

DOI: 10.12264/JFSC2024-0210

气候变暖诱发青藏高原盐湖变淡对拉果错卤虫形态变化和遗传变异的影响

韩学凯^{1, 2, 3, 4}, 张睿⁴, 扎西拉姆^{1, 2, 3}, 李科⁴, 隋丽英⁴, 张驰^{1, 2, 3}

1. 西藏自治区农牧科学院水产科学研究所, 西藏 拉萨 850032;
2. 西藏土著鱼类繁育与利用技术工程研究中心, 西藏 拉萨 850032;
3. 西藏自治区渔业与种质资源利用重点实验室, 西藏 拉萨 850032;
4. 亚洲区域卤虫参考中心, 天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457

摘要: 青藏高原是我国盐湖和卤虫(*Artemia*)资源分布最为丰富的地区之一。为探究近 20 多年来青藏高原经历的气候变暖和盐湖盐度下降对高原盐湖生物形态和遗传学特征的影响, 本研究选取 1996 年和 2021 年西藏拉果错盐湖卤虫进行培养和形态学测量, 并基于简化基因组测序(specific-locus amplified fragments sequencing, SLAF-seq)技术对两个年代卤虫遗传多样性和遗传结构进行分析。结果表明, 1996 年卤虫在复眼间距、第二触角长和抱握器外周长指标上均极显著($P<0.01$)大于 2021 年卤虫。遗传分析结果显示, 两个群体间遗传多样性差异较小, 多态信息含量(PIC)分别为 0.268 和 0.269, 属于中度多态性($0.25<PIC<0.5$); 两群体间遗传分化系数(F_{st})值为 0.106, 这表明其存在中等程度的遗传分化($0.05<F_{st}<0.15$)。系统进化树、主成分分析和亲缘关系热图进一步表明, 两个不同年代群体聚类差异明显。而 Admixture 表明, $K=1$ 为最优分群数, 这表明随着时间推移两个年份卤虫群体出现一定程度的分化, 但尚未分化为两个完全独立的居群, 它们的遗传信息来自同一原始祖先。本研究有助于全面了解气候变暖对西藏卤虫种群的影响, 也为后续西藏卤虫种质资源保护和利用提供理论支撑。

关键词: 青藏高原; 卤虫; 遗传多样性; 遗传结构; 种质资源; 气候变暖; 盐碱水

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2024)08–0978–10

卤虫(*Artemia*)是一种世界性分布的小型甲壳动物, 它不仅是高盐水体食物链的重要参与者, 同时也是水产动物重要开口饵料, 在水产养殖和海洋经济链中发挥着重要作用^[1-2]。随着全球水产养殖产量和人工培育的水产苗种产量的持续增加, 对卤虫资源的需求量逐年增加。作为天然资源, 卤虫及卤虫卵资源量和质量受环境和气候因素变化影响较大。

如今全球气候变暖已经打破部分区域的降水分布平衡, 并改变着当地物种的时空分布及多样

性水平^[3]。相比于海洋及淡水环境, 高盐生生态系统更加脆弱, 因此水资源失衡有可能对该系统内生物多样性带来更大威胁。卤虫在 40~180 g/L 盐度范围内生长繁殖和产休眠卵, 盐度是卤虫生存和种群繁殖的主要环境因素。研究表明, 墨西哥太平洋沿岸旧金山湾卤虫(*Artemia franciscana*)群体在 100~120 的盐度下存活率很高, 在 60 以下和 200 以上的盐度下死亡率很高^[4]。而伊朗乌尔米亚湖在过去 20 年里逐渐干涸已导致湖水盐度接近饱和水平, 90%以上卤虫种群丧失^[5]。如今中亚地

收稿日期: 2024-06-28; 修订日期: 2024-07-09.

基金项目: 中国博士后科学基金面上基金项目(2023MD734227); 天津市科技计划项目(23ZYCGSN00590); 西藏自治区重点科技计划项目(XZ202301ZY0012N); 农业农村部财政专项(CJW2023034); 中央引导地方项目(XZ202301YD0017C).

作者简介: 韩学凯(1987–), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为群体遗传学. E-mail: hanxk@tust.edu.cn

通信作者: 张驰, 副研究员, 研究方向为渔业种质资源. E-mail: zc0891@163.com

区最大的盐湖咸海同样面临着湖面缩小和盐度升高问题, 以致卤虫卵产量逐年缩减^[6]。青藏高原盐湖众多, 是我国卤虫资源最为丰富地区之一。在过去的 20 年里, 青藏高原正在经历温暖化和降水格局改变, 青藏高原的冰川和冰雪融化形成的淡水源源不断地汇入高原湖泊中, 导致湖面扩张、盐度降低^[7], 并有可能进一步引发高原盐湖卤虫的生存危机。作为青藏高原上卤虫产量最高的盐湖, 其香错湖的盐度近年来逐渐接近并将要突破其自然条件下正常生长繁殖的低值^[8], 由此引发的卤虫产量减少已成为制约西藏卤虫资源可持续利用的重要因素。

遗传多样性对于物种抵御不良环境能力和种群适应度等方面具有重要意义^[9-10]。全球气候变化有可能降低遗传多样性进而改变物种对环境变化的进化适应。近年来, 已有一些分子标记如 mtDNA、ISSR、RAPD 及 SSR 在卤虫中相继得到开发并用于群体遗传学研究^[11-14], 而目前西藏盐湖卤虫研究多集中于生物学特征、系统分类、营养价值等方面^[15-17], 有关其群体遗传学方面研究相对较少。最近, Li 等^[18]利用 SNP 标记对 7 个西藏盐湖卤虫种群进行群体遗传学分析, 发现西藏阿里地区卤虫种群可进一步划分为阿里东部和阿里西部两个地理群体, 并且两个群体的遗传多样性呈现西高东低的趋势。如今青藏高原上发生的气候变暖和变湿是否已经对盐湖卤虫生存、生长以及遗传多样性等方面造成影响却鲜有报道。仅

见 Li 等^[8]利用微卫星标记和 CO I 基因开展西藏其香错 1998、2007 和 2019 年 3 个不同年份卤虫的群体遗传学分析, 研究发现这 3 个年份卤虫遗传多样性持续下降, 遗传分化显著。但是由于西藏盐湖众多且分布相对分散, 各盐湖环境因子差异较大, 因此有必要针对更多西藏盐湖卤虫群体来探究近年来气候变化对其生长和遗传变异的影响。

拉果错盐湖是西藏的重要盐湖之一, 也是西藏卤虫(*Artemia tibetiana*)的定种湖。近年来拉果错盐湖的气候变化、湖面积变化及盐度下降等因素都可能对盐湖卤虫生存和生长带来不利影响。本研究选取拉果错 1996 和 2021 年两个年份卤虫, 开展不同年份卤虫生长和群体遗传学研究, 旨在探究西藏卤虫种群在面对气候变化等因素导致的环境变化时的生理和遗传反应。

1 材料与方法

1.1 卤虫培养

本研究选取 1996 年和 2021 年于西藏拉果错盐湖采集的卤虫卵, 卤虫卵样本来自亚洲区域卤虫参考中心(AR-ARC)卤虫种质资源库(表 1)。卤虫卵孵化条件为: 温度 28 ℃, 盐度 30 的人工海水, 光照 2000 lx, 持续曝气。孵化 24 h 后, 收集无节幼体, 转移至 1 L 锥形管中继续培养, 每天投喂适量小球藻藻细胞(*Chlorella* sp.), 每 3 d 换 1 次水。

表 1 样品来源及相关信息
Tab. 1 Sample source and related information

样品缩写 sample abbreviation	样品来源 sample source	采集年份 year of collection	AR-ARC 种质库编号 AR-ARC GeneBank ID	种名 species name
LGC-1996	西藏拉果错 Lagkor, Tibet	1996	CHN-SL-43	西藏卤虫 <i>Artemia tibetiana</i>
LGC-2021	西藏拉果错 Lagkor, Tibet	2021	CHN-SL-77	西藏卤虫 <i>Artemia tibetiana</i>

1.2 卤虫成虫形态特征测量和分析

待卤虫生长到成体阶段时, 分别取雌、雄各 30 只共 60 只卤虫进行表型测量。在体式显微镜下分别对虫进行形态学测量。雌性测量指标包括: 体长、腹长、体宽、复眼间距、复眼直径、第二触角长、卵囊直径、头宽; 雄性测量指标包括: 体

长、腹长、体宽、复眼间距、复眼直径、抱握器外周长、额结节直径、生殖节长、头宽。将 1996 年和 2021 年拉果错卤虫分为雌、雄两组, 同时将形态数据除以头宽进行标准化。利用 SPSS 22.0 对这各组的形态学指标进行独立样本 t 检验分析。通过 Kolmogorov-Smirnov 检验每个群体的数据

是否呈正态分布,通过 Levene 检验确定方差的同质性。利用 SPSS 软件对数据进行标准化及分析后,导入 Origin 软件进行主成分分析,生成散点图。

1.3 基因组 DNA 提取及简化基因组测序

每个年份各选 10 只成体卤虫,基因组 DNA 提取选用天津兰瑞生物技术有限公司的全基因组提取试剂盒完成。选取艾比湖孤雌卤虫(*Artemia parthenogenetica*)基因组(本课题组未发表数据)作为参考基因组进行酶切预测,最终确定采用的限制性内切酶组合为 *Hae* III+*Hpy*166II,酶切片段长度预计为 364~414 bp。并以此酶切方案进行后续文库构建。文库构建和测序分析由北京百迈客生物科技有限公司完成。

1.4 SNP 标记开发

在对原始数据进行质量检查和筛选后,保留高质量的 reads 并根据相似性进行聚类,并以本课题组艾比湖孤雌卤虫基因组为参考进行 SNP 标记开发。将筛选后的 reads 基于 BWA^[19]方法比对到艾比湖孤雌卤虫基因组上,后利用 GATK (v3.8)^[20]和 Samtools(v1.9)^[21]两种方法进行 SNP 数据整合和标记开发。

1.5 群体遗传分析

根据筛选得到的 SNPs,利用百迈克公司编写

的脚本,完成群体遗传多样性指标分析。主要包括期望等位基因数(E_a)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、基因多样性指数(Nei)、观测等位基因数(O_a)、多态信息含量(PIC)和香农-威纳指数(I)。

基于 SNP 数据,通过 EIGENSOFT(v6.0)^[22]软件完成两个群体间 20 个样本的主成分分析。利用 MEGA X^[23]软件,采用邻接法构建 20 个卤虫个体的系统发育树。两个群体间的遗传结构分析采用 Admixture(v1.22)^[24]软件完成。而个体间的亲缘关系分析和 Kinship 热图绘制采用 GCTA (v1.92.1)^[25]软件完成。

2 结果与分析

2.1 雌雄成体形态测量分析

独立样本 t 检验分析发现两个年代雌性卤虫仅在复眼间距和第二触角长指标存在极显著差异($P<0.01$),且 1996 年卤虫极显著大于 2021 年卤虫(图 1a)。而两个年代雄性卤虫仅在复眼间距和抱握器外周长指标存在极显著差异($P<0.01$),1996 年卤虫在这两个指标上极显著大于 2021 年卤虫(图 1b)。两个年代卤虫虽然在多个形态学指标方面无显著差异,但是 1996 年卤虫在复眼间距、第二触角长和抱握器外周长方面极显著大于 2021

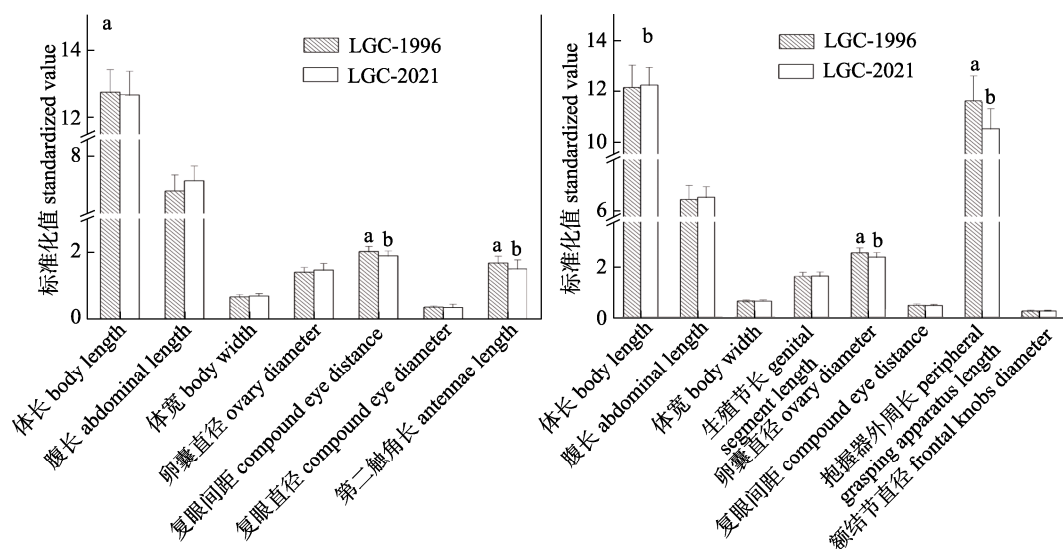


图 1 1996 年和 2021 年拉果错卤虫群体形态差异性

a. 雌性; b. 雄性。

Fig. 1 Morphological variability in the population of the *Artemia tibetiana* in lagkor Co in years 1996 and 2021

a. Female; b. Male.

年卤虫($P<0.01$)。

2.2 形态学主成分分析

雄性卤虫形态学数据分析中共获得 3 个主成分, 累计贡献率为 70.076%。其中主成分 1、2 和 3 的值分别为 48.301%、12.587%和 9.187% (图 2A)。绘制散点图发现虽然两个年份雄性卤虫整体形态相似度较大, 但是通过俯视图(图 2B)可以看出, 通过 PC1 可以对两个年份雄性卤虫进行一定程度的区分。由图中向量箭头发现, 体长、腹长、复眼间距等指标对第 1 个主成分轴的贡献率高; 抱

握器外周长、腹长、生殖节长等指标对第 2 个主成分轴的贡献率高, 额结节直径、生殖节长等指标对第 3 个主成分轴的贡献率高。

在雌性卤虫形态学数据的主成分分析结果中共获得 3 个主成分, 累计贡献率为 68.136%。其中主成分 1、2 和 3 的贡献率分别为 41.901%、13.384%和 12.852%。基于这 3 个主成分绘制散点图, 发现两个年份之间均有不同程度的重叠且距离较近, 说明两个年份雌性卤虫群体间整体形态相似度较大(图 3)。根据图中向量箭头发现, 体宽、

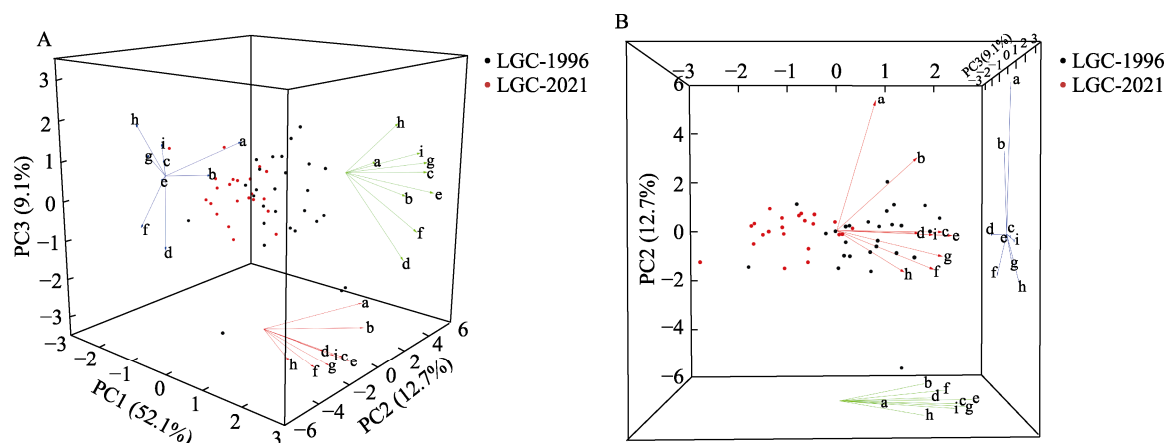


图 2 1996 年和 2021 年拉果错雄性卤虫形态主成分分析

A. 主视图; B. 俯视图. a: 体长, b: 腹长, c: 体宽, d: 生殖节, e: 复眼间距, f: 复眼直径, g: 抱握器外周长, h: 额结节, i: 头宽。

Fig. 2 Principal component analysis of male *Artemia* morphology in Lagkor Co in years 1996 and 2021

A. The main view, B. The top view. a: body length, b: abdominal length, c: body width, d: genital segment, e: compound eye distance, f: compound eye diameter, g: peripheral grasping apparatus, h: frontal knobs, i: head width.

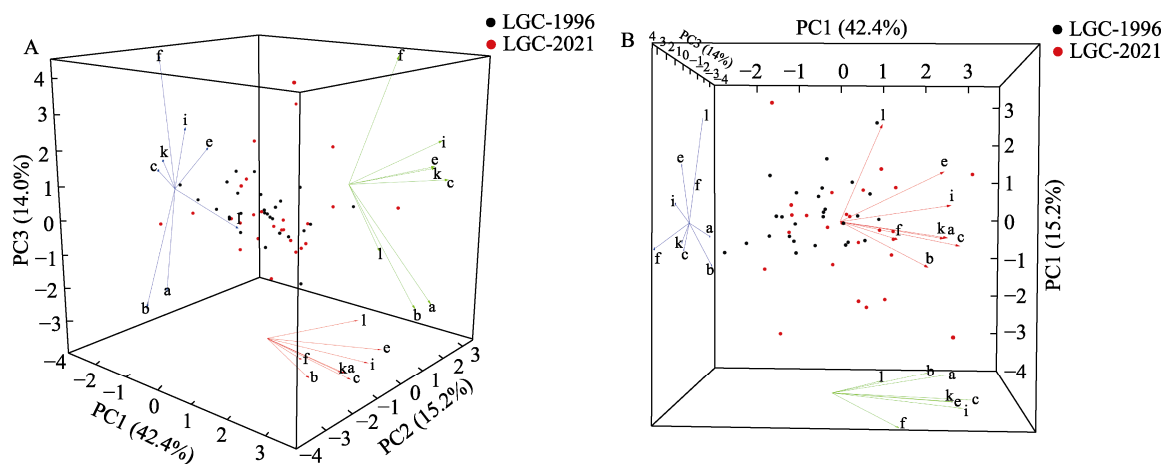


图 3 1996 年和 2021 年拉果错雌性卤虫形态主成分分析

A. 主视图; B. 俯视图. a: 体长, b: 腹长, c: 体宽, e: 复眼间距, f: 复眼直径, k: 卵囊直径, l: 第二触角长, i: 头宽。

Fig. 3 Principal component analysis of female *Artemia* morphology in Lagkor Co in years 1996 and 2021

A. The main view; B. The top view. a: body length, b: abdominal length, c: body width, e: compound eye distance, f: compound eye diameter, k: ovary diameter, l: antennae length, i: head width.

体长、腹长等指标在 PC1 轴上投影较大,说明这些性状对第 1 个主成分轴的贡献率高;第二触角长、复眼直径等指标对第 2 个主成分轴的贡献率高,而体长、复眼间距等指标对第 3 个主成分轴的贡献率高。

2.3 测序数据统计分析

对 20 个卤虫测序样本的数据进行统计分析,共获得 229.12 Mb reads 数据,测序平均 Q30 为 92.40%,平均 GC 含量为 36.96%。开发 458884 个 SLAF 标签中有 263069 个为多态性 SLAF 标签,平均测序深度为 13.60 ×。共开发得到 1757916 个 SNP

标记,后筛选获得 680955 个 SNP 用于下游分析。

2.4 群体遗传多样性分析

遗传多样性分析发现 LGC-1996 群体在 E_a 、 O_a 和 H_o 指标方面大于 LGC-2021 群体,而在其他指标方面均小于 LGC-2021 群体,两个卤虫群体整体遗传多样性差异较小(表 2)。根据 Botstein 等^[26]的标准, LGC-1996 和 LGC-2021 两群体的 PIC 值均介于 0.25~0.50,呈现中度多态性。LGC-1996 群体内部 H_o 值大于 H_e 值,而 LGC-2021 群体内部 H_o 值小于 H_e 值,说明两个不同年代群体内部交配方式可能存在差异。

表 2 1996 年和 2021 年卤虫群体的遗传多样性指数

Tab. 2 Genetic diversity indexes of *Artemia* populations in Lagkor Co in years 1996 and 2021

群体 population	期望等位 基因数(E_a) expected allele	期望杂 合度(H_e) expected heterozygosity	基因多样性 指数(Nei) genetic diversity index	观测等位基因 (O_a) observed alleles	观测 杂合度(H_o) observed heterozygosity	多态性信息 含量(PIC) polymorphic information content	香农-威纳指数(I) Shannon Wiener index
LGC-1996	1.468	0.331	0.356	1.848	0.334	0.268	0.503
LGC-2021	1.427	0.332	0.359	1.770	0.323	0.269	0.504

2.5 群体遗传结构分析

基于不同群体的 SNP 差异程度可将卤虫群体聚成不同亚群,PC1 和 PC2 的贡献率分别为 9.20% 和 5.74%。LGC-1996 群体中的个体比较分散,而 LGC-2021 群体中个体比较集中,两个群体聚类模式存在明显差异,通过 PC1 可将两个群体分开(图 4)。

通过构建系统发育树发现,1996 和 2021 年拉果错卤虫群体聚类效果明显,说明两个群体具有一定的遗传分化(图 5)。进一步分析发现两个群体

间总的遗传分化系数 F_{st} 值为 0.106,表明两个不同年代群体间存在中等程度的遗传分化($0.1 < F_{st} < 0.25$)。然而基于 Admixture 分析显示,当 $K=1$ 时,

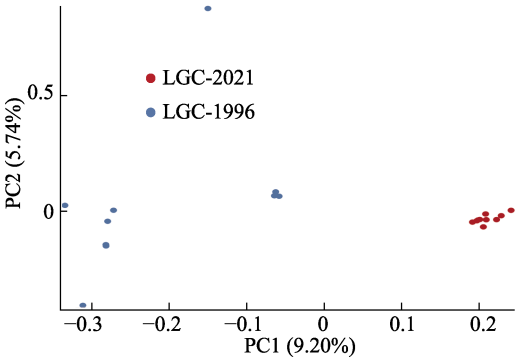


图 4 基于 SNP 数据的 1996 年和 2021 年拉果错卤虫群体的主成分分析

Fig. 4 Principal component analysis of *Artemia* populations in Lagkor Co in years 1996 and 2021 based on SNPs

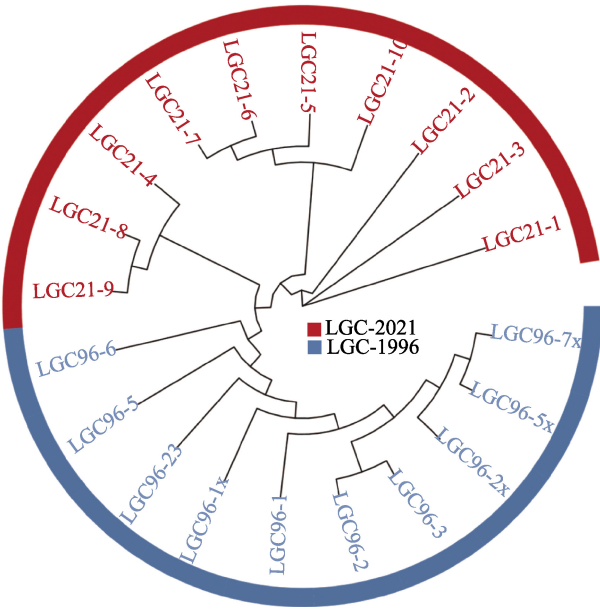


图 5 邻接法构建 1996 年和 2021 年拉果错卤虫群体系统发育树

Fig. 5 Neighbor-Joining phylogenetic tree of *Artemia* populations in Lagkor Co in years 1996 and 2021

交叉验证错误率最低,说明两个群体尚未完全分化为两个独立居群(图 6)。

亲缘关系热图可反映群体间两两个体间的亲缘关系,图中由蓝到红颜色变化对应个体间亲缘关系由远到近的变化。由图可知, LGC-1996 所有

个体和 LGC-2021 所有个体分别组成两个亚群(图 7)。其中 LGC-1996 个体组成亚群和 LGC-2021 个体组成的亚群之间遗传信息相似度较低,亲缘关系较远。而两个亚群内部个体之间遗传信息相似度更高,亲缘关系更近。

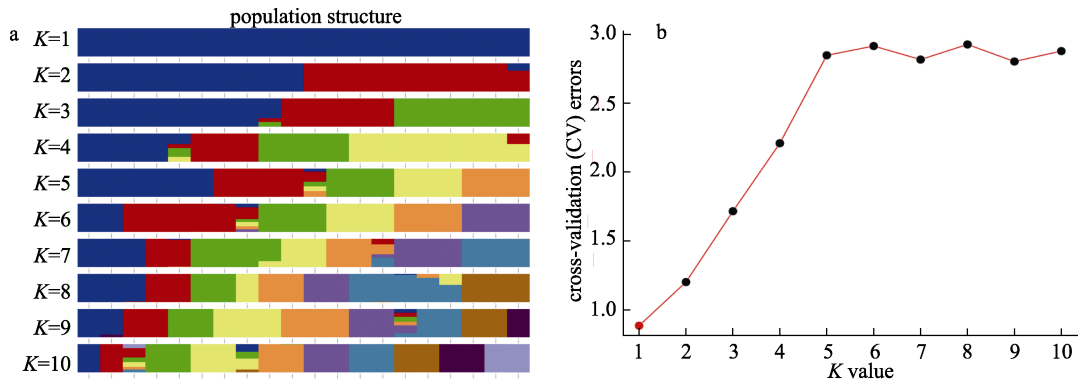


图 6 基于 Admixture 各个 K 值对应的卤虫样品聚类结果(a)和交叉验证错误率(b)
Fig. 6 Model-based population assignment by Admixture analysis for $K=1$ to 10 (a) and cross validation error rate (b)

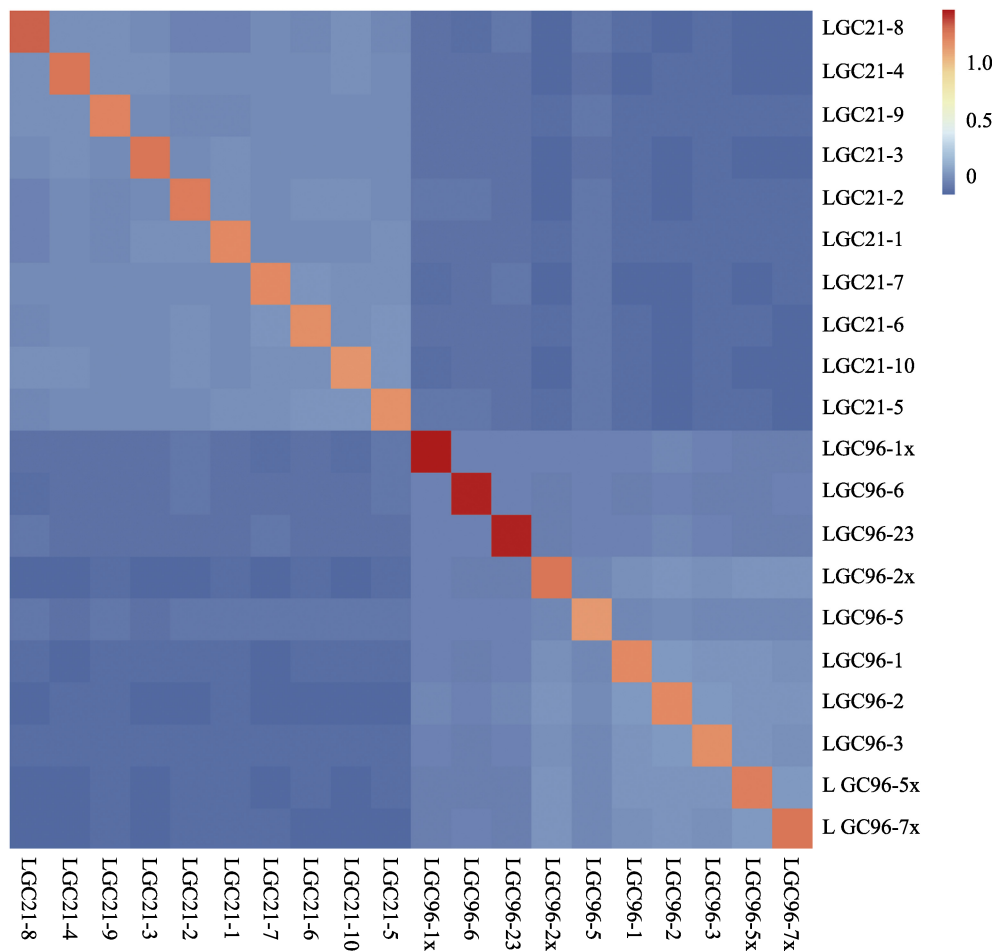


图 7 1996 年和 2021 年所取卤虫个体的亲缘关系热图
Fig. 7 Heat map of kinship of *Artemia tibetiana* individuals in years 1996 and 2021

3 讨论

在过去的几十年间,全球气候变化和人为因素已威胁到许多水生生态系统稳定,并可能进一步影响到该系统内物种的生存分布、多样性水平及基因表达谱^[27]。研究表明,在诸多环境因子中,盐度可作为水生生态系统中的主要压力源并对水生生物生存和分布起到至关重要的作用^[27-28],水体环境中盐成分变化会导致物种生态隔离和生理变化^[29-30]。如今由气候变暖引起的青藏高原降水分布格局变化和冰川融雪已经引发许多高原盐湖盐度的持续降低,并可能进而威胁到以卤虫为代表的盐湖生物的生存、生长和繁衍^[31-32]。本研究发现近 25 年间拉果错盐度降低虽然对卤虫整体形态变化影响不大,但是 1996 年卤虫在复眼间距、第二触角长和抱握器外周长方面极显著大于 2021 年卤虫。前期研究表明,相对于低盐度环境卤虫,高盐度环境下卤虫具有更小的形态学参数^[33-35],通常认为卤虫成虫体型变小的主要原因是在高盐度水平(200~250)下,食物成为限制因素,卤虫需要更多的能量来进行渗透调节^[36]。此外,在长期高盐度环境胁迫下,卤虫也可能通过调节部分热休克蛋白基因的表达来实现对长期生态改变的适应,而其代价则是形态学参数的减小^[34]。而本研究发现随着拉果错盐湖盐度从 1996 年的 62^[32]降到 2019 年的 45 (本团队使用 ATAGO 盐度计测量结果),拉果错卤虫的部分形态学参数也相应减小。已有研究发现卤虫在 45~60 的盐度范围内,其渗透调节机制会发生重构(从高盐度下的低渗型到低盐度下的高渗型),从而导致其对应激因子的抵抗力下降,死亡率增加^[31]。这表明拉果错卤虫在近 25 年期间发生的部分形态学参数减小的现象,可能是由于盐度所引发的渗透调节机制的改变所引起的。已有卤虫形态学参数的聚类分析表明,高盐环境下的盐度是决定卤虫种群分组的重要因素^[33]。近年来由于伊朗乌尔米亚湖盐湖盐度持续升高,其 2020 年卤虫群体相较于 1994 年群体形态特征明显萎缩,形态学参数聚类上更为独立^[34]。本研究中形态学主成分分析发现两个年份个体均有不同程度的重叠且距离较近,说明群体间整体

形态相似度较大,但依据 PC1 可以对两个年份雄性卤虫进行一定程度的区分。以上研究结果进一步表明长期的盐度变化不但会引起卤虫形态学特征和适应性改变,而且有可能会影响其群体结构分化。

群体遗传多样性对物种适应多变而复杂的外界环境至关重要,同时也是物种种质资源评价和保护工作重要内容。多态信息含量和杂合度是遗传多样性评价的两个优良指标。从多态信息含量指标来看,两个不同年份拉果错卤虫群体 PIC 分别为 0.268 和 0.269,属于中度多态性($0.25 < \text{PIC} < 0.5$), H_e 和 H_o 分别为 0.331~0.332 及 0.323~0.334,这些指标均高于前期基于 SNP 标记对西藏 7 个盐湖卤虫群体的报道结果,但是低于利用微卫星标记对西藏其香错卤虫的分析结果,这可能是不同盐湖卤虫群体以及分子标记的差异所造成的。本研究发现虽然 1996 年和 2021 年拉果错盐湖盐度有所下降,但是卤虫群体间遗传多样性变化并不明显。而两个群体间遗传分化系数 F_{st} 值为 0.106,表明两群体间存在中等程度的遗传分化。系统进化树和主成分分析进一步显示,两个不同年代群体中的个体分别聚集,群体间没有个体重叠或交叉,说明两个群体间确实存在较大遗传差异。遗传结构可能会受到遗传漂变、种群大小、自然选择、物种传播等多种因素的影响^[37]。通常认为时间遗传变异主要是由遗传漂变和遗传选择引起的^[38]。近年来关于伊朗乌尔米亚湖和西藏其香错卤虫群体遗传学表明,盐湖盐度的升高和降低会引起卤虫群体遗传多样性降低和显著的时间遗传分化,并认为这可能是遗传漂变和盐度变化共同选择的结果^[8,34]。与之相似的是,本研究发现拉果错两群体间已发生中等程度遗传分化,但是 Admixture 软件分析表明两个群体来自于一个原始祖先,随着时间推移出现一定程度的分化,但尚未完全分化为两个完全独立的居群。考虑到拉果错盐湖近些年经历的盐度变化,笔者推测气候变化引起的盐度下降可能是拉果错卤虫发生形态和时间遗传变异的主要原因。

尽管拉果错卤虫在近 25 年间形态学和遗传

多样性没有发生明显变化,但是如今拉果错盐湖卤虫正在面临盐度降低、气候变暖和卤虫卵捕捞等多重复杂因素的干扰,另外考虑到西藏卤虫的遗传多样性总体水平不高,以及预测西藏地区卤虫种群适生区在未来将急剧缩小等情况^[18],有必要针对西藏不同盐湖特殊情况,制定自然生境保护政策,以完善西藏盐湖卤虫资源监测、评估和保护制度。

4 结论

本研究通过对西藏拉果错 1996 和 2021 两个不同年代卤虫群体的成虫形态和遗传学进行比较分析,发现两个年代卤虫成虫形态整体差异不大,但是在复眼间距、第二触角长和抱握器外周方面存在极显著差异($P<0.01$)。两个群体在遗传多样性方面差异较小,但是遗传分化系数、系统进化树、主成分分析以及亲缘关系均表明两个群体间存在一定程度的遗传分化,而这些形态特征和遗传差异变化可能是由于拉果错盐湖近年来所经历的气候变暖引起的盐度下降以及遗传漂变所引起的。

参考文献:

- [1] Sorgeloos P, Dhert P, Candreva P. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture[J]. Aquaculture, 2001, 200(1-2): 147-159.
- [2] Dattilo A M, Bracchini L, Carlini L, et al. Estimate of the effects of ultraviolet radiation on the mortality of *Artemia franciscana* in naupliar and adult stages[J]. International Journal of Biometeorology, 2005, 49(6): 388-395.
- [3] Parmesan C. Climate and species' range[J]. Nature, 1996, 382(6594): 765-766.
- [4] Castro-Mejía J, Castro-Barrera T, Hernández-Hernández L H, et al. Effects of salinity on growth and survival in five *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae) populations from Mexico Pacific Coast[J]. Revista De Biología Tropical, 2011, 59(1): 199-206.
- [5] Asem A, Eimanifar A, van Stappen G, et al. The impact of one-decade ecological disturbance on genetic changes: A study on the brine shrimp *Artemia urmiana* from Urmia Lake, Iran[J]. PeerJ, 2019, 7: e7190.
- [6] Aladin N V, Gontar V I, Zhakova L V, et al. The zoocenosis of the Aral Sea: Six decades of fast-paced change[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(3): 2228-2237.
- [7] Yan L J, Zheng M P, Wei L J. Change of the lakes in Tibetan Plateau and its response to climate in the past forty years[J]. Earth Science Frontiers, 2016, 23(4): 310-323. [闫立娟, 郑绵平, 魏乐军. 近 40 年来青藏高原湖泊变迁及其对气候变化的响应[J]. 地学前缘, 2016, 23(4): 310-323.]
- [8] Li W J, Chen P P, Sui L Y, et al. Temporal genetic variation mediated by climate change-induced salinity decline, a study on *Artemia* (Crustacea: Anostraca) from Kyêbxang Co, a high altitude salt lake on the Qinghai-Tibet Plateau[J]. Gene, 2024, 902: 148160.
- [9] Li M W, Chen S F, Shi S, et al. High genetic diversity and weak population structure of *Rhododendron jinggangshanicum*, a threatened endemic species in Mount Jinggangshan of China[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2015, 58: 178-186.
- [10] Shen H, Liu D Y. Summary of genetic diversity[J]. Journal of Biology, 2001, 18(3): 5-7, 4. [沈浩, 刘登义. 遗传多样性概述[J]. 生物学杂志, 2001, 18(3): 5-7, 4.]
- [11] Zhang L, King C E. Genetic variation in sympatric populations of diploid and polyploid brine shrimp (*Artemia parthenogenetica*)[J]. Genetica, 1992, 85(3): 211-221.
- [12] Eimanifar A, Wink M. Fine-scale population genetic structure in *Artemia urmiana* (Günther, 1890) based on mtDNA sequences and ISSR genomic fingerprinting[J]. Organisms Diversity & Evolution, 2013, 13(4): 531-543.
- [13] Saad Y M, El-sebaie H E A, Mahoud N H, et al. Reconstruction of phylogenetic relations among some *Artemia* species[J]. Life Science Journal, 2014, 11(8): 822-826.
- [14] Han X K, Xu R Y, Zheng Y Y, et al. Development of EST-SSR markers and genetic diversity analysis among three *Artemia* species from different geographic populations [J]. Crustaceana, 2019, 92(7): 841-851.
- [15] van Stappen G, Sui L Y, Xin N H, et al. Characterisation of high-altitude *Artemia* populations from the Qinghai-Tibet Plateau, PR China[J]. Hydrobiologia, 2003, 500(1-3): 179-192.
- [16] Zheng B, Sun S C. Taxonomic consideration of eight Chinese bisexual *Artemia* populations, based on the morphology of frontal knob and gonopod and the result of cross-breeding tests[J]. Zootaxa, 2008, 1919(1): 25-44.
- [17] Planas M, Silva C, Quintas P, et al. Ongrowing and enhancement of n-3 HUFA profile in adult *Artemia*: Short- vs long-time enrichment[J]. Journal of Applied Phycology, 2017, 29(3): 1409-1420.
- [18] Li K, Zhang R, Sui L Y, et al. Genetic structure of ten *Artemia* populations from China: Cumulative effects of ancient geological events, climatic changes, and human activities[J]. Frontiers in Marine Science, 2024, 11: 1375641.

- [19] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [20] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [21] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [22] Price A L, Patterson N J, Plenge R M, et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies[J]. *Nature Genetics*, 2006, 38(8): 904-909.
- [23] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [24] Alexander D H, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals[J]. *Genome Research*, 2009, 19(9): 1655-1664.
- [25] Yang J, Lee S H, Goddard M E, et al. GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2011, 88(1): 76-82.
- [26] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [27] Velasco J, Gutiérrez-Cánovas C, Botella-Cruz M, et al. Effects of salinity changes on aquatic organisms in a multiple stressor context[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2019, 374(1764): 20180011.
- [28] Ge Q Q, Li Z D, Li J T, et al. Effects of acute salinity stress on the survival and prophenoloxidase system of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2020, 39(4): 57-64.
- [29] Browne R A, Wanigasekera G. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, 244(1): 29-44.
- [30] Yao X C, Meng L F, Zhao W L, et al. Changes in the morphology traits, anatomical structure of the leaves and transcriptome in *Lycium barbarum* L. under salt stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1090366.
- [31] Mirzoyeva N Y, Anufrieva E V, Shadrin N V. The effect of gamma radiation on *parthenogenetic Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) cysts: Nauplius hatching and postnaupliar survival under varying salinity[J]. *Biology Bulletin*, 2019, 46(10): 1390-1396.
- [32] Liu J Y, Zheng M P, Luo J. A study of *Artemia* in Lagkor Co, Tibet, I: Biological feature[J]. *Journal of Lake Sciences*, 1998, 10(2): 92-96. [刘俊英, 郑绵平, 罗健. 西藏拉果错卤虫—I. 生物学特征[J]. 湖泊科学, 1998, 10(2): 92-96.]
- [33] Litvinenko L I, Boyko E G. The morphological characteristics of *Artemia* shrimps from Siberian populations[J]. *Inland Water Biology*, 2008, 1(1): 37-45.
- [34] Ravanbakhsh R, Agh N, Nouraein M, et al. Prolonged ecological changes can affect morphometrics and gene expression profile? Focusing on *Hsp-70* and NLHS-induced *Hsp-70* of *Artemia urmiana*[J]. *Environmental Research*, 2023, 238: 117254.
- [35] Naceur H, Jenhani A, Romdhane M. Influence of environmental factors on the life cycle and morphology of *Artemia salina* (Crustacea: Anostraca) in Sabkhet El Adhibet (SE Tunisia)[J]. *Biology Letters*, 2011, 48(1): 67-83.
- [36] Naegel L C A, Rodríguez-A S. Ecological observations and biomass proximate composition of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea: Anostraca) from Pichilingue, Baja California Sur, México[J]. *Hydrobiologia*, 2002, 486(1): 185-190.
- [37] Mathur S, DeWoody J A. Genetic load has potential in large populations but is realized in small inbred populations[J]. *Evolutionary Applications*, 2021, 14(6): 1540-1557.
- [38] Wright S. *Evolution and the genetics of populations*[M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1969.

Effects of climate warming-induced desalination of salt lakes on morphological changes and genetic variation of *Artemia* in Lagkor Co, Qinghai-Tibet Plateau

HAN Xuekai^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Rui⁴, LHAMO Tashi^{1, 2, 3}, LI Ke⁴, SUI Liying⁴, ZHANG Chi^{1, 2, 3}

1. Institute of Aquatic Sciences, Xizang Autonomous Region Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lasa 850032, China;
2. Indigenous Fish Breeding and Utilization Engineering Research Center of Xizang, Lasa 850032, China;
3. Key Laboratory of Fishery and Germplasm Resources Utilization of Xizang Autonomous Region, Lasa 850032, China;
4. Asian Regional Artemia Reference Center; College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: *Artemia* is a tiny crustacean that lives in high-salinity waters and is widely distributed in inland salt lakes and coastal salt pans. *Artemia* is not only an important participant in the food chain of hypersaline water ecosystems, but also a crucial live food for aquatic animals. The Qinghai-Tibet Plateau is one of the regions with the most abundant salt lakes and *Artemia* resources in China. In recent years, the Qinghai-Tibet Plateau has experienced warming and changing precipitation patterns. Fresh water from melting glaciers and snow on the Qinghai-Tibet Plateau continuously flows into plateau lakes, leading to lake expansion and salinity reduction, which may further cause the survival crisis of *Artemia* in these lakes. To explore the effects of climate warming and salt lake salinity decline on the morphology and genetic characteristics of plateau salt lake organisms over the past 20 years, we selected the 1996 and 2021 *Artemia* populations from Lagkor Co (LGC) for culture and morphological measurement. In addition, the genetic diversity and structure of *Artemia* were analyzed using specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq). This study observed that although the decrease in LGC salinity in the last 25 years had negligible effect on the overall morphological changes in *Artemia*, the compound eye distance, second antennal length and peripleral grasping apparatus length were significantly higher in 1996 than that in 2021 ($P < 0.01$). A total of 229.12 Mb of read data were obtained by SLAF-seq, with an average sequencing Q30 of 92.40% and an average GC content of 36.96%. Furthermore, 263069 polymorphic SLAF tags were developed, and 680955 SNP markers were selected for population genetic analysis. Genetic diversity analysis showed that the LGC-1996 population was larger than the LGC-2021 population in E_s , O_s , and H_o indices and smaller than the LGC-2021 population in other indices; however, the overall genetic diversity difference between the two *Artemia* populations was small. The polymorphism information content (PIC) values for LGC-1996 and LGC-2021 were 0.268 and 0.269, respectively, indicating moderate polymorphism ($0.25 < \text{PIC} < 0.5$). The genetic differentiation coefficient (F_{st}) value between the two populations was 0.106, indicating a moderate degree of genetic differentiation ($0.05 < F_{st} < 0.15$). Phylogenetic tree analysis, principal component analysis, and kinship heat map analysis further showed obvious clustering differences between these two populations. The Admixture analysis showed that $K=1$ is the optimal number of subpopulations, which indicated that these two *Artemia* populations have differentiated to a certain extent over time, however, have not differentiated into two completely independent populations and their genetic information comes from the same original ancestor. These changes in morphological characteristics and genetic differences may be due to the decrease in salinity caused by climate warming and the genetic drift that LGC has experienced in recent years. In addition, considering the overall low level of genetic diversity and the potential threat of environmental change, developing and improving the monitoring, assessment, and protection system of *Artemia* resources in salt lakes of Tibet is necessary. This study not only contributes to a comprehensive understanding of the impact of climate warming on *Artemia* populations, but also provides theoretical support for the conservation and utilization of *Artemia* germplasm resources in Tibet.

Key words: Qinghai-Tibet Plateau; *Artemia*; genetic diversity; genetic structure; germplasm resources; climate warming; saline-alkali water

Corresponding author: ZHANG Chi. E-mail: zc0891@163.com