

# 青海湖裸鲤的起源和花斑裸鲤的种群演化\*

赵凯<sup>1,2,3</sup> 段子渊<sup>4\*\*</sup> 杨公社<sup>2</sup> 彭作刚<sup>1</sup> 何舜平<sup>1\*\*\*</sup> 陈宜瑜<sup>1</sup>

1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 西北农林科技大学动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100;  
3. 青海大学农牧学院, 西宁 810003; 4. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

**摘要** 通过线粒体 Cyt *b* 基因全序列分析, 探讨了青海湖裸鲤和花斑裸鲤的起源关系及其进化模式. 系统发育分析进一步支持了青海湖裸鲤和花斑裸鲤 3 个 mtDNA 谱系的划分. 形态上具有高鳃耙变异的个体未形成特有的进化枝, 证明了第一鳃弓外鳃耙变异并不具有系统发育意义. 对青海湖裸鲤和花斑裸鲤进化枝扩散模式的网络分析表明, 黄河独有的单倍型 A1 是一个创立者单倍型, 全部青海湖裸鲤的样品来自于它的辐射, 而青海湖裸鲤可能仅仅起源于黄河花斑裸鲤两个主要支系中的一个. *F<sub>s</sub>* 检验和核苷酸不配对分析暗示了青海湖裸鲤和柴达木盆地花斑裸鲤在历史上经历过种群扩张事件. 青海湖裸鲤谱系多样化发生在大约 0.2734 Ma 前, 并且在约 0.0658 Ma 前发生了一次局部的种群扩张, 而柴达木盆地花斑裸鲤可能在约 0.0693 Ma 经历了一次严重的“瓶颈效应”. 我们还发现种群扩张存在于主要由青海湖裸鲤组成的亚枝 A1 和由黄河花斑裸鲤独有的亚枝 A21 中, 估算的最近共同祖先年龄 (TMRCA) 分别为 (0.2308 ± 0.01) Ma 和 (0.1319 ± 0.015) Ma, 这一估算与青海湖和黄河分离的“共和运动”地质年代大致相符. 这些结果说明了晚更新世末青藏高原的强烈隆升对青海湖、黄河和柴达木盆地鱼类多样性演化及其生物地理学格局产生过重大影响.

**关键词** 青海湖裸鲤 花斑裸鲤 起源 Cyt *b* 系统地理学

第四纪中, 中国大陆的宏观地理环境发生了较大的变化, 如更新世的大成湖和黄土高原的形成, 但其中对现代生物格局影响较大的是青藏高原的隆升. 关于青藏高原区生物类群演化与高原隆升之间的关系, 研究比较透彻的是青藏高原的鱼类, 如已有报道高原裂腹鱼类的演化与青藏高原隆升之间存在着密切的关系<sup>[1]</sup>. 鱼类的分布和进化受水系的限制, 因而为生物地理学研究提供了理想的模式.

青海湖位于青藏高原东北部, 是高原最大的内陆咸水湖泊, 北枕祁连山脉, 西邻高原最大的柴达木盆地, 南由黄河环绕, 分布着青海湖特有的青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 和该种的甘子河

亚种 (*Gymnocypris przewalskii ganzihonensis*)<sup>[2,3]</sup>. 花斑裸鲤 (*Gymnocypris eckloni*) 分布于黄河上游和柴达木盆地, 与青海湖裸鲤同属鲤科 (Cyprinidae)、裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae) 的裸鲤属 (*Gymnocypris*).

我们先前曾对该地区裸鲤属鱼类种内和种间的分子系统发育关系进行了研究, 结果不支持青海湖裸鲤和花斑裸鲤的单系性, 提出形态分类中主要依据的第一鳃弓外鳃耙变异可能不具有系统发育意义<sup>[4]</sup>, 但是这些研究没有包含具有更大鳃耙变异, 在群体中分布频率极低的一些个体. 另外, 我们先前的研究没有探讨青海湖裸鲤和花斑裸鲤的起源问题以及它们的种群进化历史. 近些年, 结合分子

2006-07-11 收稿, 2006-08-31 收修改稿

\* 国家自然科学基金(批准号: 30225008)和中国科学院创新方向性项目(KSCX2-SW-101B)资助

\*\* 共同第一作者

\*\*\* 通信作者, E-mail: clad@ihb.ac.cn

mtDNA 资料的系统地理学研究为揭示许多鱼类的起源和推断河流袭夺的生物地理学过程提供了重要的信息<sup>[5,6]</sup>。青海湖与黄河隔离的地质学假设为我们进行系统地理学研究提供了理想的模式。

朱松泉等<sup>[2]</sup>依据形态学分析,提出青海湖裸鲤可能与黄河的花斑裸鲤为近缘种关系,依据为:(1)青海湖水系和黄河水系鱼类区系最为相近;(2)花斑裸鲤是青海湖邻近水系中除青海湖裸鲤以外唯一的裸鲤属鱼类;(3)历史上,青海湖与古黄河相通。这些结果为我们进一步研究青海湖裸鲤的起源和黄河花斑裸鲤的演化历史提供了重要线索。地质学研究认为黄河源区的水系发育非常新近,约 1.2 Ma 黄河出现在青藏高原东北部边缘,并与青海湖相通;约 0.15 Ma 发生的青藏高原“共和运动”导致中间山脉隆起,青海湖与古黄河分离,黄河开始向上游袭夺,最终到达今日的源头<sup>[7,8]</sup>。

在本项研究中,我们增加了形态上具有更大鳃耙变异的稀有样品,包括了尚未有过记录的花斑裸鲤第一鳃弓外鳃耙数为 8 和 9 的样品,以及地理上与青海湖最邻近的黄河河段的关键样品。通过检测线粒体 Cyt *b* 基因全序列,采用生物信息学方法识别谱系内单倍型间的进化关系,结合地质事件调查,全面认识青海湖裸鲤和花斑裸鲤的起源关系和进化模式,分析黄河袭夺的历史对该地区鱼类多样性形成的影响。同时,进一步明确鳃耙变异在裸鲤属鱼类系统分类中的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

本研究采用青海湖裸鲤和花斑裸鲤广泛地理群体的 163 个样品(样品信息见图 1 和表 1),其中青海湖裸鲤指名亚种 56 个个体,青海湖裸鲤甘子河亚种 14 个个体,来自黄河上游水系的花斑裸鲤 70 个个体,来自柴达木盆地格尔木河的花斑裸鲤 23 个个体,并包括了我们先用于系统发育关系分析的序列(GenBank 登录号为 DQ058216—DQ058291)<sup>[4]</sup>。新增的样品包括形态上具有高鳃耙变异的青海湖裸鲤 3 尾(第一鳃弓外鳃耙数分别为 41, 50 和 51)、黄河的花斑裸鲤 3 尾(第一鳃弓外鳃耙数为 8, 9 和 28)和

来自黄河贵德、同德和久治河段的花斑裸鲤 9 尾(图 1)。样品和标本用 95%酒精固定,存放在中国科学院水生生物研究所。

### 1.2 PCR 扩增和序列测定

采用 Ausubel<sup>[9]</sup>的方法从肌肉中提取总 DNA, 60  $\mu$ L PCR 反应体系包括 100 ng DNA 模板, 0.75  $\mu$ L dNTP, 1.5  $\mu$ L 引物, 5.0  $\mu$ L 10  $\times$ 缓冲液, 3 U *Taq* 聚合酶(Biostar)。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后重复 30 个循环,包括 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63  $^{\circ}$ C 复性 60 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物用 Glassmilk 试剂盒回收纯化目的片段,进行测序。引物序列为 L14724 (5'-GAC TTG AAA AAC CAC CGT TC-3') 和 H15915 (5'-CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC-3')。

### 1.3 数据分析

序列对位排列采用 CLUSTAL W<sup>[10]</sup>程序并辅以手工校正。核苷酸的组成和可变位点等遗传变异分析采用 MEGA 2.1 软件<sup>[11]</sup>。用 PAUP\* 4.0 b10<sup>[12]</sup>程序构建所有单倍型的邻接树(NJ),采用 Modeltest 3.06<sup>[13]</sup>程序,选择最佳模型为 TrN + G( $\Gamma = 0.1286$ ),通过重复 1000 次的自展(Bootstrap)方法估计支持率。使用 Network 4.0 程序<sup>[14]</sup>构建中介网络图(median-joining network),调查单倍型间的进化关系。Arlequin Ver. 2000<sup>[15]</sup>程序用于统计种群单倍型多样性( $h$ )、核苷酸多样性( $\pi$ )及其标准差(SE)。采用 AMOVA 方法(analysis of molecular variance)<sup>[16]</sup>,将青海湖裸鲤和黄河花斑裸鲤的不同地理居群划分为不同的组群,采用 10000 次重复随机抽样单倍型重排后进行显著性检验,用于估计青海湖裸鲤和黄河花斑裸鲤种群遗传结构及不同地理居群遗传变异的分布。 $F_s$  中性统计检验<sup>[17]</sup>和核苷酸不配对分析(mismatch analysis)<sup>[18]</sup>用来推断群体发生扩张的历史。通过核苷酸平均突变距离(averaged mutational distance)<sup>[19]</sup>推算一组个体 Cyt *b* 序列的溯祖时间(coalescent time),进而估算出最近共同祖先的年龄(time of the most recent common ancestor, TMRCA),并用核苷酸多样性对主要群体的种群扩张的时间进行估算<sup>[20]</sup>。

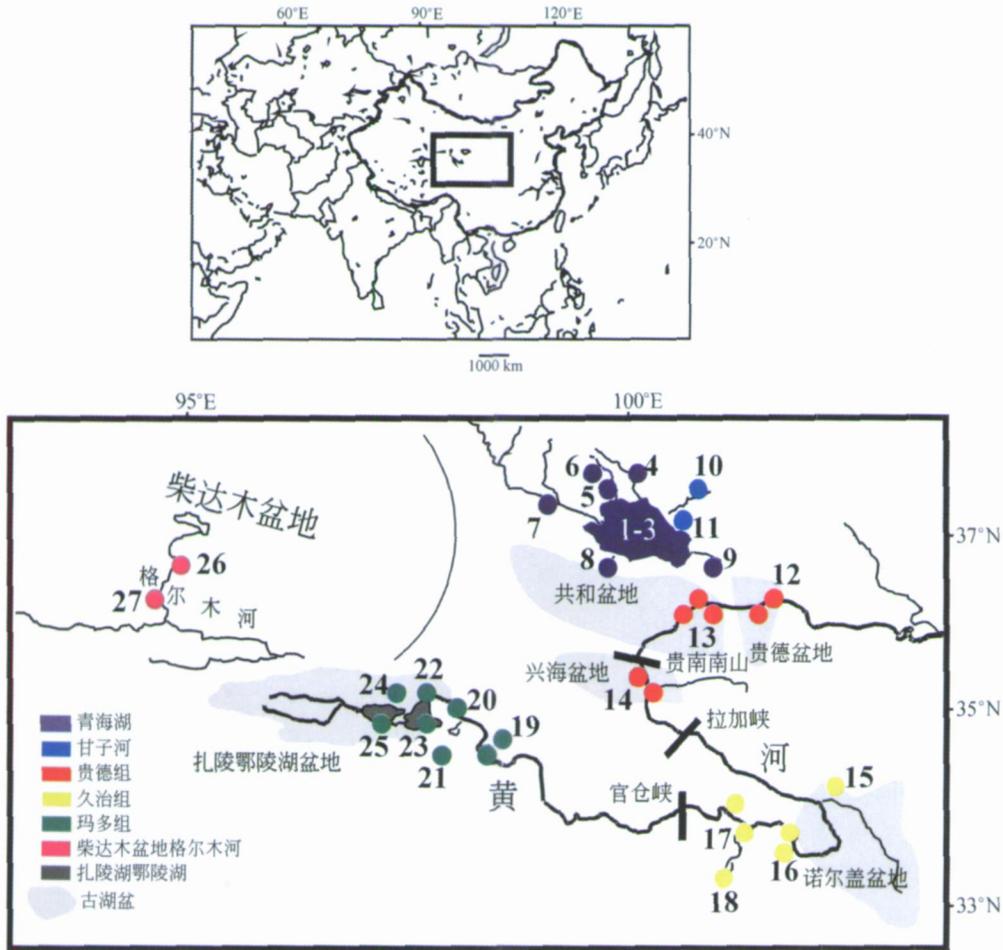


图1 青海湖裸鲤和花斑裸鲤的采样地点(1—27)及黄河上游古湖盆分布

表1 青海湖裸鲤和花斑裸鲤的样品信息

| 本研究划分的组群 | 采样地点编号 | 水系  | 采样地点      | 物种/亚种                             | 数目 | 单倍型 <sup>a)</sup>                    |
|----------|--------|-----|-----------|-----------------------------------|----|--------------------------------------|
| 青海湖      | 1      | 青海湖 | 青海湖湖北     | <i>G. przewalskii</i>             | 6  | A7(1), A9(1), A10(2), A15(1), A19(1) |
|          | 2      | 青海湖 | 青海湖湖东     | <i>G. przewalskii</i>             | 6  | A5(1), A9(1), A10(3), A14(1),        |
|          | 3      | 青海湖 | 青海湖湖南     | <i>G. przewalskii</i>             | 6  | A8(1), A10(3), A16(1), A18(1)        |
|          | 4      | 青海湖 | 青海湖泉吉河    | <i>G. przewalskii</i>             | 6  | A10(2), A13(1), A18(1), A19(2)       |
|          | 5      | 青海湖 | 青海湖沙柳河大桥  | <i>G. przewalskii</i>             | 5  | A5(1), A9(1), A10(1), A12(1), A20(1) |
|          | 6      | 青海湖 | 青海湖沙柳河上游  | <i>G. przewalskii</i>             | 8  | A4(1), A5(1), A6(1), A10(3), A19(2)  |
|          | 7      | 青海湖 | 青海湖布哈河    | <i>G. przewalskii</i>             | 6  | A5(1), A6(1), A10(3), A11(1)         |
|          | 8      | 青海湖 | 青海湖黑马河    | <i>G. przewalskii</i>             | 6  | A5(1), A6(1), A10(2), A11(1), A19(1) |
|          | 9      | 青海湖 | 青海湖小北湖    | <i>G. przewalskii</i>             | 6  | A3(1), A10(4), A18(1)                |
| 甘子河      | 10     | 青海湖 | 青海湖甘子河哈东桥 | <i>G. przewalskii przewalskii</i> | 7  | A5(1), A10(2), A11(3), A20(1)        |
|          | 11     | 青海湖 | 青海湖甘子河下游  | <i>G. przewalskii przewalskii</i> | 7  | A10(2), A11(3), A17(2)               |
| 贵德组      | 12     | 黄河  | 青海贵德阿什贡   | <i>G. eckloni</i>                 | 6  | A1(5), A28(1)                        |
|          | 13     | 黄河  | 青海贵德罗汉堂   | <i>G. eckloni</i>                 | 6  | A1(4), A2(1), A21(1)                 |
|          | 14     | 黄河  | 青海同德巴沟    | <i>G. eckloni</i>                 | 6  | A1(3), A23(1), A26(1), B4(1)         |
| 久治组      | 15     | 黄河  | 甘肃玛曲      | <i>G. eckloni</i>                 | 3  | A1(2), B5(1)                         |
|          | 16     | 黄河  | 青海久治      | <i>G. eckloni</i>                 | 5  | A21(2), A25(1), B3(2)                |

续表

| 本研究划分的组群 | 采样地点编号 | 水系    | 采样地点      | 物种/亚种             | 数目 | 单倍型 <sup>a)</sup>            |
|----------|--------|-------|-----------|-------------------|----|------------------------------|
| 玛多组      | 17     | 黄河    | 青海久治门堂    | <i>G. eckloni</i> | 5  | A21(3), B4(2)                |
|          | 18     | 黄河    | 青海久治逊木措湖  | <i>G. eckloni</i> | 3  | A21(1), A22(1), A24(1)       |
|          | 19     | 黄河    | 青海玛多黄河乡   | <i>G. eckloni</i> | 5  | A27(1), B2(1), B3(3)         |
|          | 20     | 黄河    | 青海玛多黄河大桥  | <i>G. eckloni</i> | 5  | B1(4), A30(1)                |
|          | 21     | 黄河    | 青海玛多星海    | <i>G. eckloni</i> | 7  | A21(2), B1(1), B2(1), A29(3) |
|          | 22     | 黄河    | 青海玛多鄂陵湖湖北 | <i>G. eckloni</i> | 5  | A23(1), A27(2), B1(1), B6(1) |
|          | 23     | 黄河    | 青海玛多鄂陵湖湖南 | <i>G. eckloni</i> | 5  | A27(1), B1(3), B4(1)         |
| 格尔木河     | 24     | 黄河    | 青海玛多扎陵湖湖北 | <i>G. eckloni</i> | 5  | A21(1), A27(2), B1(1), B6(1) |
|          | 25     | 黄河    | 青海玛多扎陵湖湖南 | <i>G. eckloni</i> | 5  | B1(4), B3(1)                 |
|          | 26     | 柴达木盆地 | 青海格尔木河下游  | <i>G. eckloni</i> | 12 | C1(10), C2(1), C6(1)         |
|          | 27     | 柴达木盆地 | 青海格尔木河中游  | <i>G. eckloni</i> | 11 | C1(7), C3(1), C4(2), C5(1)   |

a) 括号内数字表示在每个采样地点共享单倍型的样本数

## 2 结果

### 2.1 序列特性和 AMOVA 分析

对采自青海湖、黄河和柴达木盆地格尔木河的裸鲤 Cyt *b* 基因全序列进行对比后, 检测到变异位点 105 个, 包括 88 个简约信息位点和 17 个单个变异位点. 在全部 163 个个体中共检测出 42 个单倍型, 其中在新增样品中共检测出 5 个单倍型(青海湖裸鲤 3 个, 花斑裸鲤 2 个). 所有单倍型分别由青海湖裸鲤、黄河的花斑裸鲤和柴达木盆地的花斑裸鲤各自特有.

将黄河上游花斑裸鲤的样品按不同河段划分为不同的组群, 进行 AMOVA 层次分析, 具有最大组群间变异的群体被假定为最符合自然的种群结构模式<sup>[16]</sup>. 当以黄河上游最大的两个峡谷——官仓峡和拉加峡划分成 3 个组群时(分别命名为贵德组、久治组和玛多组)(图 1), 得到组群间最大遗传变异. 组群间变异约占整个变异的 18.92% ( $P < 0.01$ ), 组群内不同群体间的变异约占 5.87% ( $P < 0.01$ ), 因而推断黄河的黄河花斑裸鲤种群存在显著的地理结构.

### 2.2 进化枝结构

在由 42 个单倍型构建的 NJ 树上(图 2), 识别到与我们先前的研究结果一致的 3 个 mtDNA 谱系(A-C)<sup>[8]</sup>, 谱系 A 是主要的, 包含了 111 个个体(30 个单倍型), 谱系 B 和 C 分别包含 29 个个体(6 个单倍型)和 23 个个体(6 个单倍型). 中介网络图给出

了一个理想的网络模式, 显示了 42 个单倍型之间的相互关系以及青海湖裸鲤和花斑裸鲤真实的遗传结构. 网络图与系统发育树相一致, 清楚地识别到 3 个 mtDNA 谱系构成进化枝 A-C, 进化枝 A 与另外的两个枝 B 和 C 之间分别由 6 步和 77 步突变距离隔离(图 3).

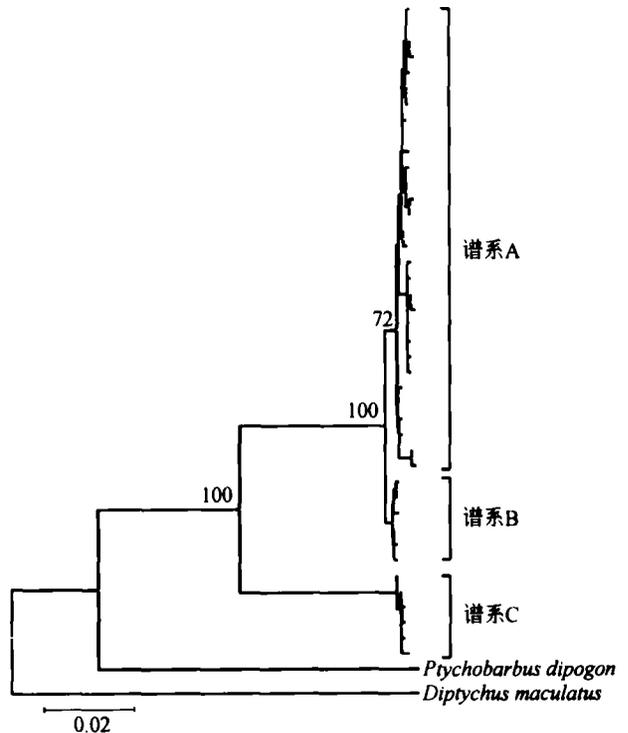


图 2 青海湖裸鲤和花斑裸鲤 163 个个体中 42 个单倍型的 NJ 树( $T_r N + G_r = 0.1286$ ) 节点的数字为 1000 次重复的自展支持率, 以 *Ptychobarbus dipogon* 和 *Diptychus maculatus* 作为外类群

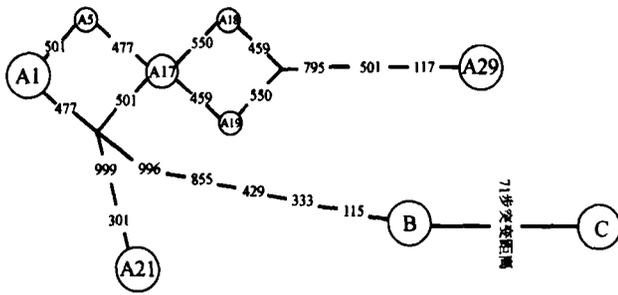


图3 青海湖裸鲤和花斑裸鲤3个谱系及其主要进化枝的相对关系

A, B 和 C 分别表示 3 个谱系, 圆圈中的数字表示具体的单倍型, 连线上的数字表示核苷酸突变位点(枝 B 与枝 C 的 71 个突变位点未显示)

在对各个进化枝的网络分析中, 我们还发现枝 A 包含 3 个明显的亚枝, 亚枝 A1, 亚枝 A21 和亚枝 A29, 分别包含 84, 23 和 4 个个体以及 20, 8 和 2 个单倍型(图 3 和 4, 亚枝 A29 在图中未显示). 亚枝 A1 与另外的 2 个亚枝之间分别由 3 步和 4 步突

变距离相分离(图 3). 除了枝 B 和亚枝 A29 外, 亚枝 A1, A21 和枝 C 的单倍型均显示为明显星状分布, 并且各自含有一个高频率分布的优势单倍型(单倍型 A1, 14 个个体, 占谱系 A 全部个体的 12.6%; 单倍型 A21, 10 个个体, 占谱系 A 全部个体的 9%; 单倍型 C1, 17 个个体, 占谱系 C 全部个体的 73.9%) 分别位于各进化枝(或亚枝)的中央(图 4).

在具有高鳃耙变异的稀有样品中检测到的特有单倍型(图 4, 单倍型 A14, A15 和 A16)分散地分布在网络图中, 未形成特有的进化枝. 尚未有过记录的花斑裸鲤第一鳃弓外鳃耙数为 8 和 9 的样品与其他的 花斑裸鲤共享相同单倍型(A21 和 A27)(图 4). 增加样本后青海湖裸鲤和花斑裸鲤的第一鳃弓外鳃耙变异几乎覆盖了所有已报道的形态学资料的变异范围, 其结果有力地证明了裸鲤属鱼类形态分类中的鳃耙变异与 Cyt b 遗传变异之间并没有相关性.

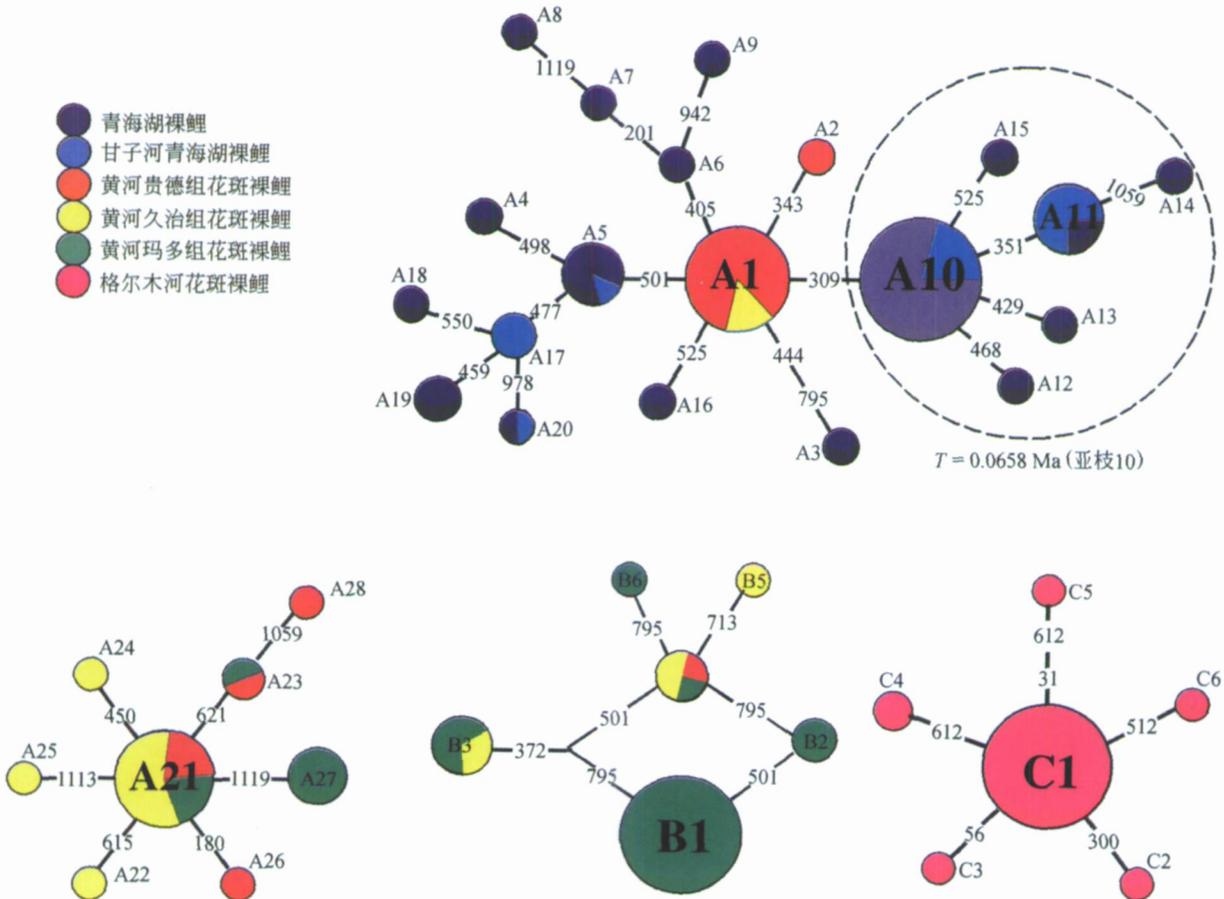


图4 青海湖裸鲤和花斑裸鲤主要进化枝的单倍型网络图

圆圈的大小表示单倍型分布的频率, 圆圈中的字符表示具体的单倍型, 连线上的数字表示核苷酸突变位点

2.3 进化枝的地理分布

图4示各进化枝(亚枝)表现出明显的水系分布特性(表1)。枝A包含了全部的青海湖裸鲤和部分来自黄河的花斑裸鲤的样品(占黄河花斑裸鲤个体总数的59.15%和单倍型总数的66.67%)。亚枝A1被青海湖裸鲤和黄河的花斑裸鲤共享,其中大部分的样品和特有单倍型分布在青海湖(占A1个体总数的82.14%和特有单倍型总数的90%),而亚枝A21和亚枝A29全部分布在黄河水系,由黄河花斑裸鲤组成。枝B同样分布在黄河水系,由剩余的黄河花斑裸鲤的样品组成。枝C全部分布在柴达木盆地,并且为柴达木盆地格尔木河的花斑裸鲤独有。

2.4 种群扩张

通常有两种方法检验种群在历史上是否发生过

扩张。一种方法是采用Fu<sup>[17]</sup>的Fs中性检验显著偏离中性突变,负的Fs值和差异显著的P值被认为种群在历史上有扩张的迹象<sup>[17]</sup>。我们在Fs检验时采用了1000次的模拟抽样。另一种方法是核苷酸不配对分析,这种方法是基于无限位点模式(infinite-site model)对样本中两两序列进行差异分析<sup>[21]</sup>,我们同样采用了1000次的重复模拟。

在我们的资料中,青海湖裸鲤的核苷酸不配对分布曲线呈现明显的单峰形(图5),而且Fs检验得到了一个较大的负Fs值和差异显著的P值(表1)。尽管柴达木盆地的花斑裸鲤(谱系C)核苷酸不配对分布曲线没有呈现明显的单峰形(图5),但Fs检验显示高度的显著(表2)。这些结果提示青海湖裸鲤和柴达木盆地的花斑裸鲤可能在历史上发生过种群扩张。

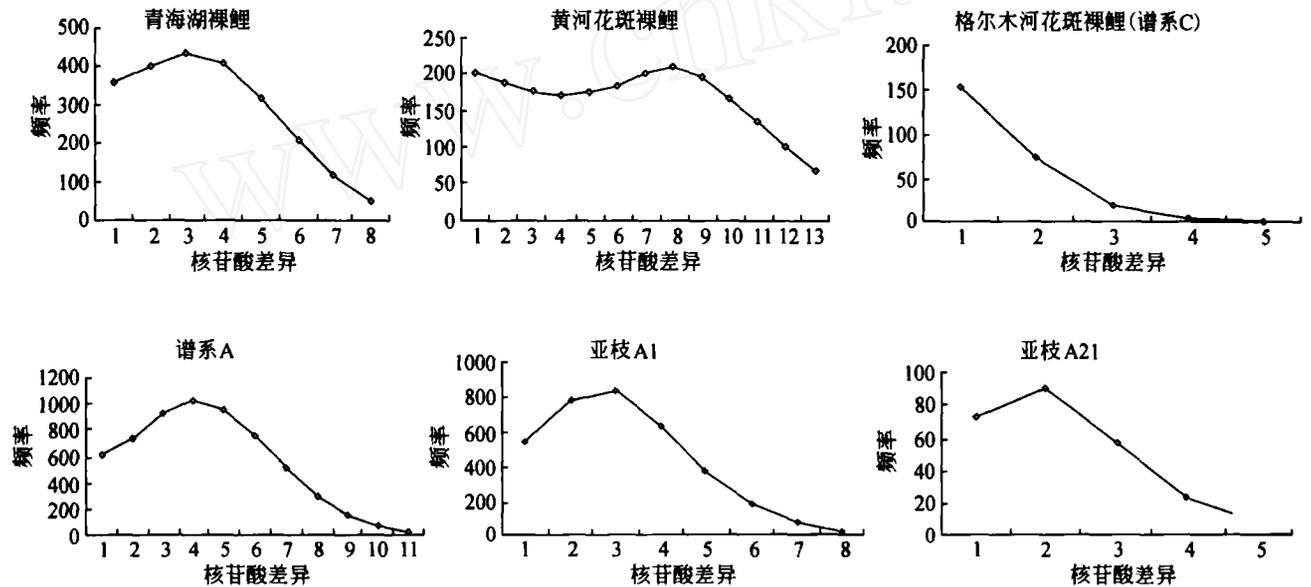


图5 青海湖裸鲤和花斑裸鲤种群及主要进化枝的核苷酸不配对分析

表2 青海湖裸鲤和花斑裸鲤种群的核苷酸多样性( )、Fs检验和年代估算

| 种群         | n  | 单倍型 | ±SE               | Fs      | P      | 扩张年代/Ma |
|------------|----|-----|-------------------|---------|--------|---------|
| 青海湖裸鲤      | 69 | 18  | 0.002078 ±0.00127 | -7.8096 | P<0.01 | 0.2734  |
| 青海湖裸鲤指名亚种  | 55 | 17  | 0.002132 ±0.00126 | -7.4039 | P<0.01 | 0.2805  |
| 青海湖裸鲤甘子河亚种 | 14 | 5   | 0.001677 ±0.00114 | -0.0365 | P>0.05 | 0.2655  |
| 黄河花斑裸鲤     | 71 | 18  | 0.004823 ±0.00260 | -1.3891 | P>0.05 | 0.6346  |
| 柴达木花斑裸鲤    | 23 | 6   | 0.000527 ±0.00049 | -3.7001 | P<0.01 | 0.0693  |

为了更详细地了解青海湖裸鲤和花斑裸鲤种群的进化历史,我们还对mtDNA谱系的各进化枝作了Fs检验和核苷酸不配对分析。结果显示种群扩张

存在于枝A(Fs = -16.6725, P < 0.01), 亚枝A1(Fs = -10.6234, P < 0.01)和亚枝A21(Fs = -4.2951, P < 0.01)。这些进化枝的扩张同样得到

了核苷酸不配对分析的支持(图5)。亚枝 A29 仅包含 2 个单倍型,因而未进行  $F_s$  检验和核苷酸不配对分析。

### 2.5 年代估算

使用鲤科鱼类每百万年 0.76% 的进化速率<sup>[22]</sup>, 根据核苷酸多样性, 分别估算青海湖裸鲤和柴达木盆地花斑裸鲤发生种群扩张的时间大致为 0.2734 Ma 和 0.0693 Ma(表 2)。

最近共同祖先年龄(TMRCA)的计算是基于我们构建的系统网络图是世系间真实的系统关系, 并且单倍型呈现星形分布<sup>[19]</sup>, 我们估计的亚枝 A1 和亚枝 A21 的 TMRCA 分别为(0.2308 ±0.01) Ma 和 (0.1319 ±0.015) Ma。

## 3 讨论

### 3.1 青海湖裸鲤的起源

我们曾经用不同方法构建的进化树显示, 青海湖裸鲤的甘子河亚种并没有发生遗传分化<sup>[4]</sup>。单倍型的网络分析为识别单倍型之间的进化关系提供了更多信息(图4)。甘子河裸鲤的全部 5 个单倍型, 有 4 个与青海湖裸鲤指名亚种共享(A5, A10, A11 和 A20), 并且广泛分布在枝 A。尽管单倍型 A17 为甘子河裸鲤亚种特有, 但从它辐射出的 3 个单倍型中的 2 个(A18 和 A19)是青海湖裸鲤指名亚种特有的, 另 1 个(A20)与指名亚种共享(图4)。由于新近起源的单倍型一般优先出现在网络图的末端<sup>[23]</sup>, 因而我们的网络结构同样不支持特有单倍型 A17 是新近起源的。同时, 青海湖裸鲤种群结构的 AMOVA 分析显示, 遗传变异的 94.3% ( $P < 0.05$ ) 存在于青海湖裸鲤种群内, 只有 5.7% ( $P < 0.05$ ) 存在于青海湖裸鲤指名亚种和甘子河亚种之间。网络分析的结果支持了青海湖裸鲤种群内没有显著的地理结构<sup>[4]</sup>, 而特有单倍型 A17 很可能在指名亚种的采样中尚未发现。

我们以前的系统发育研究不支持花斑裸鲤是一个单系群, 而该种分布在柴达木盆地的地理种群形成了一个独立的谱系(谱系 C), 分析认为柴达木盆地花斑裸鲤可能已经独立进化成相当于不同的种<sup>[4]</sup>。由全部青海湖裸鲤和少数黄河花斑裸鲤组成的亚枝 A1 显示了星状的系统发育关系, 位于亚枝

中央的单倍型 A1 被 14 个黄河花斑裸鲤的个体共享, 是一个古老的创立者单倍型, 所有青海湖裸鲤的单倍型都来源于它的辐射, 并且除 A3 和 A1 之间为 2 步突变外, 其余均为 1 步突变距离。然而枝 A 与枝 C 间高达 71 步突变距离(图 3), 说明青海湖裸鲤与柴达木盆地花斑裸鲤的隔离已相当久远。尽管我们的样本大小还不足以解释柴达木盆地花斑裸鲤的起源, 但以上信息足以表明青海湖裸鲤起源于黄河的花斑裸鲤, 而且在我们的资料中显示为单一起源。

### 3.2 黄河花斑裸鲤的谱系多样化

来自黄河花斑裸鲤的单倍型广泛分布在枝 A 的各亚枝和枝 B, 而且枝 A 中各亚枝的中央单倍型都来自黄河花斑裸鲤。枝 A 和枝 B 之间有 6 步突变距离, 而枝 A 中各亚枝相互之间的突变距离最少为 3 步(图 3), 单倍型之间大量过渡类型的丢失暗示它们的分化并非新近形成。这个结果不仅支持黄河花斑裸鲤可能存在两个母系来源<sup>[4]</sup>, 进一步暗示黄河花斑裸鲤的谱系 A 可能由多个母系支系组成, 而青海湖裸鲤很可能来源于黄河花斑裸鲤的一个支系。

分子的 AMOVA 分析显示, 黄河的花斑裸鲤在黄河上游峡谷之间存在种群结构, 暗示这些峡谷对花斑裸鲤的扩散有一定的限制, 这与裸鲤属鱼类一般生活于宽谷河流和湖泊的习性相一致。谱系 B 的系统地位表明, 它与谱系 A 中的黄河花斑裸鲤之间的分歧时间要早于青海湖与黄河的隔离时间, 而地质资料显示黄河向上游袭夺并完全贯穿源区是发生在青海湖与黄河隔离以后<sup>[24]</sup>, 因而我们认为黄河上游峡谷的限制对谱系 B 的形成没有意义。

对黄河花斑裸鲤主要进化枝单倍型分布频率的分析为我们认识谱系 B 的起源提供了信息。亚枝 A1 中来自黄河花斑裸鲤的大部分个体(86.67%)分布在贵德组(贵德盆地和共和盆地)(图 4, 表 1), 这一方面暗示了在“共和运动”以前, 贵德盆地和共和盆地是黄河上源最大的湖盆<sup>[25]</sup>, 它们对青海湖裸鲤的进化曾起过重要的作用, 可能是当时该地区鱼类的起源和扩散中心。另一方面暗示了古青海湖、贵德盆地和共和盆地的鱼类区系曾经与黄河上源地区的联系长期受到限制。谱系 B 有 79.31% 的样本分布在黄河最上源的玛多组(图 4, 表 1), 同样暗示它

们与贵德盆地和共和盆地的鱼类缺乏基因交流. 这一推断与黄河向上游袭夺在大约 0.03 Ma 才切开贵南南山进入若尔盖盆地的最新地质研究相一致(图 1)<sup>[26]</sup>. 因此, 黄河花斑裸鲤的多个母系来源可能与黄河向上游袭夺的历史有关.

地质资料显示, 黄河在完全贯穿之前, 已经有许多的古湖泊分布在今日黄河的源头地区, 如兴海盆地、诺尔盖盆地、扎陵湖和鄂陵湖盆地等<sup>[24-27]</sup>. 曹文宣等<sup>[1]</sup>基于鱼类生物地理学研究, 提出高原鱼类起源于高原本身, 裂腹鱼类由原来广泛分布于高原的原始鲃亚科鱼类演化而来. 由此可见, 黄河在上游发育之前, 原始裂腹鱼类就已经广泛分布于这里的古湖盆中. 特别是黄河最上源的扎陵湖和鄂陵湖, 早在第四纪以前就已形成为内陆湖泊, 面积也比今日的湖泊大一倍以上, 在当时无疑是一个巨大的“鱼类基因库”. “共和运动”之后, 黄河进一步向上游袭夺, 并有顺序地贯穿各个湖盆(图 1), 黄河水系开始成为一体<sup>[26, 27]</sup>. 因此, 综合我们的结果和地质资料, 对黄河花斑裸鲤表现的谱系多样化最有可能的解释是, 黄河袭夺最近一次贯穿上游湖盆并与“鱼类基因库”中的原始裂腹鱼类发生了融合. 由于黄河完全贯穿上游是晚更新世末甚至是全新世的事件<sup>[24]</sup>, 加上峡谷的阻碍, 不具洄游特性的花斑裸鲤不可能形成快速的基因交流, 因而仍保留着一些祖先的遗传特征. 黄河花斑裸鲤的主要进化枝呈现区域分布的特征, 基本上说明了这一情况. 青海湖裸鲤的起源和黄河花斑裸鲤的进化模式直接反映了青藏高原强烈隆升过程对高原生物多样性的影响, 我们的 mtDNA 结果也为青藏高原生物起源于高原本身的假说提供了证据.

### 3.3 种群历史

“共和运动”是青藏高原强烈隆升过程中的一次重要地质事件, 导致了青海湖与黄河的分离, 青藏高原“共和运动”而达到现在的高度, 形成目前的格局<sup>[8]</sup>. 我们估计的青海湖裸鲤种群扩张的时间大致在 0.2734 Ma(表 2), 根据平均突变距离估算的亚枝 A1 和亚枝 A21 的扩张时间分别是 0.1319 Ma 和 0.2308 Ma. 这些年代略高于“共和运动”的地质时间(0.15 Ma), 但仍在大致范围内. 在网络图中, 青海湖裸鲤的所有单倍型均呈现星状分布, 显

示了在历史上持续的种群扩张. 我们的  $F_s$  检验还发现种群扩张存在于亚枝 A10 中(单倍型 A10 共享了 27 个青海湖裸鲤个体,  $F_s = -3.1167$ ,  $P < 0.05$ ), 暗示青海湖裸鲤在约 0.0658 Ma 经历了一次局部种群数量的快速增长. 青海湖在形成后进入全盛发育<sup>[25]</sup>, 为促使青海湖裸鲤谱系多样化提供了更多的机会. 相对来说, 黄河浸蚀使原本发育很好的古湖盆大幅缩小或迅速消失, 湖泊型向适应河流生态环境的快速转变对黄河鱼类必然产生很大的影响, 适应进化可能导致一些类型的灭绝. 尽管如此, 新谱系的融合可能是黄河水系具有比青海湖和柴达木水系更丰富鱼类区系的一个重要原因.

柴达木盆地的裂腹鱼类仅有两种, 呈区域分布, 花斑裸鲤分布在中西部<sup>[3]</sup>. 地质研究表明<sup>[28, 29]</sup>, 晚更新世末由于青藏高原气候急剧变化, 柴达木盆地经历了数次非常干旱的时期, 曾导致了原来生活于盆地的一些生物的灭绝<sup>[30]</sup>. 柴达木盆地的干旱时期, 对鱼类的生存必然产生过不利的影响. 然而, 对于一个物种, 在致危因素的作用下, 部分个体可能被生物避难所保存, 而后数量再次回升<sup>[31]</sup>. 我们的资料显示, 柴达木盆地格尔木河的裸鲤在约 0.0693 Ma 发生过一次种群的扩张(表 2), 因而推断这一时期是该种群进化历史上一次非常严重的“瓶颈效应”, 这与柴达木盆地总体鱼类多样性的贫乏相一致. 柴达木盆地花斑裸鲤的种群扩张和青海湖裸鲤种群的局部扩张时间(0.0658 Ma)非常接近, 这似乎与“共和运动”后青藏高原在全新世的最近隆升事件相对应<sup>[26]</sup>, 可能同样具有重要的古环境意义, 暗示青藏高原最新的强烈隆升和更新世晚期全球气候的变化对青海湖和柴达木盆地鱼类多样性演化的影响.

**致谢** 采样得到青海大学陈刚、李太平教授和青海省水产局史健全、祁洪芳老师的大力协助; 实验工作得到中国科学院水生生物研究所刘焕章研究员、王绪桢、李俊兵、郭宪光和杨雷博士的热心帮助; 中国科学院昆明动物研究所张亚平院士、庞峻峰和向余劲功博士对资料分析给予了指导, 特别是庞峻峰博士对论文提出了宝贵意见, 在此谨致衷心感谢.

## 参 考 文 献

- 1 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. 见: 中国科学院青藏高原综合科学考察队编. 青藏高原隆起的时代、幅度和形式问题. 北京: 科学出版社, 1981, 118—130
- 2 朱松泉, 武云飞. 青海湖地区鱼类区系的研究. 见: 青海湖地区的鱼类区系和青海湖裸鲤的生物学. 北京: 科学出版社, 1975, 9—26
- 3 武云飞, 吴翠珍. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社, 1991, 437—444
- 4 赵凯, 李俊兵, 杨公社, 等. 青海湖及其相邻水系特有裸鲤属鱼类的分子系统发育. 科学通报, 2005, 50(13): 1348—1355
- 5 Verheyen V, Salzburger W, Snoeks J, et al. Origin of the super-flock of cichlid fishes from Lake Victoria, East Africa. *Science*, 2003, 300(11): 325—329
- 6 Waters JM, Craw D, Youngson JH, et al. Genes meet geology: Fish phylogeographic pattern reflects ancient, rather than modern, drainage connections. *Evolution*, 2001, 55(9): 1844—1851
- 7 李吉钧, 方小敏, 马海洲, 等. 晚生代黄河上游地貌演化与青藏高原隆起. *中国科学, D辑*, 1996, 26(4): 316—322
- 8 李吉钧, 方小敏, 潘保田, 等. 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*, 2001, 21(5): 381—391
- 9 Ausubel FM. *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, 1992
- 10 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22: 4673—4680
- 11 Kumar S, Tamura K, Jakobsen BI, et al. MEGA 2: Molecular evolutionary genetics analysis software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001
- 12 Swofford D L. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods), Ver 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1998—2002
- 13 Posada D, Crandall KA. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, 14: 817—818
- 14 Bandelt H, Forster P, Rohl A. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*, 1999, 16: 37—48
- 15 Schneider S, Roessli D, Excoffier L. ARLEQUIN Version 2.000: A software for population genetic data analysis. University of Geneva, Switzerland, 2000
- 16 Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 2000, 136: 343—359
- 17 Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 1997, 147: 915—925
- 18 Schneider S, Excoffier L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 1999, 152: 1079—1089
- 19 Saillard J, Forster P, Lynnerup N, et al. mtDNA variation among Greenland Eskimos: The edge of the Beringian expansion. *Am J Hum Genet*, 2000, 67: 718—726
- 20 Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 1987
- 21 Rogers AR, Harpending H. Population growth curves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol*, 1992, 9: 552—569
- 22 Zardoya R, Doadrio I. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *J Mol Evol*, 1999, 49: 227—237
- 23 Golding GB. The detection of deleterious selection using ancestors inferred from a phylogenetic history. *Genet Res*, 1987, 49: 71—82
- 24 陈志明. 黄河上游古湖沼及其环境初析. 第三次中国海洋湖沼科学会议论文集. 北京: 科学出版社, 1988, 244—253
- 25 潘保田. 贵德盆地地貌演化与黄河上游发育研究. *干旱区地理*, 1994, 17(3): 43—50
- 26 张智勇, 于庆文, 张克信, 等. 黄河上游第四纪河流地貌演化. *地球科学—中国地质大学学报*, 2003, 28(6): 621—633
- 27 郑本兴, 王苏民. 黄河源区的古冰川与古环境探讨. *冰川冻土*, 1996, 18(3): 210—218
- 28 张彭熹, 陈克造. 柴达木盆地盐湖. 北京: 科学出版社, 1987, 1—40
- 29 朱筱敏, 康安, 韩德馨, 等. 柴达木盆地第四纪环境演变、构造变形与青藏高原隆升的关系. *地质科学*, 2003, 38(3): 413—424
- 30 景民昌, 孙镇城, 李东明, 等. 柴达木盆地3万年左右 *Ilyocypris inermis* 灭绝事件及其古环境意义. *现代地质*, 2001, 15(1): 49—57
- 31 Billington N, Hebert PDN. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can J Fish Aquat Sci*, 1991, 48(suppl. 1): 80—94