

文章编号: 1674-5566(2024)02-0341-11

DOI: 10.12024/jsou.20230604260

雅罗鱼杂交种及其双亲耐碱性能相关生理指标比较

李雯^{1,2}, 艾克达·热合曼^{2,3}, 邹宇婷^{1,2}, 黄晶², 张立民², 常玉梅²

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为探究雅罗鱼杂交种“雅龙1号”及其亲本达里湖瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*, 母本)和新疆额尔齐斯河高体雅罗鱼(*Leuciscus idus*, 父本)的耐碱性能, 对3种实验鱼进行了为期7 d的50 mmol/L NaHCO₃ 碱度胁迫实验, 并对参与渗透压调节、氮代谢等与耐碱性能显著相关的几个生理指标及其对应基因表达进行了比较研究。结果发现, 具有极强耐碱性能的母本鳃组织的钠-钾ATP酶(NKA)活性及其基因表达量(*ATPase α1-like*和*ATPase α3*)均高于杂交种, 显著高于父本; 血清碱性磷酸酶(AKP)活性及其鳃基因表达量(*alpl*)均极显著低于其他两种鱼, 表明母本可能通过AKP去磷酸化作用, 调控NKA酶活性, 参与高碱胁迫下的渗透压调节。氮代谢相关指标检测发现, 母本的血氨(Amon)及尿素氮(BUN)含量均极显著低于其他两种鱼, 而血清谷氨酸脱氢酶(GDH)和谷氨酰胺合成酶(GS), 以及鳃相关基因表达量(*glud*、*glul*、*Rhbgl*和*Rhcg1*)大部分高于杂交种, 均显著高于父本, 表明母本通过合成氨中间代谢物以及提高氨转运蛋白活性的方式消耗体内的氨。综上所述, 这些生理指标与母本极强的耐碱性能显著相关, 且较好地遗传给了其杂交子代“雅龙1号”。本研究结果为鱼类耐碱性能的综合评价提供了理论依据, 为雅罗鱼耐碱新品种选育及良种申报奠定了工作基础。

关键词: 雅罗鱼; 杂交种; 耐碱性能; 渗透压调节; 氮代谢

中图分类号: S 962.3 **文献标志码:** A

我国有低洼盐碱水域约 4.6×10^7 hm², 约占全国湖泊总面积的55%, 广泛分布于东北、华北、西北等内陆干旱少雨地区^[1]。大部分盐碱水域具有高碳酸盐碱度、高pH、主要离子比例失衡、水质类型多等理化特点, 刺激鱼体造成应激性疾病或死亡, 给水产养殖业带来巨大的经济损失, 因此不宜被生产和生活利用, 仍处于荒置状态^[2-3]。实践证明, “以渔治碱”是开发利用盐碱水域的有效途径之一^[4]。近年来, 通过引种驯化, 筛选出了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)等二十余种适宜在低盐碱水体(碱度<10 mmol/L)养殖的海、淡水种, 其中尼罗罗非鱼和凡纳滨对虾达到了规模化养殖^[5-8]; 开展了以

大鳞鲃(*Luciobarbus capito*)和瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)等耐盐碱种为主的中、高盐碱水体(碱度>10 mmol/L)的养殖示范研究^[8-9], 取得了较好的社会和生态效益, 但是仍然面临养殖品种生长速度慢、市场占有率不高等制约产业稳定和持续发展的问題。

开发天然的耐盐碱鱼类种质资源, 利用其耐盐碱遗传物质有针对性地选育出适宜的养殖品种, 是推进中、高盐碱水域开发利用的有效途径^[2]。内蒙古达里湖瓦氏雅罗鱼具有极强的耐高碱特性, 是培育耐盐碱新品种的首选种源。本研究团队以耐碱的达里湖瓦氏雅罗鱼为选育母本, 以新疆额尔齐斯河具有生长优势的高体雅罗鱼为选育父本, 利用群体选育、分子标记辅助家系选育及杂交选育为一体的育种策略, 选育出一个

收稿日期: 2323-06-19 修回日期: 2023-09-26

基金项目: 国家重点研发计划(2020YFD0900402); 国家自然科学基金(32273120)

作者简介: 李雯(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类抗逆分子生理研究。E-mail: 1471506486@qq.com

通信作者: 常玉梅, E-mail: changyumei@hrfri.ac.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>

雅罗鱼新品种“雅龙1号”,并对其 NaHCO_3 半致死浓度(Half-lethal concentration, LC_{50})、生长及肌肉品质等进行了相关研究^[10-11],为其良种申报奠定了基础,但对其耐碱性能的评价尚缺乏系统研究。

早期,主要使用 NaHCO_3 半致死浓度作为鱼类耐碱能力的评价指标^[12-13]。近年来,随着国内外学者对鱼类耐盐碱的生理和分子机制研究的深入,越来越多与鱼类耐盐碱性性能相关的生理指标及基因被鉴定和利用。其中,钠-钾ATP酶(Na^+/K^+ -ATPase, NKA, EC 3. 6. 3. 9)活性及其基因表达量被认为是鱼类渗透调节能力的重要指标^[14]。碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼鳃组织NKA酶活及其基因表达量显著升高^[15];碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP, EC 3. 1. 3. 1)是衡量机体免疫机能和健康状况的重要指标,当鱼体受到盐碱胁迫时,鱼体AKP酶活应激性升高^[16-17]。血液氨氮含量与鱼体碱度耐受力呈显著负相关,高碱胁迫下鲫(*Carassius auratus*)死亡个体的氨氮含量显著高于成活个体^[17];谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, GDH, EC 1. 4. 1. 2)和谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS, EC 6. 3. 1. 2)酶活以及氨转运蛋白Rh基因表达量在尼罗罗非鱼^[18]、青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[19-20]、瓦氏雅罗鱼^[21-22]等碱胁迫下均显著高表达。

本研究旨在通过对雅罗鱼杂交种“雅龙1号”及其双亲在相同碱度处理下的关键血清生理指标及其对应基因表达情况进行比较研究,探究“雅龙1号”的耐碱性能,为其良种选育、驯化养殖及示范推广提供理论依据和科学指导。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源及管理

雅罗鱼杂交种“雅龙1号”及其双亲均为中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰试验场同年繁殖且室外土池饲养至3月龄的鱼种。随机挑选体质健壮、大小均一、活力较强,无伤病的杂交种“雅龙1号”及其双亲各60尾,其中“雅龙1号”平均体质量为 (41.09 ± 3.67) g,平均体长为 (13.26 ± 0.87) cm;母本达里湖瓦氏雅罗鱼平均体质量为 (27.82 ± 3.34) g,平均体长为 (13.13 ± 1.85) cm;父本高体雅罗鱼平均体质量为 $(34.92 \pm$

$2.98)$ g,平均体长为 (13.11 ± 1.14) cm。首先将这3种实验鱼转运至中国水产科学研究院黑龙江水产研究所室内3个循环可控水族箱($177.8 \text{ cm} \times 57.5 \text{ cm} \times 35.5 \text{ cm}$)暂养1周,每天少量投饵,及时捞出残饵,并监测水质。水温为 $(17.50 \pm 0.24)^\circ\text{C}$, pH为 7.62 ± 0.34 (pH 400便携式pH计,上海沛瑞仪器有限公司),溶解氧为 (7.66 ± 0.11) mg/L(AZ 8371,衡欣实业有限公司),氨氮为 (0.53 ± 0.27) mg/L(U-T6紫外可见风光光度计,屹谱仪器),盐度为 (0.10 ± 0.05) g/L(LS10T盐度计,广州速为电子科技有限公司),碱度为 (0.46 ± 0.04) mmol/L(0.02 mmol/L 盐酸滴定法标定),实验前48 h停止投喂。

1.2 NaHCO_3 碱度胁迫实验

以1倍达里湖碱度50 mmol/L为胁迫阈值,基于瓦氏雅罗鱼碱水种对碱度胁迫的不同生理响应(d1出现应激-d5开始启动-d7逐渐适应)开展实验^[15]。首先采用 NaHCO_3 (分析纯,天津凯通化学试剂有限公司)在200 L水族箱中($177.8 \text{ cm} \times 57.5 \text{ cm} \times 35.5 \text{ cm}$)配置50 mmol/L的碱性水体,曝气静置24 h后,放入3种实验鱼各15尾进行7 d的胁迫实验。实验期间不投饵,水体不循环,始终保持充氧,并且每天配置新鲜的碱性水体进行1/2换水处理,水质测定方法同上。水温为 $(17.00 \pm 0.50)^\circ\text{C}$, pH为 9.17 ± 0.24 ,溶解氧为 (7.46 ± 0.18) mg/L,盐度为 (3.50 ± 0.05) mg/L,碱度为 (51.20 ± 2.79) mmol/L。实验设置3组平行和1组淡水对照。

1.3 样品采集与处理

碱胁迫7 d后采集样品。3种实验鱼各取9尾(3组平行, $n=9$),用100 mg/L的MS-222(Pharmaq,英国)麻醉约30 s,擦干鱼体,称重记录后,用2 mL注射器从尾静脉缓慢采血约0.5 mL,置于无菌离心管中,4 °C静置过夜,次日3 500 r/min离心15 min,分离上层血清后转置于-80 °C低温冰箱保存,用于后续关键生理指标测定。同时,采取每条实验鱼的鳃组织,放入液氮快速研磨分装后,于-80 °C低温冰箱保存,用于后续酶活测定和基因定量表达研究。

1.4 样品测定

1.4.1 血清关键生理指标测定

根据试剂盒说明书(南京建成科技有限公司,南京),分别对血清中的碱性磷酸酶(AKP)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、谷氨酰胺合成酶(GS)、尿

素氮(BUN)和血氨(Amon)进行测定,利用Bio-Tek Synergy2多功能酶标仪(Bio-Tech, 美国)检测其对应吸光度值。

1.4.2 鳃组织 NKA 酶活测定

取出鳃组织,准确称取后按质量:体积(g/mL)=1/9加入生理盐水,冰浴条件下匀浆后,4℃,2500 r/min离心10 min后获得上清液,再用生理盐水10倍稀释,测定NKA酶活。根据NKA酶活测定试剂盒说明书(南京建成科技有限公

司,南京),使用Bio-Tek Synergy2多功能酶标仪测定,同时使用Bradford试剂(南京建成科技有限公司,南京)测定蛋白浓度。

1.4.3 关键生理指标对应基因的调取及引物设计

根据瓦氏雅罗鱼转录组数据^[22],分别调取AKP(*alpl*)、GDH(*glud*)、GS(*glul*)、NKA(*ATPase α1-like*和*ATPase α3*)以及氨转运蛋白(*Rhbg*和*Rhcg1*)等基因的cDNA序列,设计并合成定量引物,引物信息详见表1。

表1 RT-qPCR基因定量表达引物信息
Tab.1 Primer information for real-time quantitative PCR

基因 Gene	引物序列(5' - 3') Sequence of primers	退火温度 Tm/°C	产物长度 Product size/bp
<i>alpl</i>	F: CCTGATTTCTGGAAGGGCTG R: CGTCTGCTGTGACCGTAGA	60	137
<i>glud</i>	F: GCTCAGTGTGATATCCTCATCC R: CCATTAGCACCCCTCAGCAATA	60	217
<i>glul</i>	F: CTGTGGAGTTGGAGCAGATAAA R: ACAGATCATCACACCAGCATAG	60	243
<i>ATPase α1-like</i>	F: GCTCTGCTACTTGGTCTG R: TGGTATTCTTGTGGACTGAG	55	249
<i>ATPase α3</i>	F: TCGGACAAGACTGGAACA R: CGGACTCAGAAGCATCAC	55	239
<i>Rhbg</i>	F: ATGCAGGGCTTTTCCACGG R: TGGATCCGCCAGCATATTG	60	191
<i>Rhcg1</i>	F: TTCCTCTGGATGTTCTGGCC R: CCAGTTTCCCTTCTTGCCA	60	154
18S	F: GGAGTTTCGAAGACGATCAG R: GTGAGGTTTCCCGTTGAG	60	183

1.4.4 鳃组织 RNA 提取及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

称取少量保存在-80℃冰箱的鳃组织研磨粉末,根据RNA提取试剂盒说明书(Promega, 美国)提取总RNA,利用Nanodrop 8000分光光度计(Thermo Scientific, 美国)测定浓度,1%琼脂糖凝胶电泳评估其完整性。

按照Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser反转录试剂盒(TaKaRa, 大连)说明书反转录合成单链cDNA。以18S为内参基因,利用ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, 美国)进行实时荧光定量PCR检测,PCR反应程序为95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40个循环;最后95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。

1.5 数据处理

血清关键生理指标数据以实验组与对照组

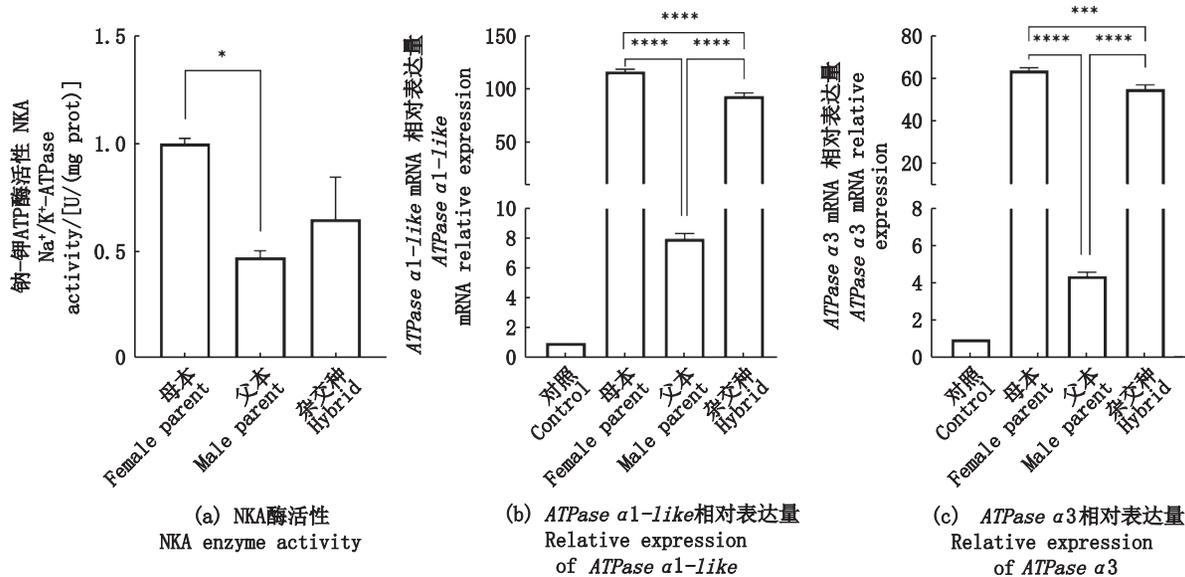
差值进行统计;基因荧光定量数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行表达倍数计算。采用SPSS 19.0进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),利用最小二乘法(LSD)进行品种间差异显著性检验,利用GraphPad Prism 9绘制包含标准误的平均值柱状图并标注显著性。

2 结果与分析

2.1 杂交种及其双亲鳃组织 NKA 酶活与基因表达差异分析

通过实验组和对照组差值分析可以看出,50 mmol/L碱度胁迫导致3种实验鱼NKA酶活均显著升高,其中母本NKA酶活最高,杂交种次之,父本最低;母本与父本之间存在显著差异($P < 0.05$,图1a),而杂交种与母本之间无明显差异;同样地,NKA α亚基*ATPase α1-like*和*ATPase α3*

基因在3种实验鱼的转录表达趋势与酶活趋势一致,即母本表达量最高,杂交种次之,父本最低,且三者均存在极显著差异($P<0.001$,图1b,1c)。



NKA 酶活为实验组与对照组差值;直方图上标记的“*”表示不同种间差异显著($P<0.05$),“***”和“****”表示不同种间差异极显著($P<0.001$, $P<0.0001$)。

NKA activity is denoted as the difference between the experimental group and the control group. Marked “*” on the histogram indicates significant differences between species ($P<0.05$), “***” and “****” indicate highly significant differences between species ($P<0.001$, $P<0.0001$).

图1 碱度胁迫下杂交种及其双亲鳃组织NKA酶活及ATPase $\alpha 1$ -like 和ATPase $\alpha 3$ 表达量变化

Fig. 1 Changes of NKA enzyme activity and mRNA expression of ATPase $\alpha 1$ -like and ATPase $\alpha 3$ in the gills of hybrids and their parents under alkalinity stress

2.2 杂交种及其双亲血清AKP酶活及其基因在鳃组织的差异表达分析

通过实验组和对照组差值分析可以看出,50 mmol/L 碱度胁迫导致3种实验鱼AKP酶活显著升高,其中父本AKP酶活最高,杂交种次之,母本最低;母本与父本及其杂交种均存在极显著差异($P<0.0001$,图2a),而父本与杂交种无显著差异。同样地,AKP对应基因 $alpl$ 在3种实验鱼的转录表达趋势与酶活趋势一致,即父本表达量最高,杂交种次之,母本最低,且三者均存在极显著差异($P<0.0001$,图2b)。

2.3 杂交种及其双亲血清GDH和GS酶活及其基因在鳃组织的差异表达分析

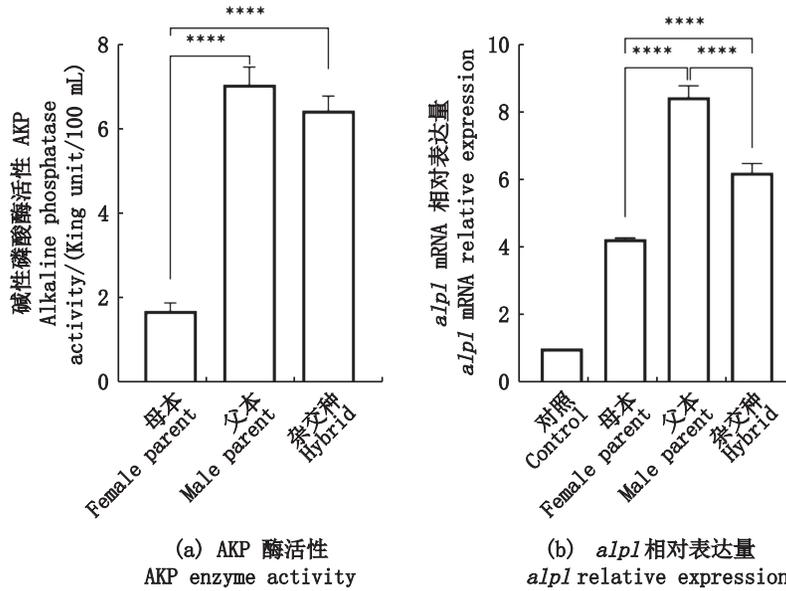
50 mmol/L 碱度胁迫下,3种实验鱼的GDH和GS含量均有不同程度的增加,其中母本的这两种酶活含量均极显著高于父本和杂交种($P<0.01$,图3a,3b),而后二者无显著差异。荧光定量PCR检测显示,GDH和GS对应基因在3种实验鱼中的转录表达趋势与其酶活趋势基本一致,即母本鳃

组织 $glud$ 和 $glul$ 基因表达量最高,其中 $glud$ 基因表达量显著高于父本, $glul$ 基因表达量显著高于父本($P<0.05$,图3),极显著高于杂交种($P<0.01$,图3c,3d)。

2.4 杂交种及其双亲血清氨氮含量及Rh基因在鳃组织的差异表达分析

经过7 d 50 mmol/L 碱度胁迫,血清差值分析显示杂交种及其双亲血清中的氨含量均显著升高,其中父本含量最高,杂交种次之,母本最低,且三者均存在极显著差异($P<0.0001$,图4a);相似地,碱度胁迫导致3种实验鱼血清尿素氮含量也有所增加,其中父本增加较多,且与母本和杂交种存在极显著差异($P<0.001$,图4b)。

氨转运相关基因 $Rhbg$ 和 $Rhcg1$ 基因定量表达结果显示,其表达趋势与3种实验鱼血清氨含量呈极显著负相关($P<0.01$,图4),即母本血清氨含量低, $Rhbg$ 和 $Rhcg1$ 表达量相对较高,父本血清氨含量最高, $Rhbg$ 和 $Rhcg1$ 基因表达量最低,杂交种血清氨含量和基因表达量基本介于二者之间(图4)。



AKP酶活为实验组与对照组差值。直方图上标记的“****”表示不同种间差异极显著($P < 0.0001$)。

AKP activity is denoted as the difference between the experimental group and the control group. Marked “****” on the histogram indicates highly significant differences between species ($P < 0.0001$).

图2 碱度胁迫下杂交种及其双亲血清AKP酶活及鳃组织alpl表达量变化

Fig. 2 Changes of AKP enzyme activity in serum and mRNA expression of *alpl* in the gills of hybrid and its parents under alkalinity stress

3 讨论

3.1 碱胁迫对雅罗鱼杂交种及其双亲渗透压调节能力的影响

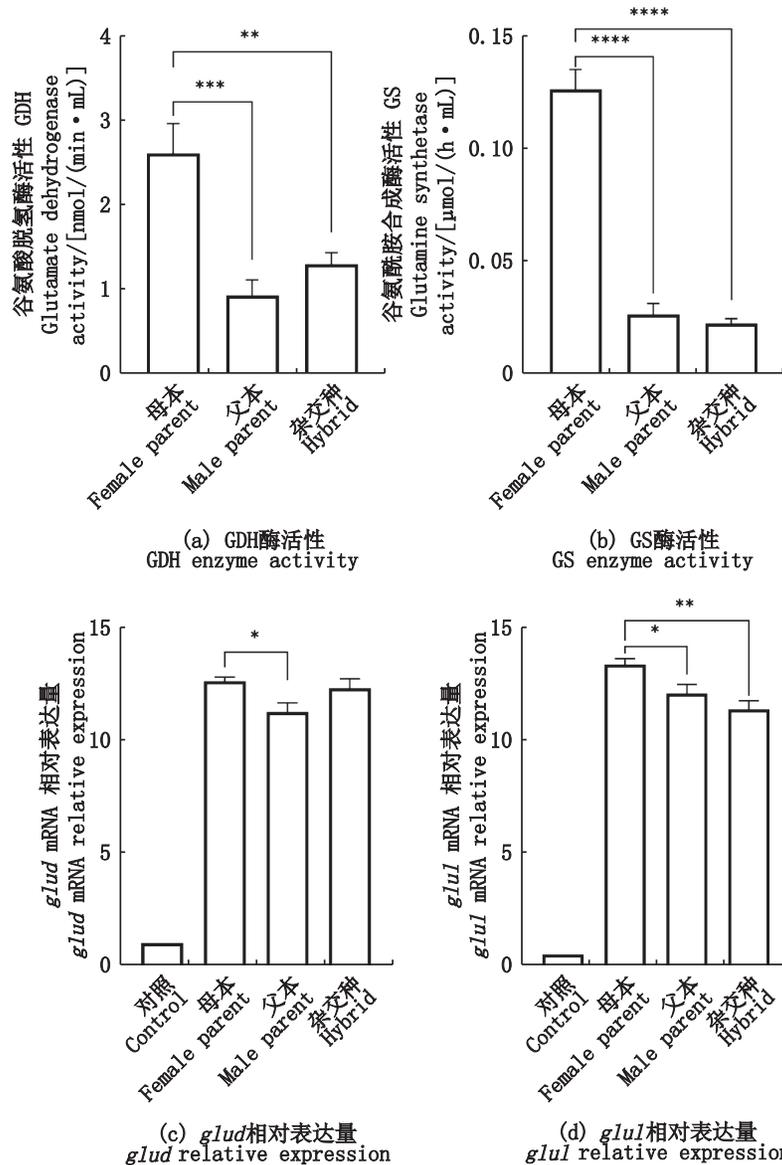
鳃组织是鱼类调节体内外离子和酸碱平衡,维持气体正常交换的重要器官。鳃上皮中的线粒体富集细胞(Mitochondria-rich cells, MRC),又称离子细胞,是离子吸收和分泌的主要场所,通过改变其数量、结构和功能,参与由渗透压变化引发的生理稳态的维持机制^[14, 23-24]。NKA是广泛分布在机体内生物膜酶系统的一种蛋白质,具有载体和酶的功能,能催化ATP水解供能,驱动 Na^+ 和 K^+ 于细胞膜两侧的对向运输,对维持细胞的正常生理功能以及细胞内环境的稳定起着极其重要的作用^[25]。因此,NKA酶活、丰度及表达量通常被认为是衡量硬骨鱼类和溯河产卵鱼类渗透压调节能力的可靠指标^[26-27]。研究指出,广盐性硬骨鱼类通常能够提高鳃NKA酶活性及基因表达量增强其对盐度的耐受性^[27]。达里湖瓦氏雅罗鱼具有生殖洄游特性,每年4—5月洄游到淡水河道产卵,随后返回到达里湖摄食生长,具有高效的双向渗透压调节能力^[28]。前期研究发现,高碱胁迫下达里湖瓦氏雅罗鱼NKA酶活及基因表达量均显著高于松花江淡水群

体^[15]。本研究将3种实验鱼从淡水低渗环境转入碱水高渗环境,同样发现NKA酶活和基因表达量均显著升高,但母本达里湖瓦氏雅罗鱼最高,杂交种次之,父本最低,表明杂交种较好地遗传了达里湖瓦氏雅罗鱼高效的渗透压调节能力。

动物的血液与机体的代谢、营养状况及疾病有着密切的关系^[29],因此血液病理分析是鱼类疾病诊断的一种重要手段,血液生化指标也常作为反映鱼类的生理状况和代谢机能的重要指标^[30]。碱性磷酸酶AKP是磷酸化酶的一种,广泛分布在原核和真核细胞中,能够在碱性条件下去除如核酸、蛋白、脂类等的磷酸基团,催化磷酸单脂水解^[31]。研究发现,AKP是生物代谢的重要免疫酶,已成为人类一些疾病如中风、骨癌等的重要生物标志物^[32]。近年来,常玉梅等^[17]通过对鲫血清AKP含量和个体碱耐受力相关性分析发现,鲫耐碱存活个体的AKP含量显著高于死亡个体,认为AKP也可以作为鱼类耐碱能力的一个重要的预测指标。本研究发现,高碱胁迫确实导致杂交种及其双亲血清AKP酶活及鳃alpl基因表达量极显著增加($P < 0.0001$,图2),表明AKP与鱼类的耐碱性能相关。但是对比杂交种及其双亲各自的酶活和基因表达量来看,母本达里湖瓦氏

雅罗鱼的AKP酶活及基因表达量均极显著低于父本高体雅罗鱼和杂交种($P < 0.0001$, 图2), 这与米博瀚等^[33]和徐悦等^[34]的研究结果相似, 即高碱胁迫下的达里湖瓦氏雅罗鱼血清AKP含量均低于其淡水群体或近缘种。已有研究发现, AKP催化的去磷酸化反应, 可以显著提高蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[35]和地松鼠(*Spermophilus lateralis*)^[36]的NKA活性。结合本研究结果, 达里

湖瓦氏雅罗鱼的NKA酶活显著高于父本和杂交种, 因此, 我们推测达里湖瓦氏雅罗鱼可能通过激活AKP去磷酸化作用, 调控NKA活性, 增强其在碱水环境的渗透压调节能力, 同时消耗产生的能量用于其他生理过程, 以此适应高碱环境。该结果实际与青海湖裸鲤^[16]、脊尾白虾^[7]随着碱度胁迫时长AKP酶活先升高后下降的结果是一致的。

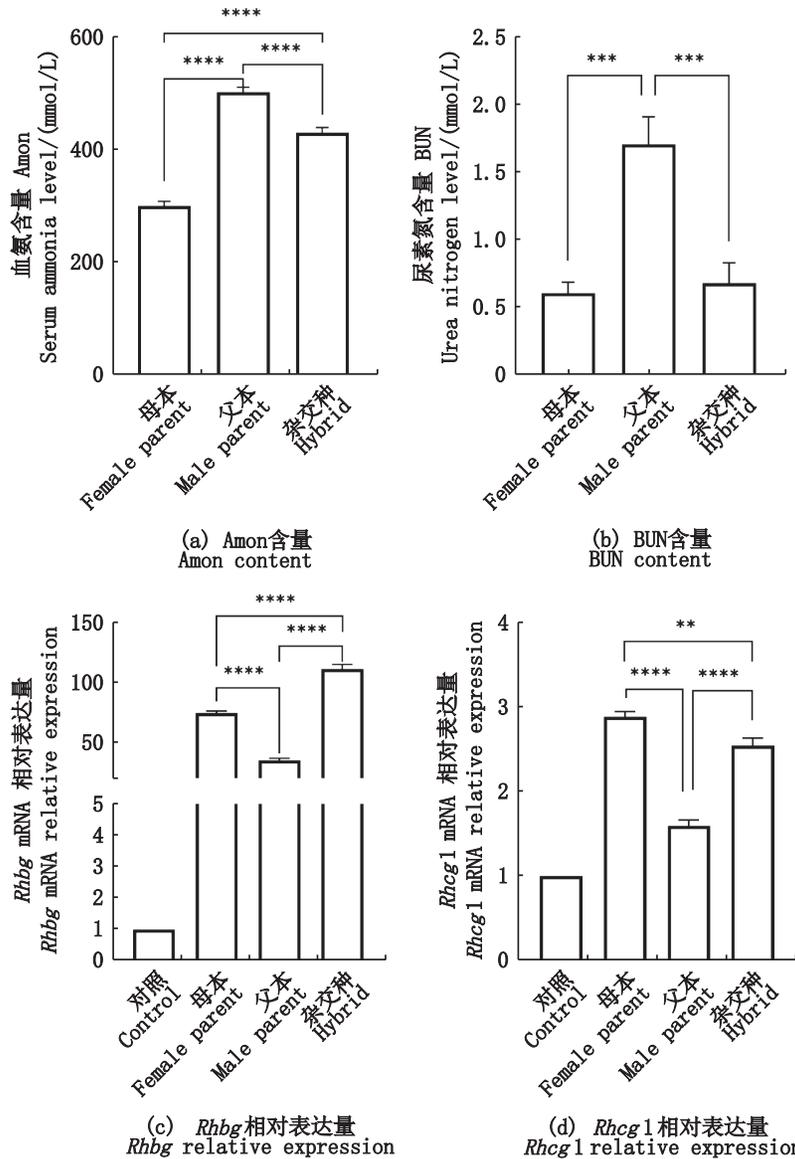


GDH和GS酶活为实验组与对照组差值。直方图上标记的“*”表示不同种间差异显著($P < 0.05$), “**”、“***”和“****”表示不同种间差异极显著($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$)。

GDH and GS activities are denoted as the difference between the experimental group and the control group. Marked “*” on the histogram indicates significant differences between species ($P < 0.05$), “***” and “****” indicate highly significant differences between species ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$).

图3 碱度胁迫下杂交种及其双亲血清GDH和GS酶活及鳃组织glud和glul表达量变化

Fig. 3 Changes of GDH and GS enzyme activities in serum and expression of *glud* and *glul* in the gills of hybrid and its parents under alkalinity stress



血氨和尿素氮含量为实验组与对照组差值。直方图上标记的“**”、“***”和“****”表示不同种间差异极显著($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$)。

Serum ammonia and nitrogen contents are denoted as the difference between the experimental group and the control group. Marked “**”, “***” and “****” on the histogram indicates highly significant differences between species ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$).

图4 碱度胁迫下杂交种及其双亲血清氨氮含量及鳃组织Rh表达量变化

Fig. 4 Changes of ammonia nitrogen content in serum and mRNA expression of Rh in the gills of hybrid and its parents under alkalinity stress

3.2 碱胁迫对雅罗鱼杂交种及其双亲氨代谢能力的影响

排氨是鱼类必需的生理过程。正常条件下,大多数淡水和海水硬骨鱼类>85%以上的氨氮主要通过鳃组织排出体外^[14]。然而在高碱度、高pH及高氨环境下,鱼类鳃组织排氨受阻,血液和组织内源性氨大量积累,可能引发鱼类氨中毒死亡^[37-38]。前期研究发现,一些耐盐碱鱼类演化出不同的代谢策略降低内氨含量,规避氨中毒。首

先,提高自身耐高氨的能力,马加迪罗非鱼(*Oreochromis alcalicus grahami*)氨的半致死浓度是其他常规硬骨鱼类的6倍^[37];其次,将内氨转化成毒性较弱的谷氨酰胺、尿素或游离氨基酸。马加迪罗非鱼通过“鸟氨酸-尿素”循环途径,将所有的氨转化成尿素的形式排出体外^[39];瓦氏雅罗鱼高碱胁迫下,血浆游离氨基酸含量显著增加^[40];再者,对抗氨分压梯度,借助氨转运蛋白由主动扩散转为被动运输。对青海湖裸鲤^[20]、瓦氏

雅罗鱼^[21-22]、尼罗罗非鱼^[18]等研究发现,碳酸盐碱度胁迫下,鳃 *Rhbg* 和 *Rhcg* 基因均显著高表达,这与斑马鱼 (*Danio rerio*)^[41]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[42]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[43]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[44]等相关研究结果一致,即鳃 Rh 蛋白参与环境胁迫下(高氨、强酸、盐碱)氨转运的生物学过程。

从雅罗鱼杂交种及其双亲血清氨氮含量结果(图4)可以看出,高碱胁迫下母本达里湖瓦氏雅罗鱼的氨氮含量最低,而与氨代谢相关的酶活、基因表达量最高(除 *Rhbg* 表达量低于杂交种外),表明达里湖瓦氏雅罗鱼在长期适应达里湖这一极端高碱环境过程中,进化出高效的氨代谢能力,而且这种能力具备可遗传性:一是通过谷氨酸脱氢酶(GDH)和谷氨酸合成酶(GS)途径,催化体内游离的 NH_3 和谷氨酸(Glu)合成谷氨酰胺(Gln),然后将其转运至鳃细胞代谢外排。该结果与常玉梅等^[40]前期发现高碱胁迫下瓦氏雅罗鱼血浆游离氨基酸中的Glu含量显著下降的结果是一致的。另外最新研究发现,青鳉鳃组织存在一种富含谷氨酰胺酶的细胞,称之为谷氨酰胺酶细胞(glutaminase cells, GLS cells),该细胞中的GLS可将Gln转化成 NH_4^+ ,然后通过毗邻的 Na^+/H^+ 交换蛋白(Na^+/H^+ Exchanger, NHE)离子细胞排出体外^[45],首次证实了Gln通过鳃组织代谢外排。二是通过提高鳃离子细胞Rh蛋白高表达,将氨转运出去。这与何强等^[21]和常玉梅等^[22]的研究结果是一致的。同时根据两个蛋白基因表达量可以看出,*Rhbg*的表达量显著高于*Rhcg1*,表明*Rhbg*可能是氨转运的主要参与者。近期课题组通过免疫荧光定位研究发现,RHCG1定位在鳃离子细胞上,而RHBG主要定位在鳃血管壁上,仅有少量定位在鳃离子细胞上,间接表明鱼体大部分氨可能直接通过RHBG转运出去而非离子细胞,以此达到快速降低体内累积的氨对自身造成毒害的目的。

4 结论

通过对雅罗鱼杂交种及其双亲的比较生理学研究,鉴定了几个与耐碱性能显著相关且具有可遗传特性的生理指标,如参与渗透压调节的NKA和AKP,以及参与氨代谢的GDH、GS和Rh蛋白等,为鱼类耐碱性能的综合评价提供了理论

依据,并为雅罗鱼耐碱新品种选育及良种申报奠定了工作基础。

参考文献:

- [1] LIN T T, LAI Q F, YAO Z L, et al. Combined effects of carbonate alkalinity and pH on survival, growth and haemocyte parameters of the Venus clam *Cyclina sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(2): 525-531.
- [2] 常玉梅, 梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展[J]. *水产学报*, 2021, 45(5): 798-812.
CHANG Y M, LIANG L Q. Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 798-812.
- [3] 徐悦, 梁利群, 孙博, 等. 瓦氏雅罗鱼鳃细胞系的建立及其耐碱生长特性初探[J]. *上海海洋大学学报*, 2023, 32(2): 283-291.
XU Y, LIANG L Q, SUN B, et al. Establishment of the gill cell line of *Leuciscus walechii* and alkaline-tolerant growth characteristics [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(2): 283-291.
- [4] 王慧, 来琦芳, 房文红. 沧州运东地区盐碱水资源对开展渔业的影响[J]. *河北渔业*, 2003(5): 16-18.
WANG H, LAI Q F, FANG W H. Infection of saline-alkali water resource to fishery development in area east of canal of Cangzhou city [J]. *Hebei Fisheries*, 2003(5): 16-18.
- [5] LIANG G L, QIN K X, CHEN Y H, et al. Transcriptomic analysis of adaptive mechanisms in response to inland saline-alkaline water in the mud crab, *Scylla paramamosain* [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 974501.
- [6] SONG L Y, ZHAO Y, SONG Y D, et al. Effects of saline-alkaline water on growth performance, nutritional processing, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 2021, 544: 737036.
- [7] 柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 1137-1147.
LIU F, LI J, LI J T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1137-1147.
- [8] 来琦芳, 么宗利, 高鹏程, 等. 盐碱水环境与培养殖种类[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
LAI Q F, YAO Z L, GAO P C, et al. Alkali-saline water environment and enrichment species [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021.

- [9] 徐伟,耿龙武,姜海峰,等. 浅析盐碱水域的鱼类养殖开发利用[J]. 水产学杂志, 2015, 28(4): 44-47.
XU W, GENG L W, JIANG H F, et al. A review of development and utilization of fish culture in saline-alkaline water[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2015, 28(4): 44-47.
- [10] 窦新杰. 10种雅罗鱼遗传多样性分析与杂交子代碱耐受性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
DOU X J. Study on the genetic diversity of 10 *Leuciscus* and the alkalinity tolerance of F₁ hybrids [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [11] 常玉梅, 闫浩, 苏宝锋, 等. 低盐碱池塘养殖雅罗鱼及其杂交种肌肉营养成分分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 332-340.
CHANG Y M, YAN H, SU B F, et al. Analysis of muscular nutritional composition in farmed *Leuciscus* spp. and their hybrids in a low saline-alkaline pond[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 332-340.
- [12] 郑伟刚, 张兆琪, 张美昭. 澎泽鲫幼鱼对盐度和碱度耐受性的研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2004, 9(2): 127-130.
ZHENG W G, ZHANG Z Q, ZHANG M Z. Study on tolerance of *Carassius auratus* Pengze fingerlings to salinity and alkalinity [J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2004, 9(2): 127-130.
- [13] 杨建, 徐伟, 耿龙武, 等. NaHCO₃碱度对5种幼鱼的生存及鳃、肾组织的影响[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(5): 1115-1121.
YANG J, XU W, GENG L W, et al. Effect of NaHCO₃ on survival and gill, kidney tissues in juvenile of 5 species [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2014, 36(5): 1115-1121.
- [14] EVANS D H, PIERMARINI P M, CHOE K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste [J]. Physiological Reviews, 2005, 85(1): 97-177.
- [15] CHANG Y M, ZHAO X F, LIEW H J, et al. Effects of bicarbonate stress on serum ions and gill transporters in alkali and freshwater forms of Amur Ide (*Leuciscus waleckii*) [J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 676096.
- [16] 王卓, 么宗利, 林昕听, 等. 碳酸盐碱度对青海湖裸鲤幼鱼肝和肾SOD、ACP和AKP酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1212-1218.
WANG Z, YAO Z L, LIN T T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on SOD, ACP, and AKP activities in the liver and kidney of juvenile *Gymnocypris przewalskii* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1212-1218.
- [17] 常玉梅, 孙博, 张立民, 等. 达里湖鲫和人工选育红鲫杂交子代对NaHCO₃碱度的耐受力[J]. 水产学杂志, 2019, 32(5): 1-7.
CHANG Y M, SUN B, ZHANG L M, et al. Tolerance of hybrid offsprings of dali lake crucian carp (*Carassius auratus*) female × artificially breeding red crucian carp male to NaHCO₃ alkalinity [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(5): 1-7.
- [18] 吴俊伟, 赵金良, 赵岩, 等. 高碳酸盐碱胁迫对尼罗罗非鱼氨代谢基因表达变化的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1290-1299.
WU J W, ZHAO J L, ZHAO Y, et al. Change in ammonia metabolism gene expression of *Oreochromis niloticus* under the stress of high carbonate alkalinity [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1290-1299.
- [19] WANG Y X S, GONZALEZ R J, PATRICK M L, et al. Unusual physiology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: a high altitude alkaline saline lake [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003, 134(2): 409-421.
- [20] 衣晓飞, 来琦芳, 史健全, 等. 高碱环境下青海湖裸鲤氨废物排泄及相关基因的表达规律[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 681-689.
YI X F, LAI Q F, SHI J Q, et al. Nitrogenous waste excretion and gene expression of nitrogen transporter in *Gymnocypris Przewalskii* in high alkaline environment [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 681-689.
- [21] 何强, 常玉梅, 苏宝锋, 等. 碳酸盐碱度对达里湖瓦氏雅罗鱼耗氧率、氨氮排泄和排氨基因表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(4): 551-558.
HE Q, CHANG Y M, SU B F, et al. Effects of carbonate alkalinity on oxygen consumption, ammonia excretion and ammonia excretion gene expression in *Leuciscus waleckii* Dybowski [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(4): 551-558.
- [22] CHANG Y M, TANG R, DOU X J, et al. Transcriptome and expression profiling analysis of *Leuciscus waleckii*: an exploration of the alkali-adapted mechanisms of a freshwater teleost [J]. Molecular BioSystems, 2014, 10(3): 491-504.
- [23] HIROSE S, KANEKO T, NAITO N, et al. Molecular biology of major components of chloride cells [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 136(4): 593-620.
- [24] SINHA A K, DASAN A F, RASOLONIRIANA R, et al. Hypo-osmotic stress-induced physiological and ion-osmoregulatory responses in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) are modulated differentially by nutritional status [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology,

- 2015, 181: 87-99.
- [25] 丁红兵, 李浩宇, 陈义华, 等. 高盐对缢蛏生长存活、 Na^+/K^+ -ATPase 活性及能量代谢相关指标的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(4): 831-838.
- DING H B, LI H Y, CHEN Y H, et al. Effects of high salinity on growth and survival, Na^+/K^+ -ATPase activity and energy metabolism related indexes of razor clam *Sinonovacula constricta* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(4): 831-838.
- [26] DEANE E E, WOO N Y S. Cloning and characterization of sea bream Na^+/K^+ -ATPase α and β subunit genes: in vitro effects of hormones on transcriptional and translational expression [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 331(4): 1229-1238.
- [27] TSAI J W, LIEW H J, JHANG J J, et al. A field and laboratory study of the responses of cytoprotection and osmoregulation to salinity stress in mosquitofish (*Gambusia affinis*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(2): 489-502.
- [28] WANG S Y, HUANG J, LIANG L Q, et al. Distinctive metabolite profiles in migrating Amur ide (*Leuciscus waluickii*) reveal changes in osmotic pressure, gonadal development, and energy allocation strategies [J]. Frontiers in Environmental Science, 2022, 10: 997827.
- [29] 高珊, 常玉梅, 赵雪飞, 等. 不同 NaHCO_3 碱度对瓦氏雅罗鱼鳃组织结构的影响[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 736-743.
- GAO S, CHANG Y M, ZHAO X F, et al. The effect of different bicarbonate alkalinity on the gill structure of Amur ide (*Leuciscus waluickii*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(4): 736-743.
- [30] 王念民, 杨合霖, 丰超杰, 等. 碳酸盐碱度对3月龄杂交鲟(*Huso dauricus*♀×*Acipenser schrenckii*♂)生长与血清生化指标的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(1): 98-107.
- WANG N M, YANG H L, FENG C J, et al. Effects of different carbonate alkalinity on survival, growth and biochemical indexes in serum of three-month-old hybrid sturgeon (*Huso dauricus* ♀ × *Acipenser schrenckii* ♂) [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(1): 98-107.
- [31] LALLÈS J P. Biology, environmental and nutritional modulation of skin mucus alkaline phosphatase in fish: A review[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 179-186.
- [32] BRICHACEK A L, BROWN C M. Alkaline phosphatase: a potential biomarker for stroke and implications for treatment[J]. Metabolic Brain Disease, 2019, 34(1): 3-19.
- [33] 米博瀚, 赵雪飞, 高珊, 等. 碱胁迫对瓦氏雅罗鱼 AKP 基因表达及生理应答的影响[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(6): 1052-1059.
- MI B H, ZHAO X F, GAO S, et al. Effects of alkaline stress on AKP gene expression and physiology response in *Leuciscus waluickii* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(6): 1052-1059.
- [34] 徐悦, 米博瀚, 赵雪飞, 等. 碳酸盐胁迫对瓦氏雅罗鱼血液中部分生理生化指标的影响[J]. 水产学杂志, 2021, 34(3): 17-21.
- XU Y, MI B H, ZHAO X F, et al. Effects of alkalinity stress on blood biochemical indices in *Leuciscus waluickii* [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2021, 34(3): 17-21.
- [35] LOVETT D L, TOWLE D W, FARIS J E. Salinity-sensitive alkaline phosphatase activity in gills of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1994, 109(1): 163-173.
- [36] MACDONALD J A, STOREY K B. Regulation of ground squirrel Na^+/K^+ -ATPase activity by reversible phosphorylation during hibernation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 254(2): 424-429.
- [37] WILKIE M P, WOOD C M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 113(4): 665-673.
- [38] LIEW H J, SINHA A K, MAURO N, et al. Feeding and swimming modulate iono-and-hormonal regulation differently in *Goldfish*, *Carassius AURATUS* and common carp, *Cyprinus carpio* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2013, 165(1): 13-21.
- [39] RANDALL D J, WOOD C M, PERRY S F, et al. Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment[J]. Nature, 1989, 337(6203): 165-166.
- [40] 常玉梅, 何强, 孙言春, 等. 碳酸盐碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 117-124.
- CHANG Y M, HE Q, SUN Y C, et al. Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waluickii* exposed to different environmental alkalinity levels [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 117-124.
- [41] SHIH T H, HORNG J L, LAI Y T, et al. Rhcg1 and Rhbg mediate ammonia excretion by ionocytes and keratinocytes in the skin of zebrafish larvae: H^+ -ATPase-linked active ammonia excretion by ionocytes [J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2013, 304(12): R1130-R1138.
- [42] TSUI T K N, HUNG C Y C, NAWATA C M, et al. Ammonia transport in cultured gill epithelium of freshwater rainbow trout: the importance of Rhesus glycoproteins and

- the presence of an apical $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ exchange complex[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(6): 878-892.
- [43] LIU S T, TSUNG L, HORNG J L, et al. Proton-facilitated ammonia excretion by ionocytes of medaka (*Oryzias latipes*) acclimated to seawater [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2013, 305(3): R242-R251.
- [44] 赵兰, 徐鹏, 孙效文. 碳酸盐碱度胁迫下鲤鱼氨排泄相关基因的差异表达[J]. *生物技术通报*, 2013(4): 185-193.
- ZHAO L, XU P, SUN X W. Ammonia excretion related genes expression of common carp under the stress of carbonate alkalinity [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(4): 185-193.
- [45] CHUANG H J, CHIU L, YAN J J, et al. Responses of medaka (*Oryzias latipes*) ammonia production and excretion to overcome acidified environments [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 445: 130539.

A comparative study on physiological indexes related to alkali resistance of *Leuciscus hybrid* and its parents

LI Wen^{1,2}, AIKEDA·Reheman^{2,3}, ZOU Yuting^{1,2}, HUANG Jing², ZHANG Limin², CHANG Yumei²

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National and Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 3. College of Fisheries and Life Sciences, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China)

Abstract: To investigate the alkali resistance of the hybrid of *Leuciscus* and its parent *Leuciscus waleckii* (female parent) and *Leuciscus idus* (male parent) of the Irtysh River in Xinjiang, the alkalinity stress experiment of 50 mmol/L NaHCO_3 was carried out on three experimental fish for 7 days. Several physiological indexes and corresponding gene expressions involving osmotic pressure regulation and ammonia metabolism and significantly related to alkali resistance were compared and studied. The results showed that the Na^+/K^+ ATPase (NKA) activity and gene expression (*ATPase $\alpha 1$ -like* and *ATPase $\alpha 3$*) of the gill tissues of the female parent with strong alkali resistance were higher than those of hybrids, and significantly higher than those of the male parent. The serum alkaline phosphatase (AKP) activity and the gene expression amount (*alpl*) of gill tissue were significantly lower than those of the other two fish, indicating that the female parent may regulate NKA enzyme activity through AKP dephosphorylation and participate in osmotic pressure regulation under high alkaline stress. The detection of ammonia metabolism related indexes showed that the blood ammonia (Amon) and urea nitrogen (BUN) contents of the female parent were extremely significantly lower than those of the other two fish, while the serum glutamate dehydrogenase (GDH) and glutamine synthetase (GS), as well as the expression of related genes in the gill tissue (*glud*, *glul*, *Rhbg* and *Rhcg1*) were mostly higher than those of hybrids, and significantly higher than those of the male parent, indicating that the female parent consumed ammonia in the body by synthesizing ammonia intermediate metabolites and increasing the activity of ammonia transporters. In summary, these physiological indexes were significantly related to the female parent's strong alkali resistance, and were well inherited to its hybrid offspring. The results of this study provide a theoretical basis for the comprehensive evaluation of the alkali resistance of fish, and lay a working foundation for the selection and breeding of new varieties of alkali resistance and the declaration of improved varieties of *Leuciscus*.

Key words: *Leuciscus*; hybrids; alkali resistance; osmotic pressure regulation; ammonia metabolism