, et al. BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis[J]. *PLoS Computational Biology*, 2014, 10(4): e1003537.
- [31] Li D P, Zhao Y, Liu J, et al. Late Cenozoic tectonic deformation on the northwestern margin of the qinghai-tibet plateau[J]. *Acta Geologica Sinica*, 2010, 84(3): 293-310. [黎敦朋, 赵越, 刘健, 等. 青藏高原西北缘晚新生代构造变形研究[J]. *地质学报*, 2010, 84(3): 293-310.]
- [32] He D K, Chen Y F. Molecular phylogeny and biogeography of highly specialized Schizothorax fishes[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(3): 303-312. [何德奎, 陈毅峰. 高度特化等级裂腹鱼类分子系统发育与生物地理学[J]. *科学通报*, 2007, 52(3): 303-312.]
- [33] Rambaut A, Drummond A J. Tracer v1.5: MCMC Trace Analyses Tool[CP/OL]. 2007. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- [34] Rambaut A. Fig Tree v1.4.4,a graphical viewer of phylogenetic trees[CP/OL]. 2018. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- [35] Cracraft J. Phylogenetic models and classification[J]. *Systematic Biology*, 1974, 23(1): 71-90.
- [36] Qi D L, Chao Y, Guo S C, et al. Convergent, parallel and correlated evolution of trophic morphologies in the subfamily schizothoracinae from the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34070.
- [37] da Fonseca R R, Johnson W E, O'Brien S J, et al. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 119.
- [38] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis[J]. *Cell*, 2005, 122(2): 221-233.
- [39] Wang Y, Shen Y J, Feng C G, et al. Mitogenomic perspectives on the origin of Tibetan loaches and their adaptation to high altitude[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29690.
- [40] Hassanin A, Ropiquet A, Couloux A, et al. Evolution of the mitochondrial genome in mammals living at high altitude: New insights from a study of the tribe Caprini (Bovidae, Antilopinae)[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2009, 68(4): 293-310.
- [41] Wang X B, Zhou S Y, Wu X Y, et al. High-altitude adaptation in vertebrates as revealed by mitochondrial genome analyses[J]. *Ecology and Evolution*, 2021, 11(21): 15077-15084.
- [42] Xu S Q, Luosang J B, Hua S, et al. High altitude adaptation and phylogenetic analysis of Tibetan horse based on the mitochondrial genome[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(8): 720-729.
- [43] Yu L, Wang X P, Ting N, et al. Mitogenomic analysis of Chinese snub-nosed monkeys: Evidence of positive selection in NADH dehydrogenase genes in high-altitude adaptation[J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(3): 497-503.
- [44] Knoll A H, Carroll S B. Early animal evolution: Emerging views from comparative biology and geology[J]. *Science*, 1999, 284(5423): 2129-2137.
- [45] Mayr E. Populations, species, and evolution: an abridgment of *Animal species and evolution*[M]. Cambridge, Mass.:

- Belknap Press of Harvard University Press, 1970.
- [46] Molnar P, England P, Martinod J. Mantle dynamics, uplift of the Tibetan Plateau, and the Indian monsoon[J]. *Reviews of Geophysics*, 1993, 31(4): 357.
- [47] Searle M P, Windley B F, Coward M P, et al. The closing of Tethys and the tectonics of the Himalaya[J]. *Geological Society of America Bulletin*, 1987, 98(6): 678.
- [48] Quade J, Cerling T E, Bowman J R. Development of Asian monsoon revealed by marked ecological shift during the latest Miocene in northern Pakistan[J]. *Nature*, 1989, 342(6246): 163-166.
- [49] Harrison T M, Copeland P, Kidd W S, et al. Raising Tibet[J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1663-1670.
- [50] Li Y L, Yang J C, Tan L H, et al. Impact of tectonics on alluvial landforms in the Hexi corridor, northwest China[J]. *Geomorphology*, 1999, 28(3-4): 299-308.
- [51] Qi D L, Guo S C, Zhao X Q, et al. Genetic diversity and historical population structure of *Schizopygopsis pylzovi* (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai? Tibetan Plateau[J]. *Freshwater Biology*, 2007, 52(6): 1090-1104.
- [52] Feng S W. Characteristics and evolution of Hexi water system in Gansu Province[J]. *Journal of Lanzhou University*, 1981, 17(1): 125-129. [冯绳武. 甘肃河西水系的特征和演变[J]. *兰州大学学报*, 1981, 17(1): 125-129.]
- [53] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. *Science*, 1987, 236(4803): 787-792.

Phylogenetic and adaptive evolution analysis of Schizothoracinae fish and the taxonomic status of *Gymnocypris chilianensis*

SONG Dan^{1,2}, PENG Di¹, CHENG Qiqun¹

1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Schizothoracinae is an endemic fish of the Tibetan Plateau and its surrounding areas. The phylogenetic and adaptive evolutionary mechanisms of this subfamily are unclear, and the taxonomic status of *Gymnocypris chilianensis* remains controversial. This study evaluated the complete mitochondrial genome sequences of 65 species of Schizothoracinae in 11 specified genera, with the aim of providing a genomic basis for elucidating the above issues. The corresponding results are as follows: (1) Phylogeny. The results showed that the Schizothoracinae subfamily is not monophyletic but belongs to two different clades, with each taxon containing several generic species. The primitive taxa of the Schizothoracinae fishes were grouped into one clade; the specialized taxa and highly specialized taxa were grouped into another clade; (2) Adaptive evolution. The results showed that no positive selection sites were detected at any of the 13 protein-coding genes with ω ratios < 1 . Positive selection sites were also found in *Atp6*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, and *ND5*. Nonetheless, positive selection primarily occurred in respiratory chain complex I (*NADH1-6*); the mitochondrial respiratory chain is the most important source of biologically reactive oxygen species (ROS), which may explain the adaptive evolutionary mechanism of the subfamily Schizothoracinae fishes in high-altitude hypoxic environments. For the divergence time study, the divergence time of the primitive taxon Schizothoracinae fishes was estimated to be before 3.200 Ma; the specialized taxon Schizothoracinae fishes began to differentiate between 5.972 Ma and 5.320 Ma in the late Miocene period; (3) Taxonomic status of *G. chilianensis*. Based on the Kimura two-parameter model, the genetic distance between *G. chilianensis* and *Schizopygopsis kessleri* was 0.0015. Nonetheless, the genetic distance between *G. chilianensis* and *Gymnocypris eckloni* was 0.0673 (> 0.0600), indicating species differentiation. Overall, it is clear that, at the molecular level, *G. chilianensis* is a distinct species of the genus *Gymnocypris* and not a subspecies of *G. chilianensis*. Therefore, this study provided evidence to resolve the long-standing disagreement over the taxonomic status of *G. chilianensis*.

Key words: Schizothoracinae; *Gymnocypris chilianensis*; phylogeny; adaptive evolution; mitogenome

Corresponding author: CHENG Qiqun. E-mail: chengqq@ecsf.ac.cn