

文章编号: 1674-5566(2025)01-0012-13

DOI: 10.12024/jsou.20241004664

鱼类耐低温的组织、细胞与分子机制及其育种应用进展

周艳, 李若汐, 吕欣怡, 张思远

(上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 低温严重影响温水和热水性鱼类的生长、繁殖和抗病等生命活动。随着气候变化, 低温对鱼类生理活动的影响日益增大, 研究鱼类耐低温的分子机制对水产养殖和渔业资源的可持续发展至关重要。本文从鱼类耐低温的生理生化基础、鱼类响应低温信号的分子通路和鱼类低温相关的遗传分析3个方面对鱼类耐低温的组织细胞及分子机制进行了综述。在面对寒冷环境时, 鱼类会通过改变脂肪酸组成、增强抗氧化酶的活性等方式来保护细胞免受低温损伤, 从而应对低温带来的压力。同时, 鱼类响应低温的分子机制涉及多个信号通路, 这些通路的激活和抑制与鱼类的耐低温能力密切相关。鱼类耐低温的分子机制研究在水产育种中具有重要应用, 随着基因组学技术的进步, 鱼类耐低温的分子基础逐渐被揭示。基因标记选择技术和基因组学分析为筛选低温耐受相关基因提供了重要工具, 帮助推进耐寒鱼种的培育。这些研究不仅有助于理解鱼类如何适应环境变化, 还将为水产行业应对气候变化、提高养殖效率开辟新的路径。

关键词: 鱼类; 耐低温; 分子机制; 育种

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

鱼类作为变温动物, 温度是影响其生长、繁殖、抗病等生命活动的重要环境因素。根据自然栖息地水温的波动范围, 鱼类通常分为冷水性、温水和热水性物种^[1]。冷水鱼类通常在高于25℃的环境中难以正常生长; 温水鱼类则通常在16℃以下的环境中停止繁殖, 并且在环境温度低于10℃时停止生长。而热水性鱼类一般会在温度低于10℃时死亡, 同时, 大多数情况下, 其生长速度在温度低于25℃的环境中会变缓^[2]。每种类型的鱼类对温度的要求和适应力都各不相同, 一般将鱼类对冰点以上低温的适应能力称为耐寒性(Cold tolerance), 如常见的冷水性及少数的广温性鱼类具有较强的耐寒性; 鱼类对冰点以下低温的适应能力称为耐冻性(Freezing tolerance), 如生活在南极-1~2℃水域的南极鱼, 适应严寒环境的能力极强。

中国作为一个水产养殖大国, 2023年全国水产品总产量为7 116.17万t, 其中人工水产养殖产量为5 809.61万t, 占总产量的81.6%^[3]。国内水产养殖大多数依赖于河流、池塘和湖泊等天然水

体, 工厂化养殖程度低, 低温是影响温水和热水性鱼类养殖的主要逆境因子。低温不仅会妨碍水产动物的正常生长和发育, 也会对水产养殖品种的地域分布和产量造成限制, 被列为我国水产养殖中的主要自然灾害之一, 同时它也是水产养殖引种的一个重要障碍。因此, 揭示鱼类耐寒的生理生化基础和耐寒相关分子信号通路, 阐明鱼类耐寒的作用机理, 对鱼类耐寒育种具有重要意义。

1 鱼类耐低温的生理生化基础

1.1 细胞膜中不饱和脂肪酸含量与低温适应的相关性

低温会引起活细胞膜脂物理性质的改变, 膜结构的生理适应能力不同是造成鱼类温度适应能力差异的一个重要原因^[4]。细胞膜中存在的饱和脂肪酸能够增加低温情况下膜的流动性^[5]。南极鱼科(Nototheniidae)的肌肉细胞膜中具有比温带鱼更高比例的不饱和脂肪酸, 这使得南极鱼在0℃以下的环境中能保持较好的膜流动性, 以

收稿日期: 2024-10-20 修回日期: 2024-12-13

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(32130109)

作者简介: 周艳(1983—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为鱼类学。E-mail: y_zhou@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

维持其正常生理功能^[6]。南极鱼作为典型冷水狭温性鱼类, BIEDERMAN 等^[7]通过荧光去偏振法对革首南极鱼(*Notothenia coriiceps*)和南极冰鱼科(Channichthyidae)鱼类的线粒体膜流动性进行量化后发现,生存在较寒冷环境中的南极冰鱼比生存在较高温度范围内的革首南极鱼含有更高比例的不饱和脂肪酸,膜的流动性也更强。

同时,冷水鱼质膜在低温环境中的适应性调节能力也更强。鲤(*Cyprinus carpio*)在早期发育过程中就能够根据外界温度对膜流动性进行调控,而在成年鲤体内,红血球和神经元细胞均可以根据温度的变化改变外膜的流动性^[8]。虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)头肾白细胞的膜流动性与环境水温呈线性关系,在环境温度降低之后,细胞膜流动性增加。出现该现象的原因是,随着环境水温的下降,头肾白细胞脂类中饱和脂肪酸含量降低,而多不饱和脂肪酸含量增加。尤其在环境温度突然下降之后,这种反应的变化程度更为显著^[9]。

在遭遇快速低温时,广温性鱼类相较于热水性的鱼类表现出更强的膜结构可塑性。当水温从 25 °C 降到 10 °C 时,广温性的草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)与热水性的鲮(*Cirrhinus molitorella*)相比,前者的肌肉细胞线粒体膜不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸明显升高,脂肽链平均长度也从 25 °C 时的 19.08 个碳原子增加到 10 °C 时的 20.46 个碳原子;而鲮的脂肪酸组成在不同处理温度下的变化并不明显^[10]。

此外,提高饲料中不饱和脂肪酸的含量也可以提高鱼类的耐寒性。KELLY 等^[11]研究发现,不饱和脂肪酸含量高的饲料喂养的白鲈鱼(*Morone chrysops*)耐寒性最强。以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为对象进行的相关实验也证实了饲料中的不饱和脂肪酸含量会对耐寒性造成影响。ABDEL-GHANY 等^[12]使用脂质来源不同的混合饲料对尼罗罗非鱼进行低温饲养,其中使用由玉米油和鱼油/玉米油混合物组成的混合饲料喂养的鱼具有更高的体内不饱和脂肪酸含量,也呈现出更低的致死温度。

综上所述,不饱和脂肪酸在鱼类对温度变化的适应过程中起到不可或缺的作用。在低温环境下生存鱼类体内通常含有更高比例的不饱和脂肪酸,而增加饲料中不饱和脂肪酸含量可以

提升鱼类的耐寒性。

1.2 活性氧清除效率对低温适应的影响

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是细胞代谢异常时产生的一类具有高度活性的物质,正常情况下 ROS 含量在机体内保持平衡。但在受到冷刺激时会逐渐累积。ROS 水平过高,将会导致细胞发生损伤,致使细胞凋亡^[13]。生物体为了抵抗这种外界环境胁迫,在长期进化过程中,形成了包括非酶促反应和酶促反应的抗氧化系统,以提高 ROS 清除效率^[14]。

鱼类在遭遇低温损伤时,细胞会通过非酶促反应抗氧化系统进行生理调控。北海绵鲷(*Zoarces viviparus*)在遭受短时间低温胁迫后,肝脏中还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)显著升高^[15]。对北海绵鲷和生活在极地的短头壮绵鲷(*Pachycara brachycephalum*)在 6 °C 和 0 °C 条件下进行低温胁迫,二者均产生脂质自由基,但短头壮绵鲷的脂质过氧化程度更低, GSH 水平约为北海绵鲷的两倍。显然,短头壮绵鲷在较低生存温度下通过保持足够高强度的氧化防御机制,避免氧化损伤产物的积累^[16]。热带鱼中的七彩神仙鱼(*Symphysodon aequifasciatus*)在 20 °C 的低温下培育 30 d 后,传统生化检测和气相色谱-飞行时间质谱(Gas Chromatography time-of-flight mass spectrometry metabolomics, GC-TOFMS)组学分析结果显示,体内活性氧的产生增加,还原型 GSH 的水平提高,但过氧化的标志产物丙二醛含量没有增加。这一结果表明 GSH 含量上调能够更有效地清除 ROS,减少有害物质的积累,从而降低细胞损伤,维持机体的正常生长发育^[17]。

此外,短时间内的冷刺激也会使酶促反应抗氧化系统产生响应,促使抗氧化酶活性增加,影响代谢物质水平。以黄鲈鱼(*Perca flavescens*)为材料进行的实验中,分别在 9 °C 和 28 °C 下对鱼进行为期 7 周的培育。对培育完成后的细胞进行分析,与 28 °C 相比,9 °C 时的肌肉细胞内以过氧化氢酶为代表的抗氧化酶活性均大幅提高;而 9 °C 时的丙二醛浓度与 28 °C 时的浓度无明显差距。表明在寒冷条件下,抗氧化酶活性上调,对维持正常的生理活动有着积极作用^[18]。

低温引发体内 ROS 含量升高在以斑马鱼(*Danio rerio*)^[19-21]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis*

niloticus)^[22-23]和青鳉鱼(*Oryzias latipes*)^[24]为研究对象的报道中也有相关的实验信息可以佐证。在针对斑马鱼细胞的冷驯化实验中,低温环境对其ROS水平也产生了相似的影响。应激组在18℃低温应激4 d后转移到更低温度(13℃)下培养5 d,结果细胞活力下降,细胞骨架出现萎缩,与此同时ROS含量增加。而在18℃下低温生存3个月后的驯化组,细胞活力与对照组(28℃培养的细胞)相比表现无异常且细胞骨架维持正常状态,并且在13℃下培育5 d后ROS水平相较于应激组更低,细胞凋亡数也低于应激组^[19]。此外,在本实验室对低温刺激下的斑马鱼卵巢进行组学分析后发现^[25],斑马鱼卵巢在低温刺激下雄性激素含量显著增加,抗过氧化分子减少,同时ROS含量升高,导致脂质和蛋白质分解产物显著增加,使得雌性斑马鱼在低温下的生育能力显著下降。

在TSENG等^[26]的研究中,斑马鱼在冷暴露(从28℃降至18℃)后的6 h内,超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的比活力增加了约60%,冷暴露24 h后过氧化氢酶(Catalase, CAT)的mRNA水平上调90%。这一上调现象有助于减少氧化损伤,维持斑马鱼大脑的代谢平衡和细胞稳态。而尼罗罗非鱼在不同温度(20、16、12和10℃)下进行培养,随着温度的降低,脾脏黄嘌呤氧化酶的活性降低,而过氧化物酶活性显著增加,ROS水平明显上调,死亡率也随之上升,这一结果表明低温条件下罗非鱼昏迷和死亡现象与ROS水平相关^[22]。HU等在不同低温下(10℃, 4℃)对青鳉鱼的鳃组织进行研究,以适宜温度(26℃)为对照,培育12 h后对鳃细胞内所含ROS的MFI(Mean fluorescence intensity)值进行测量,与对照组相比,10℃组青鳉鳃细胞ROS的MFI明显上调,4℃组青鳉鳃细胞ROS的MFI则极显著上升^[24]。并且,对鳃细胞凋亡情况进行检测的结果显示,10℃组鳃细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$),而4℃组鳃细胞凋亡率极显著升高($P < 0.01$)。这表明,低温胁迫引起青鳉鳃细胞ROS含量的积累会对细胞造成损伤甚至导致细胞凋亡。

综上所述,短期的冷应激会导致ROS过度产生从而破坏机体的生理平衡,对细胞产生不可逆的损伤,甚至致使细胞凋亡。而长期的冷驯化可

以使细胞的ROS水平维持在较低的范围,从而提高细胞的低温耐受性。

1.3 细胞骨架体系对低温的适应性变化

在低温条件下,细胞的结构蛋白也会受到影响。微管和微管相关蛋白(Microtubule associated proteins, MAPS)作为细胞的重要组成部分,在正常生理活动中起到重要的功能作用^[27]。同时,微管也是细胞中对低温最敏感的结构之一,低温环境会降低微管蛋白的稳定性,从而对细胞骨架造成破坏^[28]。

生活在较高恒温环境下的热带鱼经历低温时,其细胞内的微管易受到低温影响而解聚,而南极鱼类在面临相同低温条件时,细胞内微管仍能够保持结构的完整性。博氏南冰鳕(*Pagothenia borchgrevinki*)分布于南极海域,这种鱼的皮肤黑色素细胞能对肾上腺素和茶碱作出快速反应,通过微管运动使黑色素体聚集或分散。即使在温度为0℃以下的寒冷环境中,黑色素体仍能正常运动。结果表明,这种鱼的微管系统具有抵御低温逆境的能力,能够维持黑色素细胞的正常生理功能^[29]。

此外,生活在极地水域的鱼类,细胞中的微管蛋白存在氨基酸替换,使微管在低温下可以有效聚合和组装,降低微管的动态不稳定性^[30]。对革首南极鱼和驼背鲷南极鱼(*Gobionothens gibberifrons*)大脑细胞中微管蛋白进行多肽和cDNA分析,并与其他脊椎动物的神经微管蛋白进行对比,发现南极鱼大脑的Ⅱ类β微管蛋白亚型含有7个特殊的氨基酸替换和1个位于主序列446位的新插入残基。微管组装过程中局部结构的灵活性因此提高,有利于微管蛋白的构象稳定,促进微管的聚合。由此可以得出,微管的冷稳定性与鱼类的抗寒性呈正相关,冷水性鱼类会产生特定的补偿机制使得微管组装速率适应低温,防止微管蛋白解聚^[31]。

2 鱼类响应低温信号的分子通路

鱼类所处的环境温度常随季节变更而发生波动,鱼类可以小幅调节自己的基因表达来应对这些变化。当温度适宜、食物充足时,鱼类基因表达模式处于“功能态”,即有利于合成反应的进行,促进细胞增殖和个体生长;而当面临极端温度或者食物短缺时,鱼类进入另外一种“防御态”

模式,此时鱼类减少合成反应以降低消耗,同时增加对逆境的抵抗能力,最大程度地保持生命力。总的来说,有5条主要的分子信号通路涉及鱼类由“功能态”向“防御态”的转变。

2.1 胰岛素/类胰岛素生长因子(INS/IGF-1)信号通路

在温度适宜与营养充足时,鱼类因为食欲旺盛,所以胰腺会分泌较多的胰岛素(Insulin, INS)或类胰岛素生长因子(Insulin-like Growth Factor-1, IGF-1),加快新陈代谢,促进鱼类的生长和繁殖。同时,细胞内的叉头蛋白转录因子(Forkhead box O, FoxO)将会被磷酸化,失去其原有的转录因子作用。FoxO蛋白本是动物抵抗逆境的“主控开关”,能够增强动物抵抗不利环境的能力。对FoxO蛋白进行抑制会使得动物应对

逆境的能力降低,进而致使寿命缩短^[32]。

当遭遇低温时,INS和IGF-1的分泌均减少,而FoxO蛋白受到的抑制作用被解除,鱼类进入对抗逆境状态,抵抗低温胁迫的能力增强。HU等^[33]报道热带尼罗罗非鱼和相对广温的热带斑马鱼在温度从28℃降到8℃后,二者鳃组织在降温前后的基因表达出现明显差异,这种差异首先出现在胰岛素途径(Insulin pathway)和代谢途径(Metabolism pathways)。当温度在8℃的条件下持续停留6h后,二者差异表达的基因包含嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism)和凋亡(Apoptosis)过程。在持续停留12h的过程中,二者差异表达基因则主要集中在FoxO信号途径(图1)^[33]。通过FoxO信号传导形成级联信号,调控免疫反应、DNA修复、细胞周期和自噬等生物学过程。

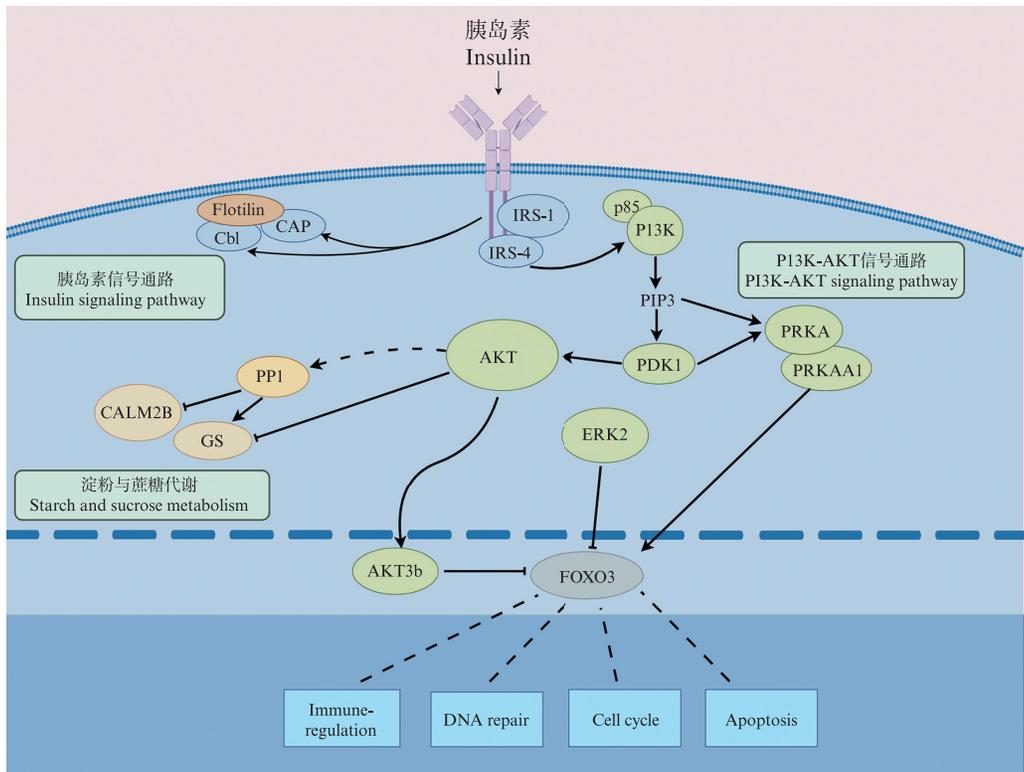


图1 胰岛素/类胰岛素生长因子信号通路作用机制
Fig. 1 Mechanism of INS/IGF-1 pathway

此外,对松浦镜鲤(*Cyprinus carpio*)和大头鲤(*Cyprinus pellegrini*)进行的耐寒实验发现^[34],松浦镜鲤的耐寒能力以及对寒冷的适应能力要明显强于大头鲤。KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析的结果显示,FoxO相关信号通路是导致两种鲤耐寒性和适应性差异

的主要因素,当FoxO信号通路中的关键蛋白受到抑制而失活时,松浦镜鲤的耐寒能力显著下降。

综上,INS/IGF-1信号通路可能是鱼类响应低温胁迫时较早启动的分子信号通路,随后启动上调FoxO信号途径,有利于鱼类抵抗逆境,提高寒冷下的存活率。

2.2 雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路

雷帕霉素(Rapamycin)是细菌分泌出来对抗真菌的物质。哺乳动物细胞中,与雷帕霉素结合的蛋白被称为雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR),它作为一种蛋白激酶,可以使靶蛋白分子发生磷酸化实现对其功能进行调节。mTOR的主要作用是促进体内合成反应,有利于生长和繁殖,但不利于对抗逆境。

mTOR可以使细胞合成更多的核糖体,同时也能够活化核糖体蛋白S6激酶(Ribosomal protein S6 Kinase, S6K),这种激酶可使核糖体中S6蛋白磷酸化。S6蛋白被磷酸化后可以促使核糖体合成更多的蛋白质,加快细胞中蛋白质的新陈代谢速度,并且还能抑制自噬作用。LU等^[35]通过在饲料中添加药物雷帕霉素喂养斑马鱼,使得mTOR信号通路受到抑制。结果表明,在冷应激情况下S6蛋白水平下降,与细胞自噬活性呈负相关的p62蛋白量减少,细胞存活率提高,有效地提高了斑马鱼的耐寒性。此外,MANOR等^[36]对虹鳟鱼进行的实验证明,mTOR辅助因子的高表达量能促使脂肪酸合成基因的表达增加,mTOR的表达量升高使得脂肪酸动员得到增强,进而对鱼类的抗逆产生不利作用,削弱鱼类的抗寒能力。

综上,在低温情况下,抑制mTOR信号通路的表达,阻碍其相关的脂肪酸合成和自噬调控作用,有利于鱼类抵抗逆境,而雷帕霉素可以通过与mTOR结合达到这一目的,为后续研究提供思路。

2.3 AKT信号通路

AKT(Protein kinase B)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶。AKT信号通路激活后磷酸化多种酶,促进细胞内糖原的合成,同时激活脂肪酸的合成。活化的AKT也会对FoxO蛋白产生抑制作用,激活mTOR信号途径,增加能量消耗,降低鱼类对低温的抵抗能力^[37]。

当鱼类处于低温环境中,为了维持血糖的稳定以及降低细胞中能量消耗,AKT信号通路通常受到抑制,AKT蛋白的合成减少,葡萄糖向细胞内转运的过程受到抑制。本实验室前期进行了不同适应温度范围内鱼类的耐低温实验^[38],实验鱼类依次为广温性草鱼(0~38℃)、较广温的斑马

鱼(6~30℃)和热带尼罗罗非鱼(12~36℃)。在36h内,当温度由28℃下降至8℃,此时观察草鱼鳃组织中磷酸化的AKT蛋白(AKT-473 Ser-p)表达量大幅减少,8℃时表达量约为28℃时表达量的1/7;斑马鱼鳃中减少幅度较小,约为降温前的1/3。而罗非鱼中不仅没有减少,降温后还明显增加(图2)^[38]。

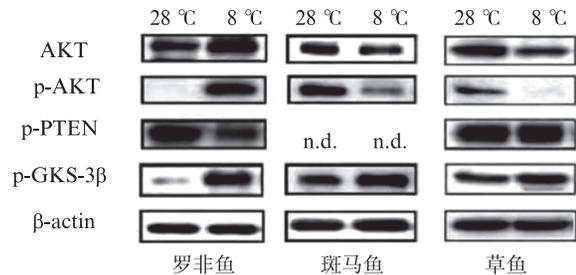


图2 罗非鱼、斑马鱼和草鱼蛋白表达情况

Fig. 2 Protein expression of tilapia, zebrafish and grass carp

AKT-473 Ser-p是AKT的一种激活形式,它能够抑制糖原合成酶激酶3(Glycogen synthase kinase-3, GSK3)的表达,而GSK3主要作用是通过磷酸化抑制糖原合成酶(Glycogen synthase, GS)的功能,后者可以促进细胞内糖原的合成。当AKT-473 Ser-p表达量下降时,GSK3的表达上升,从而抑制GS的功能,最终呈现为细胞内糖原合成量下降,能量储存减少,有利于鱼类对低温逆境的抵抗作用(图2);而热带鱼在面对低温情况时体内的AKT蛋白表达量增加,使得其在低温状态下的抵抗逆境能力弱于广温性鱼类。

2.4 AMPK信号通路的调节作用

除了以上3条主要的信号通路外,还存在其他的信号通路共同参与对鱼类抗寒能力的调控以及合成代谢的影响作用。当食物不足时,动物细胞内ATP的合成减少,同时ATP继续分解为ADP和AMP,二者作用使得AMP/ATP或者ADP/ATP上升,从而激活依赖AMP的蛋白激酶(AMP-dependent protein kinase, AMPK)信号。AMPK信号通路被激活后,增加ATP的合成,减少ATP的消耗。同时AMPK相关基因的表达还能够活化“长寿蛋白”FoxO,并抑制mTOR信号通路,增加细胞在逆境中的生存能力(图3)^[39]。

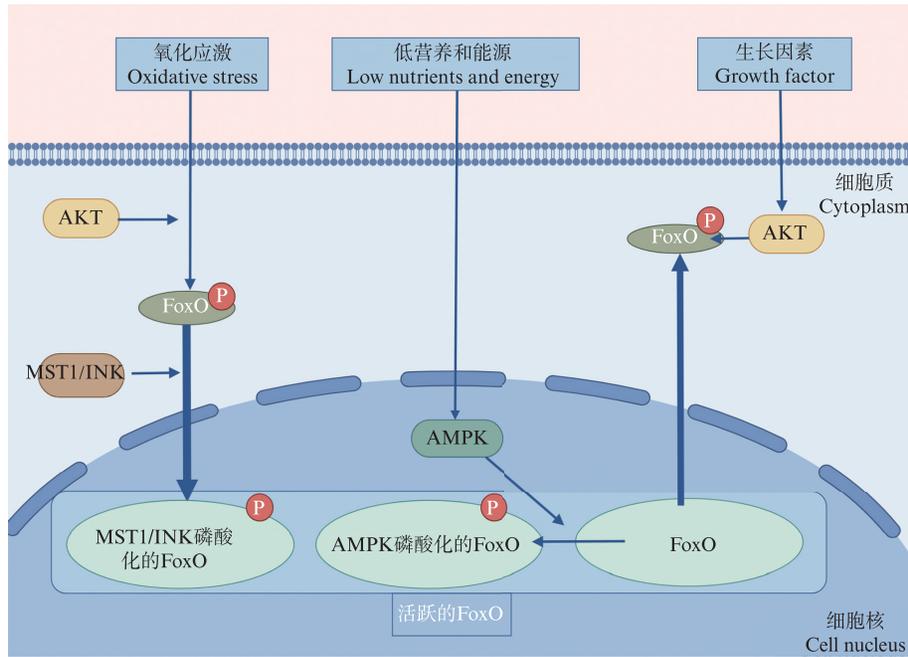


图3 AMPK 信号通路作用机制
 Fig. 3 Mechanism of AMPK pathway

在 BREMER 等^[40]以金鱼 (*Carassius auratus*) 为实验对象进行的耐低温实验中, 金鱼对外界的冷适应过程中引起 AMPK 磷酸化减少, 对逆境的抵抗力下降, 死亡率上升。另外, 使用 AMPK 激活剂 AICAR (Acadesine) 对斑马鱼胚胎细胞进行处理, 在低温条件下 AMPK 的磷酸化增加, 促进该信号通路的信息传递, 并使得 AMPK 靶点 mTOR 受到抑制, 转录水平降低, 抑制相关生物合成过程, 这使得斑马鱼细胞在低温下的存活率升高。

综上, AMPK 信号通路的磷酸化激活, 对鱼类的抗寒性提升具有积极作用。该信号通路激活后, 能够对正向调控补充 ATP 的生理过程, 并对消耗 ATP 的 mTOR 信号通路等代谢过程产生抑制作用, 有助于鱼类对寒冷环境的抵御。

2.5 MAPK 信号通路

促分裂素原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路是真核生物信号传递网络中的重要途径之一, 在细胞增殖、分化和凋亡以及应激反应过程中起到重要作用。该信号通路为级联磷酸化的过程, 核心成员包括: MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)、MAP kinase kinase (MAPKK) 和 MAP Kinase (MAPK)。

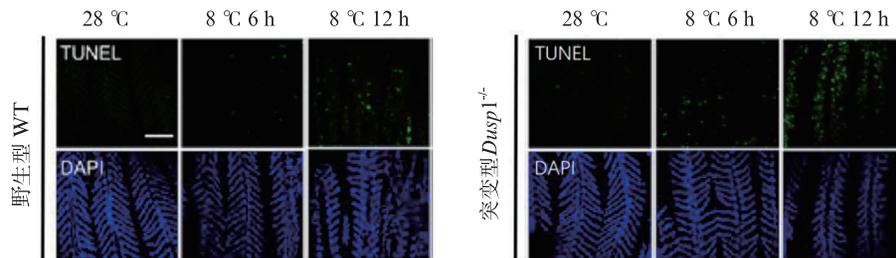
MAPK 信号通路除了参与细胞增殖与分化, 与环境压力大小也密切相关。当环境压力过大时, MAPK 信号通路被激活, 对细胞代谢进行调

控。一项关于温度梯度 (25、19 和 13 °C) 和时间梯度 (0、6、24 和 96 h) 在暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 骨骼肌的组织形态和生理状态方面产生影响的研究^[41]显示, 低温对肌肉的微观结构造成破坏, 抗氧化酶活性增加, 同时 MAPK 被有丝分裂原激活后参与脂肪生成相关基因的表达调控, 促进脂肪分解过程。通过脂质组学进行分析, 显示暗纹东方鲀体内磷脂代谢物在冷胁迫下增加, 对细胞膜进行弥补使其维持完整性。这项研究表明, 暗纹东方鲀可能通过 MAPK 调整脂肪代谢以补偿低温造成的肌肉细胞膜损伤, 从而降低细胞死亡率。

此外, 双特异性磷酸酶 1 (Dual-specificity Phosphatase 1, DUSP1) 作为 MAPK 信号途径的重要一员, 能够特异性地使 MAPK 家族中的 3 个主要亚族——ERK1/2、JNK 和 P38 去磷酸化而失活^[42]。在之前的研究中, 将伯氏肩孔南极鱼 (*Trematomus bernacchii*) 的 *Dusp1* 基因通过同源重组的途径构建重组质粒并转染至人胚肾 293T 细胞 (HEK293T) 中, 以转入空载质粒的 HEK293T 为对照组, 在低温环境下进行培养^[43]。结果表明, 受到低温胁迫时, 与对照组相比, *Dusp1* 基因过表达使细胞中 ROS 的含量和细胞凋亡率显著下调, 并对凋亡基因的表达产生抑制, 减少细胞的低温受损情况。

目前,本实验室通过 CRISPR-Cas9 技术构建了 *Dusp1* 基因敲除的斑马鱼,将其与野生型在相同的低温环境下进行培育,以研究该基因与鱼类耐低温能力的关系,结果发现 *Dusp1* 基因的缺失使得鳃组织细胞内 ROS 的生成量增加和细胞凋亡率上升^[44]。在正常温度下,突变型斑马鱼细胞内的 ROS 水平与野生型差距并不明显。但在冷刺激(8 °C、12 h)条件下,突变型产生的 ROS 量远

高于野生型,细胞凋亡数上调,对低温胁迫的抵抗能力降低。并且,对突变型斑马鱼细胞内受 *Dusp1* 特异性去磷酸化的 3 种激酶(ERK1/2, JNK, P38)表达水平进行检测后发现,P38 和 ERK1/2 的磷酸化形式含量显著升高,表明该基因的缺失会促使 MAPK/P38 和 MAPK/ERK1/2 通路表达下调(图 4)^[44],对细胞增殖和细胞凋亡过程产生显著影响。



TUNEL. 原位末端标记法;DAPI. 苯基吡啶染色法。

TUNEL. the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling method;DAPI. the 4',6-diamidino-2-phenylindole staining method.

图 4 野生型与突变型斑马鱼细胞凋亡情况对比

Fig. 4 Comparison of apoptosis in WT (Wild type) and *Dusp1*^{-/-} zebrafish

3 低温相关的遗传分析

3.1 鱼类与低温耐受相关位点的遗传定位

近几年在鱼类抵御寒冷方面的遗传研究已取得了一定进展,对鱼类的抗寒基因进行遗传定位成为目前国内外研究的重点方向之一。虎皮鱼(*Puntius tetrazona*)作为重要的养殖品种,LIU 等^[45]通过全基因组重测序构建了该鱼种的高密度遗传连锁图谱,包含分布在 22 个连锁组(Linkage groups, LGs)的 4 416 个标记基因。在该图谱基础上,进行数量性状基因座(Quantitative trait locus, QTL)分析的结果表明,在 6 个 LGs 中有 8 个 QTLs 与虎皮鱼抗寒能力显著相关。

在对罗非鱼的抗寒位点进行研究时,CNAANI 等^[46]使用 QTL 定位技术,在莫桑比克和奥利亚罗非鱼杂交 F₂ 群体(*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis aureus*)中寻找简单重复序列(Simple sequence repeats, SSR)标记与耐寒性相关基因之间存在的遗传联系,对来自两个家族的 60 条和 114 条鱼体进行全基因组 SSR 扫描。结果发现,在这两个家族同一连锁群上存在 1 个与耐寒性相关联的 QTL,位于 SSR 标记 UNH879 附近。此外,UNH130、UNH180 和 UNH907 也与罗非鱼的低温生存能力有一定相关性。MOEN 等^[47]为了寻找罗

非鱼耐寒性状的 QTL,选择父本为伽利略罗非鱼(*Sarotherodon galilaeus*)与尼罗罗非鱼杂交后代、母本为莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)与奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)杂交后代的 F₂ 杂交群体为实验对象,在该 F₂ 杂交群体中进行全基因组扫描,完成了对特定性别的连锁图构建,发现了多个与抗寒性状显著相关的标记基因并进行了测试,最终找到了 1 个与耐寒性相关的 QTL,位于 UNH130 附近。而 AI 研究吉富罗非鱼(Genetically improved farmed tilapia, GIFT)时选择使用以 ddRAD-seq(Double digest restriction-site associated sequencing)为基础的 QTL 图谱^[48],在所选用的 GIFT 全同系家族中发现了 1 个全基因组 QTL 定位区域,与耐寒性状的表现显著相关。该定位区域位于 chrLG18,并且研究人员在这个区间内成功扫描得到 6 对微卫星标记。qRT-PCR 测试显示,位于 QTL 区间的候选基因(*Pak1ip1*、*Loc100696456* 和 *Loc100697261*)经过冷刺激后其表达受到明显影响,成功获取罗非鱼耐寒相关的基因。

GWAS 是在全基因组水平上对基因与特定性状进行关联研究,为了研究鲟鱼抗寒相关的基因,NIE 等^[56]将褐牙鲟(*Paralichthys olivaceus*)分为耐寒(CT)和冷敏感(CS)组进行冷处理。通过

全基因组分析,在褐牙鲈体内的 *Hsp70*、*Yb-1* 和 *Hmgb1* 部分序列中分别定位到 9 个、21 个和 10 个与耐寒和冷敏感相关的单核苷酸多态性位点 (Single nucleotide polymorphisms, SNP), 经筛选发现其中 *Hsp70* 中的 SNP8 以及 *Hmgb1* 的 SNP7 均与耐寒有关。

对抗寒性状的相关基因所进行的遗传位点定位,为筛选鱼类的抗寒性状提供了技术支撑和实验基础,从而便于对基因进行筛查以及标记,有助于进一步了解鱼类对低温的适应以及耐受机制。

3.2 低温相关的转录组学分析

转录组分析为目前应用最广泛的高通量测序分析技术之一,LIU 以虎皮鱼为实验对象,分别采集对照组 (27 °C 培养) 和冷应激组 (13 °C 培养) 的脑、鳃、肝和肌肉组织细胞,通过 RNA-Seq (RNA sequencing) 技术进行分析。将 4 对组织细胞进行对比得到 23 743 个差异表达基因 (Different expressed genes, DEGs), 筛选后发现 *Hsp70* 和 *Cirbp* 基因在虎皮鱼应对寒冷环境时表达量显著上调^[49]。银鲳鱼 (*Pampus argenteus*) 是一种重要的经济鱼种,为了对其抗寒基因进行筛选,ZHANG 等^[50]将银鲳鱼的培育水温从 13 °C 改变到 8 °C 进行低温刺激,提取鳃、肝和肌肉组织进行了研究。DEG 分析和 RT-qPCR 的结果显示,组织细胞中共存在 12 489 个 DEGs, 其中 *Hspa1* 的表达量在冷应激时显著提高。

NITZAN 等^[51]对 66 个奥利亚罗非鱼家族进行冷胁迫 (12 °C) 处理后,筛选出 3 个明显对低温敏感的家族和 3 个耐寒家族。在 24 °C 和 12 °C 培育后对 CT 和 CS 组分别进行采样,通过高通量 mRNA-Seq 对家族 480 (CT) 和 740 (CS) 的鳃部和肝脏组织进行对比分析后得到 4 827 个和 5 642 个 DEGs, 其中有 494 个 DEGs 在两个组织中均存在。使用 qPCR 和转录组测序对选取的 3 个 CT 家族和 3 个 CS 家族的罗非鱼鳃部样品进行分析,结果显示 *Gpia*、*ldha*、*TbiB* 和 *Pgam1a* 的转录水平在低温环境下明显上调。

为了对斑马鱼低温下的基因表达进行研究, LONG 等^[52]将 96 hpf (Hours post fertilization) 的斑马鱼苗分为两组,一组进行 24 h 的冷应激 (16 °C) 预处理后进行冷胁迫 (12 °C), 而另一组作为对照在冷胁迫前先在 28 °C 恒温中进行培

育。在 12 °C 严寒暴露 36 h 后,对照组的鱼苗大多死亡,预处理的实验组鱼苗死亡率则明显低于对照组。提取对照组和实验组的 RNA 进行 RNA-seq 分析,在样本中共检测到 23 693 个表达基因,经过 DEGs 分析确定其中共有 1 830 个 DEGs。其中,与对照组相比,冷处理组中的基因 *Ptgr1*、*Irg1l* 和 *Mp13a* 表达水平上调幅度最高,同时 *Per3* 基因表达量呈现高度上调,而 *Mep1b*、*Rh50* 和 *Nr5a5* 表达则受到显著抑制。

为了阐明南极大头鳊 (*Lycodichthys dearborni*) 耐寒性的分子机制,在之前的研究中,对 III 型抗冻蛋白基因家族中的 LD4 蛋白基因进行克隆,并构建了真核表达载体^[53]。将质粒载体转染到斑马鱼成纤维细胞系 (ZF4) 中进行功能验证,发现在 ZF4 细胞系中,LD4 表达量极高且在低温胁迫下 ZF4 细胞死亡率明显下降。通过转录组测序和基因表达分析对不同实验温度 (28 °C、18 °C 2 d、10 °C 2 d) 下的 WT 和 LD4 细胞进行处理,确定了存在 26 个差异表达的转录因子,其中 *I2mb13* 和 *Znf687b* 表达量在低温条件下呈现上调,且 KEGG 通路分析证明相关转录因子参与细胞凋亡、细胞周期和增殖调控。

3.3 低温相关的顺式转录元件

变温性硬骨鱼类的转录受到水温的直接影响,而低温应答反应中存在相关的顺式作用元件和反式作用因子调控转录。本实验室使用 RNA-Seq 技术,对斑马鱼多个组织在低温和严寒环境下发生的转录变化进行分析,并从得到的共 1 943 个 DEGs 中筛选出代表着不同组织和温度响应的表达模式的聚簇^[54]。使用 DREME (Discriminative regular expression motif elicitation) 进一步分析后,在 DEGs 聚簇中识别到 17 个顺式调控元件富集的启动子区域,显示出强共调控作用。其中存在两个顺式作用元件为转录因子 *Bcl6* 和 *Jun* 的结合位点,与低温引起的基因调控有关。而模型和实验验证表明,*Jun* 与 *Bcl6* 之间存在物理相互作用,其很可能是调控斑马鱼低温响应的关键因子。HUANG 等^[55]通过 RNA-seq 和 ATAC-seq 组学联合分析研究草鱼在低温胁迫下的表现及转录调控机制,发现转录因子 *Foxo1* 和 *Atf3* 的染色质结合强度在低温下发生显著差异。

表 1 耐冷遗传分析结果
Tab. 1 Genetic analysis results of cold tolerance

物种 Species	处理方法 Treatment	研究手段 Methods	种群 Population	相关基因、位点或转录因子 Markers or candidate signal genes
虎皮鱼 <i>Puntius tetrazona</i> ^[45]	25 °C(对照), 13 °C	QTLs 定位	单种群	8 QTLs in 6 LGs
莫桑比克罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i> ^[46]	16 °C(对照), 8 °C	QTLs 定位	F ₂ 杂交种群	UNH130, UNH180, UNH879, UNH907
莫桑比克罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i> ^[47]	16 °C(对照), 8 °C	QTLs 定位	F ₂ 杂交种群	UNH130
吉富罗非鱼 GIFT ^[48]	26 °C(对照), 8.5 °C	ddRAD-seq 和 QTLs 定位	A full-sib family of GIFT	<i>Paklip1</i> , <i>Loc100696456</i> , <i>Loc100697261</i>
褐牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i> ^[56]	15 °C(对照), 0.7 °C	转录组分析和 SNP 关 联分析	CT 和 CS 鲆鱼 种群	<i>Hsp70</i> , <i>Yb-1</i> , <i>Hmgb1</i>
虎皮鱼 <i>Puntius tetrazona</i> ^[49]	27 °C(对照), 13 °C	转录组分析	单种群	<i>Hsp70</i> , <i>CIRBP</i>
银鲟鱼 <i>Pampus argenteus</i> ^[50]	13 °C(对照), 8 °C	DEGs 分析 RT-qPCR	单种群	<i>Hspa1</i>
奥利亚罗非鱼 <i>Oreochromis aureus</i> ^[51]	24 °C(对照), 12 °C	mRNA-Seq, qPCR 和转 录组测序	CT 和 CS 种群	<i>Gpia</i> , <i>ldha</i> , <i>TbiB</i> , <i>Pgam1a</i>
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> ^[52]	28 °C(对照), 16 °C, 12 °C	RNA-seq 和 DEGs 分析	96 hpf 斑马鱼 鱼苗	<i>Ptgr1</i> , <i>Irg1l</i> , <i>Mp13a</i> , <i>Per3</i> , <i>Mep1b</i> , <i>Rh50</i> , <i>Nr5a5</i>
南极大头鳗鲡 <i>Lycodichthys dearborni</i> ^[53]	28 °C(对照), 18 °C, 10 °C	转录组测序和基因表达 分析	ZF4 细胞系	<i>I3MB13</i> , <i>ZNF687b</i>
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> ^[54]	28 °C(对照), 18 °C, 10 °C	RNA-Seq 和 DREME	单种群	<i>Jun</i> , <i>Bcl6</i>

4 展望

鱼类对低温的耐受能力是当前水产育种的重点研究方向之一。通过改良饲料配方,提高细胞膜不饱和脂肪酸含量,增强抗氧化性等途径提高热带鱼或温水性鱼类的抗寒性,已经有了广泛的应用^[11-12,15-16,56]。然而,这些低温生理响应机制背后的分子信号通路还有待于深入研究。在低温胁迫下存在多条信号通路相互作用,共同对机体的生理代谢、物质合成和基因表达进行调控。鱼类在面对低温环境时,包括 INS/IGF-1 信号通路和 AKT 信号通路在内的多种代谢信号通路受到抑制,相关的转录因子失活,而与 FoxO 蛋白激活相关的信号通路则呈现上调。这种协同作用对鱼类在抵抗低温逆境过程中维持生理平衡和正常发育具有重要意义,有助于鱼类更好地适应寒冷环境。

现代分子标记技术如 QTL 定位技术和 GWAS 分析已被用于筛选低温耐受相关的基因,从而加速耐低温品种的选育。目前已有通过分子标记选拔出具有目标性状的个体后,采取群体选育的方法将不同的优良性状进行结合,提高后代耐寒能力的实际应用。闫兵兵等^[57]通过选育后获得的暗纹东方鲀“中洋 1 号”在相同养殖条件

下,与未经选育暗纹东方鲀相比,最低摄食温度降低了 4 °C,越冬成活率明显提高;苗亮等^[58]通过分子标记技术,以野生大黄鱼为基础,群体选育出了在低温下具有更高存活率的新品种“东海 1 号”。

鱼类耐寒基因的研究尚处于初步阶段,许多关键基因的功能尚未完全揭示。随着比较基因组学、基因编辑和多组学技术的不断发展,未来在耐寒基因的鉴定和功能验证方面将取得更大的突破。南极鱼体内的抗冻糖蛋白(Antifreeze glycoproteins, AFGPs)是已知的最有效的冰重结晶抑制剂,它可抑制鱼类体液中冰的生长,从而有效地帮助南极鱼抵御 0 °C 以下的低温^[59]。本实验室将来自花纹南极鱼(*Notothenia coriiceps*)的 LD4 抗冻蛋白转入到吉富罗非鱼中,显著提升了 3 月龄的罗非鱼在 12 °C 低温下的存活时间。有多项研究认为热激蛋白 HSP 蛋白家族在鱼类的耐低温机制中发挥关键作用。HSP70 是典型的诱导型表达蛋白,然而 PLACE 等^[60]发现在伯氏肩孔南极鱼、博氏南冰鲱(*Pagothenia borchgrevinki*)、南极绵鲟(*Lycodichthys dearborni*)等南极鱼中,HSP70 基因普遍表现为高水平的组成型表达,表明 HSP70 在鱼类应对长期低温环境中发挥重要作用。

为了实现耐寒新品种的培育,需要更深入地

阐明鱼类耐低温性状的遗传机理,并完善鱼类育种的技术措施。现阶段国内外相关研究主要集中在与抗寒性状相关的遗传位点定位以及一些转录组表达分析上,仍未有影响鱼类抗寒性的关键基因或关键遗传位点的报道。因此,未来的研究需要进一步探索这些未知领域,通过遗传学手段鉴定出鱼类抗寒的关键基因,以期将来能够利用抗寒遗传信息为水产养殖业的发展提供新的角度,进行育种创新,培育突破性的水产耐寒新品种。

作者声明本文无利益冲突

参考文献:

- [1] NERY M S, MACHADO A, CAMPOS M F M, et al. Determining the appropriate feature set for fish classification tasks [C]//XVIII Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing (SIBGRAP'05). Natal, Brazil: IEEE, 2005.
- [2] FRY F E J, HOAR W S, RANDALL D J. The effect of environmental factors on the physiology of fish [M]//HOAR W S, RANDALL D J. Fish Physiology Vol VII: Environmental Relations and Behaviour. New York: Academic Press, 1971: 83.
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2024中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024.
Bureau of Fisheries of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fisheries statistical yearbook 2024 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024.
- [4] LOS D A, MURATA N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2004, 1666 (1/2): 142-157.
- [5] BROCKERHOFF H, ACKMAN R G, HOYLE R J. Specific distribution of fatty acids in marine lipids [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1963, 100 (1): 9-12.
- [6] MACDONALD J A, MONTGOMERY J C. Rate-compensated synaptic events in Antarctic fish: consequences of homeoviscous cold-adaptation [J]. Experientia, 1986, 42(7): 806-808.
- [7] BIEDERMAN A M, KUHN D E, O'BRIEN K M, et al. Mitochondrial membranes in cardiac muscle from Antarctic nototheniid fishes vary in phospholipid composition and membrane fluidity [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 235: 46-53.
- [8] FARKAS T, FODOR E, KITAJKA K, et al. Response of fish membranes to environmental temperature [J]. Aquaculture Research, 2001, 32(8): 645-655.
- [9] BOWDEN L A, RESTALL C J, ROWLEY A F. The influence of environmental temperature on membrane fluidity, fatty acid composition and lipoxygenase product generation in head kidney leucocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 115(3): 375-382.
- [10] 曹永长, 王祖熊. 鱼类低温适应机制的研究——II. 驯化温度对草鱼和鲢鱼肌肉线粒体膜脂肪酸组成和胆固醇含量的影响[J]. 华南农业大学学报, 1991(s1): 45-49.
CAO Y C, WANG Z X. Study on the mechanism of low temperature adaptation in fish. II. effects of acclimation temperature on fatty acid composition and cholesterol content in mitochondrial membranes of muscle tissue of the grass carp and mud carp [J]. Journal of South China Agricultural University, 1991(s1): 45-49.
- [11] KELLY A M, KOHLER C C. Cold tolerance and fatty acid composition of striped bass, white bass, and their hybrids [J]. North American Journal of Aquaculture, 1999, 61(4): 278-285.
- [12] ABDEL-GHANY H M, EL-SAYED A F M, EZZAT A A, et al. Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Journal of Thermal Biology, 2019, 79: 50-55.
- [13] BLOMGREN K, HAGBERG H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia - ischemia in the developing brain [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2006, 40 (3): 388-397.
- [14] PAMPLONA R, COSTANTINI D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals [J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2011, 301(4): R843-R863.
- [15] HEISE K, PUNTARULO S, NIKINMAA M, et al. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. [J]. Journal of Experimental Biology, 2006, 209(2): 353-363.
- [16] HEISE K, ESTEVEZ M S, PUNTARULO S, et al. Effects of seasonal and latitudinal cold on oxidative stress parameters and activation of hypoxia inducible factor (HIF-1) in zoarcid fish [J]. Journal of Comparative Physiology B, 2007, 177(7): 765-777.
- [17] WEN B, JIN S R, CHEN Z Z, et al. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics [J]. Science of the Total Environment, 2018, 640-641: 1372-

- 1381.
- [18] FADHLAOUI M, COUTURE P. Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 180: 45-55.
- [19] WANG H M, WANG Y, NIU M H, et al. Cold acclimation for enhancing the cold tolerance of zebrafish cells [J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 12: 813451.
- [20] CHEN T H, LIN C Y, TSENG M C. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 63 (5/12): 303-308.
- [21] MALEK R L, SAJADI H, ABRAHAM J, et al. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2004, 138(3): 363-373.
- [22] 彭婷, 胡庭俊, 林勇, 等. 低温胁迫对罗非鱼血液生化、免疫及抗氧化指标的影响 [J]. *水产科学*, 2012, 31 (5): 259-263.
- PENG T, HU T J, LIN Y, et al. Effects of low temperature stress on indices of biochemistry, immunity and antioxidation in Nile tilapia [J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(5): 259-263.
- [23] QIANG J, XU P, WANG H Z, et al. Combined effect of temperature, salinity and density on the growth and feed utilization of Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43 (9) : 1344-1356.
- [24] 胡玲红, 王映, 王化敏, 等. 不同温度胁迫对青鳉凋亡的影响 [J]. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(6): 929-936.
- HU L H, WANG Y, WANG H M, et al. Effects of different temperature stress on gill apoptosis of medaka *Oryzias latipes* [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2021, 36(6): 929-936.
- [25] LI W H, LI Z Q, BU M D, et al. Metabolomic-based analysis reveals bile acid-mediated ovarian failure induced by low temperature in zebrafish [J]. *Zoological Research*, 2024, 45(4): 791-804.
- [26] TSENG Y C, CHEN R D, LUCASSEN M, et al. Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18180.
- [27] DOWNING K H, NOGALES E. Tubulin and microtubule structure [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998, 10(1): 16-22.
- [28] OU J X, BALL J M, LUAN Y Z, et al. iPSCs from a hibernator provide a platform for studying cold adaptation and its potential medical applications [J]. *Cell*, 2018, 173 (4): 851-863. e16.
- [29] OBIKA M, MEYER-ROCHOW V B. Ultrastructure of microtubules in dermal melanophores and spinal nerve of the Antarctic teleost *Pagothenia borchgrevinki* [J]. *Cell and Tissue Research*, 1986, 244(2): 339-343.
- [30] PUCCIARELLI S, PARKER S K, DETRICH H W, et al. Characterization of the cytoplasmic chaperonin containing TCP-1 from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* [J]. *Extremophiles*, 2006, 10(6): 537-549.
- [31] WILLIAM DETRICH III H. Microtubule assembly in cold-adapted organisms: functional properties and structural adaptations of tubulins from antarctic fishes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1997, 118(3): 501-513.
- [32] EIJKELENBOOM A, BURGERING B M T. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(2) : 83-97.
- [33] HU P, LIU M L, LIU Y M, et al. Transcriptome comparison reveals a genetic network regulating the lower temperature limit in fish [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6 (1): 28952.
- [34] GE G D, LONG Y, SHI L Y, et al. Transcriptomic profiling revealed key signaling pathways for cold tolerance and acclimation of two carp species [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 539.
- [35] LU D L, MA Q, WANG J, et al. Fasting enhances cold resistance in fish through stimulating lipid catabolism and autophagy [J]. *The Journal of Physiology*, 2019, 597 (6): 1585-1603.
- [36] MANOR M L, CLEVELAND B M, WEBER G M, et al. Effects of sexual maturation and feeding level on fatty acid metabolism gene expression in muscle, liver, and visceral adipose tissue of diploid and triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 179: 17-26.
- [37] OSAKI M, OSHIMURA M, ITO H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 667-676.
- [38] 王金凤, 胡鹏, 牛虹博, 等. 低温胁迫对鱼类 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路的影响 [J]. *生物学杂志*, 2016, 33(6): 24-28.
- WANG J F, HU P, NIU H B, et al. Effect of cold stress on PI3K/AKT/GSK-3 β signal pathway in fishes [J]. *Journal of Biology*, 2016, 33(6): 24-28.
- [39] MIHAYLOVA M M, SHAW R J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism [J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13 (9) : 1016-1023.
- [40] BREMER K, KOCHA K M, SNIDER T, et al. Sensing

- and responding to energetic stress: the role of the AMPK-PGC1 α -NRF1 axis in control of mitochondrial biogenesis in fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 199: 4-12.
- [41] CHU P, WANG T, SUN Y R, et al. Effect of cold stress on the MAPK pathway and lipidomics on muscle of *Takifugu fasciatus* [J]. *Aquaculture*, 2021, 540: 736691.
- [42] LANG R, RAFFI F A M. Dual-specificity phosphatases in immunity and infection: an update [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2710.
- [43] 王映, 胡玲红, 王化敏, 等. 伯氏肩孔南极鱼 *dusp1* 基因在冷应激中的功能研究 [J]. *水生生物学报*, 2022, 46(8): 1105-1112.
- WANG Y, HU L H, WANG H M, et al. Role of *Trematomus bernacchii dusp1* gene in cell cold resistance [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(8): 1105-1112.
- [44] WANG Y, WANG H M, ZHOU Y, et al. *Dusp1* regulates thermal tolerance limits in zebrafish by maintaining mitochondrial integrity [J]. *Zoological Research*, 2023, 44(1): 126-141.
- [45] LIU Z F, WANG X N, MA A J, et al. Construction of a high-density genetic linkage map and QTL mapping of growth and cold tolerance traits in tiger puffer *Takifugu rubripes* [J]. *Aquaculture*, 2022, 561: 738613.
- [46] CNAANI A, HALLERMAN E M, RON M, et al. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F₂ tilapia hybrid [J]. *Aquaculture*, 2003, 223(1/4): 117-128.
- [47] MOEN T, AGRESTI J J, CNAANI A, et al. A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23 [J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(9): 893-904.
- [48] AI C H, LI B J, XIA J H. Mapping QTL for cold-tolerance trait in a GIFT-derived tilapia line by ddRAD-seq [J]. *Aquaculture*, 2022, 556: 738273.
- [49] LIU L L, ZHANG R, WANG X W, et al. Transcriptome analysis reveals molecular mechanisms responsive to acute cold stress in the tropical stenothermal fish tiger barb (*Puntius tetrazona*) [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 737.
- [50] ZHANG M, HU J B, ZHU J J, et al. Transcriptome, antioxidant enzymes and histological analysis reveal molecular mechanisms responsive to long-term cold stress in silver pomfret (*Pampus argenteus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 121: 351-361.
- [51] NITZAN T, KOKOU F, DORON-FAIGENBOIM A, et al. Transcriptome analysis reveals common and differential response to low temperature exposure between tolerant and sensitive blue tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 100.
- [52] LONG Y, SONG G L, YAN J J, et al. Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 612.
- [53] 杨敏, 黄巧, 陈良标. 南极鱼 III 型抗冻基因真核表达质粒的构建及其细胞表达 [J]. *浙江农业学报*, 2016, 28(11): 1862-1866.
- YANG M, HUANG Q, CHEN L B. Construction of type III antifreeze protein eukaryotic expression plasmid and expression in zebrafish cell line [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2016, 28(11): 1862-1866.
- [54] HU P, LIU M L, ZHANG D, et al. Global identification of the genetic networks and *cis*-regulatory elements of the cold response in zebrafish [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(19): 9198-9213.
- [55] HUANG S Q, YAN C Y, XU Y, et al. Integrated transcriptomic and epigenomic analyses to disclose the transcriptional regulatory mechanisms of lipid and energy metabolism under cold stress in grass carp [J]. *Aquaculture*, 2025, 595: 741526.
- [56] NIE M M, HU J W, LU Y L, et al. Cold effect analysis and screening of SNPs associated with cold-tolerance in the olive flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2019, 35(4): 924-932.
- [57] 闫兵兵, 陈义培, 卢玉平, 等. 暗纹东方鲀“中洋1号”新品种育种技术 [J]. *科学养鱼*, 2019(7): 6-7.
- YAN B B, CHEN Y P, LU Y P, et al. Breeding technique of puffer fish new variety "Zhongyang No 1" [J]. *Scientific Fish Farming*, 2019(7): 6-7.
- [58] 苗亮, 李明云, 陈炯, 等. 快长、耐低温大黄鱼新品种东海1号的选育 [J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(10): 1314-1320.
- MIAO L, LI M Y, CHEN J, et al. Breeding of fast growth and low temperature tolerance of new variety Donghai No. 1 Large Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(10): 1314-1320.
- [59] HUANG Q, HU R Q, ZHU H, et al. Expression of multi-domain type III antifreeze proteins from the Antarctic eelpout (*Lycodichthys dearborni*) in transgenic tobacco plants improves cold resistance [J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2021, 6(2): 186-191.
- [60] PLACE S P, HOFMANN G E. Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, *hsp70*, in phylogenetically distant Antarctic fish [J]. *Polar Biology*, 2005, 28(4): 261-267.

Progress in the tissue, cellular, and molecular mechanisms of cold tolerance in fish and its applications in breeding

ZHOU Yan, LI Ruoxi, LYU Xinyi, ZHANG Siyuan

(Key Laboratory of Exploration and Utilisation of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Low temperature critically affects the growth, reproduction and disease resistance of warm-water and tropical fishes. Because of climate changes, the effect of low temperatures on fish physiological processes is becoming increasingly pronounced. The molecular mechanism of cold tolerance in fish is a research direction highly relevant to basic life sciences and industrial applications. In this article, the current researches on the molecular mechanism of fish cold tolerance are reviewed from three aspects: physiological and biochemical basis, molecular pathway of responses to signal from low temperature and genetic mapping of cold tolerance traits. When in cold environment, fish will change the composition of fatty acids and enhance the activity of antioxidant enzymes to protect cells from damage, thereby coping with the stress of low temperatures. Meanwhile, the molecular mechanism of fish response to low temperature involves several signal pathways, and the activation and inhibition of these pathways are closely related to the cold tolerance of fish. The molecular mechanisms of cold tolerance in fish has important applications in aquaculture breeding. With advances in genomics technologies, the molecular basis of cold tolerance has been gradually revealed. Gene marker-assisted selection (MAS) and genomic analyses provide essential tools for screening genes related to cold tolerance, facilitating the breeding of cold-resistant fish species. These studies will not only help us understand how fish adapt to environmental changes, but will also open up new ways for the aquaculture industry to address climate changes and improve farming efficiency.

Key words: fish; cold tolerance; molecular mechanism; breeding