

小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体基因组比较及系统发育分析

张亚颖^{①②} 何慧^① 马海霞^{①②} 郭铭炎^{①②}
张玉婉^{①③} 封烁^{①*}

① 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室 西宁 810016;

② 青海大学生态环境工程学院 西宁 810016; ③ 青海大学农牧学院 西宁 810016

摘要: 线粒体是真核生物中具有独立遗传物质的重要细胞器。本研究比较了小头高原鱼 (*Heizensteinia microcephalus*) 和骨唇黄河鱼 (*Chuanchia labiosa*) 的线粒体基因组, 重建了系统发育关系, 并估算了分化时间。结果表明, 这两种鱼类的线粒体基因组都是典型的圆形环状结构, 长度分别为 16 726 bp 和 16 705 bp, 均包含 13 个蛋白质编码基因、22 个转运 RNA 基因、两个核糖体 RNA 基因和一个非编码控制区。*ATPase8* 基因表现出较高的 K_a/K_s 值 (0.527 和 0.256)。基于最大似然法的系统发育分析显示, 高原鱼属和黄河鱼属与裸裂尻鱼属 (*Schizopygopsis*) 的亲缘关系最为接近。小头高原鱼和骨唇黄河鱼之间的分化时间可以追溯到 0.83 百万年前。本研究可以为改进高原鱼类的生物多样性保护战略提供一定的理论基础。

关键词: 小头高原鱼; 骨唇黄河鱼; 线粒体基因组; 系统发育; 分化时间

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2024) 05-743-11

Comparative and Phylogenetic Analysis of Mitochondrial Genomes of *Heizensteinia microcephalus* and *Chuanchia labiosa*

ZHANG Ya-Ying^{①②} HE Hui^① MA Hai-Xia^{①②} GUO Ming-Yan^{①②}
ZHANG Yu-Wan^{①③} FENG Shuo^{①*}

① State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016;

② College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016;

③ College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: [Objectives] The study aims to analyze the complete sequence of the mitochondrial genome of *Heizensteinia microcephalus* and *Chuanchia labiosa*, and to explore the phylogenetic relationship of Schizothoracinae fishes based on the mitochondrial genome sequence. **[Methods]** We obtained the

基金项目 青海大学农牧学院大学生科研训练项目 (No. NKX202303);

* 通讯作者, E-mail: fengshuo8894@126.com;

第一作者介绍 张亚颖, 女, 硕士研究生; 研究方向: 适应性进化; E-mail: zyyebf@163.com.

收稿日期: 2023-10-26, 修回日期: 2024-03-10 DOI: 10.13859/j.cjz.202423198

mitochondrial genome sequences of *H. microcephalus* and *C. labiosa* from NCBI and used the online software MitoAnnotator to map the mitochondrial genomes. The base composition of the whole mitochondrial genomes of both species was calculated using the Sequence Manipulation Toolbox. Relative synonymous codon usage (RSCU) was calculated using CodonW software. K_a/K_s values were calculated using KaKs_calculator v 3.0 software based on the NG method. The best nucleotide substitution model was automatically selected using the MFP parameter in IQtree2 software, and the maximum likelihood (ML) tree was constructed using the GTR + F + I + I + R2 evolutionary model, and the confidence value of each branch node of the phylogenetic tree was examined using bootstrapping with 1 000 repetitions. Differentiation times were estimated using the MCMCtree subroutine in the PAML v4.9j package. **[Results]** The two mitogenomes are typical circular molecules of 16 726 and 16 705 bp in length containing 13 protein-coding genes (PCGs), 22 transfer RNA genes (tRNAs), two ribosomal RNA genes (rRNAs) and one non-coding control region (D-loop) (Fig. 1 and Table 2). In addition, the *ATPase8* gene showed a higher K_a/K_s value (0.527 and 0.256) and the *NDL4* gene showed a lower K_a/K_s value (0.527 and 0.256, Fig. 3). Maximum likelihood phylogenetic analyses revealed that *H. microcephalus* and *C. labiosa* were the closest relatives, and the genus *Heizensteinia* and the genus *Chuanchia* were closest to the genus *Schizopygopsis* (Fig. 4). The divergence between *H. microcephalus* and *C. labiosa* was dated back to 0.83 million years ago (Mya) (Fig. 5). **[Conclusion]** This study helped to improve biodiversity conservation strategies for highland fishes in the future.

Key words: *Heizensteinia microcephalus*; *Chuanchia labiosa*; Mitogenome; Phylogenetic analyses; Divergence time

线粒体是细胞的能量代谢中心,在 ATP 合成和通过细胞呼吸产生热量方面发挥着关键作用。95% 以上的细胞能量是由线粒体通过氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 产生的。因此,线粒体编码的氧化磷酸化基因可能在自然选择下产生进化,并在哺乳动物、鸟类和鱼类中显示出不同的适应性进化 (Shen et al. 2010)。动物线粒体 DNA 是一个小型的基因组,大小通常为 16 kb。几乎所有的动物线粒体基因组都包含相同的 37 个基因: 2 个核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 基因、13 个蛋白质编码基因 (protein-coding genes, PCGs) 和 22 个转运 RNA (transfer RNA, tRNA) 基因 (Boore 1999)。一般来说,线粒体基因的进化速度比核基因快 5 到 10 倍。且相较于核基因组,线粒体基因组核酸序列更易获得。因此,线粒体基因被广泛用于确定物种的系统发育关系研究 (王爱帅 2016)。然而,基于单一基因的进化关系并不能准确地反映物种间的真实系统发育关系,与一个基因的低信息含量相比,

多个基因的组合,如线粒体全基因组可以提供大量的遗传信息,从而能更加完整地解释系统发育关系。

裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae), 属于鲤科 (Cyprinidae), 分布在我国青藏高原及周围的国家和地区。中国是世界上裂腹鱼亚科鱼类分布最多的国家,关于其种质资源的研究已逐渐成为热点。小头高原鱼 (*Heizensteinia microcephalus*) 是鲤科裂腹鱼亚科高原鱼属的唯一物种,栖息在海拔 4 400 ~ 5 200 m 的高原河流和湖泊中 (Li et al. 2016), 是世界上分布海拔最高的鱼类之一。骨唇黄河鱼 (*Chuanchia labiosa*) 是鲤科裂腹鱼亚科黄河鱼属的唯一物种,是中国的特有物种,分布于黄河上游海拔超过 2 700 m 的地区,在维持生态系统平衡方面起着重要作用。然而,由于人类活动和由人类造成的环境变化,骨唇黄河鱼成为易危级物种 (He et al. 2016)。作为青藏高原的代表性物种,小头高原鱼和骨唇黄河鱼都能够很好地适应高海拔环境。然而,目前除了少数几个涉及线粒体基因

序列分类的研究外 (He et al. 2007, Kim et al. 2022), 对小头高原鱼和骨唇黄河鱼的了解仍然相当有限。

以往研究表明, 根据形态特征, 可将裂腹鱼亚科的鱼类分为三个等级, 即原始等级 (original level)、特化等级 (specialized level) 和高度特化等级 (highly specialized level) (赵新全等 2008, 李亚莉 2012)。根据鳞片、咽齿和触须的特化, 曹文宣等 (1981) 也将裂腹鱼类分为如前的三个等级: (1) 原始等级, 全身或除腹面外均有微小鳞片, 有三排咽齿, 除扁吻鱼 (*Aspiorhynchus laticeps*) 外均有两对触须; (2) 特化等级, 或多或少有细小鳞片, 两排咽齿, 一对触须; (3) 高度特化等级, 身体几乎全裸, 一或两排咽齿, 无触须。然而, 基于分子数据的分析结果与形态学的结果并不完全一致。例如, 通过对细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因序列的分析表明, 高度特化等级的裂腹鱼不是一个单系类群 (何德奎等 2003); 通过线粒体 12S rRNA 和 13 个蛋白编码基因序列的分析结果显示 (迪丽娜·茹斯坦木 2021), 裂腹鱼亚科内部的分化不符合根据形态学的分类, 并没有形成原始等级、特化等级和高度特化等级的三个类群。据此, 基于少数几个基因的系统发育树与基于形态学特征构建的系统发育树始终存在树形冲突。

此外, 以往的研究只完成了小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体基因组的组装及注释 (He et al. 2016, Li et al. 2016), 并没有深入研究其线粒体全基因组序列。故本研究的主要内容是:

(1) 对小头高原鱼和骨唇黄河鱼的线粒体全基因组进行全面的比较分析; (2) 探讨高原鱼属和黄河鱼属的系统发育关系; (3) 估算小头高原鱼和骨唇黄河鱼与裂腹鱼亚科其他鱼类的分化时间。

1 材料与方法

1.1 材料

小头高原鱼、骨唇黄河鱼及裂腹鱼亚科其

他 21 个物种的线粒体基因组序列均从 NCBI 数据库中下载得到 (表 1)。

表 1 本研究中 23 个物种的基本信息

Table 1 The basic information of 23 species used in this study

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession no.
骨唇黄河鱼 <i>Chuanchia labiosa</i>	NC_029181.1
小头高原鱼 <i>Herzensternra microcephalus</i>	NC_033403.1
软刺裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis malacanthus</i>	NC_024880.1
拉萨裸裂尻鱼 <i>S. younghusbandr</i>	NC_021409.1
温泉裸裂尻鱼 <i>S. thermalis</i>	NC_021421.1
青海湖裸鲤 <i>Gymnocypris przewalskii</i>	NC_008661.1
花斑裸鲤 <i>G. eckloni Herzensten</i>	NC_019605.1
极边扁咽齿鱼 <i>Platypharodon extremus</i>	NC_029171.1
斯氏尖裸鲤 <i>Oxygymnocypris stewartii</i>	NC_022718.1
高原裸鲤 <i>G. waddellii</i>	NC_047410.1
裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>	NC_025303.1
中甸叶须鱼 <i>P. chungtienensis</i>	NC_034230.1
双须叶须鱼 <i>P. dipogon</i>	NC_024537.1
厚唇裸重唇鱼 <i>Gymnodiptychus pachycheilus</i>	NC_023793.1
新疆裸重唇鱼 <i>G. dybowskii</i>	NC_028544.1
斑重唇鱼 <i>Diptychus maculatus</i>	NC_025650.1
大理裂腹鱼 <i>Schizothorax taliensis</i>	NC_037516.1
澜沧裂腹鱼 <i>S. lantsangensis</i>	NC_026294.1
拉萨裂腹鱼 <i>S. waltoni</i>	NC_020606.1
扁吻鱼 <i>Aspiorhynchus laticeps</i>	NC_022855.1
塔里木裂腹鱼 <i>S. biddulphi</i>	NC_017873.1
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	NC_018035.1
三角鲤 <i>C. multitaeniara</i>	NC_028419.1

1.2 绘制线粒体基因组图

使用在线软件 MitoAnnotator (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/annotation/input/>) (Iwasaki et al. 2013) 绘制小头高原鱼和骨唇黄河鱼的线粒体基因组图。

1.3 线粒体基因组序列特征分析

使用序列操作工具箱 JavaScript (http://www.detaibio.com/sms2/codon_plot.html) (Stothard 2000) 计算小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体全基因组的碱基组成。链的不对称性使用以下公

式计算: $S_{AT-skew} = (I_A - I_T) / (I_A + I_T)$, $S_{GC-skew} = (I_G - I_C) / (I_G + I_C)$, 式中, I_A 、 I_T 、 I_G 和 I_C 分别为碱基 A、T、G 和 C 含量, $S_{AT-skew}$ 为 AT 偏倚值, $S_{GC-skew}$ 为 GC 偏倚值。

线粒体基因组的相对同义密码子使用频率 (relative synonymous codon usage, RSCU) 是一种有价值的进化信息, 主要由突变和进化选择产生, 对研究生物体的进化至关重要 (谭传港等 2023)。使用 CodonW v1.4.2 软件 (Sharp et al. 1987) 计算相对同义密码子使用频率 (RSCU)。

非同义突变频率 (K_a) 对同义突变频率 (K_s) 的核苷酸替换率通常被作为阐明蛋白质编码基因进化和物种适应性进化的有力工具 (Feng et al. 2019)。 K_a/K_s 决定了基因的分化等级, 即基因受正选择 ($K_a/K_s > 1$)、纯化选择 ($K_a/K_s < 1$, 尤其是小于 0.5), 还是中性进化 ($K_a/K_s = 1$)。使用 ClustalW (Larkin et al. 2007) 软件对 13 个蛋白质编码基因的线粒体基因组序列进行比对, 然后使用 KaKs_calculator v3.0 (Zhang 2022) 软件基于 NG 法计算 K_a/K_s 值。

1.4 系统发育分析

从 NCBI 数据库中下载了裂腹鱼亚科 19 种鱼类和两个外群物种, 三角鲤 (*Cyprinus multitaeniara*) 及鲤 (*C. carpio*) 的线粒体基因组序列进行系统发育树的构建。使用 MAFFT v7.388 (Katoh et al. 2013) 软件对这些线粒体基因组序列进行比对校正。使用 IQtree2 软件 (Nguyen et al. 2015) 筛选出最佳核苷酸替换模型, 最终选择 GTR + F + I + I + R2 为建树模型, 构建最大似然 (maximum likelihood, ML) 树, 采用 bootstrap (1 000 次重复) 检验系统发育树各分支节点的置信值。使用 MEGA-X (Kumar et al. 2018) 构建最大简约 (maximum parsimony, MP) 树。最大似然和最大简约树的可视化均使用 Figtree v1.4.4 软件 (Freccero 1975)。

1.5 估算分化时间

使用 PAML v4.9j 软件包 (Yang 2007) 中

的 mcmctree 子程序估算分化时间。本研究采用两个校准点: (1) 现有化石资料表明, 中新世已有鲤亚科、鲴亚科和雅罗鱼亚科鱼类出现 (周伟 1989, 周家健 1990, 张弥曼等 2001)。王绪祯等 (2012) 认为, 鲤亚科的分化时间为 (18.46 ± 1.04) 百万年前 (million years ago, Mya)。结合化石的地质年代和系统发育估算的分歧时间, 本研究将节点 C1 (鲤和三角鲤) 的分歧时间设置为 18.0 ~ 19.0 Mya, 作为上限;

(2) 黄河上游和青海湖隔离的地质时间 0.15 Mya (李吉均等 2001), 作为 C2 节点 [青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 和花斑裸鲤 (*G. eckloni*)] 的下限。参数设置如下: 使用 Hashagano Kishino Yano 1985 (HKY85) 替代模型 (model = 4), 每次运行时, 丢弃前 2 000 次迭代, 然后每 10 次迭代取样一次, 直到收集到 20 000 个样本。分化时间树使用在线软件 normal tree (<https://www.chiplot.online/normalTree.html?originalJsonDataUri=/static/xiaochiPlot/gallery/normalTree/Fig2a-s41588-022-01127-7.json>) (Xie et al. 2023) 进行可视化。

2 结果

2.1 小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体基因组的组成

小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体基因组均为典型的环状结构 (图 1), 序列总长度分别为 16 726 bp 和 16 705 bp, 总 GC 含量均为 45%。小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体基因组均由 13 个蛋白编码基因 (protein-coding genes, PCGs)、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和 1 个非编码控制区 (D-loop) 组成。

2.2 小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体基因组的碱基组成

小头高原鱼序列中碱基含量分别为, A 28.40%、T 27.16%、G 18.38%、C 26.06%, A + T 含量高于 G + C 含量, AT 偏倚值 ($S_{AT-skew}$) 和 GC 偏倚值 ($S_{GC-skew}$) 分别为 0.022 5 和 -0.172 6,

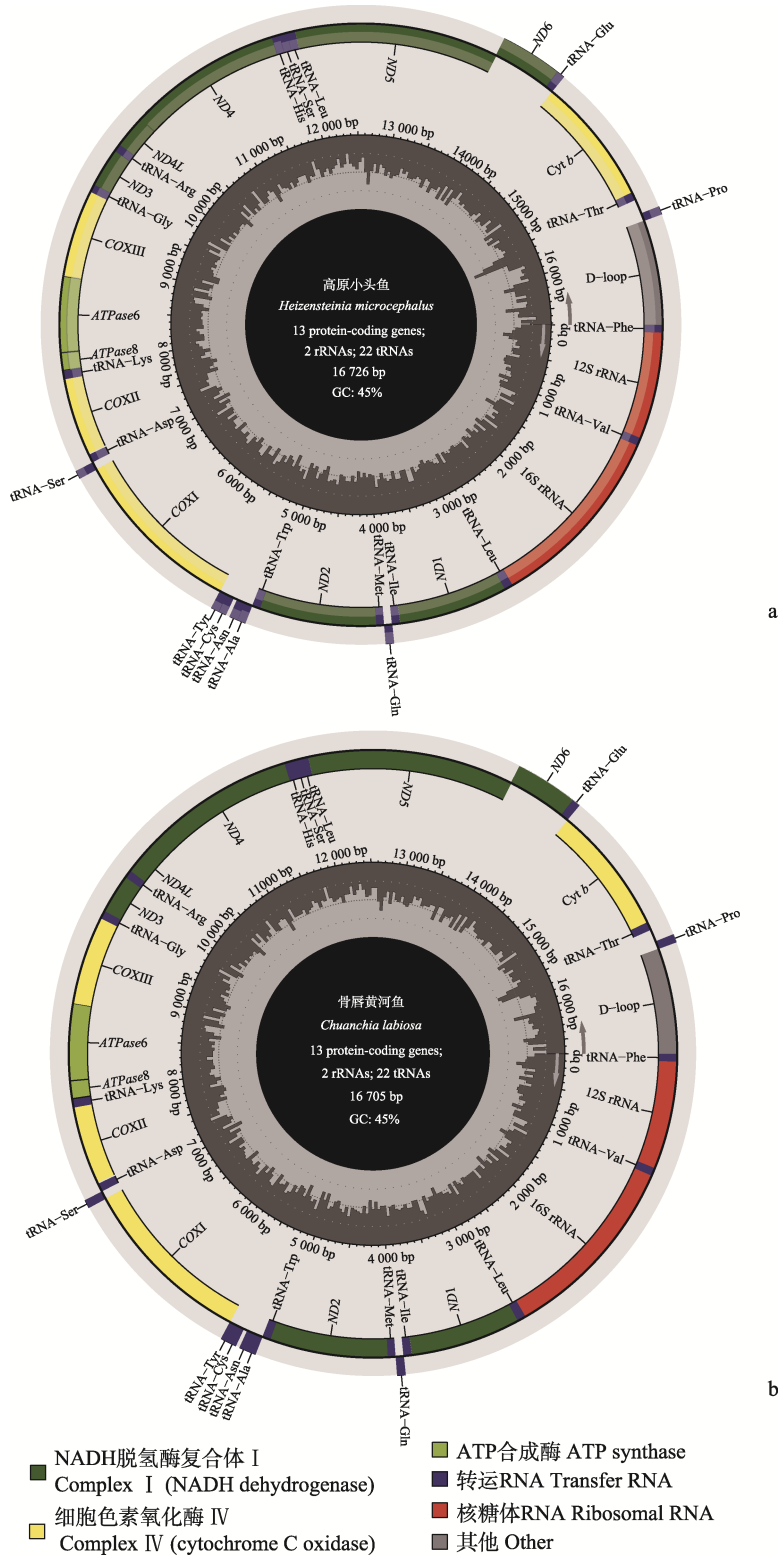


图 1 小头高原鱼 (a) 和骨唇黄河鱼 (b) 线粒体基因组结构图

Fig. 1 Circular map of the mitochondrial genomes of *Heizensternra microcephalus* (a) and *Chuanchia labiosa* (b)

说明本研究中小头高原鱼线粒体基因组呈现 AT 偏好性。骨唇黄河鱼序列中碱基含量分别为, A 28.39%、T 27.16%、G 18.36%、C 26.09%, A + T 含量高于 G + C 含量, AT 偏倚值($S_{AT-skew}$)和 GC 偏倚值($S_{GC-skew}$)分别为 0.022 2 和 - 0.173 4, 说明本研究中骨唇黄河鱼线粒体基因组亦呈现 AT 偏好性。

2.3 小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体基因组密码子偏好性

本研究的结果表明, GCC 和 UCU 的相对同义密码子使用频率等于 1.44, 表明这两个密码子是小头高原鱼线粒体基因组中使用频率最高的密码子(图 2a), 使用频率最低的密码子是 GCG, 即其相对同义密码子使用频率等于 0.37, 它编码的是丙氨酸(alanine, Ala)。此外, 有 30 个密码子使用频繁, 即其相对同义密码子使用频率大于 1。两个密码子(AUG 和 UGG)的相对同义密码子使用频率等于 1。GCC 是骨唇黄河鱼线粒体基因组中使用最频繁的密码子, 即其相对同义密码子使用频率最高, 为 1.58(图 2b), 使用频率最低的密码子是 GCG, 即其相对同义密码子使用频率最低, 为 0.33, 该密码子编码丙氨酸(alanine, Ala)。此外,

有 25 个密码子使用频率大于 1, 6 个密码子(UCA、UGG、CAU、CAC、AUG、GCA)的相对同义密码子使用频率等于 1。

2.4 选择压力分析

13 个蛋白质编码基因(protein-coding genes, PCGs)的 K_a/K_s 值远远低于 1(图 3), 说明均受到纯化选择。*ATPase8* 基因的 K_a/K_s 比值(0.527 和 0.256)显著高于其他蛋白质编码基因, 这表明 *ATPase8* 基因相比于其他蛋白质编码基因承受了相对较弱的净化选择(负选择)压力。这可能导致在该基因中保留了较多的非同义突变。然而, 这个比值虽然较高, 但仍低于 1, 表明 *ATPase8* 仍然受到一定程度的净化选择。另一方面, *ND4L* 基因的 K_a/K_s 比率是最低的, 这意味着相对于其他蛋白质编码基因, *ND4L* 基因在进化过程中受到了更强的净化选择压力, 限制了非同义突变的积累。

2.5 基于线粒体全基因组的系统发育关系

本研究利用共享的线粒体基因组数据集进行了系统发育分析(图 4)。使用 IQtree2 软件构建的最大似然树自举值非常高, 19 个节点的自举值为 100, 1 个为 99, 1 个为 83。本研究与之前的研究一致, 将这 23 个物种分为 3 个等

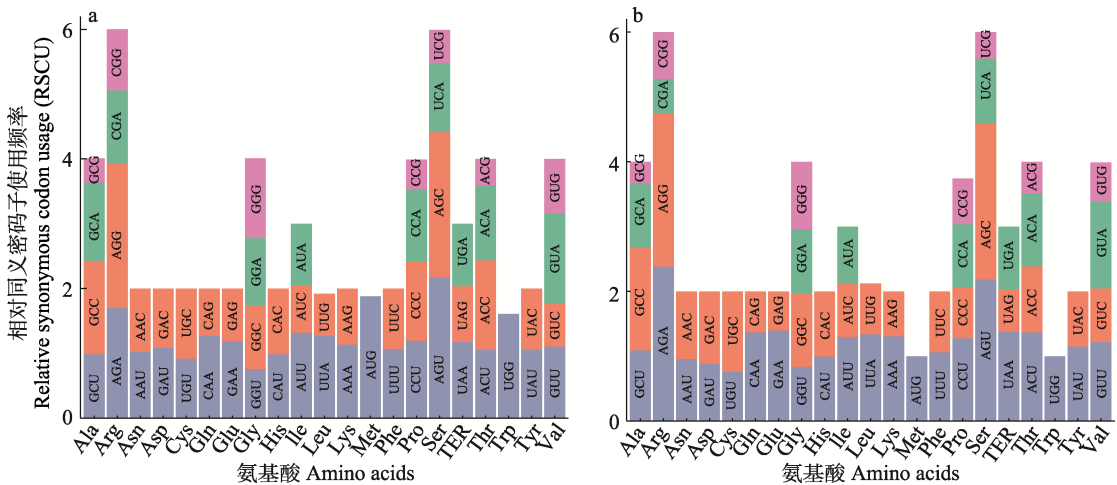


图 2 小头高原鱼 (a) 和骨唇黄河鱼 (b) 的 13 个蛋白质编码基因的相对同义密码子使用频率
 Fig. 2 Relative synonymous codon usage (RSCU) analysis of the 13 protein-coding genes (PCGs) in the mitochondrial genomes of *Herzensternna microcephalus* (a) and *Chuanchia labiosa* (b)

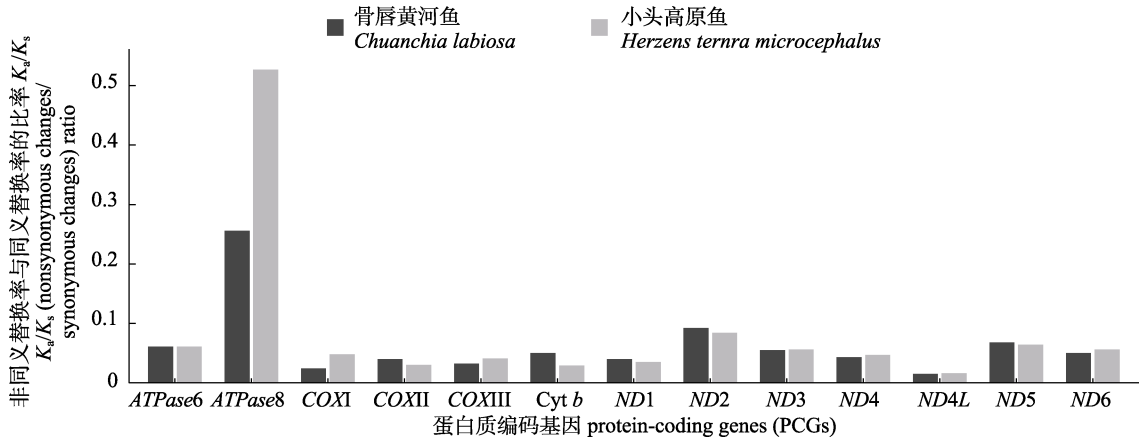


图 3 小头高原鱼和骨唇黄河鱼 13 个蛋白质编码基因的非同义替换率与同义替换率的比率

Fig. 3 The nonsynonymous changes/synonymous changes (K_a/K_s) ratio for 13 protein-coding genes (PCGs) within the mitochondrial genomes of the *Herzensternra microcephalus* and *Chuanchia labiosa*

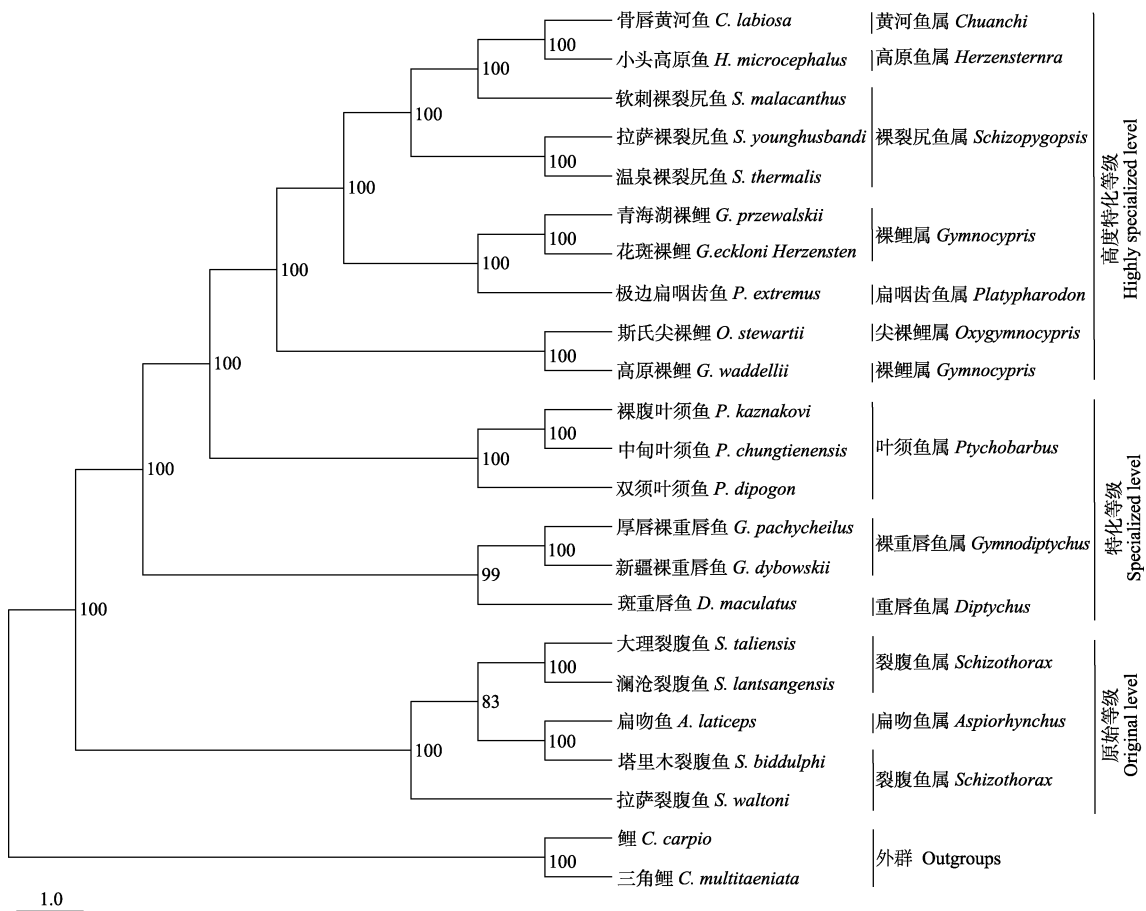


图 4 基于 23 个鱼类物种线粒体基因组构建的最大似然树

Fig. 4 Maximum likelihood tree constructed using mitochondrial genomes of 23 fish species

自举值在每个节点附近。标尺表示每个位点上的替换数。Bootstrap values are shown near each node. Scale bar indicates the number of substitutions at each locus.

级：第一个等级为高度特化等级，由骨唇黄河鱼、小头高原鱼、软刺裸裂尻鱼、拉萨裸裂尻鱼、温泉裸裂尻鱼、青海湖裸鲤、花斑裸鲤、极边扁咽齿鱼、尖裸鲤和高原裸鲤组成；第二个等级为特化等级，由裸腹叶须鱼、中甸叶须鱼、双须叶须鱼、厚唇裸重唇鱼、新疆裸重唇鱼和斑重唇鱼组成；第三个等级为原始等级，由大理裂腹鱼、澜沧裂腹鱼、扁吻鱼、塔里木裂腹鱼和拉萨裂腹鱼组成。系统发育分析表明，小头高原鱼和骨唇黄河鱼互为姐妹关系，高原鱼属和黄河鱼属及裸裂尻鱼属亲缘关系最近。

最大简约树与最大似然树的拓扑结构基本一致，原始等级裂腹鱼类处于系统发育树基部，其次为特化等级裂腹鱼类，高度特化等级裂腹鱼类位于系统发育树顶部。

2.6 分化时间的估算

基于线粒体全基因组，使用 PAML v4.9j 软件包 (Yang 2007) 中的 mcmctree 子程序获得了 23 个物种的分化时间 (图 5)。小头高原鱼和骨唇黄河鱼之间的分化时间可追溯到 0.83 百万年前。高原鱼属和黄河鱼属与软刺裸裂尻鱼的分化时间可以被追溯到 1.91 百万年前。

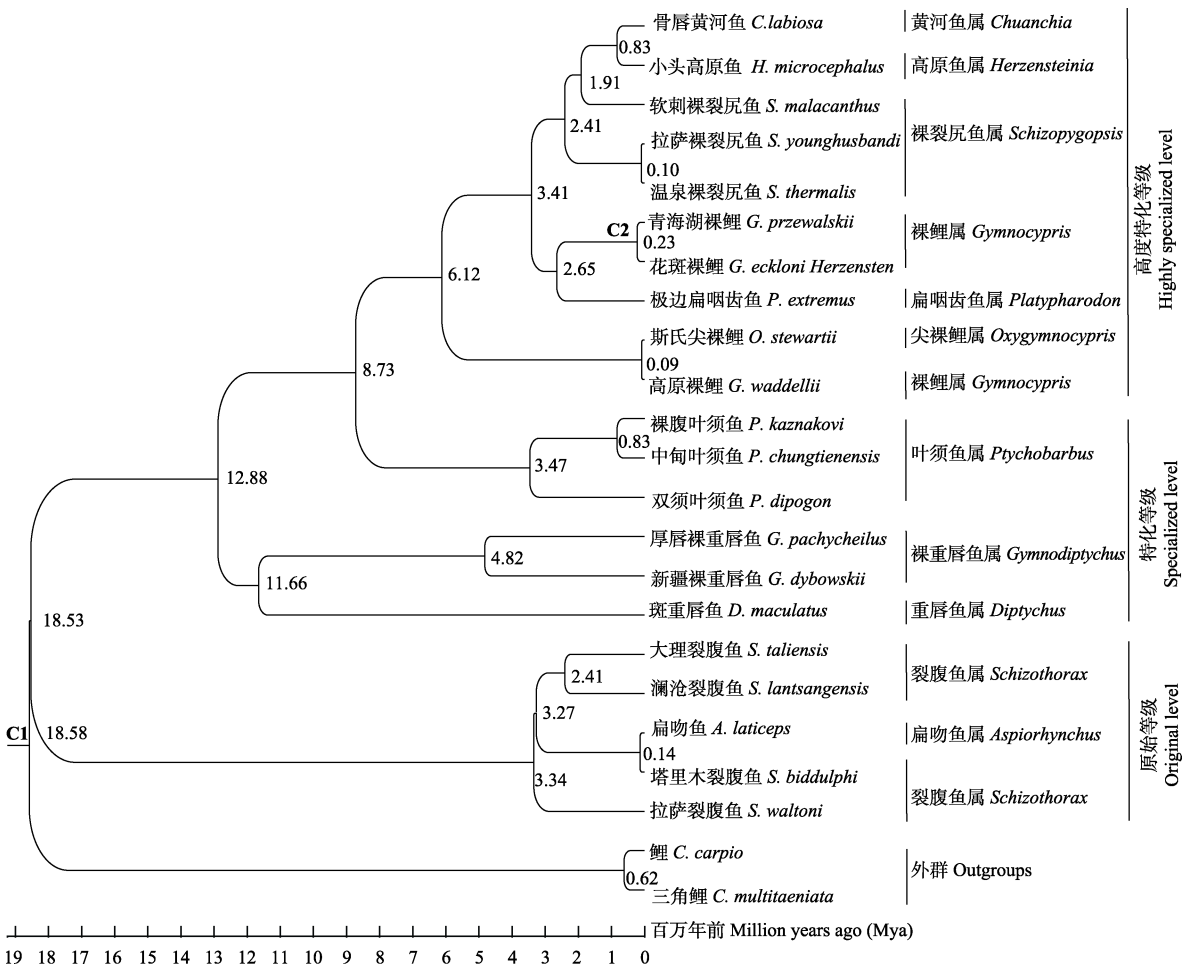


图 5 基于 23 个鱼类物种线粒体基因组构建的分化时间树

Fig. 5 Divergence time tree constructed using mitogenomes of 23 fish species

分化时间在每个节点附近，加粗字体C1和C2为2个化石节点。

Divergence times are shown near each node. The two calibration points C1 and C2 were showed in bold.

3 讨论

本研究基于生物信息学方法对小头高原鱼和骨唇黄河鱼的线粒体基因组进行了比较分析。两个物种的线粒体全基因组序列长度分别为 16 726 bp 和 16 705 bp, 总 GC 含量为 45%, 基因顺序和基因方向与其他已发表的鱼类研究几乎一致(董传举 2016, 王爱帅 2016, Zhang et al. 2016), 说明线粒体基因组的顺序很少发生变化, 小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体均未发生基因重排现象, 适合被广泛应用到遗传学、系统发育学以及生物地理学等研究领域。

在参与氧化磷酸化的 13 个线粒体蛋白质编码基因中, *ATPase8* 基因的 K_a/K_s 值较高, *ATPase8* 是 ATP 合成酶的两个亚单位之一, 它是最后一个酶复合体, 利用质子的浓度梯度来产生 ATP。本研究中, *ND4L* 基因的 K_a/K_s 值最低, 即非同义替换 (K_a) 高于同义替换 (K_s), 说明其进化速率最慢, 线粒体 *ND4L* 基因编码的 *ND4L* 蛋白是呼吸复合物 I (NADH 脱氢酶) 亚基之一。Guan 等 (2021) 的研究表明, 在线粒体蛋白编码基因中, *ND4* 和 *ND4L* 基因在蜉蝣 (*Choroterpes yixingensis*) 中的稳态转录模式可以随着环境污染程度的不同而发生变化, 因此有可能成为未来水生态毒性监测的生物标志。众多研究表明, NADH 脱氢酶复合物和 ATP 合成酶的适应性进化对氧化磷酸化的能量合成至关重要 (Zhang et al. 2019, 2020)。因此, 我们推测 *ATPase8* 基因和 *ND4L* 基因对小头高原鱼和骨唇黄河鱼的高海拔适应性发挥了一定的作用。

线粒体因其遗传变异相对稳定, 被广泛用于系统发育关系的研究, 且线粒体全基因组比单基因 (线粒体或核基因) 能更好地阐明系统发育的形成 (Hou et al. 2020)。Wang 等 (2019) 通过 *COI* DNA 条形码的研究证明裂腹鱼属为原始等级。Zhang 等 (2016) 构建了裂腹鱼亚科 32 种鱼类的系统发育树, 裂腹鱼属位于原始等级, 叶须鱼属、裸重唇鱼属及重唇鱼属位于

特化等级; 裸鲤属、裸裂尻鱼属及尖裸鲤属均位于高度特化等级。本研究的结果与上述对裂腹鱼类系统发育的研究一致, 表明使用线粒体全基因组来重建系统发育关系是比较有效的方法。Tang 等 (2019) 的研究表明, *Gymnocypris chui* 的 *chui* 和 *longimandibularis* 亚种在大约 2.42 百万年前产生分化, 本研究中青海湖裸鲤与花斑裸鲤在大概在 0.23 百万年前开始分化, 晚于 Tang 等 (2019) 的研究, 可能是由于选择的模型及物种不同造成的。小头高原鱼和骨唇黄河鱼之间的分化时间为 0.83 百万年前, 属于近期分化。本研究继续支持裂腹鱼亚科鱼类是青藏高原隆起的年轻产物这一观点, 并且认为裂腹鱼亚科的物种仍在进化中 (祁得林 2007, Tong et al. 2017, 迪丽娜·茹斯坦木 2021, 马宝珊等 2023)。

在对不同环境或者不同功能的适应过程中, 线粒体基因也会相应地发生适应性进化。高原环境影响机体的主要因素是缺氧, 机体对高原环境的适应也主要是围绕着氧的摄取运输来进行的。Shen 等 (2010) 对蝙蝠的线粒体基因组以及氧化呼吸相关的核基因进行了分析, 结果表明, 23.08% 的线粒体基因以及 4.90% 的核基因能够检测到适应性进化, 这是为了适应蝙蝠的飞行能力。因为飞行消耗的能量非常多, 蝙蝠在飞行能力的演化过程中, 为了维持这一高的能量代谢效率, 线粒体 DNA 受到自然选择的作用, 发生了适应性进化。Luo 等 (2012) 对藏野驴 (*Equus kiang*) 基于线粒体全基因组的 12 个重链编码蛋白基因的研究表明, 藏野驴的线粒体编码蛋白基因, 特别是编码 NADH 亚基的 *ND4* 和 *ND5* 可能影响线粒体复合体和电子传递的效率, 从而有利于藏野驴适应青藏高原高寒、低氧的恶劣环境。高原鱼类一般生活在高海拔地区的湖泊中, 其对高寒、低氧的恶劣环境的适应性机制一直未有定论, 本研究基于小头高原鱼和骨唇黄河鱼线粒体基因组重建系统发育关系和估算分化时间, 为了解这些物种的适应性进化和分化时间提供一定的参考,

从而有利于制定专门的策略进行保护。

参 考 文 献

- Boore J L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767–1780.
- Feng S, An Z F, Wang Y, et al. 2019. Complete mitochondrial genome of *Schizothorax davidi* (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae). *Mitochondrial DNA Part B, Resources*, 4(2): 3210–3211.
- Freccero J. 1975. The fig tree and the laurel: petrarch's poetics. *Diacritics*, 5(1): 34–40.
- Guan J Y, Zhang Z Y, Cao Y R, et al. 2021. The complete mitochondrial genome of *Choroterpes (Euthralus) yixingensis* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) and its mitochondrial protein-coding gene expression under imidacloprid stress. *Gene*, 800: 145833.
- He D K, Chen Y F. 2007. Molecular phylogeny and biogeography of the highly specialized grade schizothoracine fishes (Teleostei: Cyprinidae) inferred from cytochrome *b* sequences. *Chinese Science Bulletin*, 52(6): 777–788.
- He D K, Li C H, Tao J, et al. 2016. The complete mitochondrial genome sequence of *Chuanchia labiosa* (Cypriniformes: Cyprinidae). *Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(3): 1638–1639.
- Hou X J, Lin H D, Tang W Q, et al. 2020. Complete mitochondrial genome of the freshwater fish *Acrossocheilus longipinnis* (Teleostei: Cyprinidae): genome characterization and phylogenetic analysis. *Biologia*, 75(11): 1871–1880.
- Iwasaki W, Fukunaga T, Isagozawa R, et al. 2013. MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11): 2531–2540.
- Katoh K, Standley D M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4): 772–780.
- Kim N Y, Ahn S J, Seo J S, et al. 2022. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Miamiensis avidus* causing flatfish scuticociliatosis. *Genetica*, 150(6): 407–420.
- Kumar S, Stecher G, Li M, et al. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549.
- Kumar S, Stecher G, Suleski M, et al. 2017. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Molecular Biology and Evolution*, 34(7): 1812–1819.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Li C H, Chen Y F, Liu C L, et al. 2016. The complete mitochondrial genome sequence of *Herzensteinia microcephalus* (Cypriniformes: Cyprinidae). *Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(3): 2255–2256.
- Luo Y J, Chen Y, Liu F Y, et al. 2012. Mitochondrial genome of Tibetan wild ass (*Equus kiang*) reveals substitutions in NADH which may reflect evolutionary adaptation to cold and hypoxic conditions. *Asia Life Science*, 21(1): 1–11.
- Nguyen L T, Schmidt H A, von Haeseler A, et al. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1): 268–274.
- Sharp P M, Li W H. 1987. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*, 15(3): 1281–1295.
- Shen Y Y, Liang L, Zhu Z H, et al. 2010. Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19): 8666–8671.
- Stothard P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28(6): 1102, 1104.
- Tang Y T, Li C H, Wanghe K Y, et al. 2019. Convergent evolution misled taxonomy in schizothoracine fishes (Cypriniformes: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 134: 323–337.
- Tong C, Fei T, Zhang C F, et al. 2017. Comprehensive transcriptomic analysis of Tibetan Schizothoracinae fish *Gymnocypris przewalskii* reveals how it adapts to a high altitude aquatic life. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1): 74.
- Wang T, Qi D S, Sun S H, et al. 2019. DNA barcodes and their characteristic diagnostic sites analysis of Schizothoracinae fishes

- in Qinghai Province. *Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 30(4): 592–601.
- Xie J M, Chen Y R, Cai G J, et al. 2023. Tree Visualization By One Table (tvBOT): a web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 51(W1): W587–W592.
- Yang Z H. 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1586–1591.
- Zhang J, Chen Z, Zhou C J, et al. 2016. Molecular phylogeny of the subfamily Schizothoracinae (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae) inferred from complete mitochondrial genomes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 64: 6–13.
- Zhang Y, Li X H, Tian F, et al. 2020. Mitochondrial genome and phylogenetic relationship of *Gymnocypris eckloni* (Schizothoracinae) in Qaidam river basin. *Genomics*, 112(6): 4316–4321.
- Zhang Z. 2022. KaKs_Calculator 3.0: calculating selective pressure on coding and non-coding sequences. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 20(3): 536–540.
- Zhang Z C, Cheng Q Q, Ge Y S. 2019. The complete mitochondrial genome of *Rhynchocypris oxycephalus* (Teleostei: Cyprinidae) and its phylogenetic implications. *Ecology and Evolution*, 9(13): 7819–7837.
- 曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞, 等. 1981. 裂腹鱼类的起源和演化及其与青藏高原隆起的关系. 青藏高原隆起的时代、幅度和形式问题. 北京: 科学出版社, 118–130.
- 迪丽娜·茹斯坦木. 2021. 裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae) 及鲃亚科 (Barbinae) 物种比较线粒体基因组学和系统发育研究. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文.
- 董传举. 2016. 基于线粒体基因组的两种鲤科鱼类系统发育基因组学分析及鲤鱼 *Frizzled* 基因家族的研究. 上海: 上海海洋大学博士学位论文.
- 何德奎, 陈毅峰, 陈宜瑜, 等. 2003. 特化等级裂腹鱼类的分子系统发育与青藏高原隆起. *科学通报*, 48(22): 2354–2362.
- 李吉均, 方小敏, 潘保田, 等. 2001. 新生代晚期青藏高原强烈隆起及其对周边环境的影响. *第四纪研究*, 21(5): 381–391.
- 李亚莉. 2012. 青藏高原三种裂腹鱼线粒体全基因组的测定及分子进化分析. 上海: 复旦大学博士学位论文.
- 马宝珊, 魏开金, 赵天一, 等. 2023. 裂腹鱼类系统进化及高原适应性研究进展. *湖泊科学*, 35(3): 808–824.
- 祁得林. 2007. 青藏高原裂腹鱼亚科鱼类的分类、系统发育和生物地理学-基于线粒体 DNA 细胞色素 *b* 的研究. 北京: 中国科学院大学博士学位论文.
- 谭传港, 喻达辉, 任童童, 等. 2023. 珠母贝线粒体全基因组密码子偏好性分析. *广东海洋大学学报*, 43(2): 127–134.
- 王爱帅. 2016. 隆头鱼类线粒体全基因组序列分析及系统发育关系探讨. 舟山: 浙江海洋大学硕士学位论文.
- 王绪祯, 甘小妮, 李俊兵, 等. 2012. 基于分区贝叶斯法和最大似然法的鲤科鱼类系统发育分析及其系统学意义. *中国科学: 生命科学*, 42(8): 648–661.
- 张弥曼, 陈宜瑜, 张江永, 等. 2001. 鱼化石与沧桑巨变. *中国科学院院刊*, 16(1): 39–43.
- 赵新全, 祁得林, 杨洁. 2008. 青藏高原代表性土著动物分子进化与适应研究. 北京: 科学出版社, 14–69.
- 周家健. 1990. 山东山旺中新世鲤科化石. *古脊椎动物学报*, 28(2): 95–127, 173–175.
- 周伟. 1989. 鲤亚科鱼类的系统发育. *动物分类学报*, 14(2): 247–256.