两栖爬行动物的高海拔适应性演化: 现状与展望

高伟^{1,2}, 付婷婷^{1,2}, 车静^{1,3*}

1. 中国科学院昆明动物研究所, 遗传资源与进化国家重点实验室, 昆明 650223;

2. 中国科学院大学昆明生命科学学院, 昆明 650204;

3. 中国科学院动物进化与遗传前沿交叉卓越创新中心, 昆明 650223

* 联系人, E-mail: chej@mail.kiz.ac.cn

收稿日期: 2018-10-11; 接受日期: 2019-01-30; 网络版发表日期: 2019-04-16

中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDB13020200)和国家自然科学基金(批准号: 91431105)资助

摘要 高海拔极端环境具有低温、低氧、强紫外等特点, 加之复杂的地质历史、独特的地形地貌等环境因素, 为开展生物适应性演化研究提供了天然实验室. 作为变温动物(poikilotherm)的代表类群, 两栖爬行动物是高海拔生物区系中重要的组成部分, 已知物种最高海拔分布可达5300 m. 前期研究显示两栖爬行动物代表物种在生理、形态及生活史等方面进化出一系列表型特征, 以适应高海拔环境. 近年来, 随着新一代测序技术的发展, 从基因组水平探讨高海拔适应的分子机制成为可能, 并取得了突破性进展, 尤其是青藏高原地区代表性两栖爬行动物基因组的解析, 标志着两栖爬行动物适应性演化研究进入了一个新的时代. 本文总结分析了目前表型研究已取得的成果, 重点分析和讨论了分子机制的研究进展. 展望未来, 以下几个方面研究将是发展的重点: 表型组学(phenomics)的建立; 表型组和基因组(genomics)的关联分析; 遗传变异的功能分析及实验体系的建立. 高海拔适应性研究已成为两栖爬行动物适应性演化研究领域的开拓性工作和范例.

关键词 两栖动物, 爬行动物, 高海拔适应, 变温动物, 表型组, 基因组

高海拔地区具有明显的低氧、低温、强紫外等极端环境特点^[1-3], 这种恶劣条件给生活于此的生物带来了多重的压力和挑战, 高海拔缺氧和较强的紫外辐射对机体细胞造成结构损伤和功能代谢障碍^[4,5], 气温的降低增加了恒温动物(homotherm)的能量消耗, 使变温动物(poikilotherm)整体的代谢水平降低, 限制其正常生命活动. 虽然高海拔环境在医学上被定义为>2500 m的地区, 然而根据近期的一些研究进展^[6,7], 地球上高海拔环境远不止于此, 部分物种在2000 m左右已经受到明显的高海拔环境压力^[7], 按此界定, 全世界

约有5.1%的陆地(图1)为高海拔地区^[1]. 高海拔地区作为一种典型的极端环境, 伴随着复杂多样的地质历史因素, 为探讨生物适应性演化研究提供了天然实验室.

在高海拔如此严酷的生存环境中生活的脊椎动物, 除了大家熟知的哺乳类和鸟类等恒温动物外, 还包括变温动物, 如两栖和爬行动物. 这两大类物种是脊椎动物演化过程中关键的代表类群, 现生分布范围十分广泛^[8]. 其中不少物种分布在高海拔地区, 包括亚洲的青藏高原、横断山区和南美洲的安第斯山(图1)(<http://www.Amphibiachina.Org>)^[9-11], 少量分布在北美洲的落

引用格式: 高伟, 付婷婷, 车静. 两栖爬行动物的高海拔适应性演化: 现状与展望. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 345-360

Gao W, Fu T T, Che J. High-altitude adaptive evolution in amphibians and reptiles: Status and prospect (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 345-360, doi: 10.1360/N052018-00216

基山脉^[12,13]、拉丁美洲的墨西哥高原^[14]、非洲的阿特拉斯山脉^[15]、欧洲的内华达山脉^[16]等(图1)。青藏高原作为全球面积最大且平均海拔最高的地区, 相比其他高地, 长期受到生物学家的关注。目前世界上海拔分布最高的两栖动物如高山倭蛙(*Nanorana parkeri*, 最高海拔约5100 m)等(<http://www.Amphibiachina.Org>)^[17]和爬行动物如红尾沙蜥(*Phrynocephalus erythrurus*, 最高分布海拔5300 m左右)等^[18]均分布于此。

两栖爬行动物作为高海拔生物区系中重要的组成部分, 相比哺乳动物, 经历了长时间的演化^[20]。已有研究显示, 高原两栖爬行动物在形态、生理生化等方面发展出一系列适应性表型性状, 如提高血红蛋白浓度或血氧亲和力来提高氧气运输能力^[14,21~25]、加深皮肤颜色以防御紫外辐射和调节体温^[16,26]、许多爬行动物繁殖方式进化为胎生^[11,12,27,28]等。尽管如此, 表型背后的遗传学基础等机制问题鲜少涉及。

近年来, 随着新一代测序技术的发展, 一系列包括对人和其他恒温动物高海拔适应分子机制的研究取得

了突破性的进展^[29~35]; 而对两栖爬行动物的研究, 也在此次技术革新的大潮中取得了初步的成果, 一些代表性物种, 如高原林蛙(*Rana kukunoris*)^[36]、青海沙蜥(*P. vlangalii*)^[37]、红尾沙蜥^[38]、高山倭蛙^[7,39]、温泉蛇(*Thermophis baileyi*)^[40]等物种适应高海拔环境的分子机制陆续得以初步解析。特别是高原代表性物种全基因组数据的解析^[40,41], 为两栖爬行动物适应性演化研究提供了重要的基础数据。基于目前的发展现状, 本文拟通过对已有高海拔两栖爬行动物表型及分子机制研究进行总结和分析, 明确当前研究面临的挑战和机遇, 提出未来两栖爬行动物高海拔适应性研究发展的重点。

1 两栖爬行动物高海拔适应的表型研究进展

为适应高海拔极端环境, 两栖爬行动物在提高氧气运输能力、防御紫外、调温等器官组织结构及生理

图1 在世界高海拔区域分布的代表两栖爬行动物(图片来自<http://www.Amphibiachina.Org>和文献[19], 图片使用许可见致谢部分)

Figure 1 Representative amphibians and reptiles distributed at high altitude areas all over the world (photos from <http://www.Amphibiachina.Org> and ref. [19], images used with permission obtained from photographers are acknowledged)

方面进化出一系列适应性表型. 部分表型显示与恒温动物的功能趋同性, 同时也演化出一些独特的适应性状.

1.1 提升氧气运输能力

两栖爬行动物增加氧气运输主要表现在氧气从外界环境到组织线粒体运输的各个环节, 包括肺和皮肤氧气向血液的扩散、血液氧运输、氧从血液到组织的扩散等(图2)^[42,43]. 与低海拔物种或种群相比, 高海拔物种肺部和皮肤(两栖动物中可辅助呼吸)毛细血管较为密集^[21,44], 肺重/体重比更大且具有更多蜂窝状气室结构^[44], 从而显著提升了高海拔两栖爬行动物氧气扩散到血液的效率. 高海拔青海沙蜥的心脏/体重比显著高于低海拔种群, 有效提升了心脏血液的输出量^[22]. 在血液学特征方面, 高海拔的两栖爬行动物血红蛋白浓度(hemoglobin, Hb)、血细胞比容(hematocrit, Hct)、红细胞数目(erythrocyte count, Erc)等均高于低海拔物种或种群^[14,21~23,39,45~50], 而红细胞大小(erythrocyte size, Ers)则随着海拔的升高而下降(小的红细胞体积可加快血流速度)^[14,21,46,51], 另外, 分布于高海拔的物种或种群相比低海拔类群, 血氧亲和力(blood oxygen affinity)也有明显升高^[21,24,25,52,53](图2, 表1), 血液学特征的变化在一定程度上提高了高海拔两栖爬行动物氧气的运输能力. 在氧从血液到组织运输方面, 高海拔两栖爬行动物骨骼肌和心肌中较高的毛细血管密度增强了氧的传递

效率^[22,44], 而肌红蛋白(myoglobin, Mb)浓度的升高也显著提升了氧在组织细胞内的传递能力^[44,55].

两栖爬行动物在提高氧气运输的策略方面(器官组织结构)在恒温动物中也有许多报道, 有趋同性. 例如心肺结构、组织毛细血管密度以及许多血液特征值在高海拔哺乳动物(如牦牛(*Bos grunniens*)、岩羊(*Pseudois nayaur*)、藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)、高原鼠兔(*Peromyscus maniculatus*)等)和鸟类(如黑翅草雁(*Chloephaga melanoptera*)、粉红腹岭雀(*Leucosticte arctoa*)等)中呈现出与两栖爬行动物相似的变化模式^[56~61]. 不过, 血液Hb和Hct的升高可能会导致血液黏稠度的增加, 增大血流阻力, 在这方面, 两栖动物(如疣螈(*Rhinella spinulosa*))和藏族人群、斑头雁(*Anser indicu*)的研究是一致的, 其Hb和Hct维持在一个相对较低的水平^[25,62,63], 通过其他一些方式(如提高血流速度和血液亲和力等)来提高氧气的运输^[64], 从而避免了上述负面效应.

1.2 抵御紫外(ultraviolet, UV)辐射

对于主要依靠太阳辐射来调温的爬行动物及部分两栖动物而言, 高海拔环境紫外辐射强, 且一些物种为获得更多外界热量会增加晒太阳的时间^[65,66], 大大增加了受到紫外损伤的几率; 尤其对两栖动物而言, 裸露的皮肤使其较其他类群更易受到这种损伤. 紫外辐射产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)是造成

图2 高海拔两栖爬行动物提高氧气运输能力途径的示意图

Figure 2 Diagram of improved oxygen transport capacity pathway in amphibians and reptiles living at high altitudes

表 1 与低海拔物种或群体相比, 两栖爬行动物高海拔类群的血液学参数变化统计表^{a)}

Table 1 Statistics of changes in the hematological parameters of amphibians and reptiles living at high altitudes, compared to their low-altitude relatives and populations

研究水平	类群	物种	血红蛋白浓度	血细胞比容	红细胞数目	红细胞大小	血氧亲和力和	文献来源
种上	爬行动物	红尾沙蜥(<i>Phrynocephalus erythrurus</i>)	↑	↑	↑	—	↑	[24,44]
		黑领强棱蜥(<i>Sceloporus poinsetti</i>)	↑	/	/	/	/	[48]
		平咽蜥属(<i>Liolaemus</i>)	—	—	—	—	/	[54]
	两栖动物	理纹池蟾(<i>Telmatobius marmoratus</i>)	↑	↑	— [*]	— [*]	/	[47]
		博克蟾蜍(<i>Incilius bocourti</i>)	↑	/	/	/	/	[50]
		秘鲁池蟾(<i>Telmatobius peruvianus</i>)	/	/	/	/	↑	[52]
6种高海拔物种 [#]		↑	/	↑	↓	/	[46]	
种下	爬行动物	青海沙蜥(<i>Phrynocephalus vlangalii</i>)	↑	↑	—	/	/	[22]
		卫氏强棱蜥(<i>Sceloporus torquatus</i>)	↑	↑	↑	↑	/	[23]
		条纹强棱蜥(<i>Sceloporus grammicus</i>)	先↑后↓	先↑后—	先↑后—	先↑后↓	/	[14]
		西方强棱蜥(<i>Sceloporus occidentalis</i>)	/	↑	↑	/	↑	[49,53]
	两栖动物	高山倭蛙(<i>Nanorana parkeri</i>)	↑	/	/	/	/	[39]
		疣蟾蜍(<i>Rhinella spinulosa</i>)	先—后↓	先—后↓	先—后↓	/	先—后↑	[25]
		尻池蟾(<i>Telmatobius culeus</i>)	—	↓	↑	↓	/	[51]
		博克蟾蜍(<i>Incilius bocourti</i>)	↑	↑	↑	↓	↑	[21]
三锯拟蝗蛙(<i>Pseudacris triseriata</i>)		—	/	/	/	/	[50]	
		—	/	/	/	/	[13]	

a) ↑表示高海拔物种或种群显著高于; ↓表示显著低于; —表示无显著差异; /表示无研究数据; *表示有差异, 但与海拔无明显相关性, 属于种间差异; #包括疣蟾蜍、秘鲁池蟾、理纹池蟾、霍尔池蟾(*Telmatobius halli*)、阿里科池蟾(*Telmatobius pefauri*)、理纹肺肋蟾(*Pleurodema marmoratum*)。

损伤的一个重要途径, 研究表明, 分布于海拔2300 m左右的滇蛙(*Rana pleuraden*)中存在大量且变异程度高的抗氧化肽^[67], 同时, 海拔2500 m左右分布的云南臭蛙(*Odorrana andersonii*)相比其低海拔(~800 m)近缘种务川臭蛙(*O. wuchuanensis*)而言, 抗氧化肽同样展示出较高的多样性和抗氧化活性^[68], 这些肽类具有有效清除自由基的能力, 从而大大降低紫外辐射对高海拔两栖动物皮肤的损伤^[67,68]。另外, 已有研究显示^[69,70], 黑色素作为一种防晒因子, 可以有效吸收紫外辐射从而起到保护作用。例如生活在高海拔地区的侧纹奔蜥(*Psammodromus algirus*, 分布在西班牙东南部)背部皮肤颜色随着海拔升高而不断的加深^[16]。两栖动物中, 高山倭蛙高海拔种群与低海拔种群相比, 皮肤含有更多的色素含量(车静, 个人通讯)。研究表明, 高海拔地区分布的爬行动物肤色较暗能够有效吸收紫外辐射, 起到了防御紫外损伤的功能^[71]。

尽管两栖爬行动物与人类之间皮肤结构差异较

大, 在皮肤抵御紫外损伤中表现出趋同性。例如对人类皮肤的研究发现, 色素的沉着能有效保护皮肤免受紫外的损害^[72,73], 而青藏高原的藏人肤色显著要暗于低海拔汉族人^[74], 暗示了皮肤色素在高海拔人类抵御紫外损伤中发挥了重要作用。

1.3 高海拔两栖爬行动物独特的低温适应

如上所述, 高海拔两栖爬行动物背部颜色随着海拔升高而不断加深^[16], 不仅能够抵御紫外的损伤^[5], 这种黑化现象在调温方面也具有重要作用^[27,75,76], 在相同的太阳辐射水平上, 深色的个体比浅色个体升温更快^[77], 这对高海拔两栖爬行动物处于低温环境中快速提升体温具有重要作用。

此外, 蜥蜴腹部黑斑大小及颜色的深浅与物种吸收地表辐射热密切相关^[78], 例如青藏高原的沙蜥属物种腹部黑斑面积与海拔具有明显的相关性, 高海拔物种或种群黑斑面积显著高于低海拔类群^[11,79], 美国西

南部内华达山脉的西方强棱蜥高海拔种群腹部颜色显著深于低海拔种群^[26], 推测是对高海拔低温环境的进化适应^[11,26]。除了形态上的适应, 部分两栖爬行动物通过一系列的行为机制调节体温, 如选择合适晒太阳地点、姿势、时间等。一些高海拔两栖动物白天会选择温度较高的微生境进行调温^[80,81], 欧洲的胎生蜥(*Zootoca vivipara*)高海拔种群平均每天晒太阳的时间要显著长于低海拔种群^[65], 更长时间的太阳辐射使得高海拔地区的蜥蜴补偿性地获得更多能量。

面对较低的环境温度, 高海拔生活的两栖爬行动物展现出良好的低温适应能力^[82], 许多高海拔的两栖爬行动物往往具有较低的活动体温^[10,27,83~87], 且比低海拔物种或种群可以耐受更低的温度^[50,88~91], 同时在低温环境中能有更好的表现和活动能力^[86,92,93]。然而高海拔两栖爬行动物这种低温适应的生理机制尚不清楚。

除此之外, 冬眠是两栖爬行动物适应冬季低温环境的一种策略, 尤其对高海拔分布的物种而言, 冬季所处温度极低, 冬眠期如何抵抗如此寒冷的环境压力值得关注。分布于青藏高原上的红尾沙蜥在模拟冬眠的状态下比冬眠前期具有更高的过冷耐受能力和接种结冰的抵抗能力^[94]; 生活于高海拔地区的倭蛙(*Nanorana pleskei*)的冬眠期平均环境温度明显低于体液结冰温度, 大部分的倭蛙在此温度中可以耐受并存活, 而尿素可能是其主要的抗冻保护蛋白^[95]。不过上述研究都只是针对高海拔物种或种群, 其低海拔近缘种或种群是否有相似的冬眠抗冻策略还有待进一步研究。

1.4 高海拔爬行动物的繁殖方式演化

高海拔爬行动物(主要是有鳞目)有别于其他类群的一个显著适应性特征是其繁殖方式的演化。由于高海拔低温、低氧等恶劣环境, 部分高海拔爬行动物的繁殖方式由卵生(oviparity)进化为胎生(viviparity)^[96~98], 即胚胎从母体中发育完全才产出, 能够保护胚胎不受外界环境的伤害, 加速胚胎的发育, 大大降低了外界环境对胚胎孵化的影响^[96]。事实上, 高海拔分布的爬行动物, 胎生繁殖模式物种的比例明显高于低海拔地区^[27,28,96~98]。不仅如此, 许多近缘种的卵生和胎生繁殖模式的分化都与海拔密切相关, 沙蜥属(*Phrynocephalus*)和角蜥属(*Phrynosoma*)蜥蜴中营胎生繁殖模式的物种海拔分布普遍要高于卵生物种(图3)^[11,12]。

目前海拔对爬行动物繁殖模式进化影响因素的研究主要在低温上, 即冷气候假说('cold-climate' hypothesis)^[99,100], 认为滞留卵可以受到母体的保护而免受外界低温的伤害, 同时母体高于外界的温度环境也可加速胚胎的发育^[12]。对青海沙蜥妊娠过程中温度调节的研究结果显示, 没有母体的调温作用, 胚胎不能正常发育, 表明了青海沙蜥胎生繁殖模式对高海拔环境适应的一个影响因素是温度^[101]。但高海拔环境除了低温之外, 还有其他环境因素同样可能影响繁殖方式的进化, 如缺氧假说('hypoxia' hypothesis)^[12,102]认为高海拔地区较低的氧分压可延迟胚胎的发育, 而胎盘结构可以提供理想水平的氧来完成胚胎发育过程, 从而促使了母体内胚胎滞留时间的延长, 逐渐进化为胎生繁殖模式^[12,102], 该假说在对具有不同海拔分布且具两种繁殖模式的平咽蜥属(*Liolaemus*)的研究中也得到了支持^[103]; 另外, 高海拔地区除了平均气温低以外, 温度波动也较大^[82], 且不稳定, 胎生繁殖模式可以给胚胎提供一个稳定的发育场所。低氧和温度的综合作用可能是胎生繁殖模式在高海拔地区适应性进化的促进因素^[103], 也是爬行动物高海拔适应后续研究的一个方向。

1.5 高海拔两栖动物声音通讯及摄食器官结构的适应性退化

研究发现, 许多高海拔两栖动物声音通讯及摄食器官结构出现了退化现象^[104,105], 推测可能是为适应高海拔地区气压低、空气稀薄、高山风大且食物短缺单一的特点。通过对一些生活在青藏高原及其毗邻地区的两栖动物与其低海拔近缘种的部分解剖学形态特征比较, 同时结合它们的系统发育关系, 我们发现倭蛙属分布于高海拔的高山倭蛙、腹斑倭蛙(*N. ventripunctata*)和倭蛙(*N. pleskei*)均无声囊, 也无犁骨齿或犁骨齿极细, 其中分布范围可达5100 m的高山倭蛙其鼓膜和耳柱骨完全丢失或仅残留一点^[104]; 与之相对的低海拔近缘种, 如棘臂蛙(*N. liebigii*)、错那棘蛙(*N. conaensis*)、墨脱棘蛙(*N. medogensis*)、察隅棘蛙(*N. chayuensis*)和花棘蛙(*N. maculosa*)等则大多数有声囊、鼓膜和耳柱骨, 且犁骨齿强壮^[104]。类似的现象在青藏高原的另一类群齿突蟾属(*Scutiger*)也同样出现, 该类群大部分物种生活在海拔2500~5100 m, 也出现了声囊、鼓膜、耳柱骨退化或消失, 上颌齿、犁骨齿

图3 沙蜥属和角蜥属的繁殖模式与海拔分布(数据来源文献[11,12,17,19])。A: 沙蜥属物种海拔分布; B: 角蜥属物种海拔分布。横坐标表示物种, 纵坐标表示海拔, 点表示中间海拔, 误差线表示海拔分布的跨度, 颜色表示生殖方式

Figure 3 Relationship between reproductive modes and altitude distribution of species in genera *Phrynocephalus* and *Phrynosoma* (data from refs. [11,12,17,19]). A: Genus *Phrynocephalus*; B: genus *Phrynosoma*. x-axis represents species and y-axis represents altitude. Dots indicate middle altitude and error bars indicate highest and lowest altitude. Viviparity and oviparity are marked in red and green, respectively

退化的现象^[104], 暗示了栖息于高原的不同两栖动物类群出现了器官结构的趋同性现象。

2 两栖爬行动物高海拔适应性演化的分子机制

两栖爬行动物高海拔适应分子机制的研究目前主要围绕低氧应答、DNA修复、能量代谢等方面, 其中绝大部分工作集中在对青藏高原的动物类群(沙蜥属物种、高山倭蛙、高原林蛙等)的研究。

2.1 血氧运输相关因子的序列和表达变化提升了高海拔物种携氧能力(Sanger测序)

通过借鉴于哺乳动物高原适应的研究, 早期两栖爬行动物对高海拔低氧适应的相关研究, 主要集中在氧气运输过程中的以血红蛋白、肌红蛋白为代表的球蛋白家族, 以及低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)通路及其下游的单个分子。通过对高低海拔物种(如安第斯山高海拔的秘鲁池蟾与低海拔非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)^[52]、高海拔的红尾沙蜥与低海拔的

荒漠沙蜥(*P. przewalskii*)^[24]等)的蛋白序列和结构的比较研究发现, 高海拔物种血红蛋白序列都发生了突变或氨基酸的修饰, 虽然位点有所差异, 但都导致了其蛋白构象的变化, 从而有更高的氧气携带与释放能力^[24,52]。另一主要的携氧分子肌红蛋白在红尾沙蜥中也发生了3个氨基酸位点的替换(与荒漠沙蜥相比), 使其血红素袋(heme pocket)体积比荒漠沙蜥更大, 更有利于氧气的结合和卸载^[55]。除了血红蛋白和肌红蛋白, 球蛋白家族中其他生理功能相似的成员, 比如红尾沙蜥的神经珠蛋白(neuroglobin, Ngb)以及细胞珠蛋白(cytoglobin, Cygb)的氨基酸位点都发生突变改变了蛋白结构, 同样促进了组织氧亲和力和氧供应效率的提高^[45]。与恒温动物(人、鸟类)相比, 虽然不同类群在这些蛋白上发生的突变位点不一致, 但通过这种方式调节氧亲和力的机制是相似的^[106~108]。而与哺乳动物不同的是, 已有研究发现低氧应答中起关键作用的HIF-1通路及其下游的血管生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转铁蛋白(transferrin, TF)等, 在不同的高海拔两栖爬行动物与低海拔物种或种群比较中的表达差异显示出物种特异性以及组织特异性

(表2)^[44,109,110].

2.2 基因组水平数据的获得推动了两爬物种高海拔适应性机制的研究

长期以来, 在两栖爬行动物中开展适应性演化研究存在瓶颈问题, 特别是两栖动物, 由于基因组的复杂性(0.8~117.9 Gb)^[111], 一直以来仅有一个基因组相对较小的非洲爪蟾的数据(1.5 Gb), 使得前期高海拔适应性研究主要集中在特定功能基因片段开展的工作, 缺乏在基因组水平探讨两栖动物适应性演化问题的研究. 随着二代测序技术的发展, 高海拔物种基因组的成功解析^[40,41,112], 为研究物种适应高海拔环境的分子机制提供了可能. 2015年青藏高原特有爬行动物高山倭蛙的基因组得到解析, 这是首个“现代蛙类”的基因组, 极大推动了两栖动物的比较基因组学及高海拔适应性演化研究^[41]. 通过对高山倭蛙居群全基因组重测序数据的群体遗传学分析, 发现高山倭蛙东部支系存在“低-高-低-高”海拔的分化, 通过比较基因组和实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)分析, 发现与血液循环、低氧应答、紫外损伤修复等高海拔适应相关的基因受到正选择且群体间有表达差异^[39].

2018年, 青藏高原特有爬行动物, 温泉蛇的基因组也得以解析^[40]. 通过对温泉蛇属3个物种(温泉蛇, ~3600 m; 四川温泉蛇(*T. zhaoermii*), ~4000 m; 香格里拉温泉蛇(*T. shangrila*), ~3500 m)与基因组已知的其他

动物, 包括原鸡(*Gallus gallus*)、扬子鳄(*Alligator sinensis*)、绿海龟(*Chelonia mydas*)、吊袜带蛇(*Thamnophis sirtalis*)、缅甸蟒(*Python bivittatus*)、眼镜王蛇(*Ophiophagus hannah*)、安乐蜥(*Anolis carolinensis*)比较研究发现, 高海拔分布的温泉蛇有308个基因受到正选择, 其中温泉蛇属3个物种在一些基因上发生了共同的氨基酸突变, 包括与DNA修复相关的*FEN1*基因与低氧应答基因*EPAS1*, 增强了温泉蛇对高海拔紫外辐射的耐受性以及低氧条件的适应能力^[40]. 另外, 最新的一项研究对分布于青藏高原上的青海沙蜥(~4200 m)及近缘物种荒漠沙蜥的基因组进行了破译, 这为该族群以及后续进行不同类群高海拔适应分子机制的比较性研究提供了重要的参考信息^[112].

2.3 基于转录组数据进行的物种比较研究方便了从多角度探讨高海拔适应

(1) 高低海拔两栖物种比较研究. 转录组数据的应用在近年来高海拔适应性研究中起到了重要作用. 相比于全基因组测序, 转录组测序由于其相对较低的价格以及其能提供基因组水平的基因表达谱等优势备受关注.

通过对高原林蛙(3358 m)与近缘种中国林蛙(*R. chensinensis*, 604 m)的转录组学数据比较发现, 125个基因在高原林蛙中受到正选择, 其中14个基因与氧气结合(*CYP4B1*和*CYP2F1*)、紫外应答(*USP-1*)以及自由基损伤修复(*GSTO2*, *GPX4*, *PRDX4*以及*SCP2*)等高海

表2 与低海拔物种或群体相比, 两栖爬行动物高海拔类群的HIF及部分下游因子变化统计表^{a)}

Table 2 Statistics of changes in the expression of HIF protein family and their downstream factors in amphibians and reptiles distributed at high altitude, compared to those at lower altitude

研究水平	物种	组织	HIF-1 α	HIF-2 α	VEGF	TF	参考文献
种上	西藏沙蜥(高海拔)	心脏	—	—	/	↑	[109]
		肝脏	—	↑	/	↑	
	西藏沙蜥(低海拔)	心脏	↓	↓	/	—	[44]
		肝脏	↑	↑	/	↓	
	红尾沙蜥	心脏	—	—	↓	/	[44]
		肺	↓	↓	—	/	
种下	高山倭蛙	骨骼肌	—	—	↓	/	[110]
		心脏	↑	/	↑	↑	
	西藏沙蜥	心脏	↑	↑	/	↑	[109]
		肝脏	↓	↑	/	↑	

a) ↑表示高海拔物种或种群显著高于; ↓表示显著低于; —表示无显著差异; /表示无研究数据.

拔适应密切相关^[36]。在此基础上, 进一步比较分析高低海拔的中华蟾蜍(*Bufo gargarizans*)群体转录组数据, 在高海拔分布的中华蟾蜍以及高原林蛙中各自找到29个和33个正选择基因, 主要与营养代谢的调控相关^[113]。通过类似两两高低海拔物种转录组数据的比较研究, 缺氧调节、DNA修复以及能量代谢功能相关的基因在其他高原物种(青海沙蜥、红尾沙蜥、西藏沙蜥)中也被发现发生快速进化^[37,38,109], 其中两个基因(*UBE2D1*和*NBN*)在红尾沙蜥与高原林蛙中均受到了正选择, 提示高海拔物种的适应性趋同演化。

(2) 基于海拔梯度的多物种类群的比较研究。如上所述, 已有研究侧重于高海拔与低海拔物种的两两比较, 而高海拔是比较宽泛的范围, 高海拔不同海拔区域在气压及气温等方面存在诸多差异, 如2000 m海拔地区平均气温比海平面要低11℃左右, 而极高海拔(~5000 m)和中高海拔(~3000 m)地区, 平均气温比2000 m地区分别低16℃和6℃左右, 因此生存于2000 m以上的物种, 在不同海拔范围内面临的仍然是不同的生存挑战。通过比较在青藏高原地区呈现海拔梯度分布的两个类群(倭蛙属和沙蜥属)的多个物种转录组数据^[7], 研究发现高海拔适应在海拔抬升的初始阶段就已经出现, 即在与低海拔物种(~1000 m)分开后, 参与胞吞胞吐、胺代谢、DNA损伤修复、能量代谢以及血管生成等与高海拔适应相关的基因就受到正选择, 同时在更高海拔(~2000, ~3500, ~4500 m)的物种中, 与高海拔适应相关的基因均分别受到正选择, 说明高海拔适应是逐步进化的过程。该研究提示蛙和蜥两个类群在高原适应中的趋同性更多地体现在功能上的趋同(DNA修复、能量代谢), 而非具体基因层面上的趋同。

从以上研究可以看出, 目前利用转录组数据进行的分析通常关注的是序列水平变化, 利用转录组数据我们还能从表达变化的角度去探讨该问题, 以及序列改变和表达变化两者是如何共同作用于高海拔适应中。

2.4 两栖爬行动物高海拔适应的多基因调控网络

由以往对两栖爬行动物高海拔适应分子机制的研究来看, 高海拔适应是个相当复杂的多基因调控过程。本文总结了以上研究中各高海拔物种受到选择的关键基因及它们的功能互作关系(图4), 低氧应答的相关基因(HIF-1通路)在其中起到重要作用, 部分基因与恒温

动物发生趋同进化(如氧气结合相关的CYP蛋白家族)。此外, 高海拔极端环境导致机体产生大量自由基, 很多与氧化还原调控、DNA损伤修复相关的基因在高海拔物种中受到选择, 可能在清除自由基及其带来的损伤中发挥作用。同时, 两栖爬行动物中许多能量代谢相关的基因在高海拔物种中发生快速进化, 甚至在倭蛙属、沙蜥属类群随海拔抬升过程中持续受到自然选择^[7], 说明代谢调控通路在高海拔适应中也发挥重要作用。目前关于两栖爬行动物高原适应性调控网络只得到了初步解析, 完善这一复杂的基因调控网络将是后续分子机制研究的一个方向和重点。

3 两栖爬行动物适应性演化研究的展望

3.1 开展表型组学(phenomics)研究

表型(phenotype)是基因型(genotype)和环境因素(environmental factors)复杂交互网络的结果, 即基因型是表型得以表达的内因, 而环境是各类形态特征得以显现的外部条件^[114], 没有详细的表型数据, 这种交互关系难以得到研究^[115]。从两栖爬行动物高海拔适应性演化目前已有的研究来看, 高海拔两栖爬行动物基础表型数据有限, 不完整、不系统, 且已有研究的物种也较少。以血液学参数的研究为例, 尽管有许多的高海拔两栖爬行动物种已经开展了相关工作, 但具有完整血液学研究数据的物种极少(表1), 同时大量高海拔物种并无任何相关数据发表。此外, 目前表型的研究方法也不完善, 随海拔的升高某些生理表型的变化往往并非呈线性关系, 如爬行动物中的条纹强棱蜥3个不同海拔的种群(2500, 3400, 4300 m), 尽管两相邻海拔种群之间海拔跨度相同, 但血液学参数的变化趋势并不相同^[14]; 在两栖动物疣蟾蜍中, 几个血液学参数在中海拔(3100 m)与高海拔(4200 m)种群之间才有差异, 而中海拔与低海拔种群(海拔接近海平面)并无差异^[25], 这些均表明了两栖爬行动物沿海拔梯度分布的种群或物种所受到的环境压力并不均匀, 仅仅依靠简单的高低海拔之间比较并不能真实反映其对高海拔环境适应的动态变化情况。另外, 研究技术和工具也明显滞后, 大多研究都采用非常传统的方法和仪器, 效率较低, 而一些新的可以准确、快速、全面获取表型数据的综合测量设备在两栖爬行动物高海拔适应性演化的研究中却很少用到。比如目前两栖爬行动物血液学参数中血

图 4 高海拔两栖爬行动物受选择基因通路示意图

Figure 4 Diagram of pathways of genes under positive selection in high-altitude amphibians and reptiles

红蛋白测量大多采用分光光度计, 红细胞大小和数量则利用显微镜计数和测量; 而可以一次性、快速、准确地将上述甚至更多血液指标测定出来的针对两栖爬行动物的全自动血细胞分析仪则有待研发并投入到相关研究中。

随着基因、基因表达产物及各类遗传关联分析研究的开展, 与基因组学(genomics)相对应的表型组学概念被提出^[116], 它是旨在研究获取整个生物体的高维表型数据的学科, 可以实现生物性状参数的快速、准确大规模、高通量的测量, 对表型数据进行注释、标准化和存储, 最终挖掘出有意义的生物学知识。表型组水平的数据为研究健康与疾病、作物育种、进化可适度等复杂现象的分子机制上提供了充足且详细的信息^[115], 目前主要在前两个领域迅速发展, 包括“国际人类表型组计划”在内的一系列表型组项目在人、一些模式生物以及培育作物等物种上展开^[115], 受到广泛关注^[116~120], 然而在适应性演化领域却鲜有提及。不过随

着人工智能(artificial intelligence)、机器人技术(robotics)、机器视觉(computer vision)和高通量细胞表型筛选(high-content screening)等技术的发展, 表型组学研究已经进入一个新的时代^[121], 系统、全面、多维度地解析生物表型的体系正变得越来越完善, 这对两栖爬行动物适应性进化表型研究是一个机遇, 也将是未来突破表型研究瓶颈的关键领域。

3.2 表型组和基因组的关联分析

随着部分高海拔代表物种基因组和转录组的解析, 分子机制的研究正在经历飞跃式的发展, 一些在两栖爬行动物高海拔适应中发挥作用的新的基因被发掘出来。然而, 两栖爬行动物相比恒温动物而言, 有参考基因组的物种数量很少, 且基因组信息并不完善, 尤其是对两栖动物而言, 许多物种基因组非常大(如高海拔分布的无斑山溪鲵等), 难以解析。三代测序技术的发展, 使得获取高质量且完整的基因组信息将不再困难,

同时大基因组物种的解析也成为可能. 除此之外, 现有研究大都集中在对基因序列层面的研究, 然而从序列到表型中间还有转录、翻译等过程, 仅仅序列上的变异是否能够导致表型的变异并发挥作用尚不可知, 综合基因组、转录组(mRNA, miRNA, lncRNA等)、表观基因组、蛋白组、代谢组等多组学数据的联合分析能够从基因序列以及表达调控的整个网络来解析所研究表型的具体调控机制, 这也是后续解析两栖爬行动物高海拔适应分子机制必不可少的手段.

对于分子机制的研究, 只有实现基因组与表型组的关联分析, 才能有效开展后续的功能分析和验证工作. 然而, 目前表型与分子机制的研究大多各自为体系, 并无交互, 许多已有分子机制研究的结果往往无法对应到相应的表型, 只能停留在基因层面; 而表型组研究的不单是从生物体各个层面获取相关联的表型性状, 更重要的是要为揭示性状调控的分子机制和阐明基因功能提供大数据支持^[122]. 因此, 表型组和基因组的关联分析将是两栖爬行动物高海拔适应性演化后续研究的一个重点. 通过表型组分析来描述关键性状, 并与高分辨率连锁图谱、全基因组关联分析、基因组选择模型等基因组学技术紧密结合^[121], 同时联合其他各类组学(表观基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学和离子组学等)研究数据进行综合分析^[123], 在细胞、器官、群体不同层次上量化分析特定表型的遗传规律, 从而实现对两栖爬行动物适应性演化进行多方位的解释.

3.3 遗传变异的功能分析及实验体系的建立

可信的分子机制的研究离不开功能验证, 爬行动物目前尚没有模式生物, 而两栖动物的模式生物也非常有限, 只有非洲爪蟾一种, 而且该物种与现代蛙类的亲缘关系非常遥远^[41], 以此物种进行相关功能分析

极易受遗传背景差异的干扰; 同时两栖爬行动物的细胞培养对条件要求非常苛刻, 难以形成稳定传代的细胞系, 因此两栖爬行动物相关功能实验一直难以开展. 在两栖爬行动物高海拔适应的研究中, 进行了功能验证的极少, 只有温泉蛇的研究中利用HEK293细胞系进行了功能验证^[40], 但该细胞系来源于人的肾脏, 是否适用于两栖爬行动物的功能验证尚不清楚.

尽管两栖爬行动物功能实验中存在诸多问题, 但功能实验的开展是高海拔适应研究的一个必然趋势. 首先, 通过不同类群或不同地域高海拔两栖爬行动物的比较研究, 筛选一些在高海拔适应中作用范围广(多物种趋同)、可信程度高的基因或者位点. 其次, 在现有条件下, 可以利用已有的成熟细胞系进行一些初步的功能实验, 并在现有模式生物(如非洲爪蟾)上进行一些基因编辑实验, 以此来初步验证相关分子的功能. 考虑到以现有细胞系和模式生物进行功能实验可能存在的弊端, 新的模式体系亟需建立, 应逐步开展野生高海拔物种细胞的培养、活体转染或基因编辑技术. 高山倭蛙和青海沙蜥分别是两栖动物和爬行动物中具代表性的高海拔土著物种, 长期生活在高海拔地区使二者发展出许多的适应性表型, 同时二者都具有较大的海拔跨度和低海拔近缘种, 便于种上和种下水平对高海拔环境适应的研究, 目前二者的基因组信息都已得到解析, 一系列相关的表型和分子研究也取得了不错的进展, 实验室条件下成功开展了个体与细胞水平的培养, 因此高山倭蛙和青海沙蜥有潜力成为研究两栖爬行动物高海拔适应的模式系统. 除此之外, 与非洲爪蟾相比, 高山倭蛙与大部分现生蛙类分化时间短, 便于其他蛙类以此开展适应性演化的功能研究; 而青海沙蜥模式系统一旦建立起来, 将填补爬行动物没有模式生物的空白, 为爬行动物功能分析和研究提供开创性的实验体系.

致谢 感谢中国科学院昆明动物研究所张亚平院士对文章的指导和建议, 陈宏满提供文中世界海拔分布图, 张宝林在资料收集提供宝贵建议, Lotanna Micah Nneji对文中英语的润色, 南京师范大学王可心绘制文中示意图的部分图片. 感谢王凯, 周炜炜, Luciano J. Avila, Daniel Jablonski, Tiffany A. Kosch, Michele Menegon, Honorio I. García, Richard D. Bartlett, Adam G. Clause, Pierre-Yves Vaucher提供的两栖爬行动物照片.

参考文献

- 1 Körner C. The use of 'altitude' in ecological research. *Trends Ecol Evol*, 2007, 22: 569–574
- 2 Dahlback A, Gelsor N, Stamnes J J, et al. UV measurements in the 3000–5000 m altitude region in Tibet. *J Geophys Res*, 2007, 112: D09308

- 3 Norsang G, Kocbach L, Stamnes J, et al. Spatial distribution and temporal variation of solar UV radiation over the Tibetan Plateau. *Appl Phys Res*, 2011, 3: 37–46
- 4 Li W H, Liu Z, Yuan Y D. Molecular Medicine of Plateau (in Chinese). Shanghai: Fudan University Press, 2011. 5–18 [李文华, 刘忠, 袁东亚. 高原分子医学. 上海: 复旦大学出版社, 2011. 5–18]
- 5 Blaustein A R, Belden L K. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. *Evol Dev*, 2002, 5: 89–97
- 6 Ji L D, Qiu Y Q, Xu J, et al. Genetic adaptation of the hypoxia-inducible factor pathway to oxygen pressure among Eurasian human populations. *Mol Biol Evol*, 2012, 29: 3359–3370
- 7 Sun Y B, Fu T T, Jin J Q, et al. Species groups distributed across elevational gradients reveal convergent and continuous genetic adaptation to high elevations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E10634–E10641
- 8 Roll U, Feldman A, Novosolov M, et al. The global distribution of tetrapods reveals a need for targeted reptile conservation. *Nat Ecol Evol*, 2017, 1: 1677–1682
- 9 Navas C A. Patterns of distribution of anurans in high Andean tropical elevations: Insights from integrating biogeography and evolutionary physiology. *Integr Comp Biol*, 2006, 46: 82–91
- 10 Navas C A. Herpetological diversity along Andean elevational gradients: Links with physiological ecology and evolutionary physiology. *Comp Biochem Physiol Part A-Mol Integr Physiol*, 2002, 133: 469–485
- 11 Zhao E M, Zhao K T, Zhou K Y, et al. Fauna Sinica—Reptilia Vol. 2: Squamata, Lacertilia (in Chinese). Beijing: Science Press, 1999. 1–379 [赵尔宓, 赵肯堂, 周开亚, 等. 中国动物志-爬行纲(第二卷): 有鳞目 蜥蜴亚目. 北京: 科学出版社, 1999. 1–379]
- 12 Hodges W L. Evolution of viviparity in horned lizards (*Phrynosoma*): Testing the cold-climate hypothesis. *J Evol Biol*, 2004, 17: 1230–1237
- 13 Packard G C, Stivers R K. Blood hemoglobin concentration in chorus frogs (*Pseudacris triseriata*): Relationship to body size and altitude. *Am Midland Natist*, 1976, 96: 482–487
- 14 González-Morales J C, Beamonte-Barrientos R, Bastiaans E, et al. A mountain or a plateau? Hematological traits vary nonlinearly with altitude in a highland lizard. *Physiol Biochem Zool*, 2017, 90: 638–645
- 15 Bouazza A, Slimani T, El Mouden H, et al. Thermal constraints and the influence of reproduction on thermoregulation in a high-altitude gecko (*Quedenfeldtia trachyblepharus*). *J Zool*, 2016, 300: 36–44
- 16 Reguera S, Zamora-Camacho F J, Moreno-Rueda G. The lizard *Psammmodromus algirus* (Squamata: Lacertidae) is darker at high altitudes. *Biol J Linn Soc Lond*, 2014, 112: 132–141
- 17 IUCN. The IUCN red list of threatened species. Version 2018-1. 2018. Available at <<http://www.Iucnredlist.Org>>
- 18 Zhu L, Liao P, Tong H, et al. The complete mitochondrial genome of the subspecies, *Phrynocephalus erythrurus parva* (Reptilia, Squamata, Agamidae), a toad-headed lizard dwell at highest elevations of any reptile in the world. *Mitochondrial DNA*, 2016, 27: 703–704
- 19 Uetz P, Freed P, Hošek J, et al. The reptile database. 2018. Available at <<http://www.Reptile-database.Org>>
- 20 Che J, Zhou W W, Hu J S, et al. Spiny frogs (Paini) illuminate the history of the Himalayan region and Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 13765–13770
- 21 Hutchison V H, Haines H B, Engbretson G. Aquatic life at high altitude: Respiratory adaptations in the lake titicaca frog, *Telmatobius culeus*. *Respir Physiol*, 1976, 27: 115–129
- 22 He J, Xiu M, Tang X, et al. The different mechanisms of hypoxic acclimatization and adaptation in lizard *Phrynocephalus vlangalii* living on Qinghai-Tibet Plateau. *J Exp Zool*, 2013, 319: 117–123
- 23 González-Morales J C, Quintana E, Díaz-Albiter H, et al. Is erythrocyte size a strategy to avoid hypoxia in Wiegmann's Torquate Lizards (*Sceloporus torquatus*)? Field evidence. *Can J Zool*, 2015, 93: 377–382
- 24 Lu S, Xin Y, Tang X, et al. Differences in hematological traits between high- and low-altitude lizards (genus *Phrynocephalus*). *PLoS ONE*, 2015, 10: e0125751
- 25 Ostojic H, Monge C, Cifuentes V. Hemoglobin affinity for oxygen in three subspecies of toads (*Bufo sp.*) living at different altitudes. *Biol Res*, 2000, 33: 5–10
- 26 Leaché A D, Helmer D S, Moritz C. Phenotypic evolution in high-elevation populations of western fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) in the Sierra Nevada mountains. *Biol J Linn Soc*, 2010, 100: 630–641
- 27 Carothers J H, Marquet P A, Jaksic F M. Thermal ecology of a *Liolaemus* lizard assemblage along and Andean altitudinal gradient in Chile. *Rev Chil Hist Nat*, 1998, 71: 39–50

- 28 Schulte II J, Macey J R, Espinoza R E, et al. Phylogenetic relationships in the iguanid lizard genus *Liolaemus*: Multiple origins of viviparous reproduction and evidence for recurring Andean vicariance and dispersal. *Biol J Linnean Soc*, 2008, 69: 75–102
- 29 Huerta-Sánchez E, Degiorgio M, Pagani L, et al. Genetic signatures reveal high-altitude adaptation in a set of Ethiopian populations. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 1877–1888
- 30 Ge R L, Cai Q, Shen Y Y, et al. Draft genome sequence of the Tibetan antelope. *Nat Commun*, 2013, 4: 1858
- 31 Bigham A W, Wilson M J, Julian C G, et al. Andean and Tibetan patterns of adaptation to high altitude. *Am J Hum Biol*, 2013, 25: 190–197
- 32 Qiu Q, Zhang G, Ma T, et al. The yak genome and adaptation to life at high altitude. *Nat Genet*, 2012, 44: 946–949
- 33 Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E, et al. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science*, 2010, 329: 75–78
- 34 Simonson T S, Yang Y, Huff C D, et al. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet. *Science*, 2010, 329: 72–75
- 35 Bigham A W, Mao X, Mei R, et al. Identifying positive selection candidate loci for high-altitude adaptation in Andean populations. *Hum Genomics*, 2009, 4: 79
- 36 Yang W, Qi Y, Bi K, et al. Toward understanding the genetic basis of adaptation to high-elevation life in poikilothermic species: A comparative transcriptomic analysis of two ranid frogs, *Rana chensinensis* and *R. kukunoris*. *BMC Genomics*, 2012, 13: 588
- 37 Yang W, Qi Y, Fu J. Exploring the genetic basis of adaptation to high elevations in reptiles: A comparative transcriptome analysis of two toad-headed agamas (genus *Phrynocephalus*). *PLoS ONE*, 2014, 9: e112218
- 38 Yang Y, Wang L, Han J, et al. Comparative transcriptomic analysis revealed adaptation mechanism of *Phrynocephalus erythrurus*, the highest altitude lizard living in the Qinghai-Tibet Plateau. *BMC Evol Biol*, 2015, 15: 101
- 39 Wang G D, Zhang B L, Zhou W W, et al. Selection and environmental adaptation along a path to speciation in the Tibetan frog *Nanorana parkeri*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E5056–E5065
- 40 Li J T, Gao Y D, Xie L, et al. Comparative genomic investigation of high-elevation adaptation in ectothermic snakes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 8406–8411
- 41 Sun Y B, Xiong Z J, Xiang X Y, et al. Whole-genome sequence of the Tibetan frog *Nanorana parkeri* and the comparative evolution of tetrapod genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E1257–E1262
- 42 Frisancho A R. Developmental functional adaptation to high altitude: Review. *Am J Hum Biol*, 2013, 25: 151–168
- 43 Storz J F, Scott G R, Cheviron Z A. Phenotypic plasticity and genetic adaptation to high-altitude hypoxia in vertebrates. *J Exp Biol*, 2010, 213: 4125–4136
- 44 Xin Y. The physiological and biochemical mechanisms of adaptation to hypoxia in *Phrynocephalus erythrurus* (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Lanzhou: Lanzhou University, 2015 [辛英. 红尾沙蜥适应低氧环境的生理和生化机制研究. 博士学位论文. 兰州: 兰州大学, 2015]
- 45 Lu S S. The adaptive mechanism of globin family to high altitude hypoxia in *Phrynocephalus* lizards (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Lanzhou: Lanzhou University, 2017 [鲁松松. 沙蜥属蜥蜴珠蛋白家族高原低氧适应机制的研究. 博士学位论文. 兰州: 兰州大学, 2017]
- 46 Ruiz G, Rosenmann M, Veloso A. Hematologic values and altitudinal distribution of Chilean amphibians. *Arch Biol Med Exp (Santiago)*, 1987, 20: 79–84
- 47 Ruiz G, Rosenmann M, Veloso A. Respiratory and hematological adaptations to high altitude in *Telmatobius* frogs from the Chilean Andes. *Comp Biochem Physiol Part A-Physiol*, 1983, 76: 109–113
- 48 Newlin M E, Ballinger R E. Blood hemoglobin concentration in four species of lizards. *Copeia*, 1976, 1976: 392–394
- 49 Weathers W W, White F N. Hematological observations on populations of the lizard *Sceloporus occidentalis* from sea level and altitude. *Herpetologica*, 1972, 28: 172–175
- 50 Stuart L C. The distributional implications of temperature tolerances and hemoglobin values in the toads *Bufo marinus* (Linnaeus) and *Bufo bocourti* Brocchi. *Copeia*, 1951, 1951: 220–229
- 51 Ruiz G, Rosenmann M, Veloso A. Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Comp Biochem Physiol Part A-Physiol*, 1989, 94: 643–646
- 52 Weber R E, Ostojic H, Fago A, et al. Novel mechanism for high-altitude adaptation in hemoglobin of the Andean frog *Telmatobius peruvianus*. *Am J Physiol-Regulatory Integrative Comp Physiol*, 2002, 283: R1052–R1060
- 53 Vinegar A, Hillyard S D. The effects of altitude on oxygen-binding parameters of the blood of the iguanid lizards, *Sceloporus jarrovi* and

- Sceloporus occidentalis*. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, 1972, 43: 317–320
- 54 Ruiz G, Rosenmann M, Nuñez H. Blood values in South American lizards from high and low altitudes. *Comp Biochem Physiol Part A-Physiol*, 1993, 106: 713–718
 - 55 Xin Y, Tang X, Wang H, et al. Functional characterization and expression analysis of myoglobin in high-altitude lizard *Phrynocephalus erythrurus*. *Comp Biochem Physiol Part B-Biochem Mol Biol*, 2015, 188: 31–36
 - 56 Qi X Z, Yuan Q, Cao X L, et al. Adaptation of the blood of blue sheep (*Pseudois nayaur*) to hypoxic conditions (in Chinese). *J Anhui Agric Sci*, 2013, 41: 3392–3406 [齐新章, 袁琦, 曹兴玲, 等. 岩羊血液对低氧环境的适应特性研究. *安徽农业科学*, 2013, 41: 3392–3406]
 - 57 Rong C, Yan M, Zhen-Zhong B, et al. Cardiac adaptive mechanisms of Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*) at high altitudes. *Am J Vet Res*, 2012, 73: 809–813
 - 58 McCracken K G, Barger C P, Sorenson M D. Phylogenetic and structural analysis of the HbA ($\alpha A/\beta A$) and HbD ($\alpha D/\beta A$) hemoglobin genes in two high-altitude waterfowl from the Himalayas and the Andes: Bar-headed goose (*Anser indicus*) and Andean goose (*Chloephaga melanoptera*). *Mol Phylogenets Evol*, 2010, 56: 649–658
 - 59 Hammond K A, Roth J, Janes D N, et al. Morphological and physiological responses to altitude in deer mice *Peromyscus maniculatus*. *Physiol Biochem Zool*, 1999, 72: 613–622
 - 60 Hepple R T, Agey P J, Hazelwood L, et al. Increased capillarity in leg muscle of finches living at altitude. *J Appl Physiol*, 1998, 85: 1871–1876
 - 61 Jiang J C, Gama R, He M L. A comparison on several hematologic values of yaks on Tibet Plateau at different altitudes. *Acta Veterin Zootech Sin*, 1991, 22: 20–26 [江家椿, 嘎玛仁增, 何玛丽. 不同海拔高度西藏高原牦牛若干血液生理常值的比较. *畜牧兽医学报*, 1991, 22: 20–26]
 - 62 Black C P, Tenney S M, van Kroonenburg M. Oxygen transport during progressive hypoxia in bar-headed geese (*Anser indicus*) acclimatized to sea level and 5600 meters. In: Johannes P, ed. *Proceedings of the Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic*. Berlin: Springer, 1978. 79–83
 - 63 Zhang H, He Y, Cui C, et al. Cross-altitude analysis suggests a turning point at the elevation of 4500 m for polycythemia prevalence in Tibetans. *Am J Hematol*, 2017, 92: E552–E554
 - 64 Erzurum S C, Ghosh S, Janocha A J, et al. Higher blood flow and circulating no products offset high-altitude hypoxia among Tibetans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 17593–17598
 - 65 Gvoždík L. To heat or to save time? Thermoregulation in the lizard *Zootoca vivipara* (Squamata: Lacertidae) in different thermal environments along an altitudinal gradient. *Can J Zool*, 2002, 80: 479–492
 - 66 Carrascal L M, López P, Martín J, et al. Basking and antipredator behaviour in a high altitude lizard: Implications of heat-exchange rate. *Ethology*, 2010, 92: 143–154
 - 67 Yang H, Wang X, Liu X, et al. Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8: 571–583
 - 68 Yang X, Wang Y, Zhang Y, et al. Rich diversity and potency of skin antioxidant peptides revealed a novel molecular basis for high-altitude adaptation of amphibians. *Sci Rep*, 2016, 6: 19866
 - 69 Cope R B, Fabacher D L, Lieske C, et al. Resistance of a lizard (the green anole, *Anolis carolinensis*; polychridae) to ultraviolet radiation-induced immunosuppression. *Photochem Photobiol*, 2007, 74: 46–54
 - 70 Hofer R, Mokri C. Photoprotection in tadpoles of the common frog, *Rana temporaria*. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 2000, 59: 48–53
 - 71 Porter W P, Norris K S. Lizard reflectivity change and its effect on light transmission through body wall. *Science*, 1969, 163: 482–484
 - 72 Jablonski N G, Chaplin G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 8962–8968
 - 73 Brenner M, Hearing V J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *PhotoChem PhotoBiol*, 2007, 84: 539–549
 - 74 Wang H, Wu H, Liu W D, et al. Skin reflectance in the Han and Tibetan nationality in China (in Chinese). *Chin J Dermatol*, 2000, 33: 257–258 [王红, 吴红, 刘维达, 等. 汉族和藏族人群肤色的测定. *中华皮肤科杂志*, 2000, 33: 257–258]
 - 75 Geen M R S, Johnston G R. Coloration affects heating and cooling in three color morphs of the Australian bluetongue lizard, *Tiliqua scincoides*. *J Thermal Biol*, 2014, 43: 54–60
 - 76 Jong P, Gussekloo S, Brakefield P. Differences in thermal balance, body temperature and activity between non-melanic and melanic two-spot ladybird beetles (*Adalia bipunctata*) under controlled conditions. *J Exp Biol*, 1996, 199: 2655
 - 77 Clusella-Trullas S, van Wyk J H, Spotila J R. Thermal melanism in ectotherms. *J Thermal Biol*, 2007, 32: 235–245
 - 78 Jin Y, Tong H, Zhang K. The impact of phenotypic characteristics on thermoregulation in a cold-climate agamid lizard, *Phrynocephalus guinanensis*. *Asian Herpetol Res*, 2016, 7: 210–219

- 79 Jin Y, Liao P. An elevational trend of body size variation in a cold-climate agamid lizard, *Phrynocephalus theobaldi*. *Curr Zool*, 2015, 61: 444–453
- 80 Heath A G. Behavioral thermoregulation in high altitude tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Herpetologica*, 1975, 31: 84–93
- 81 Feder M E. Thermal ecology of neotropical lungless salamanders (Amphibia: Plethodontidae): Environmental temperatures and behavioral responses. *Ecology*, 1982, 63: 1665–1674
- 82 Buckley L B, Miller E F, Kingsolver J G. Ectotherm thermal stress and specialization across altitude and latitude. *Integr Comp Biol*, 2013, 53: 571–581
- 83 Gutiérrez J A, Krenz J D, Ibarguengoytia N R. Effect of altitude on thermal responses of *Liolaemus pictus argentinus* in Argentina. *J Thermal Biol*, 2010, 35: 332–337
- 84 Navas C A. Implications of microhabitat selection and patterns of activity on the thermal ecology of high elevation neotropical anurans. *Oecologia*, 1996, 108: 617–626
- 85 Waltner R C. Altitudinal ecology of *Agama tuberculata* Gray in the western Himalayas. *Univ Kans Mus Nat Hist Misc Publ*, 1991, 83: 1–74
- 86 van Damme R, Bauwens D, Castilla A M, et al. Altitudinal variation of the thermal biology and running performance in the lizard *Podarcis tiliguerta*. *Oecologia*, 1989, 80: 516–524
- 87 Marquet P A, Ortiz J C, Bozinovié F, et al. Ecological aspects of thermoregulation at high altitudes: The case of Andean *Liolaemus* lizards in northern Chile. *Oecologia*, 1989, 81: 16–20
- 88 Li X T, Wang Y, Li M, et al. Comparison of cold hardiness of two toad-headed lizards from different altitudes (in Chinese). *Sichuan J Zool*, 2017, 36: 300–305 [李相涛, 王燕, 李梅, 等. 不同海拔两种沙蜥低温耐受性的比较. *四川动物*, 2017, 36: 300–305]
- 89 von May R, Catenazzi A, Corl A, et al. Divergence of thermal physiological traits in terrestrial breeding frogs along a tropical elevational gradient. *Ecol Evol*, 2017, 7: 3257–3267
- 90 Sunday J M, Bates A E, Kearney M R, et al. Thermal-safety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 5610–5615
- 91 Bernal M H, Lynch J D. Thermal tolerance in anuran embryos with different reproductive modes: Relationship to altitude. *Sci World J*, 2013, 2013: 183212
- 92 Bueter C, Haas A. Living the high life: *Sceloporus malachiticus* from high elevations perform better at extreme temperatures. *Lake Forest College*, 2008, 4: 112–114
- 93 Navas C A. Thermal extremes at high elevations in the Andes: Physiological ecology of frogs. *J Thermal Biol*, 1997, 22: 467–477
- 94 Li X, Wang Y, Lu S, et al. The cold hardiness of *Phrynocephalus erythrurus*, the lizard living at highest altitude in the world. *CryoLetters*, 2017, 38: 216–227
- 95 Niu Y, Wang J, Men S, et al. Urea and plasma ice-nucleating proteins promoted the modest freeze tolerance in Pleske's high altitude frog *Nanorana pleskei*. *J Comp Physiol B*, 2018, 188: 599–610
- 96 Stewart J R, Blackburn D G. Viviparity and placentation in lizards. In: Rheubert J L, Siegel D S, Trauth S E, eds. *Reproductive Biology and Phylogeny of Lizards and Tuatara*. Boca Raton: CRC Press, 2014. 448–563
- 97 Shine R. The evolution of viviparity in reptiles: An ecological analysis. *Biol Reptil*, 1985, 15: 605–694
- 98 Tinkle D W, Gibbons J W. The distribution and evolution of viviparity in reptiles. In: *Museum of Zoology, University of Michigan*. Ann Arbor, MI, 1977
- 99 Weekes H C. On the distribution, habitat and reproductive habits of certain European and Australian snakes and lizards, with particular regard to their adoption of viviparity. *Proc Linn Soc NSW*, 1933, 58: e274
- 100 Mell R. Beiträge zur fauna sinica. IV. Grundzüge einer Öcologie der chinesischen Reptilien und einer herpetologischen Tiergeographie Chinas. Berlin: Walter de Gruyter, 1929
- 101 Wang Z, Lu H L, Ma L, et al. Viviparity in high-altitude phrynocephalus lizards is adaptive because embryos cannot fully develop without maternal thermoregulation. *Oecologia*, 2014, 174: 639–649
- 102 Lambert S M, Wiens J J. Evolution of viviparity: A phylogenetic test of the cold-climate hypothesis in Phrynosomatid lizards. *Evolution*, 2013, 67: 2614–2630
- 103 Pincheira-Donoso D, Jara M, Reaney A, et al. Hypoxia and hypothermia as rival agents of selection driving the evolution of viviparity in lizards. *Glob Ecol Biogeogr*, 2017, 26: 1238–1246

- 104 Fei L, Hu S Q, Ye C Y, et al. Fauna Sinica—Amphibia Vol. 3: Anura (in Chinese). Beijing: Science Press, 2009. 1–953 [费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 中国动物志-两栖纲(下卷): 无尾目. 北京: 科学出版社, 2009. 1–953]
- 105 Zhao E M, Yang D T. Amphibians and Reptiles in Hengduan Mountains (in Chinese). Beijing: Science Press, 1997. 1–303 [赵尔宓, 杨大同. 横断山区两栖爬行动物. 北京: 科学出版社, 1997. 1–303]
- 106 Piccinini M, Kleinschmidt T, Jürgens K D, et al. Primary structure and oxygen-binding properties of the hemoglobin from guanaco (*Lama guanaco*, Tylopoda). *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1990, 371: 641–648
- 107 Bauer C, Rollemma H S, Till H W, et al. Phosphate binding by llama and camel hemoglobin. *J Comp Physiol B*, 1980, 136: 67–70
- 108 Braunitzer G, Schrank B, Stangl A, et al. Regulation of respiration at high altitudes and its molecular interpretation: The sequence of beta-chains of hemoglobins from pig and llama (author's transl). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1977, 358: 921–925
- 109 Ye Y Z. The molecular mechanisms of hypoxia adaptation in lizards: A comparison between the bald's toad-headed agama (*Phrynocephalus theobaldi*) and the steppe toad-headed agama (*Phrynocephalus frontalis*) (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Hanzhou: Hanzhou Normal University, 2016 [叶银子. 蜥蜴低氧适应的分子机制: 西藏沙蜥和草原沙蜥的比较研究. 硕士学位论文. 杭州: 杭州师范大学, 2016]
- 110 Zhang Q, Han X, Ye Y, et al. Expression of HIF-1 α and its target genes in the *Nanorana parkeri* heart: Implications for high altitude adaptation. *Asian Herpetol Res*, 2016, 7: 17–20
- 111 Liedtke H C, Gower D J, Wilkinson M, et al. Macroevolutionary shift in the size of amphibian genomes and the role of life history and climate. *Nat Ecol Evol*, 2018, 2: 1792–1799
- 112 Gao W, Sun Y B, Zhou W W, et al. Genomic and transcriptomic investigations of the evolutionary transition from oviparity to viviparity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 3646–3655
- 113 Yang W, Qi Y, Fu J. Genetic signals of high-altitude adaptation in amphibians: A comparative transcriptome analysis. *BMC Genet*, 2016, 17: 134
- 114 Johannsen W. The genotype conception of heredity. *Int J Epidemiol*, 2014, 43: 989–1000
- 115 Houle D, Govindaraju D R, Omholt S. Phenomics: The next challenge. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 855–866
- 116 Schork N J. Genetics of complex disease: Approaches, problems, and solutions. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156: S103–S109
- 117 Furbank R T, Tester M. Phenomics—Technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends Plant Sci*, 2011, 16: 635–644
- 118 White J W, Andrade-Sanchez P, Gore M A, et al. Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crops Res*, 2012, 133: 101–112
- 119 Burd L, Klug M G, Martsolf J T, et al. Fetal alcohol syndrome: Neuropsychiatric phenomics. *NeuroToxicol Teratology*, 2003, 25: 697–705
- 120 Zbuk K M, Eng C. Cancer phenomics: RET and PTEN as illustrative models. *Nat Rev Cancer*, 2006, 7: 35–45
- 121 Cobb J N, Declerck G, Greenberg A, et al. Next-generation phenotyping: Requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype-phenotype relationships and its relevance to crop improvement. *Theor Appl Genet*, 2013, 126: 867–887
- 122 Cardona A, Tomancak P. Current challenges in open-source bioimage informatics. *Nat Methods*, 2012, 9: 661–665
- 123 Lin E, Lane H Y. Machine learning and systems genomics approaches for multi-omics data. *Biomark Res*, 2017, 5: 2

High-altitude adaptive evolution in amphibians and reptiles: Status and prospect

GAO Wei^{1,2}, FU TingTing^{1,2} & CHE Jing^{1,3}

1 State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2 Kunming College of Life Science, University of Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

3 Center for Excellence in Animal Evolution and Genetics, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China

The study of high-altitude adaptation is pioneering and exemplary work in the field of adaptive evolution in amphibians and reptiles. High-altitude areas often have extreme environmental characteristics, such as low temperature, hypoxia, and strong ultraviolet (UV) radiation, in addition to a complex geological history and unique topography. Therefore, these areas provide a natural laboratory for examining the adaptive evolution of organisms. As representative groups of poikilotherms, amphibians and reptiles are important members of high-altitude fauna; some of them are found as high as 5300 m above sea level. Previous studies have reported that representative species of high-altitude amphibians and reptiles have evolved a series of phenotypic characteristics in physiology, morphology, and life history to adapt to extreme environments. With the development of next-generation sequencing technology, breakthroughs have recently been made in exploring the molecular mechanisms of high-altitude adaptation at the genomic level. In particular, complete genomes of representative amphibians and reptiles in the Qinghai-Tibet Plateau have been elucidated, leading to a better understanding of poikilotherm adaptive evolution. In this study, we investigated and summarized results of phenotypic studies on high-altitude adaptation in amphibians and reptiles, focusing on the analysis and discussion of molecular mechanisms. We believe that several study fields should, therefore, focus on the (i) establishment of phenomics, (ii) association analysis of phenomics and genomics, (iii) functional analysis of genetic variation, and (iv) establishment of experimental systems.

amphibian, reptile, high-altitude adaptation, poikilotherm, phenomics, genomics

doi: [10.1360/N052018-00216](https://doi.org/10.1360/N052018-00216)