论文

鲤亚科多倍体物种独立起源及其与第三纪青藏高原隆升的关系

王绪祯, 甘小妮, 李俊兵, 陈宜瑜, 何舜平*

中国科学院水生生物研究所, 中国科学院水生生物多样性与保护重点实验室, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: clad@ihb.ac.cn

收稿日期: 2016-05-20; 接受日期: 2016-07-13; 网络版发表日期: 2016-10-28

国家自然科学基金(批准号: 31272290)资助

摘要 青藏高原特有鲤科多倍体鱼类(裂腹鱼类)的起源和物种分化研究有助于探讨鲤科鱼类物种分化和青藏高原隆升之间的关系. 本研究利用线粒体和核基因DNA序列构建系统发育关系, 并以此来追溯裂腹鱼类多倍体的起源及其物种分化. 倍性水平的祖先状态重建结果显示, 鲤亚科是二倍体起源的, 而裂腹鱼类是四倍体起源. 研究还发现, 在适应青藏高原隆升过程中, 鲤亚科鱼类物种分化速率发生了两次明显改变, 而且这些分化速率变化都发生在青藏高原特有鱼类的分支中. 研究表明, 青藏高原特有的多倍体化裂腹鱼类包含了两个独立起源的类群. 裂腹鱼类的物种分化与晚第三纪以来的青藏高原隆升密切相关, 其中, 渐新世晚期至中新世中期的裂腹鱼类适应性分化与青藏高原南部地区以及喜马拉雅山脉的隆升相关; 中新世中期到更新世早期的物种分化基本同晚第三纪青藏高原隆升的主要阶段相一致; 而更新世以来裂腹鱼属(*Schizothorax*)的物种分化则和青藏高原快速隆升过程中的昆仑-黄河运动及共和运动密切相关.

关键词 鲤亚科, 多倍体, 裂腹鱼类, 青藏高原, 物种分化

青藏高原是世界上面积最大、海拔最高的高原, 面积超过250万平方千米, 平均海拔4500 m以上. 青藏高原代表性的极端环境条件包括了高海拔、低温和低氧. 物种的多倍体化现象在青藏高原植物中发生得非常频繁^[1-4], 因为青藏高原为高山植物提供了广阔的栖息环境, 因此高原特有多倍体化植物的物种多样性非常丰富. 这表明多倍体化是生物在适应青藏高原极端环境条件的进化过程中常见的而且有成效的演化转变. 研究发现, 多倍体化物种在鲤科(Cyprinidae)一些类群中也大量存在^[5-7], 而且鲤科鱼类的这些多

倍体化物种大多分布于青藏高原及其周边地区^[8]. 众所周知, 脊椎动物中青藏高原及其周边区域分布的特有鲤科鱼类的多倍体化现象非常普遍. 然而, 关于这些多倍体物种的起源和演化及其与青藏高原之间的关系等问题, 目前为止已经开展的研究并不多.

鲤科是世界淡水鱼类中最大的一个类群, 约有2420种^[9]. 其中Howes^[10]认定的鲤亚科(又称鲃系^[11,12])大概包含了87属1332种, 超过了鲤科鱼类的1/2, 从南亚至非洲都有分布^[13,14]. 形态上, 鲤亚科包括4个类群, 分别是鲃类(barbine)、鲤类(cyprinine)、野鲮类(labeonine)

引用格式: 王绪祯, 甘小妮, 李俊兵, 等. 鲤亚科多倍体物种独立起源及其与第三纪青藏高原隆升的关系. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1277-1295, doi: [10.1360/N052016-00282](https://doi.org/10.1360/N052016-00282)

英文版见: Wang X Z, Gan X N, Li J B, et al. Cyprininae phylogeny revealed independent origins of the Tibetan Plateau endemic polyploid cyprinids and their diversifications related to the Neogene uplift of the plateau. Sci China Life Sci, 2016, 59: 1149-1165, doi: [10.1007/s11427-016-0007-7](https://doi.org/10.1007/s11427-016-0007-7)

和裂腹鱼类(schizothoracine), 它们曾分别被定义为4个亚科^[12]. 就野生物种的染色体核型而言, 鲤亚科中从普通的二倍体($2n=50$)一直到多倍体($2n=417\sim 470$)物种都有发现^[5~7,15,16]. 在鲃类, 尤其是鲤类和裂腹鱼类中, 多倍体物种还是很常见的. 截至目前, 所有做过核型检测的野鲮鱼类均为二倍体, 没有发现有多倍体; 而所有检测的裂腹鱼类都被证实为多倍体. 此外, 目前所确认的裂腹鱼类全部物种都集中分布在青藏高原及其周边地区.

东亚地区古地质和古气候的重要事件包括了青藏高原的隆升和东亚季风的生成, 二者对东亚地区的环境产生了巨大影响. 通常认为, 青藏高原特有生物的物种分化和高原隆升之间的关系尤其密切, 因为生物栖息地及其生态环境都受到了高原隆升和由隆升造成的气候变化的剧烈影响. 青藏高原和喜马拉雅山脉是由印度板块和欧亚板块间持续不断的地壳碰撞产生, 这一过程大约于五千万年前开始发生. 尽管青藏高原当前地貌形成的具体机制、幅度和时间还不太清楚^[17,18], 但通常认为青藏高原的海拔高度在1000~800万年前^[19,20]甚至更近的时间^[17,21]内发生过显著的进一步抬升. 针对裂腹鱼类和鲃鱼类的分化时间估算结果显示, 青藏高原及其临近地区的鱼类物种分化与新生代晚期的高原隆升密切相关. 其他研究也表明, 新生代时期青藏高原隆升所造成的环境和栖息地的改变促进了动物类群的物种分化^[22,23]. 因此, 系统发育和生物地理学研究对新生代晚期的青藏高原隆升对高原物种分化和分布的影响已经做过详细阐述, 从而为青藏高原新生代时期的地质变迁及其伴随的生态变迁进程的相关假说提供了验证. 考虑到鲤亚科中许多特有物种局限性地分布于青藏高原(包括临近区域)地区, 而且其多倍化物种的种类众多, 因此, 鲤亚科是研究鲤科鱼类多倍体物种的分化时间和速率及其与青藏高原隆升间关系的代表性类群. 然而, 目前针对在新生代时期的青藏高原隆升背景下的鲤亚科鱼类物种分化格局研究并不多见. 利用分子生物学证据, 本研究将阐述青藏高原隆升及其带来的气候变化对鲤亚科(尤其是多倍体化种类)物种分化的影响. 由于物种的多倍体化现象会给分子系统发育分析造成麻烦^[24], 为了减少系统发育历史重建过程中多倍体物种的负面影响, 研究通常会选择低拷贝的核基因作为遗传标记. 而且, 基于线粒体基因和低拷贝核基因数

据的系统发育分析已经让人们的多倍体的物种演化有了进一步的认识^[25~32]. 核重组活化基因2(RAG2)编码介导免疫球蛋白和T细胞受体基因结合的重组酶的组分, 在斑马鱼(*Danio apogon*)中被证实仅保存了单一拷贝^[33]. RAG2基因为近来的一些鲤科鱼类系统发育研究提供了重要信息^[34~37]. 本研究选择了RAG2核基因, 线粒体基因组中16S核糖体RNA(16S rRNA)基因、细胞色素c氧化酶亚基 I (COI)基因、NADH脱氢酶亚基4(ND4)基因和细胞色素b(cytb)基因作为标记来重建鲤亚科鱼类的系统发育历史. 本研究目的包括: (i) 提供鲤亚科鱼类可靠的系统发育关系以更好地理解裂腹鱼类多倍体物种间的相互关系; (ii) 为鲤亚科中多倍体化物种的起源和分化时间研究提供线索; (iii) 通过估算鲤亚科鱼类物种分化的时间和速率格局来探讨青藏高原新生代晚期的隆升对多倍体化鱼类物种分化时间和速率的重要影响.

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究所分析的内类群种类包括了鲤亚科46属123种鱼类以及20种鲤亚科以外的其他鲤科鱼类. 基于鲤形目为单系群的研究结论, 选取了鲤科之外的3种鲤形目鱼类作为外类群, 即胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)、双孔鱼(*Gyrinocheilus* sp.)和泥鳅(*Misgurnus* sp.)(表1). 样品采集地地图见图1, 其中用于DNA提取的组织样品用95%酒精保存, 其对应标本则保存于中国科学院水生生物研究所淡水鱼类博物馆中.

1.2 DNA序列数据的收集和排列

野外采集的肌肉或者鳍条样品, 用95%乙醇固定后保存于实验室-20℃冰箱中以用于DNA抽提. 采用酚/氯仿抽提法, 从肌肉或者鳍条组织中提取基因组总DNA^[38]. 利用已发表和/或优化引物(表2), 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)从总基因组DNA中分别扩增了RAG2核基因和线粒体基因. PCR反应体系包含约100 ng的DNA模板、5 μL的10×反应缓冲液、2 μL的dNTPs(各2.5 mmol L⁻¹)、2.0单位的Taq聚合酶以及1 μL的各寡聚核苷酸引物(引物浓度为10 μmol L⁻¹), 反应混合物的最终体积为50 μL. PCR扩增程序包括最初94℃预变性3 min, 随后是30 s的94℃变

表 1 本研究中鲤亚科鱼类内类群及外类群分类单元取样表, 括号内为国内样品采集地的坐标

亚科	物种	采集地(纬度, 经度)	基因序列				
			<i>RAG2</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>Col</i>	<i>ND4</i>	<i>Cytb</i>
外类群	双孔鱼(<i>Gyrinocheilus</i> sp.)	Genbank	AY804074*	A2164*	A2164*	A2164*	A2164*
	泥鳅(<i>Misgurnus</i> sp.)	Genbank	AY804103*	A2171*	A2171*	A2171*	A2171*
	胭脂鱼(<i>Myxocyprinus asiaticus</i>)	湖北, 武汉(30.598, 114.312)	DQ367043	DQ845896	AY526869*	AY526869*	AY986503*
	鳙(<i>Aristichthys nobilis</i>)	湖北, 武汉(30.598, 114.312)	DQ367038	GQ406281	HQ236000	HQ235871	AF051855*
	草鱼(<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	广西, 横县(22.686, 109.268)	DQ366996	GQ406277	HQ236004	HQ235869	AF051860*
	翘嘴鲌(<i>Culter alburnus</i>)	湖南, 桃源(28.909, 111.495)	DQ367004	GQ406293	GU190362*	GU190362*	AP009060*
	真小鲤(<i>Cyprinella lutrensis</i>)	GN531	DQ367019	GQ406267	A0206*	A0206*	A0206*
	斑马鱼(<i>Danio apogon</i>)	Genbank	U71094*	A4175*	A4175*	A4175*	A4175*
	鮡(<i>Gobio gobio</i>)	法国	DQ367015	GQ406305	A9596*	A9596*	AY426592*
	鲢(<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	湖南, 辰溪(28.013, 110.190)	DQ367002	GQ406282	HQ236001	HQ235870	AF051866*
	雅罗鱼(<i>Leuciscus leuciscus</i>)	法国	DQ367007	GQ406268	—	—	AY509823*
	团头鲂(<i>Megalobrama amblycephala</i>)	湖北, 武汉(30.598, 114.312)	DQ367025	GQ406294	EU434747*	EU434747*	AF051867*
	青鱼(<i>Mylopharyngodon piceus</i>)	湖南, 桃源(28.909, 111.495)	DQ367011	GQ406278	HQ236003	HQ235872	AF051870*
	马口鱼(<i>Opsariichthys bidens</i>)	湖南, 桃源(28.909, 111.495)	DQ367014	GQ406289	DQ367044*	DQ367044*	DQ367044*
	鲢(<i>Phoxinus phoxinus</i>)	Europe	DQ367022	GQ406269	—	—	Y10448*
	吻鲢(<i>Rhinichthys atratulus</i>)	GN529	DQ367018	GQ406273	EU525120*	—	AF452078*
	鲮鱼(<i>Rhodeus</i> sp.)	广西, 西林(24.496, 105.100)	DQ367031	GQ406311	DQ026430*	DQ026430*	DQ026430*
	拟鲤(<i>Rutilus rutilus</i>)	France	DQ367003	GQ406271	—	—	AF095610*
	华鲮(<i>Sarcocheilichthys sinensis sinensis</i>)	四川, 合江(28.818, 105.838)	DQ367026	GQ406308	A4124*	A4124*	AY952983*
	唐鱼(<i>Tanichthys albonubes</i>)	水族馆	DQ367023	GQ406291	—	—	EF151121*
	丁鲷(<i>Tinca tinca</i>)	Europe	DQ367029	GQ406280	A8686*	A8686*	Y10451*
	银鲳(<i>Xenocypris argentea</i>)	湖南, 桃源(28.909, 111.495)	DQ367024	GQ406285	AP009059*	AP009059*	AP009059*
	宽鳍鱮(<i>Zacco platypus</i>)	广西, 金秀(24.139, 110.195)	DQ367010	GQ406292	EF452896*	EF452825*	AY245048*
野鲮亚科	鲮(<i>Cirrhinus molitorella</i>)	广西, 藤县(23.381, 110.921)	DQ366959	DQ845883	HQ235977	HQ235791	AY463098*
(Labeoninae)	印度穗唇鲃(<i>Crossocheilus latius</i>)	云南, 腾冲(25.380, 98.210)	DQ366982	DQ845882	—	—	—
	伍氏盘唇鱼(<i>Discocheilus wui</i>)	广西, 凤山(24.553, 107.049)	HQ235874	HQ235699	—	HQ235797	HQ235747
	双珠盘鲃(<i>Discogobio bismargaritus</i>)	广西, 柳州(24.332, 109.422)	DQ366947	DQ845890	—	—	GQ406318
	短体盘鲃(<i>Discogobio brachyphysallidos</i>)	广西, 金秀(24.139, 110.195)	DQ366958	DQ845901	—	—	GQ406319
	宽头盘鲃(<i>Discogobio laticeps</i>)	广西, 天峨(25.005, 107.180)	DQ366949	DQ845889	—	HQ235795	GQ406320
	双角角鱼(<i>Epalzeorhynchus bicornis</i>)	云南, 保山(25.118, 99.168)	HQ235875	DQ845919	—	HQ235802	HQ235748
	须唇角鱼(<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>)	水族馆	HQ235876	—	—	HQ235819	AY954252*

(续表1)

亚科	物种	采集地(纬度, 经度)	基因序列				
			<i>RAG2</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>Col</i>	<i>ND4</i>	<i>Cytb</i>
野鲮亚科 (Labeoninae)	须唇角鱼(<i>Epalzeorhynchus frenatus rar</i>)	水族馆	DQ366943	DQ845905	—	HQ235778	GQ406321
	西藏墨头鱼(<i>Garra kempfi</i>)	西藏, 察隅(28.668, 97.473)	DQ366968	DQ845885	HQ235946	—	—
	奇额墨头鱼(<i>Garra mirofrontis</i>)	云南, 腾冲(25.380, 98.210)	DQ366934	HQ235700	—	HQ235793	HQ235749
	东方墨头鱼(<i>Garra orientalis</i>)	海南, 乐东(18.659, 109.063)	DQ366957	DQ845884	—	—	GQ406322
	东方墨头鱼(<i>Garra taeniata</i> 2)	云南, 景洪(22.006, 100.778)	HQ235877	HQ235701	—	—	—
	东方墨头鱼(<i>Garra taeniata</i> 3)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	HQ235878	HQ235702	—	—	—
	条纹墨头鱼(<i>Garra taeniata</i>)	云南, 景洪(22.006, 100.778)	DQ366953	GQ406262	—	—	—
	墨头鱼(<i>Garra tana</i>)	Ethiopia	HQ235879	HQ235703	HQ235945	HQ235792	HQ235750
	单吻鱼(<i>Henicorhynchus lineatus</i>)	云南, 勐仑(21.941, 101.256)	DQ366935	GQ406263	—	HQ235789	GQ406323
	野鲮(<i>Labeo forskalii</i>)	Ethiopia	HQ235880	HQ235704	—	—	HQ235751
	云南野鲮(<i>Labeo yunnanensis</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	DQ366948	DQ845881	—	HQ235794	GQ406324
	长背鲃(<i>Labiobarbus lineatus</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	HQ235881	DQ845914	—	HQ235790	HQ235752
	舌唇鱼(<i>Lobocheilus melanotaenia</i>)	云南, 勐仑(21.941, 101.256)	DQ366940	DQ845902	—	—	DQ464990*
	纹唇鱼(<i>Osteochilus salsburyi</i>)	广西, 融安(25.230, 109.404)	DQ366971	DQ845892	—	HQ235804	GQ406325
	异华鲮(<i>Parasinilabeo assimilis</i>)	广西, 融安(25.230, 109.404)	DQ366992	DQ845887	—	HQ235798	GQ406326
	盆唇鱼(<i>Placocheilus cryptonemus</i>)	云南, 六库(25.850, 98.861)	HQ235882	DQ845915	—	—	HQ235753
	巴马拟缨鱼(<i>Pseudocrossocheilus bamaensis</i>)	广西, 天峨(25.005, 107.180)	DQ366993	DQ845895	—	HQ235799	GQ406327
	柳城拟缨鱼(<i>Pseudocrossocheilus liuchengensis</i>)	广西, 柳城(24.656, 109.251)	HQ235883	—	—	—	—
	泉水鱼(<i>Pseudogyrincheilus procheilus</i>)	四川, 南充(30.843, 106.117)	HQ235884	HQ235705	—	HQ235800	HQ235754
	卷口鱼(<i>Ptychidio jordani</i>)	广西, 天峨(25.005, 107.180)	DQ366974	DQ845893	—	HQ235838	GQ406328
	泸溪直口鲮(<i>Rectoris luxiensis</i>)	湖南, 桃源(28.909, 111.495)	DQ366977	—	—	—	—
	直口鲮(<i>Rectoris posehensis</i>)	广西, 都安(23.937, 108.112)	DQ366975	DQ845891	—	HQ235796	GQ406329
	唇鲮(<i>Semilabeo notabilis</i>)	广西, 金秀(24.139, 110.195)	DQ366983	DQ845886	—	HQ235801	GQ406330
	宽头华鲮(<i>Sinilabeo laticeps</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	HQ235885	DQ845904	—	HQ235779	HQ235755
	华鲮(<i>Sinilabeo rendahli</i>)	湖北, 宜都(30.384, 111.4570)	DQ366932	GQ406264	—	—	—
	华缨鱼(<i>Sinocrossocheilus guizhouensis</i>)	广西, 布柳河(24.914, 106.944)	HQ235886	—	—	HQ235777	HQ235756
鲤亚科 (Cyprininae)	鲫(<i>Carassius auratus</i>)	湖北, 武汉(30.598, 114.312)	DQ366941	A6953*	A6953*	A6953*	A6953*
	印度鲤(<i>Catlocarpio siamensis</i>)	水族馆	HQ235887	HQ235706	—	—	HQ235757
	鲤(<i>Cyprinus carpio</i>)	广西, 天峨(25.005, 107.180)	DQ366994	010*	010*	010*	010*
	三角鲤(<i>Cyprinus multitaeniata</i>)	广西, 桂平(23.400, 110.086)	DQ366939	DQ845845	—	HQ235776	HQ235758
	岩原鲤(<i>Procypris rabaudi</i>)	四川, 合江(28.818, 105.838)	DQ366969	DQ845846	HQ235974	HQ235809	GQ406317

王绪祯等: 鲤亚科多倍体物种独立起源及其与第三纪青藏高原隆升的关系

(续表1)

亚科	物种	采集地(纬度, 经度)	基因序列				
			<i>RAG2</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>Col</i>	<i>ND4</i>	<i>Cytb</i>
鲤亚科 (Barbinae)	岩原鲤(<i>Procypris rabaudi</i> 2)	湖北, 枝城(30.304, 111.507)	HQ235888	HQ235707	HQ235975	HQ235811	HQ235759
	北江光唇鱼(<i>Acrossocheilus beijiangensis</i>)	广西, 融安(25.230, 109.404)	DQ366967	DQ845869	—	HQ235847	HQ235760
	细身光唇鱼(<i>Acrossocheilus elongatus</i>)	广西, 融安(25.230, 109.404)	DQ366979	GQ406254	—	—	—
	半刺光唇鱼(<i>Acrossocheilus hemispinus</i>)	广西, 融安(25.230, 109.404)	DQ366986	DQ845867	—	HQ235848	GQ406312
	袋唇鱼(<i>Balantiocheilos melanopterus</i>)	水族馆	DQ366933	GQ406255	—	—	—
	高体鲃(<i>Barbonymus schwanenfdi</i>)	水族馆	DQ366961	DQ845906	—	HQ235805	AF180823*
	鲃(<i>Barbus barbus</i>)	France	DQ366990	DQ845879	HQ235999	—	A8965*
	<i>Barbus ethiopicus</i>	Ethiopia	HQ235889	HQ235708	HQ235947	HQ235781	AF180828*
	<i>Barbus intermedia</i>	Ethiopia	HQ235890	HQ235709	HQ235948	HQ235780	AF145948*
	<i>Barbus marequensis</i>	South Africa	HQ235891	—	HQ236007	—	AF180830*
	方口鲃(<i>Cosmochilus cardinalis</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	HQ235892	HQ235710	—	—	HQ235761
	瓣结鱼(<i>Foliter brevifilis brevifilis</i>)	广西, 天峨(25.005, 107.180)	HQ235893	HQ235711	HQ236008	HQ235846	F1161*
	裂峡鲃(<i>Hampala macrolepidota</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	DQ366965	DQ845863	HQ236005	—	DQ464974*
	高须鲃(<i>Hypsibarbus vernayi</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	DQ366987	DQ845870	—	HQ235785	GQ406313
	长臀鲃(<i>Mystacoleucus marginatus</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	HQ235894	HQ235712	—	HQ235806	HQ235762
	新光唇鱼(<i>Neolissochilus hexagonolepis</i>)	西藏, 墨脱(29.331, 95.340)	HQ235895	HQ235713	—	—	AY463516*
	四川白甲鱼(<i>Onychostoma angustistomata</i>)	四川, 攀枝花(26.588, 101.725)	HQ235896	HQ235714	—	—	HQ235763
	台湾白甲鱼(<i>Onychostoma barbatula</i>)	福建, 福安(27.094, 119.654)	DQ366964	—	—	—	—
	南方白甲鱼(<i>Onychostoma gerlachi</i>)	云南, 景洪(22.006, 100.778)	DQ366963	DQ845862	—	HQ235845	GQ406314
	细尾白甲鱼(<i>Onychostoma leptura</i>)	广西, 西林(24.496, 105.100)	DQ366955	GQ406257	—	—	HM142578*
	多鳞白甲鱼(<i>Onychostoma macrolepis</i>)	山东, 泰安(36.206, 117.095)	DQ366942	GQ406258	—	—	—
	珠江卵形白甲鱼(<i>Onychostoma ovalis rhomboides</i>)	广西, 天峨(25.005, 107.180)	DQ366988	—	—	HQ235826	—
	稀有白甲鱼(<i>Onychostoma rara</i>)	广西, 天峨(25.005, 107.180)	DQ366984	HQ235715	—	HQ235844	HQ235764
	白甲鱼(<i>Onychostoma sima</i>)	四川, 合江(28.818, 105.838)	DQ366991	DQ845861	—	HQ235812	HQ235765
	金沙鲈鲤(<i>Percocypris pingi pingi</i>)	四川, 合江(28.818, 105.838)	DQ366962	GQ406259	HQ235972	—	HQ235766
	花鲈鲤(<i>Percocypris pingi regani</i>)	云南, 富源(25.680, 104.261)	HQ235897	HQ235716	HQ235971	HQ235832	HQ235767
	后背鲈鲤(<i>Percocypris pingi retrodorslis</i>)	云南, 保山(25.118, 99.168)	HQ235898	HQ235717	HQ235973	HQ235833	HQ235768
	云南吻孔鲃(<i>Poropuntius huangchuchieni</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	DQ366952	HQ235718	—	HQ235807	HQ235769
	<i>Puntius conchorinus</i>	水族馆,	GQ406253	DQ845880	—	HQ235783	AY004751*
	斑尾小鲃(<i>Puntius sophore</i>)	海南, 乐东(18.659, 109.063)	HQ235899	—	—	—	EU241461*
	<i>Puntius tetrazoma varieties</i>	水族馆	DQ366938	EU287909*	—	HQ235782	EU287909*

(续表1)

亚科	物种	采集地(纬度, 经度)	基因序列				
			RAG2	16S rRNA	Col	ND4	Cytb
鲃亚科 (Barbinae)	少鳞舟齿鱼(<i>Scaphiodonichthys acanthopterus</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	HQ235900	HQ235719	HQ236002	HQ235842	HQ235770
	短吻鱼(<i>Sikukia stejnegeri</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	DQ366931	DQ845872	HQ236006	HQ235784	GQ406315
	抚仙金线鲃(<i>Sinocyclocheilus tingi</i>)	云南, 抚仙湖(24.542, 102.905)	DQ366978	DQ845866	—	AY854758*	AY854701*
	阳宗金线鲃(<i>Sinocyclocheilus yangzongensis</i>)	云南, 阳宗海(24.959, 103.012)	HQ235902	DQ845926	—	AY854783*	AY854726*
	宜山金线鲃(<i>Sinocyclocheilus yishanensis</i>)	广西, 宜山(24.491, 108.643)	HQ235903	DQ845908	—	—	A6445*
	光倒刺鲃(<i>Spinibarbus hollandi</i>)	安徽, 黄山(29.702, 118.322)	DQ366973	DQ845865	—	HQ235841	AY195628*
	中华倒刺鲃(<i>Spinibarbus sinensis</i>)	四川, 南充(30.843, 106.117)	HQ235904	DQ845864	—	HQ235808	HQ235771
	大鳞结鱼(<i>Tor douronensis</i>)	云南, 勐仑(21.941, 101.256)	DQ366945	DQ845877	—	HQ235786	DQ464986*
	桥街结鱼(<i>Tor qiaojiensis</i>)	云南, 盈江(24.711, 97.938)	DQ366970	DQ845873	—	—	GQ406316
	中国结鱼(<i>Tor sinensis</i>)	云南, 勐腊(21.696, 101.655)	DQ366936	DQ845876	—	HQ235788	F1164*
裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae)	骨唇黄河鱼(<i>Chuanchia labiosa</i>)	青海, 古德(36.046, 101.440)	HQ235905	HQ235720	HQ235978	HQ235860	HQ235772
	斑重唇鱼(<i>Diptychus maculatus</i>)	新疆, 伊犁(43.898, 81.303)	HQ235906	HQ235721	HQ235994	HQ235827	AY463515*
	花斑裸鲤(<i>Gymnocypris eckloni eckloni</i>)	青海, 黄河(33.770, 100.391)	DQ366950	DQ845853	HQ235982	HQ235856	AY463522*
	青海湖裸鲤(<i>Gymnocypris przewalskii przewalskii</i>)	青海, 青海湖(36.584, 100.502)	DQ366954	DQ845851	HQ235984	HQ235839	AY463523*
	新疆裸重唇鱼(<i>Gymnodiptychus dybowskii</i>)	新疆, 伊犁(43.898, 81.303)	DQ366956	DQ845859	HQ235997	HQ235828	AY463513*
	全裸裸重唇鱼(<i>Gymnodiptychus integrigynatus</i>)	云南, 明光(32.783, 117.996)	HQ235907	HQ235722	HQ235990	HQ235837	AY463527*
	厚唇裸重唇鱼(<i>Gymnodiptychus pachycheilus</i> 2)	青海, 黄河(33.770, 100.391)	HQ235908	—	HQ235996	HQ235862	—
	厚唇裸重唇鱼(<i>Gymnodiptychus pachycheilus</i>)	青海, 黄河(33.770, 100.391)	HQ235909	HQ235723	HQ235995	HQ235863	F1039*
	小头高原鱼(<i>Herzensteinia microcephalus</i>)	青海, 沱沱河(34.223, 92.451)	HQ235910	HQ235724	HQ235980	HQ235861	DQ309354*
	斯氏尖裸鲤(<i>Oxygymnocypris stewartii</i>)	西藏, 拉萨(29.665, 91.271)	HQ235911	DQ845918	HQ235988	HQ235836	DQ309358*
	扁咽齿鱼(<i>Platypharodon extremus</i>)	青海, 久治(33.435, 101.489)	HQ235912	HQ235725	HQ235985	HQ235858	F1023*
	中甸叶须鱼(<i>Ptychobarbus chungtienensis gezaensis</i>)	云南, 中甸(27.588, 99.798)	HQ235913	HQ235726	HQ235992	HQ235864	AY463506*
	双须叶须鱼(<i>Ptychobarbus dipogon</i>)	西藏, 拉萨(29.665, 91.271)	HQ235914	HQ235727	HQ235993	HQ235866	AY463510*
	裸腹叶须鱼(<i>Ptychobarbus kaznakovi</i>)	西藏, 左贡(29.812, 97.422)	HQ235915	DQ845916	HQ235991	HQ235865	AY463505*
	软刺裸裂尻鱼(<i>Schizopygopsis malacanthus</i>)	四川, 雅江(30.038, 101.021)	HQ235916	HQ235728	HQ235986	HQ235834	DQ309361*
	班公湖裸裂尻鱼(<i>Schizopygopsis stoliczkae bangongensis</i>)	西藏, 班公湖(33.670, 78.745)	HQ235917	—	HQ235981	HQ235824	—
	拉萨裸裂尻鱼(<i>S. younghusbandi younghusbandi</i>)	西藏, 波密(29.865, 95.774)	DQ366976	GQ406265	HQ235987	HQ235835	AY463501*
	黄河裸裂尻鱼(<i>Schizopygopsis pylzovi</i>)	青海, 黄河(33.770, 100.391)	HQ235918	DQ845856	HQ235979	HQ235859	DQ646897*
	银色裂腹鱼(<i>Schizothorax argentatus</i>)	新疆, 伊犁(43.898, 81.303)	HQ235919	DQ845898	—	—	AF180861*
	银色裂腹鱼(<i>Schizothorax argentatus</i> 2)	新疆, 伊犁(43.898, 81.303)	HQ235920	—	HQ235967	HQ235831	AY954269*

王绪祯等: 鲤亚科多倍体物种独立起源及其与第三纪青藏高原隆升的关系

(续表1)

亚科	物种	采集地(纬度, 经度)	基因序列				
			<i>RAG2</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>Col</i>	<i>ND4</i>	<i>Cytb</i>
裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae)	塔里木裂腹鱼(<i>Schizothorax biddulphi</i>)	新疆, 伊犁(43.898, 81.303)	HQ235921	—	HQ235966	HQ235829	F1464*
	细鳞裂腹鱼(<i>Schizothorax chongi</i>)	四川, 攀枝花(26.588, 101.725)	HQ235922	HQ235729	HQ235953	HQ235867	DQ126118*
	隐鳞裂腹鱼(<i>Schizothorax cryptolepis</i>)	四川, 雅安(30.021, 103.046)	HQ235923	HQ235730	HQ236010	HQ235815	HQ235773
	重口裂腹鱼(<i>Schizothorax davidi</i>)	四川, 雅安(30.021, 103.046)	HQ235924	HQ235731	HQ236009	HQ235814	AY954257*
	长丝裂腹鱼(<i>Schizothorax dolichonema</i>)	四川, 攀枝花(26.588, 101.725)	HQ235925	HQ235732	HQ235952	HQ235850	DQ126116*
	独龙裂腹鱼(<i>Schizothorax dulongensis</i>)	云南, 古永(25.371, 98.318)	DQ366985	DQ845849	HQ235968	HQ235821	AY954284*
	细身裂腹鱼(<i>Schizothorax elongatus</i>)	云南, 腾冲(25.380, 98.210)	HQ235926	HQ235733	HQ235970	HQ235820	—
	贡山裂腹鱼(<i>Schizothorax gongshanensis</i>)	云南, 石普(28.073, 98.582)	HQ235927	HQ235734	HQ235954	HQ235818	AY954279*
	昆明裂腹鱼(<i>Schizothorax grahami</i>)	云南, 黑龙潭(33.770, 100.391)	HQ235928	HQ235735	HQ235944	HQ235843	HQ235774
	中间裂腹鱼(<i>Schizothorax intermedia</i>)	新疆, 塔里木(41.061, 83.201)	HQ235929	HQ235736	HQ235965	HQ235825	AY954272*
	四川裂腹鱼(<i>Schizothorax kozlovi</i>)	四川, 巴塘(30.012, 99.117)	HQ235930	HQ235737	HQ235950	HQ235816	AY954256*
	厚唇裂腹鱼(<i>Schizothorax labrosus</i>)	西藏, 察隅(28.668, 97.473)	HQ235931	HQ235738	—	HQ235823	—
	澜沧裂腹鱼(<i>Schizothorax lantsangensis</i>)	云南, 瓦窑(24.924, 98.717)	HQ235932	DQ845911	HQ235956	HQ235853	DQ126126*
	光唇裂腹鱼(<i>Schizothorax lissolabius</i>)	云南, 瓦窑(24.924, 98.717)	HQ235933	HQ235739	HQ235958	HQ235817	EU158042*
	巨须裂腹鱼(<i>Schizothorax macropogon</i>)	西藏, 拉萨(29.665, 91.271)	HQ235934	HQ235740	HQ235961	HQ235868	AY463517*
	软刺裂腹鱼(<i>Schizothorax malacanthus</i>)	四川, 雅江(30.038, 101.021)	HQ235935	HQ235741	HQ235962	HQ235822	AY954277*
	南方裂腹鱼(<i>Schizothorax meridionalis</i>)	云南, 盈江(24.711, 97.938)	DQ366989	DQ845847	—	—	AY954287*
	墨脱裂腹鱼(<i>Schizothorax molesworthi</i>)	西藏, 察隅(28.668, 97.473)	DQ366946	DQ845848	HQ235963	HQ235855	DQ126130*
	吸口裂腹鱼(<i>Schizothorax myzostomus</i>)	云南, 古永(25.371, 98.318)	DQ366960	DQ845850	HQ235969	—	GQ406331
	怒江裂腹鱼(<i>Schizothorax nukiangensis</i>)	云南, 六库(25.850, 98.861)	HQ235936	HQ235742	HQ235955	HQ235852	DQ126125*
	异齿裂腹鱼(<i>Schizothorax oconnori</i>)	西藏, 拉萨(29.665, 91.271)	HQ235937	HQ235743	HQ235959	HQ235854	AY463519*
	齐口裂腹鱼(<i>Schizothorax prenanti</i>)	四川, 雅安(30.021, 103.046)	HQ235938	DQ845910	HQ235951	HQ235849	AY954259*
	伊犁裂腹鱼(<i>Schizothorax pseudaksaiensis</i>)	新疆, 伊犁(43.898, 81.303)	HQ235939	DQ845899	HQ235964	HQ235830	AF180827*
	拉萨裂腹鱼(<i>Schizothorax waltoni</i>)	西藏, 察隅(28.668, 97.473)	DQ366981	GQ406266	HQ235960	HQ235787	AY463518*
	短须裂腹鱼(<i>Schizothorax wangchiachii</i>)	四川, 攀枝花(26.588, 101.725)	HQ235940	HQ235744	HQ235943	HQ235813	AY954254*
	威宁裂腹鱼(<i>Schizothorax yunnanensis weiningensis</i>)S	云南, 罗平(24.891, 104.315)	HQ235941	HQ235745	—	HQ235851	HQ235775
	云南裂腹鱼(<i>Schizothorax yunnanensis yunnanensis</i>)	云南, 下关(32.109, 118.773)	HQ235942	HQ235746	HQ235957	HQ235819	AY954252*

图 1 鲤亚科内类群物种国内取样地点的分布地图

表 2 本研究中线粒体基因及核基因扩增引物

基因	引物名称	引物序列(5'-3')
16S	16Sp1F	CTTACACCGAGAARACATC
	16Sp1R	CTTAAGCTCCAAAGGGTC
ND4	L11264	ACGGGACTGAGCGATTAC
	H12320	AATCATTGTAGTCCTCGGGCGAG
COI	L5257	TCWTAGTTAACAGCTAAGC
	COI-H6855	RAAGTGRCAGAGYGGTTATG
Cytb	L14724	GACTTGAAAAACCACCGTTG
	H15915	CTCCGATCTCCGATTACAAGAC
Rag2	RAG2-f2 ^a	ArACGCTCmTGTCCmACTGG
	RAG2-R6 ^a	TGrTCCArGCAGAAGTACTTG

性、30 s的45℃~56℃退火(退火温度视具体的扩增基因而定)和90 s的72℃延伸, 经过35个循环后, 最后是72℃延伸8 min. 扩增的DNA通过0.8%低熔点琼脂糖凝胶电泳加以分离、回收和纯化, 回收和纯化过程使

用了BioStar玻璃奶DNA纯化试剂盒并参照厂家提供的用户指南进行. 经过纯化的PCR产物最终用于核基因和线粒体基因核苷酸序列的测定. 所有基因的DNA序列都已经上传至GenBank(表1).

对于线粒体 *16S rRNA* 基因, 经过 CLUSTAL X 程序^[39]的最初序列比对后, 还参考了现有的鲤科鱼类线粒体 *16S rRNA* 基因二级结构模型^[40-42], 基于模型中的二级结构单元和保守序列对序列进行进一步检视和手动排列. 对于蛋白质编码基因而言, 先使用 CLUSTAL X 程序来进行序列多重比对, 然后利用 MacClade 4.0^[43]按照氨基酸序列仔细进行手工校正.

1.3 系统发育分析和染色体倍性水平进化

鲤亚科鱼类系统发育分析使用了核基因和线粒体基因 DNA 序列的联合数据. 最大简约性(maximum parsimony, MP)的分析利用 PAUP*4.0b10 程序进行. 分析过程中, 采用了同等权重的简约性树启发搜索(heuristic search)过程、树二分法重接(tree bisection-reconnection, TBR)的分支交换策略, 以及 1000 次的随机序列附加重复. 节点的可靠性经由 1000 次非参数自展分析^[44]加以评估, 节点衰减指数则使用 Autodecay 程序^[45]生成. 使用了 RaxML 程序^[46]进行了最大似然分析(maximum likelihood, ML). 分析中, 通过 2000 次搜索来寻找似然值最高的 ML 拓扑结构, 并运用 500 次重复的自展分析来验证节点的可靠性. ML 分析中, 核苷酸序列的进化模型为 GTRGAMMAIG.

贝叶斯分析所使用的程序为 MrBayes 3.1.2^[47]. 分析中联合 DNA 序列的最适进化模型使用了 Modeltest 3.07^[48]程序进行确定. 马尔可夫蒙特卡罗链式反应(Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo, MCMCMC)运行了 20000000 代, 每 1000 代进行 1 次取样. 为了鉴定和舍弃达到平稳状态之前的运行代数, 采用 Tracer (version 1.4) 程序将似然值对数、树长和其他模型参数值对应运行代数作图, 以此来确定老化样本(burn-in samples)的代数. 分析表明, 虽然在最初的 2000000 代链通常开始聚合, 还是采取了更加保守的做法将最初的 10000 个样本作为老化样本舍弃, 而将剩余的 10000 个样本用作后续的分析. 贝叶斯树拓扑结构为 50% 多数一致性树, 其节点的可靠性采用后验概率(posterior probability, PP)加以评估.

为了追溯鲤亚科鱼类染色体倍性水平的进化过程, 将鱼类染色体倍性水平作为性状状态标记到系统发育树中. 染色体组型的祖先状态重建采用了 Mesquite 程序^[49], 采用了基于分支树追溯性状以及简约性祖先状态重建方法.

1.4 分歧时间估算

基于分子钟约束和缺乏分子钟约束分别得到的 ML 树的似然值, 利用似然速率测试来评估 ML 树中谱系间进化速率的异质性. 在谱系间进化速率不一致的情况下, 采用 r8s 程序^[50]中的罚分似然值法(penalized likelihood, PL)^[51]估计物种的分化时间. PL 法能对整个系统发育中的碱基替换速率进行连续的自动校正来放宽严格分子钟假设, 并通过交叉验证程序对速率变动进行调整.

用于分歧时间估算的拓扑结构是分析所得的贝叶斯树. 运用 PL 法估算时间时, 采用了平截牛顿(truncated Newton, TN)算法和附加罚分函数来优化目标函数. 同时选用了化石记录来校正时间度量分支树和标定内部节点. 最早的类似野鲮和类似鲃的化石鱼类标本出现于中新世早期^[52,53], 因此赋予鲤亚科分支基部节点一个最小年龄约束(minimum age constraint)值 1600 万年前. 野鲮属鱼类的化石种类出现于中新世晚期^[53,54], 并以此作为野鲮分支根部节点的最小年龄约束. 与之类似, 鲃分支根部节点的最小年龄约束也为中新世晚期出现的鲃属鱼类化石标本^[53,55]. 由于以前的分子钟估算研究表明鲤亚科和雅罗鱼亚科的分化发生于渐新世中期, 所以将鲤亚科鱼类的起源时间设定为 2770 万年前. 此外, 采用了分支长度自展分析方法(lengthy bootstrap analysis)来确定估算时间的 95% 置信度区间. 利用 Phylip 3.5c^[56]程序中的 SEQBOOT 命令, 对联合数据矩阵进行 100 次自展取样得到虚拟重复序列. 保持树的拓扑结构不变, 对每一虚拟重复序列分别采用 ML 法并依据 Modeltest^[57]所确定的最适进化模型进行节点分支长度(用于年龄估算)的估算. 对每一节点而言, 联合数据矩阵的自展分析共获得了 100 个年龄值, 进而根据这些数值的分布来计算节点年龄的 95% 置信度区间.

1.5 物种分化速率的时间变化

采用 R 程序包中的 LASER 程序^[58]来阐述鲤亚科物种分化速率假说, 即在鲤亚科系统发育中物种分化速率什么时候和什么地方发生过变化? 是如何变化? 通过 PL 分析, 得到了鲤亚科带有时间度量的分支图, 进一步去除全部非鲤亚科分类单元以及重复物种后, 得到了内类群的分支时间图并用于物种分化速率转变

的测试.

测试基于出生-死亡似然分析方法(birth-death likelihood analysis, BDL)^[59]. 对分化速率恒定零假设的检验采用了Akaike信息准则(Akaike information criterion, AIC). 本研究中, LASER程序中已经包含了一组分化模型, 如纯出生(pure birth)、出生-死亡(birth-death)、指数密度依赖性(exponential density-dependent, DDX)、对数密度依赖性(logistic density-dependent, DDL)、yule2rate和yule3rate, 分别使用AIC准则进行估算. 对于可能的速率转变节点, 只考虑了观察到的分支时间值. 而所观察到的AIC参数变化的显著性则使用LASER程序中yuleSim函数进行评估. 该函数会在速率恒定(纯出生)模型的零假设前提下, 保持分类单元数目不变并进行1000次系统发育模拟.

1.6 物种分化速率的转变

采用基于树拓扑结构的SymmeTREE程序^[60], 来确定整个鲤亚科中是否存在物种分化速率的转变. 基于拓扑结构的方法是将树拓扑结构中观察到的物种多样性分布同由Yule模型(即基于相同速率的马可夫随机分支过程原理)产生的分布进行比较. 运用SymmeTREE程序, 对进化树进行了6个差异分化速率统计测试: 分别为 M_R , M_{II} 和 M_{Σ} , M_{II*} 和 $M_{\Sigma*}$ 以及 I_C , 这6项统计对分支树中不同深度节点的分化速率变化的敏感程度是不一样的^[60-62].

为了在鲤亚科中检测和定位出显著的快速分化速率转变, 采用了4种不同的统计方法, 两种基于似然比的统计方法(Δ_1 和 Δ_2)、斯洛文斯基-盖伊统计^[60](SymmeTREE 1.1)以及相对支系发生统计^[63](即软件END-EPI 1.0中的相对支系发生测试).

1.7 谱系时间变迁的半对数坐标曲线

利用GENIE 3.0软件, 在PL分支时间图的鲤亚科内类群中剔除重复物种后构建了谱系时间变迁(lineage through time, LTT)曲线图. 为了评估分析中分类单元取样的不完整对经验LTT曲线斜率的影响, 利用软件Phylogen 1.1在0.5的死亡-出生比(death-birth ratio)和1332现生分类单元的前提下构建了1000个系统发育树, 然后每一棵树都随机剔除多余的物种最终只保留123个分类单元. 上述1000个包含了123个分类单元的

抽样树用于构建平均LTT曲线及其95%置信度区间, 然后和经验LTT曲线进行比较.

2 结果

2.1 系统发育分析

基于合并的DNA序列矩阵的最大简约(MP)、最大似然(ML)和贝叶斯分析得到了高分辨、稳固支持的系统分支树, 分支树的拓扑结果基本一致. 正如所料, 鲤亚科的单系性得到了证实, MP和ML分析的节点自展支持率为99%~100%, 贝叶斯后验概率为1.0. 鲤亚科中, 野鲮鱼类的单系性也得到了自展支持率($\geq 94\%$)和后验概率(1.0)的强力支持, 然而剩余鲤亚科鱼类(包括鲤类、鲃类和裂腹鱼类)分支的单系性的后验概率则为0.94, 而ML和MP自展支持率也分别只有77%和58%. 至于青藏高原特有的多倍体鲤科鱼类, 研究揭示了两个强力支持的分支(分别标记为SCH和SPE, 图2), 分支的节点自展支持率为99%~100%, 而后验概率为1.0. 分支SPE和少鳞舟齿鱼(*Scaphiodonichthys acanthopterus*)+鲃(*Barbus barbus*)互为姐妹群, 分支SCH则构成了鲃鲤属(*Percocypris*)的姐妹群, 这些节点的自展支持率和后验概率都很高.

2.2 倍性水平的性状状态重建

本研究基于贝叶斯分析得到的系统分支树用于鲤科鱼类染色体倍性水平状态的重建. 核型状态重建结果(图2)表明, 鲤科(节点CYD)以及鲤亚科(节点CYN)鱼类染色体核型的祖先状态均为二倍体(diploid), 但是在鲃系群(节点BAR)中染色体核型进行了第一次转变, 由二倍体变成了四倍体(tetraploid). 鲃系群(节点BAR)中, 至少发生了3次由四倍体向更高倍性的独立转变和3次由四倍体向二倍体的逆转变(图2).

2.3 分子时间估算

基于联合序列数据的分子钟模型和非分子钟模型得到的似然值进行了似然比检测, 结果($\chi^2=2279.686$, $df=148$, $P<0.05$)明显拒绝了分子钟的假设. 因此, 研究采取了松散分子钟方法来估算物种分歧时间, 用于分歧时间估算的分支树是由贝叶斯分析得到的分支树. 估算的分子时间表明(图2和表3), 鲤亚科鱼类大约于

图2 鲤亚科鱼类的分支时间图

分歧时间估算的拓扑结构基于贝叶斯树, 树中获得 $\geq 95\%$ 后验概率支持的节点都用星号(*). 节点附近的数字代表的是估算的分歧时间(百万年前, Mya). 关键节点的缩写符号以及它们的平均分歧时间和95%置信度区间参考表3. 分析中物种的染色体组型以及重建的染色体倍性水平的祖先状态分别用彩色条块和圆点表示^[16].

两千三百万年前开始分化, 其95%置信度区间为23.16~24.33百万年前(MyA)(节点CYN). 而鲤亚科内部, 野鲮鱼类分支(节点LAB)的物种分化约为21.65 Mya(95%置信度区间为20.67~22.50 Mya), 剩余鱼类构成的鲃分支(节点BAR)的物种大约从23.21 Mya开始分化, 其95%置信度区间为22.49~24.09 Mya.

2.4 谱系分化

整体而言, 由SymmeTREE程序基于6种树平衡统计算法分别得到的 P 值依次为: $I_C=0.009718$, $M_{II^*}=0.00095$, $M_{II}=0.00645$, $M_{\Sigma^*}=0.004094$, $M_{\Sigma}=0.083688$, $B_1=0.37156$, P 值从IC到B1依次增加. 6种树平衡统计法对分支树中不同深度节点的敏感程度是不一样的, 在上述从IC到B1排序中, 它们依次对应最浅加点到最深节点. 上述结果表明, 鲤亚科谱系分化速率的变化显著集中于分支树中相对较浅的节点. 德尔塔统计(Δ_1 和 Δ_2)^[62]以及Slowinski-Guyer统计^[64]则有助于在分支树上定位物种分化速率改变的单个位点. 此外, 相对分支进化测试(the relative cladogenesis test)在15个分支中检测出快速分化速率变化. 分化速率变化位点全部位于分支树中的鲃分支内(图2和表3), 而分支年龄上这些位点都局限于中新世(Miocene)、上新世(Pliocene)和早更新世(Pleistocene)(23.0~0.9 Mya), 除了分支1~3/6和7之外其余都发生在距今1200万年前之内(即中新世晚期至更新世). 上述的分化速率格局相对来讲是可靠的, 因为基于由贝叶斯树进行100次随机抽样得到的分支树同样检测出了分化速率改变位点, 它们在分支树中的年龄和位置和上述的位点基本一致.

LTT半对数坐标曲线显示出与模拟曲线的显著偏离, 模拟曲线是基于出生-死亡模型(birth-death model)获得的, 该模型考虑到了不完全分类单元取样以及恒定的偏移速率. 本研究获得的经验LTT曲线模型证实了物种分化速率在中新世中期发生过下降, 而在更新

表 3 鲤亚科系统发育(图2)中主要节点的分歧时间及95%置信度区间

分支	节点	时间估算(百万年前)	
		$\bar{x} \pm SD$	95%置信度
鲤科	CYD	38.22±0.92	33.84~38.42
鲤亚科	CYN	23.96±0.31	23.16~24.33
鲃系, 除野鲮鱼类以外其他鲤亚科鱼类	BAR	23.49±0.33	22.49~24.09
野鲮鱼类	LAB	21.57±0.44	20.67~22.50
裂腹鱼属(<i>Schizothorax</i>)	SCH	9.23±0.35	8.96~9.83
裂腹鱼类(裂腹鱼属除外)	SPE	10.70±0.54	9.64~11.78

世中期又表现出上升趋势。出生-死亡似然(birth-death likelihood, BDL)分析选择pureBirth模型作为最佳的速率恒定模型, 并以此作为零假设(null hypothesis)来验证速率变化模型假设。BDL分析结果拒绝了速率恒定的零假设, 并选择了yule3rate作为最佳的速率变化模型($\Delta AIC_{\text{c}}=14.62078$, $P<0.05$)。BDL分析结果也确认了由经验LTT曲线偏离带有95%置信度区间模拟曲线得到的证据。根据yule3rate模型的假设, 鲤亚科鱼类物种分化的演化过程中物种的净分化速率经历了两次急剧变化, 分别发生在1600万年前和91万年前。净分化速率在1600万年前时由0.28分化事件/百万年降低至0.09分化事件/百万年, 而在91万年前时分化速率又增加至0.17分化事件/百万年。

3 讨论

本研究中, 系统发育分析结果为探讨青藏高原对鲤亚科鱼类生物地理学格局和倍性水平进化的影响提供了分子证据。总体说来, 本研究的分化时间估算表明, 多倍体鲤科鱼类(包括青藏高原代表性鲤科鱼类)的物种分化在地质时间区间上和早中新世以后青藏高原的重要隆升阶段相当一致^[19,21,65~68]。

3.1 鲤亚科生物地理学格局和倍性水平

本研究不但为鲤亚科的单系性提供了有力支持, 也为野鲮鱼类和包括鲤类、鲃类、裂腹鱼类在内的分支间的姐妹群关系提供了重要证据。

得以强力重建的野鲮鱼类分支LAB全部由二倍体物种组成, 这些二倍体种类大约起源于渐新世晚期(约2400万年前, 图2)。二倍体野鲮鱼类局限分布于温暖且海拔相对较低的栖息环境。它们在非洲和亚洲有广泛但不连续的分布, 主要分布于东南亚地区。通常

认为, 野鲮鱼类特殊的激流环境适应性和其发达且形态多样的口唇及其附属结构形态密切相关, 发达的口唇结构能够为野鲮鱼类刮食藻类提供巨大的便利。

鲤亚科中, 分支BAR(图2)的倍性水平则要复杂得多, 包括了几种不同的染色体倍性水平。该分支主要由多倍体鲤科鱼类组成, 但至少也包含了两个二倍体物种分支(分支C和F)。多倍体鲤科鱼类的物种发生大约开始于2350万年前, 紧随分支LAB和分支BAR的分离时间, 与青藏高原其他特有类群的起源基本同时发生^[69,70]。分支BAR内部的物种分化是首先产生了一个包含四倍体和六倍体物种在内的多倍体分支A(图2)。分支A中四倍体和六倍体物种在地理分布上相距非常遥远, 四倍体种类分布在南亚和东南亚地区而六倍体物种则广泛分布于非洲地区。本研究中, 四倍体分支B和二倍体分支C互为姐妹群关系(图2)。分支B由四倍体的金线鲃(*Sinocyclocheilus*)、鲤(*Cyprinus*)、鲫(*Carassius*)和印度鲤(*Catlocarpio*)等组成, 而分支C是一群二倍体的小型鲤科鱼类。这两个分支鱼类在地理分布上相互重叠, 从中国南部到东南亚地区的美功(MaeKlong)、湄公河(Mekong)和湄南河(Chao Phraya)流域都有分布。

形态学上, 裂腹鱼类曾被视为一个亚科, 包含了原始等级、特化等级和高度特化等级3个类群^[71]。然而, 近些年来的分子生物学证据都不支持裂腹鱼类的这种基于形态学特征的类群划分^[72~74]。本研究也揭示这些青藏高原特有的多倍体鲤科鱼类实际上包含了两个独立起源的类群, 它们或许是相互独立地扩散至青藏高原地区并适应了高海拔环境^[73]。裂腹鱼类中的一个分支SCH包含了形态上的原始等级类群, 而另一分支SPE则包含了特化和高度特化等级类群^[71]。青藏高原特有分支SCH和SPE的物种起源时间都发生在中

新世早期, 而现生物种的分化基本在中新世晚期至更新世之间。

裂腹鱼类的分支SPE基本上是由四倍体种类组成, 它在系统位置上和另一个由四倍体鲃(*Barbus barbus*)和二倍体舟齿鱼(*Scaphiodonichthys*)组成的分支D关系紧密(图2)。推算的分支SPE和分支D间的分离时间为1930万年前, 其中的裂腹鱼类的物种分化从中新世晚期开始。地理分布上, 分支SPE围绕塔克拉玛干沙漠(Takla Makan)形成了一个半圆形的分布区域, 包括了天山(Tien Shan)、兴都库什山(Hindu Kush)和喜马拉雅山(Himalaya)^[10]; 鲃虽然在欧洲广泛分布但东部以乌拉尔山(Urals)为界, 南部以天山为界; 舟齿鱼则局限分布于湄公河和湄南河流域。分支SPE、鲃和舟齿鱼系统位置上的紧密关系表明它们的最近共同祖先或许曾在欧亚大陆广泛分布。

裂腹鱼类的另一分支SCH包含了裂腹鱼属(*Schizothorax*)物种, 基本上由四倍体和六倍体物种组成, 分布于环塔克拉玛干沙漠沙漠的天山、兴都库什山以及喜马拉雅山地区^[10]。系统分支树中, 裂腹鱼属和分布于金沙江、萨尔温江和湄公河流域的四倍体鲃鲤属(*Percocypris*, 分支G, 图2)构成姐妹群关系。二倍体白甲鱼属(*Onychostoma*)和光唇鱼属(*Acrossocheilus*)共同构成的分支F和四倍体的倒刺鲃属(*Spinibarbus*, 分支E)进一步形成单系群, 它们共同作为裂腹鱼属+鲃鲤属的姐妹群。白甲鱼、光唇鱼和倒刺鲃主要分布于老挝、越南和中国东南地区, 它们和鲃鲤在东南亚的分布区有着较大的重叠。据估算, 裂腹鱼属和鲃鲤属的共同起源及二者间的相互分化都发生在中新世早期(时间分别为1970万年前和1600万年前, 图2), 而只有现生的裂腹鱼属物种局限分布于青藏高原及其邻近区域的高海拔水系中。基于本研究的系统发育和生物地理学格局, 可以推测裂腹鱼属的物种或许是一个曾经广泛分布于东南亚地区的四倍体祖先的残留类群, 在第三纪晚期的青藏高原隆升过程中, 它们的分布趋于破碎化并只在高海拔地区幸存下来。

3.2 鲤亚科物种倍性水平的进化

本研究中, 不同的倍性水平出现在鲤亚科的多个分支中, 使得我们有机会来追溯多倍体鲤科鱼类的进化历史。系统发育分析表明, 鲤亚科是二倍体起源

的, 而其中的鲃分支(分支BAR, 图2)则为四倍体起源。在鲃分支中, 四倍体物种通常出现在如下一些属中, 如鲃属(*Barbus*)、鲫属(*Carassius*)、鲤属(*Cyprinus*)、新光唇鱼属(*Neolissocheilus*)、鲃鲤属(*Percocypris*)、拟鲃属(*Pseudobarbus*)、裂腹鱼属、金线鲃属(*Sinocyclocheilus*)、倒刺鲃属(*Spinibarbus*)和结鱼属(*Tor*)等^[16]。鲤科鱼类四倍体物种可由二倍体祖先经同源四倍化(*autotetraploidization*)事件加倍而成, 即精子和卵细胞各包含一套互补的二倍体染色体^[75]。对鲤科鱼类而言, 多倍体物种的有利特征可以总结为体型大、生长速率快、生命周期长和环境适应能力强^[76,77]。非洲分布的鲃属鱼类(分支A, 图2)就是一个例证, 人们发现这些物种通常是个体相对较大、寿命长且具有良好的生态适应性^[75]。尽管多倍体物种在进化中具有很多优势, 但是由四倍体通过减少染色体数目变成二倍体的核型逆向转化在鲃分支中也有发生。

多倍体化事件在裂腹鱼类的进化过程中显然发生了重要的作用, 这是因为这些青藏高原特有的鲤科鱼类都是多倍体物种。迄今为止, 研究发现所有做过核型分析的裂腹鱼类物种都有大量的染色体数目, 包括了四倍体和六倍体, 甚至高倍体 $2n=446$ 。倍性祖先状态重建揭示裂腹鱼类的两个分支SCH和SPE都是四倍体起源, 但裂腹鱼属中至少发生了两次独立的核型转化事件导致了六倍体物种的产生。除了裂腹鱼属的四倍体物种外, 还有六倍体物种也引起了研究者对青藏高原特有鲤科鱼类演化及其生存研究的巨大兴趣。裂腹鱼属中六倍体物种的起源机制目前虽然尚不清楚, 但通常认为异源六倍体性(*allohexaploidy*)是这些六倍体物种形成的最可信途径^[75]。多倍体在鱼类进化过程中发挥了非常重要的作用, 它通过提供多余的等位基因位点帮助鱼类去规避自然选择压力^[78]和更加容易地累积突变^[79]。多倍体化通常被认为是开启和驱动裂腹鱼类物种分化的关键因素。因此, 可以推测这些多倍体化的裂腹鱼属鱼类之所以能够成功占据青藏高原隆升所形成的高海拔栖息地, 或许从低温和低氧的选择性适应方面可以加以解释。其中的例证之一就是, 试验中通过对受精卵进行温度刺激(即急剧降温)而获得四倍体是切实可行的^[80]。另外, 在青藏高原分布的厚唇裸重唇鱼(*Gymnoditychus pachycheilus*)中研究发现, 发生快速进化和正向选择的基因功能上和能量代

图3 鲤亚科鱼类物种分化的时间和速率

A: 鲤亚科内类群的PL分支时间图。时间图的拓扑结构基于贝叶斯树, 去掉了树中除鲤亚科以外的其他分类单元和重复物种。由4种统计方法检测出的重要分化速率转变节点分别使用阿拉伯数字和颜色进行标记: 转变节点1(红色)得到了似然比统计法 Δ_1 和 Δ_2 以及斯洛夫斯基-盖伊统计的支持, 而其余的转变节点(2~16, 蓝色)则得到了相对分支发生统计法支持。蓝色方形条块所在的分枝表示了包含多倍体鲤亚科鱼类的分支, 而白色表示的是包含了二倍体的分支。分支时间图右侧用3个鱼类标本图作为各个聚类分支的代表性示例; B: 鲤亚科鱼类LTT半对数曲线图(蓝色), 叠加的是新生代晚期青藏高原的海拔高度的近似推测值(粉红色虚线, 改编自^[17])、基于恒定0.5死亡-出生速率的模拟LTT曲线图(红色)及其95%置信度区间(绿色)。经验LTT曲线图中的上升或下转反映的是物种分化速率的变化。物种分化速率下降的延伸区间采用了阴影区域来突出显示

谢和低氧适应密切相关^[81].

3.3 裂腹鱼类的物种分化格局

时间尺度上的BDL分析和LTT曲线图均表明, 大约在2300万年前到1600万年前期间, 鲤科鱼类发生了一次中新世早期的物种适应性进化(变化点1, 2和6, 图3), 其中变化点2和6都与青藏高原特有鲤科鱼类的祖先类群分化相关. 上述中新世早期的鲤科鱼类适应性进化与渐新世晚期至中新世早期的青藏高原隆升密切相关(约2500~1700万年前), 这一阶段以青藏高原南部及喜马拉雅山的隆升为重要标志, 并且青藏高原-喜马拉雅山区域的海拔高度达到了2000 m^[67]. 此外, 越来越多的证据表明青藏高原南部地区的快速隆升从2000万年前开始, 并在2000~1500万年前经历了一次快速隆升的峰值期^[19,82,83]. 晚渐新世-早中新世(约2500~1700万年前)的青藏高原隆升带来了巨大的环境变化, 其中包括青藏高原南部的热带、亚热带雨林被半湿润、半干旱森林所取代. 环境变化或许是该地区气候由渐新世温暖干燥的气候向中新世早期相对寒冷湿润的气候变化的结果, 而且气候随后继续变冷和变干^[84]. 渐新世-中新世时期(2400~1900万年前)青藏高原特有鳊鲴鱼类的起源与高原隆升之间的密切关系也有助于解释如下假说, 即喜马拉雅山脉中新世早期的隆升带来的环境和气候的异质性或许促进了高原区系的物种形成^[70,85]. 因此, 推测中新世早期裂腹鱼类祖先类群的物种分化也符合上述假说, 即早中新世时期的适应性进化是裂腹鱼类对喜马拉雅山和青藏高原南部隆升所造成的环境及栖息地改变的响应.

本研究显示, 鲤亚科鱼类的物种分化速率在中新世中期到更新世早期(约1600~100万年前)期间发生下降, 这表明物种的产生速率减少和/或者灭绝速率增加. 上述时段同晚第三纪时期青藏高原隆升的重要阶段基本上相一致. 紧密嵌套的分化速率改变节点(节点4, 5和7~15, 图3)发生于中新世晚期到更新世早期(约1200~100万年前), 并且只发生在青藏高原特有的多倍体化鲤科鱼类的两个谱系中. 其中节点7~15全部发生在全部由裂腹鱼属(分支SCH)鱼类构成的谱系中, 而节点4和5发生的谱系则由除裂腹鱼属以外的其他高度特化类群组成(分支SPE). 尽管中新世早期青藏高原南部地区已经历了其快速隆升的主要阶段并且其海拔高度在过去的1500万年间可能维持不变^[86,87], 但

最近1500万年内青藏高原东部和北部地区却发生过进一步的显著隆升(及其间发生的可能变形)^[88,89]. 地质学证据表明, 青藏高原东部的急速隆升可能从1500万年前才开始发生, 因为中新世早期到中期期间(约2000~1500万年前)太平洋海沟的快速迁徙运动曾一度中断, 这或许促进了青藏高原东部地区的地壳加厚和表面的急剧隆升^[90]. 此外, 青藏高原的地壳构造体系由南北方向聚合向东西方向扩展的转变大约是从1400万年前开始的^[91], 这也是第三纪晚期青藏高原隆升的重要阶段. 尽管对青藏高原首先达到它目前海拔高度的时间尚存在争议^[17,19,21,65,92], 但第三纪晚期确实见证了青藏高原达到了其最大的海拔高度. 因此, 青藏高原第三纪晚期(约从1500万年前开始)的地壳构造过程必然与全球气候变化密切联系, 甚至在塑造东亚地区气候和环境变化的过程中也发挥着重要作用. 由青藏高原隆升引起的晚第三纪气候和环境的变化包括了干旱和湿润环境间的剧烈振荡^[93]、植被的改变^[94,95]、古流域系统开放与关闭^[93]以及亚洲季风的出现和演化^[65,96]. 据此推测, 约1600万年前到100万年前期间, 青藏高原剧烈构造过程所造成的生态系统改变或导致了青藏高原特有鲤科鱼类退守高海拔地区, 而这些裂腹鱼类在新栖息地环境中能成功存活并建立种群, 或许是因为在分布地扩展过程中它们的多倍体化情形发挥出了优势. 从1600万年前开始的晚第三纪分化速率转变时间上同青藏高原特有多倍体鲤科鱼类(分支SCH和SPE, 图3)的现生物种分化非常一致, 或许表明中新世早期由祖先类群的适应性辐射分化形成的相对古老的物种多样性得到了保存.

在LTT曲线图中(图3), 可以观察到物种分化速率从91万年前开始轻微地增加. 上述速率增加的时间又同青藏高原连续的昆仑-黄河运动(110~60万年前)以及共和运动(15万年前)密切相关, 而青藏高原通过上述两个运动才抬升到目前的海拔高度^[17]. 裂腹鱼属(分支SCH)内部的鱼类物种分化事件为91万年前至今的鲤亚科分化速率增加做出了更多的贡献. 因此, 最近的物种分化受到了青藏高原及其周边环境的第四纪(quaternary)气候和地壳构造事件的影响, 包括亚洲季风的增强、青藏高原冰冻圈的形成和大型高原冰川的发育. 从早更新世末期到现在, 青藏高原相对稳定的环境和由冰川运动引起的气候波动或许促进了多倍体裂腹鱼类物种形成的积累.

本研究构建了鲤亚科中青藏高原特有的多倍体化鲤科鱼类的物种分化历史. 研究发现, 青藏高原特有的裂腹鱼类现生物种的分化可能发生得相对较早(中中新世早期), 而最近的物种分化则是对第四纪气候和地壳构造事件的响应, 如更新世时期的高原隆升和冰川运动. 通常而言, 可变物种分化速率的时间模型似乎符合摇篮模型(*cradle models*, 即最近且急速的物种分化)或博物馆模型(*museum models*, 即物种多样性的缓慢积累和/或古老多样性的保存), 或者二者兼有. 因此, 由本研究结果可以得出如下假说, 目前裂

腹鱼类物种多样性的成因或许可归结为是相对古老的物种辐射分化和近期急速的物种分化的共同作用. 在第四纪裂腹鱼属多样性的形成过程中, 裂腹鱼类物种的多倍体核型或许发挥了巨大作用. 此外, 相关假说通常认为与青藏高原密切相关的、重要的地壳构造、气候和生物事件都可能对适当的地理/分类(比如青藏高原及其周边地区或者特异性的代表种类)类群的物种分化及分化时间(如晚第三纪和第四纪)产生巨大影响, 而青藏高原裂腹鱼类可以作为验证上述假说的一个良好模型.

参考文献

- 1 Zhang J W, Nie Z L, Sun H. Cytological study on the genus *Synclathium* (Asteraceae-Lactuceae), an endemic taxon to alpine scree of the Sino-Himalayas. *J Syst Evol*, 2009, 47: 226–230
- 2 Nie Z L, Wen J, Gu Z J, et al. Polyploidy in the flora of the Hengduan Mountains hotspot, southwestern China. *Ann Mo Bot Gard*, 2005, 92: 275–306
- 3 Liu J Q. Uniformity of karyotypes in *Ligularia* (Asteraceae: Senecioneae), a highly diversified genus of the eastern Qinghai-Tibet Plateau highlands and adjacent areas. *Botan J Linn Soc*, 2004, 144: 329–342
- 4 Tang H, Lihua M, Shiqing A, et al. Origin of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Milula* (Liliaceae): further insights from karyological comparisons with *Allium*. *Caryologia*, 2005, 58: 320–331
- 5 Leggatt R A, Iwama G K. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev Fish Biol Fisheries*, 2003, 13: 237–246
- 6 余先觉, 周墩, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社, 1989
- 7 Yu X, Zhou T, Li K, et al. On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China. *Geneta*, 1987, 72: 225–235
- 8 乐佩琦. 中国动物志, 硬骨鱼纲, 鲤形目(下卷). 北京: 科学出版社, 2000. 1–661
- 9 Nelson J S. *Fishes of the World*. 4th. New York: John Wiley and Sons Inc., 2006
- 10 Howes G J. Systematics and biogeography: an overview. In: Winfield I J, Nelson J S, eds. *Cyprinid Fishes: Systematics, Biology and Exploitation*. London: Chapman and Hall, 1991. 1–33
- 11 陈湘舜, 乐佩琦, 林人端. 鲤科的科下类群及其宗系发生关系. *动物分类学报*, 1984, 9: 424–440
- 12 陈宜瑜. 中国动物志, 硬骨鱼类, 鲤形目(中卷). 北京: 科学出版社, 1998. 1–525
- 13 Rainboth W J. Cyprinid fishes of Southeast Asia. In: Winfield I J, Nelson J S, eds. *Cyprinid Fishes: Systematics, Biology and Exploitation*. London: Chapman and Hall, 1991. 156–210
- 14 Skelton P H, Tweddle D, Jackson P B N. Cyprinids of Africa. In: Winfield I J, Nelson J S, eds. *Cyprinid Fishes: Systematics, Biology and Exploitation*. London: Chapman and Hall, 1991. 211–239
- 15 Buth D G, Dowling T E, Gold J R. Molecular and cytological investigations. In: Winfield I J, Nelson J S, eds. *Cyprinid Fishes: Systematics, Biology and Exploitation*. London: Chapman and Hall, 1991. 83–126
- 16 Arai R. *Fish Karyotypes: A Check List*. Tokyo: Springer, 2011. 1–340
- 17 Li J, Fang X. Uplift of the Tibetan Plateau and environmental changes. *Chin Sci Bull*, 1999, 44: 2117–2124
- 18 Tapponnier P, Zhiqin X, Roger F, et al. Oblique stepwise rise and Growth of the Tibet Plateau. *Science*, 2001, 294: 1671–1677
- 19 Harrison T M, Copeland P, Kidd W S F, et al. Raising Tibet. *Science*, 1992, 255: 1663–1670
- 20 Molnar P, England P, Martinod J. Mantle dynamics, uplift of the Tibetan Plateau, and the Indian Monsoon. *Rev Geophys*, 1993, 31: 357–396
- 21 Zheng H, Powell C M A, An Z, et al. Pliocene uplift of the northern Tibetan Plateau. *Geol*, 2000, 28: 715–718
- 22 Luo J, Yang D, Suzuki H, et al. Molecular phylogeny and biogeography of Oriental voles: genus *Eothenomys* (Muridae, Mammalia). *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 33: 349–362
- 23 Guo X, Wang Y. Partitioned Bayesian analyses, dispersal-vicariance analysis, and the biogeography of Chinese toad-headed lizards (Agamidae:

- Phrynocephalus*): a re-evaluation. [Mol Phylogenet Evol](#), 2007, 45: 643–662
- 24 Rousseau-Gueutin M, Gaston A, Ainouche A, et al. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): new insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. [Mol Phylogenet Evol](#), 2009, 51: 515–530
 - 25 Machordom A, Doadrio I. Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. [Proc Biol Sci](#), 2001, 268: 1297–1306
 - 26 Tsigenopoulos C S, Ráb P, Naran D, et al. Multiple origins of polyploidy in the phylogeny of southern African barbs (Cyprinidae) as inferred from mtDNA markers. [Heredity](#), 2002, 88: 466–473
 - 27 Sang T. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. [Crit Rev Biochem Mol Biol](#), 2002, 37: 121–147
 - 28 Marhold K, Lihová J. Polyploidy, hybridization and reticulate evolution: lessons from the Brassicaceae. [Plant Syst Evol](#), 2006, 259: 143–174
 - 29 Evans B J. Evolution of RAG-1 in polyploid clawed frogs. [Mol Biol Evol](#), 2005, 22: 1193–1207
 - 30 Evans B J, Kelley D B, Tinsley R C, et al. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. [Mol Phylogenet Evol](#), 2004, 33: 197–213
 - 31 Brysting A K, Oxelman B, Huber K T, et al. Untangling complex histories of genome mergings in high polyploids. [Syst Biol](#), 2007, 56: 467–476
 - 32 Fortune P M, Schierenbeck K A, Ainouche A K, et al. Evolutionary dynamics of *Waxy* and the origin of hexaploid *Spartina* species (Poaceae). [Mol Phylogenet Evol](#), 2007, 43: 1040–1055
 - 33 Willett C E, Cherry J J, Steiner L A. Characterization and expression of the recombination activating genes (*rag1* and *rag2*) of zebrafish. [Immunogenetics](#), 1997, 45: 394–404
 - 34 Chen W, Du K, He S. Genetic structure and historical demography of *Schizothorax nukiangensis* (Cyprinidae) in continuous habitat. [Ecol Evol](#), 2015, 5: 984–995
 - 35 Wang M, Yang J X, Chen X Y, et al. Molecular phylogeny and biogeography of *Percocypris* (Cyprinidae, Teleostei). [PLoS ONE](#), 2013, 8: e61827
 - 36 Yazdani Moghaddam F, Aliabadian M, Khalijah Daud S, et al. Molecular phylogeny of the *Puntius* (Hamilton, 1822) based on nuclear gene *RAG2*. [Prog Biol Sci](#), 2013, 2: 66–75
 - 37 Li G, Peng Z, Zhang R, et al. Mito-nuclear phylogeography of the cyprinid fish *Gymnodiptychus dybowskii* in the arid Tien Shan region of Central Asia. [Biol J Linn Soc](#), 2016, 118: 304–314
 - 38 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
 - 39 Thompson J. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. [Nucleic Acids Res](#), 1997, 25: 4876–4882
 - 40 De Rijk P. The European large subunit ribosomal RNA database. [Nucleic Acids Res](#), 2000, 28: 177–178
 - 41 Gutell R R, Gray M W, Schnare M N. A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures: 1993. [Nucleic Acids Res](#), 1993, 21: 3055–3074
 - 42 Gutell R R, Fox G E. A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. [Nucleic Acids Res](#), 1988, 16 Suppl r175–269
 - 43 Maddison D R, Maddison W P. MacClade 4. Sunderland: Sinauer, 2000
 - 44 Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. [Evolution](#), 1985, 39: 783–791
 - 45 Eriksson T. AutoDecay ver. 5.0 (program distributed by the author). 2001
 - 46 Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. [Bioinformatics](#), 2006, 22: 2688–2690
 - 47 Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. [Bioinformatics](#), 2003, 19: 1572–1574
 - 48 Posada D, Crandall K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. [Bioinformatics](#), 1998, 14: 817–818
 - 49 Maddison W P, Maddison D R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10. <http://mesquiteproject.org>, 2016
 - 50 Sanderson M J. r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. [Bioinformatics](#), 2003, 19: 301–302
 - 51 Sanderson M J. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. [Mol Biol Evol](#), 2002, 19: 101–109
 - 52 Stewart K M. The freshwater fish of Neogene Africa (Miocene-Pleistocene): systematics and biogeography. [Fish Fisheries](#), 2001, 2: 177–230
 - 53 Couvreur J A H V. Early records of freshwater fishes in Africa. [Copeia](#), 1977, 1977: 163–166
 - 54 Stewart K M. Fossil fish from the Nile River and its southern basins. [Monog Biol](#), 2008, 89: 677–704
 - 55 Otero O. The oldest-known cyprinid fish of the Afro-Arabic Plate, and its paleobiogeographical implications. [J Vertebr Paleontol](#), 2001, 21: 386–388
 - 56 Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). version 3.5 c. 1993

- 57 Sanderson M J. A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Mol Biol Evol*, 1997, 14: 1218–1231
- 58 Rabosky D L. LASER: a maximum likelihood toolkit for detecting temporal shifts in diversification rates from molecular phylogenies. *Evol Bioinform Online*, 2006, 2: 273–276
- 59 Rabosky D L. Likelihood methods for detecting temporal shifts in diversification rates. *Evolution*, 2006, 60: 1152–1164
- 60 Chan K M A, Moore B R. SYMMETREE: whole-tree analysis of differential diversification rates. *Bioinformatics*, 2005, 21: 1709–1710
- 61 Chan K M A, Moore B R. Whole-tree methods for detecting differential diversification rates. *Syst Biol*, 2002, 51: 855–865
- 62 Moore B R, Chan K M A, Donoghue M J. Detecting diversification rate variation in supertrees. In: Bininda-Emonds O R P, ed. *Phylogenetic Supertrees: Combining Information to Reveal the Tree of Life*. Dordrecht: Kluwer Academic. 2004. 487–533
- 63 Nee S, Mooers A O, Harvey P H. Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 8322–8326
- 64 Slowinski J B, Guyer C. Testing whether certain traits have caused amplified diversification: an improved method based on a model of random speciation and extinction. *Am Natist*, 1993, 142: 1019–1024
- 65 Guo Z T, Ruddiman W F, Hao Q Z, et al. Onset of Asian desertification by 22 Myr ago inferred from loess deposits in China. *Nature*, 2002, 416: 159–163
- 66 Molnar P. Mio-pliocene growth of the Tibetan Plateau and evolution of East Asian climate. *Palaeontol Electron*, 2005, 8: 131–142
- 67 Shi Y, Li J, Li B, et al. Uplift of the Qinghai-Xizang (Tibetan) Plateau and East Asia environmental change during late Cenozoic. *Acta Geogr Sin*, 1999, 54: 10–21
- 68 Zheng H, Clift P D, Wang P, et al. Pre-Miocene birth of the Yangtze River. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 7556–7561
- 69 Liu J Q, Wang Y J, Wang A L, et al. Radiation and diversification within the *Ligularia-Cremanthodium-Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered by uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 38: 31–49
- 70 Guo X, He S, Zhang Y. Phylogeny and biogeography of Chinese sisorid catfishes re-examined using mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA gene sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 35: 344–362
- 71 Cao W X, Chen Y Y, Wu Y F, et al. Origin and evolution of schizothoracine fishes in relation to the upheaval of the Xizang Plateau. In: The Team of the Comprehensive Scientific Expedition to the Qinghai-Xizang Plateau, C A o S. ed. *Collection in Studies on the Period, Amplitude and Type of the Uplift of the Qinghai-Xizang Plateau (in Chinese)*. Beijing: Science Press, 1981. 118–130
- 72 Yang L, Sado T, Vincent Hirt M, et al. Phylogeny and polyploidy: resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Mol Phylogenet Evol*, 2015, 85: 97–116
- 73 Yonezawa T, Hasegawa M, Zhong Y. Polyphyletic origins of schizothoracine fish (Cyprinidae, Osteichthyes) and adaptive evolution in their mitochondrial genomes. *Genes Genet Syst*, 2014, 89: 187–191
- 74 Li J, Wang X, Kong X, et al. Variation patterns of the mitochondrial 16S rRNA gene with secondary structure constraints and their application to phylogeny of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Mol Phylogenet Evol*, 2008, 47: 472–487
- 75 Oellermann L K, Skelton P H. Hexaploidy in yellowfish species (*Barbus*, Pisces, Cyprinidae) from southern Africa. *J Fish Biol*, 1990, 37: 105–115
- 76 Uyeno T, Smith G R. Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes. *Science*, 1972, 175: 644–646
- 77 Schultz R J. Role of polyploidy in the evolution of fishes. In: Lewis W H, ed. *Polyploidy: Biological Relevance*. Boston: Springer, 1980. 313–340
- 78 Becak W, Becak M L, Ohno S. Intraindividual chromosomal polymorphism in green sunfish (*Lepomis cyanellus*) as evidence of somatic segregation. *Cytogenetics*, 1966, 5: 313–318
- 79 Wolf U, Ritter H, Atkin N B, et al. Polyploidization in the fish family Cyprinidae, order Cypriniformes. I. DNA-content and chromosome sets in various species of Cyprinidae. *Humangenetik*, 1969, 7: 240–244
- 80 Don J, Avtalion R R. Production of viable tetraploid tilapias using the cold shock technique. *Isr J Aquacult-Bamid*, 1988, 40: 17–21
- 81 Yang L, Wang Y, Zhang Z, et al. Comprehensive transcriptome analysis reveals accelerated genic evolution in a Tibet fish, *Gymnodiptychus pachycheilus*. *Genome Biol Evol*, 2015, 7: 251–261
- 82 Yuan W, Dong J, Shicheng W, et al. Apatite fission track evidence for Neogene uplift in the eastern Kunlun Mountains, northern Qinghai-Tibet Plateau, China. *J Asian Earth Sci*, 2006, 27: 847–856
- 83 Copeland P, Mark Harrison T, Kidd W S F, et al. Rapid early Miocene acceleration of uplift in the Gangdese Belt, Xizang (southern Tibet), and its bearing on accommodation mechanisms of the India-Asia collision. *Earth Planet Sci Lett*, 1987, 86: 240–252
- 84 Wu Z, Barosh P J, Wu Z, et al. Vast early Miocene lakes of the central Tibetan Plateau. *Geol Soc Am Bull*, 2008, 120: 1326–1337
- 85 Zhou C, Wang X, Gan X, et al. Diversification of *Sisorid catfishes* (Teleostei: Siluriformes) in relation to the orogeny of the Himalayan Plateau. *Sci Bull*, 2016, 61: 991–1002

- 86 Spicer R A, Harris N B W, Widdowson M, et al. Constant elevation of southern Tibet over the past 15 million years. *Nature*, 2003, 421: 622–624
- 87 Harris N. The elevation history of the Tibetan Plateau and its implications for the Asian monsoon. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*, 2006, 241: 4–15
- 88 Ritts B D, Yue Y, Graham S A, et al. From sea level to high elevation in 15 million years: uplift history of the northern Tibetan Plateau margin in the Altun Shan. *Am J Sci*, 2008, 308: 657–678
- 89 Lu H. Geomorphologic evidence of phased uplift of the northeastern Qing-hai-Tibet Plateau since 14 million years ago. *Sci China Ser D*, 2004, 47: 822–833
- 90 Royden L H, Burchfiel B C, van der Hilst R D. The geological evolution of the Tibetan Plateau. *Science*, 2008, 321: 1054–1058
- 91 Coleman M, Hodges K. Evidence for Tibetan plateau uplift before 14 Myr ago from a new minimum age for east-west extension. *Nature*, 1995, 374: 49–52
- 92 Li T. The process and mechanism of the rise of the Qinghai-Tibet Plateau. *Tectonophysics*, 1996, 260: 45–53
- 93 Fan M, Dettman D L, Song C, et al. Climatic variation in the Linxia basin, NE Tibetan Plateau, from 13.1 to 4.3Ma: the stable isotope record. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*, 2007, 247: 313–328
- 94 Cerling T E, Harris J M, MacFadden B J, et al. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. *Nature*, 1997, 389: 153–158
- 95 Ma Y Z, Li J J, Fang X M. Pollen assemblage in 30.6–5.0 Ma redbeds of Linxia region and climate evolution. *Chin Sci Bull*, 1998, 43: 301–304
- 96 An Z, Kutzbach J E, Prell W L, et al. Evolution of Asian monsoons and phased uplift of the Himalaya-Tibetan plateau since Late Miocene times. *Nature*, 2001, 411: 62–66