



## 低盐驯化对低盐胁迫下大黄鱼转录组的影响

曾霖<sup>1</sup>, 张惠<sup>2,3</sup>, 宋炜<sup>2,3\*</sup>, 熊逸飞<sup>2</sup>, 谢正丽<sup>4</sup>, 黄伟卿<sup>5</sup>

(1. 蚌埠学院食品与生物工程学院, 安徽蚌埠 233030;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;

3. 浙江海洋大学, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江舟山 316022;

4. 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 上海 200092;

5. 宁德师范学院生命科学学院, 福建宁德 352100)

**摘要:** 为探讨低盐驯化对低盐胁迫下大黄鱼氧化损伤和转录组的影响, 本实验将体重为 (52.46±1.47) g 的大黄鱼暴露在盐度为 25 或 20 的水体中 7 d, 再暴露在盐度为 10 的水体中 24 h。结果显示, 低盐胁迫显著增加了活性氧 (ROS) 和脂质过氧化物 (LPO) 含量。尽管低盐驯化对 ROS 和 LPO 不产生影响, 但低盐驯化显著降低了低盐胁迫下大黄鱼 ROS 和 LPO 含量, 表明低盐驯化缓解了低盐胁迫对大黄鱼的氧化损伤。从低盐驯化 vs. 对照组、低盐胁迫 vs. 对照组和低盐驯化+低盐胁迫 vs. 低盐胁迫实验中, 分别筛选到 356、478 和 484 个差异基因。GO 和 KEGG 分析发现, 差异基因显著富集在 GnRH 信号通路、PPAR 信号通路、凋亡、Toll 样受体通路和 MAPK 信号通路等, 表明低盐驯化可以通过调节离子和物质运输、脂类代谢、细胞凋亡和非特异性免疫等来提高大黄鱼的低盐胁迫耐受性。研究表明, 低盐驯化可以通过调节离子和物质运输、脂类代谢、细胞凋亡和非特异性免疫等来提高大黄鱼的低盐胁迫耐受性。研究结果揭示了低盐驯化改善大黄鱼低盐胁迫耐受性的分子机制, 可为今后工厂化和内陆采用淡水或半咸水养殖大黄鱼提供科学依据。

**关键词:** 大黄鱼; 盐度; 胁迫; 转录组; 毒物兴奋效应; 信号通路

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国重要的海洋经济鱼类, 养殖区域主要分布在福建、浙江和广东等近海海域, 2019 年全国养殖产量高达 22.55 万 t, 已成为我国海水鱼类养殖产量最高的单一品种<sup>[1-2]</sup>。尽管大黄鱼养殖业获得了突飞猛进的发展, 但仍面临着养殖海域面积有限、养殖网箱密度过高、病害频发和养殖水体恶化等问题。盐度是影响鱼类生理功能的重要环境因子。大黄鱼为广盐性鱼类, 具有很强的低盐胁迫耐受性, 经过低盐驯化的大黄鱼甚至可以在淡水中存活<sup>[3]</sup>。

已有研究表明, 适当降低盐度有利于改善大黄鱼的生长, 防治寄生虫如刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) (俗称“白点病”)、淀粉卵涡鞭虫 (*Amyl-oosinium ocellatum*) 和本尼登虫 (*Benedenia seri-olae*) 等疾病<sup>[4]</sup>。因此, 采用接力养殖 (从高盐海域转运到低盐海域)、深远海养殖工船模式 (寄生虫病发生后, 向船内注入淡水或者停泊到低盐海区) 和内陆淡水或半咸水等低盐养殖技术来扩大大黄鱼的养殖区域, 不仅有利于上述问题的解决, 也可以促进大黄鱼养殖业健康可持续发展。

收稿日期: 2022-03-15 修回日期: 2022-04-27

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900904); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室山东省专项经费 (2022QNLM30001); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-47); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020TD76)

第一作者: 曾霖, 从事养殖生理生态学研究, E-mail: zenglin615@126.com

通信作者: 宋炜 (照片), 从事水产养殖研究, E-mail: songw@ccsf.ac.cn



在生产实践中, 养殖户通常采用逐步降低盐度的方法来缓解低盐应激对大黄鱼造成的损伤。毒物兴奋效应是指有机体经历低剂量胁迫后, 可以提高其对相同或不同高剂量胁迫因子的耐受性<sup>[5]</sup>。研究表明, 高温驯化提高了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 对高盐胁迫的耐受性<sup>[6]</sup>。最近的研究表明, 低浓度铜驯化和低氧驯化分别通过改善非特异性免疫和能量代谢来提高大黄鱼对铜胁迫的耐受性<sup>[7-8]</sup>。目前, 有关低盐驯化改善鱼类低盐胁迫耐受性的作用机制研究尚未见报道。

转录组测序技术 (RNA-Seq) 具有灵敏度高和可靠性好等优点, 可以快速地检测基因表达的变化, 为全面准确理解鱼类对环境胁迫响应的分子机制提供了契机。已有研究采用 RNA-Seq 技术揭示了大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*)、大黄鱼和银鲳 (*Pampus argenteus*) 分别对低氧、饥饿和低温的响应机制<sup>[9-11]</sup>。然而, 采用 RNA-Seq 技术解析盐度驯化对低盐胁迫下鱼类基因表达谱的影响鲜有报道。本实验通过测量氧化损伤标志物, 并利用 RNA-Seq 技术筛选与盐度变化相关的功能基因, 为揭示低盐驯化提高大黄鱼低盐胁迫耐受性的作用机制提供理论支撑, 也为今后接力养殖、深远海养殖工船模式和内陆采用淡水或半咸水养殖大黄鱼提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计及样本采集

体重为 (52.46±1.47) g 的实验大黄鱼购自福建宁德富发水产有限公司。将实验鱼放入 12 个容积为 400 L 的钢化玻璃桶中暂养 2 周, 20 尾/桶。之后将实验鱼随机分为 2 组 (6 桶/组), 分别采用盐度为 25 和 20 的养殖水体暴露 7 d。低盐水体由过滤天然海水 (盐度为 25) 加入适量的淡水调配而成, 以 1/d 的速率降至 20。暂养和低盐驯化期间, 每天过饱和投喂商业饲料 2 次 (08:00 和 16:00), 换水率为 100%。水质参数: 温度 (21.42±1.63)℃、pH 7.54±0.31、溶解氧 (7.43±0.36) mg/L、总氨氮 (0.16±0.02)~(0.22±0.03) mg/L。低盐驯化结束后, 饥饿 24 h, 将一半数量养殖桶的水体盐度维持不变, 另一半数量养殖桶的水体盐度以 2.5/h 的速率降至 10。此时, 实验鱼可分为对照组 (C 组)、低盐驯化组 (A 组)、低盐组 (CL 组) 和低盐驯化+低盐组 (AL 组), 每组 3 个平行 (图 1)。低盐胁迫 24 h

后, 每桶随机取 4 尾鱼肝脏用于活性氧 (ROS) 和脂质过氧化物 (LPO) 测定, 另取 1 尾鱼的肝脏用于转录组测序。实验过程中操作人员严格遵守浙江海洋大学伦理规范, 并按照浙江海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

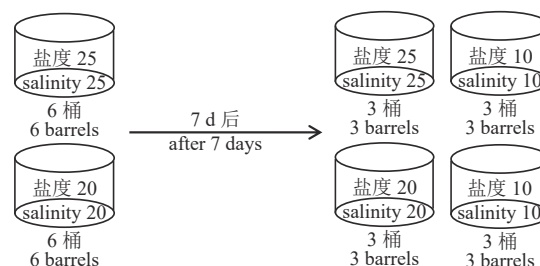


图 1 实验组示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experimental groups

### 1.2 ROS 和 LPO 含量检测

依照最近的实验方法<sup>[12]</sup>, 采用缓冲液 [80 mmol Tris、1 mmol 苯甲脒、1 mmol 4-(2-氨基)苯磺酰氟盐酸、2 mmol DTT 和 5 mmol EDTA, pH=7.6] 对肝脏样本进行匀浆, 提取上清液。然后使用试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 采用分光光度法测量 ROS 和 LPO 含量。

### 1.3 RNA 提取、文库构建和高通量测序

依照已有的实验方法<sup>[13]</sup> 提取肝脏 RNA, 分别采用琼脂糖凝胶电泳法和 Nanodrop 微量分光光度计来检测 RNA 的完整性和浓度。使用 TruSeq™ RNA sample preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) 试剂盒进行 cDNA 文库构建。在高通量测序平台 Illumina Hiseq 2500 上进行转录组测序。

### 1.4 数据分析

使用 SeqPrep v1.3.2 软件对原始数据 (Raw Date) 进行过滤, 获得高质量数据 (Clean reads)。采用 HISAT2 软件将过滤后的 Clean reads 与本课题组的大黄鱼基因组数据库进行比对与功能注释<sup>[14]</sup>。

使用 DESeq 2 软件采用 FPKM 计算方法将 Clean data 标准化, 以差异倍数  $\log_2(\text{fold change}) \geq 1$  且  $P < 0.05$  为标准筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)<sup>[15]</sup>。然后采用 Go-tools 和 KOBAS 3.0 软件将差异表达基因与 GO 数据库和 KEGG 数据库进行比对, 从而获得 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。

### 1.5 RT-qPCR 验证

随机挑选出 10 个基因, 参照 Zeng 等<sup>[13]</sup> 的方

法进行 RT-qPCR 检测。使用 Trizol (Invitrogen) 试剂盒提取肝脏总 RNA, 使用 first-strand cDNA synthesis kit (Fermentas) 反转录成 cDNA。依据大黄鱼基因组数据库中的基因序列设计实时荧光定量引物 (表 1)。在荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosys-

tems Prism 7500 Sequence Detection System, 美国) 上使用 2×QuantiFast SYBR Green Master Mix 试剂盒 (Qiagen) 进行 PCR 反应。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法对目的基因表达水平进行分析<sup>[16]</sup>。使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 ( $P < 0.05$ )。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers used for Real-time PCR analysis

基因名称 gene names	正向引物 forward primer (5'-3')	反向引物 reverse primer (5'-3')
<i>cox2</i>	GAGTGCTAATCTCCGCTGAAG	TGGGACTGCTTCAACTACGAT
<i>ccnb2</i>	CCAGGTCCACTCCAGGTTC	GCGTTGTCCGTGATGTGAGGC
<i>tnfa</i>	ACACCTCTCAGCCACAGGAT	CCGTGTCCACTCCATAGTT
<i>tlr5s</i>	CGCCTTGTGTTTCAATACAGA	GAAAGAAGGAACAGCCATATTA
<i>sqlea</i>	GAGCTGCTGCAGCC	GGAGGAGATCTGGTAGATGA
<i>ppara</i>	GTCAAGCAGATCCACGAAGCC	TGGTCTTCCAGTGAGTATGAGCC
<i>pfk</i>	CCTCGCAAGTATAACATCTC	CAGCATTGACAGCCGTATC
<i>sod3</i>	GAGACAATACAAACGGGTGC	CAATGATGGAAATGGGGC
<i>foxo3b</i>	GACGAGGTGCCCGATGACGA	AACCCTGAGGAACCATTTGGAGTG
<i>hsf1</i>	TGATTGGACGGACGCAGGA	GAAAGTGGTGGGGGAAAGGG
$\beta$ -actin	TCGTGGTCTGCCAGGCAT	ATGGCGTGGGGCAGAGCGT

## 2 结果

### 2.1 ROS 和 LPO 含量

与对照组相比, CL 组的 ROS 和 LPO 含量显著增加。尽管 A 组的 ROS 和 LPO 含量与对照组之间无显著差异, 但 AL 组的 ROS 和 LPO 含量显著低于 CL 组 (图 2)。

### 2.2 转录组测序结果

肝脏样本经过高通量转录组测序、原始数据过滤后获得有效数据 (clean reads) 超过  $5.79 \times 10^7$  条,

clean reads 的质量得分 Q30 均在 96.29 以上, GC 含量为 49.08~49.82, 表明测序数据可靠, 可用于后续分析 (表 2)。

### 2.3 差异表达基因分析

低盐驯化 (A vs. C) 共诱导 356 个差异基因, 其中上调差异基因 173 个, 下调差异基因 183 个。低盐 (CL vs. C) 共诱导 478 个差异基因, 其中上调差异基因 184 个, 下调差异基因 294 个。在低盐胁迫的大黄鱼中, 低盐驯化 (AL vs. CL) 共诱导 484 个差异基因, 其中上调差异基因 284 个, 下

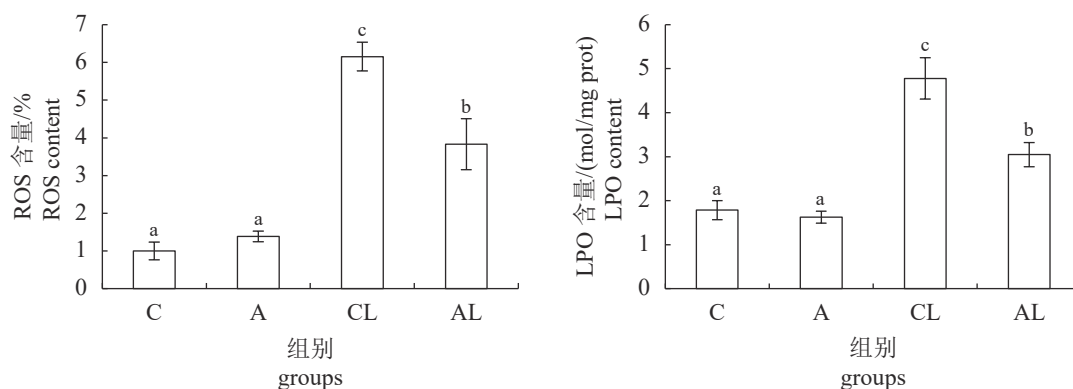


图 2 盐度变化对大黄鱼肝脏 ROS 和 LPO 含量的影响

C. 对照组, A. 低盐驯化组, CL. 低盐组, AL. 低盐驯化+低盐组, 下同。不同字母表示存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Effects of salinity on ROS and LPO content in the liver of *L. crocea*

C. control, A. low-salt acclimation group, CL. low-salt group, AL. low-salt acclimation + low-salt group, the same below. Different letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ).

表 2 测序数据统计分析

**Tab. 2 Statistics of sequencing data**

样品 sample	原始数据 raw reads	过滤数据 clean reads	过滤数据 大小/Gb clean bases	Q30/%	GC含量/% GC content
C1	77 649 366	75 254 540	11.28	96.92	49.43
C2	81 810 578	78 983 222	11.84	96.54	49.26
C3	80 868 078	78 150 256	11.71	96.64	49.08
CL1	77 008 962	74 489 650	11.16	96.73	49.37
CL2	65 106 678	63 068 944	9.45	96.87	49.74
CL3	60 349 446	58 157 278	8.71	96.37	49.22
A1	64 706 690	62 658 500	9.39	96.83	49.38
A2	65 848 574	63 879 978	9.57	97.01	49.17
A3	62 618 968	60 293 424	9.03	96.29	49.29
AL1	87 644 116	85 170 414	12.76	97.18	49.13
AL2	76 300 560	73 877 622	11.07	96.82	49.82
AL3	59 530 342	57 870 710	8.67	97.21	49.09

调差异基因 200 个。将两两对比后的差异基因进行韦恩分析 (图 3), 有 15 个重叠的差异表达基因, A vs. C 的特异性差异表达基因较少, 有 215 个。AL vs. CL 的特异性差异表达基因较多, 有 367 个。

### 2.4 GO 功能富集分析

对所有差异基因进行了 GO 功能富集分析。低盐驯化后 (A vs. C), 差异表达基因显著富集在生物过程类别中的补体激活、B 细胞活化的正调

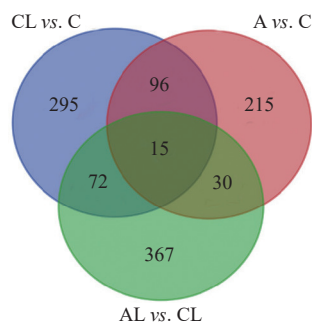


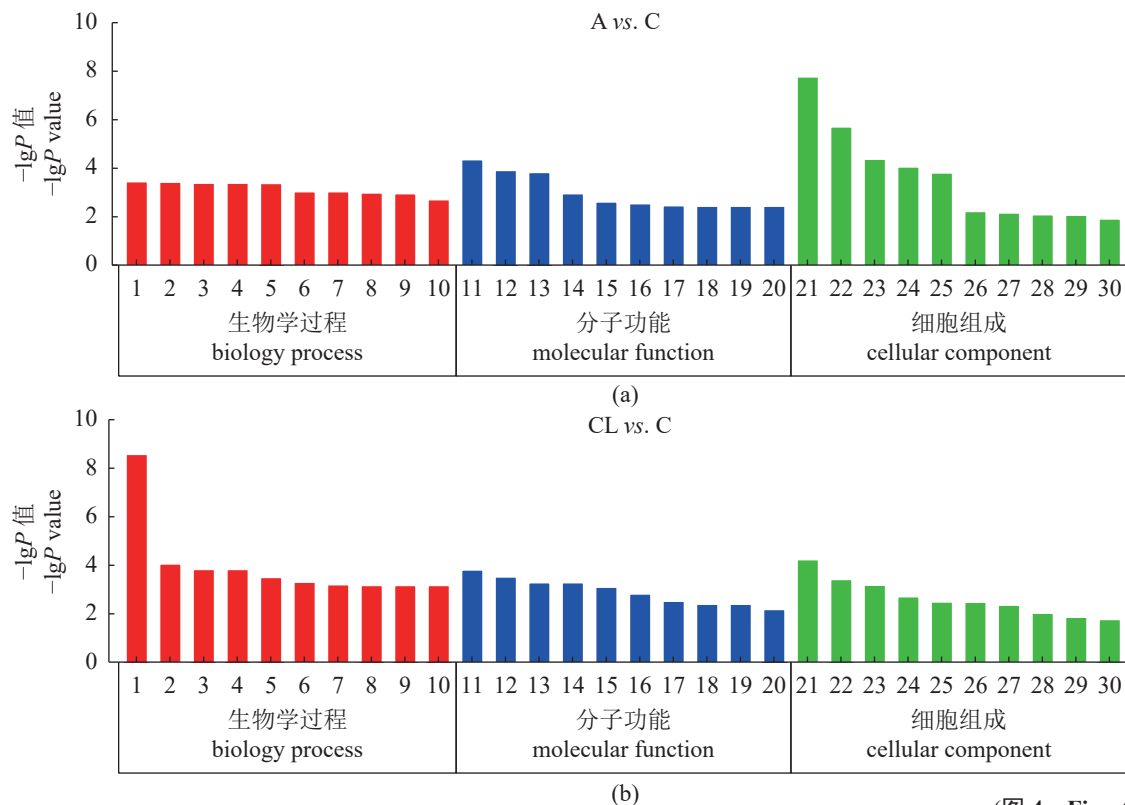
图 3 转录组中差异表达基因韦恩图

A vs. C 表示低盐驯化组 (A 组) 与对照组 (C 组) 对比, CL vs. C 表示低盐组 (CL 组) 与对照组 (C 组) 对比, AL vs. CL 表示低盐驯化+低盐组 (AL 组) 与低盐组 (CL 组) 对比, 下同。

Fig. 3 Venn diagram of differentially expressed genes in the transcriptome

A vs. C represents the comparison between the low salt acclimation group (A group) and the control group (C group), CL vs. C represents the comparison between the low salt group (CL group) and the control group (C group), AL vs. CL represents the comparison between the low salt acclimation+low salt group (AL group) and the low salt group (CL group), the same below.

节、吞噬、识别等, 分子功能类别中的丝氨酸型内肽酶活性、免疫球蛋白受体结合和抗原结合等, 以及细胞组分类别中的细胞外间隙、质膜外侧和胞外区等 (图 4)。低盐应激后 (CL vs. C), 差异基因显著富集在生物过程类别中的胆固醇生物合成、



(图 4 Fig. 4)

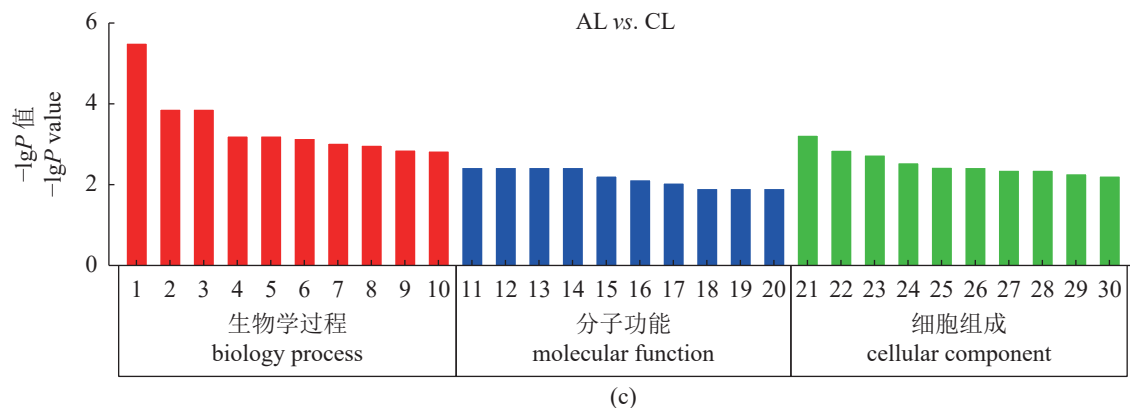


图 4 转录组差异基因的 GO 分析

(a) 1. 补体激活, 经典途径; 2.  $\beta$ -胡萝卜素代谢过程; 3. B 细胞活化的正调控; 4. 吞噬、识别; 5. 免疫调节反应; 6. 白细胞介素-10 产生的正调控; 7. 胆固醇分解代谢过程; 8. 蛋白水解; 9. 补体激活; 10. 消化; 11. 丝氨酸型内肽酶活性; 12. 免疫球蛋白受体结合; 13. 抗原结合; 14. D3 多巴胺受体结合; 15. 岩藻糖结合素; 16. RNA 导向的 DNA 聚合酶活性; 17. 病毒受体活性; 18. 酰基肉碱跨膜转运蛋白活性; 19. 类胡萝卜素双加氧酶活性; 20.  $\beta$ -胡萝卜素 15、15'-单加氧酶活性; 21. 细胞外间隙; 22. 质膜外侧; 23. 胞外区; 24. 免疫球蛋白复合物, 循环; 25. 质膜; 26. 免疫球蛋白复合物; 27. 肌多糖复合物; 28. 膜的整体组成; 29. 粗面内质网; 30. 片状膜。(b) 1. 胆固醇生物合成过程; 2. 内源性凋亡信号通路的正调控; 3. 维生素 D 的代谢过程; 4. 维生素的代谢过程; 5. 氧化还原过程; 6. 淋巴细胞趋化性; 7. 胆固醇的代谢过程; 8. 蛋白质去折核苷酸二磷酸酶活性; 9. 嗜酸性粒细胞迁移的正调控; 10. 纤维连接蛋白依赖性胸腺细胞迁移的正调控; 11. dTTP 二磷酸酶活性; 12. 核苷三磷酸二磷酸酶活性; 13. 免疫球蛋白受体结合; 14. NADH 焦磷酸酶活性; 15. 抗原结合; 16. 血红素结合; 17. 胰岛素样生长因子受体结合; 18. 前胶原-脯氨酸 4-双氧酶活性; 19. 胞外区; 20. 醇脱氢酶活性; 21. 吞噬溶酶体; 22. 免疫球蛋白复合物, 循环; 23.  $\alpha$ 9- $\beta$ 1 整合素-adam8 复合物; 24. 致密的核心颗粒膜; 25. 质膜外侧; 26. 磷脂酰肌醇 3-激酶复合物; 27. 脂肪粒; 28. 三级颗粒; 29. 细胞外间隙; 30. 精子环。(c) 1. 对细菌的反应; 2. 维生素代谢过程; 3. 维生素 D 代谢过程; 4. 维生素 D 分解代谢过程; 5. 蛋白质折叠; 6. 胰岛素分解代谢过程; 7. 成骨细胞分化; 8. 醚脂代谢过程; 9. 突触受体定位的调节; 10. 蛋白质稳定化; 11. 生长抑素受体结合; 12. 生物素化物酶活性; 13. 激酶抑制剂活性; 14. 甲状腺素 5-脱碘酶活性; 15. 低密度脂蛋白受体活性; 16. 铁离子结合; 17. 甾醇酯酶活性; 18. 未折叠蛋白结合; 19. cAMP 反应元件结合; 20. 锚蛋白重复结合; 21. 质膜; 22. 内质网伴侣复合物; 23. 突触后膜; 24. 封闭连接; 25. 吞噬溶酶体; 26. 细胞表面; 27. 静脉曲张; 28. 轴突起始段; 29. 胞外区; 30. 内动力蛋白臂。

Fig. 4 Gene ontology analyses of differentially expressed genes in the transcriptome

(a) 1. complement activation, classical pathway; 2. beta-carotene metabolic process; 3. positive regulation of B cell activation; 4. phagocytosis, recognition; 5. regulation of immune response; 6. positive regulation of interleukin-10 production; 7. cholesterol catabolic process; 8. protein unfolding nucleotide diphosphatase activity; 9. complement activation; 10. digestion; 11. serine-type endopeptidase activity; 12. immunoglobulin receptor binding; 13. antigen binding; 14. D3 dopamine receptor binding; 15. fucose binding; 16. RNA-directed DNA polymerase activity; 17. virus receptor activity; 18. acyl carnitine transmembrane transporter activity; 19. carotenoid dioxygenase activity; 20. beta-carotene 15, 15'-monooxygenase activity; 21. extracellular space; 22. external side of plasma membrane; 23. extracellular region; 24. immunoglobulin complex, circulating; 25. plasma membrane; 26. immunoglobulin complex; 27. sarcoglycan complex; 28. integral component of membrane; 29. rough endoplasmic reticulum; 30. lamellipodium membrane. (b) 1. cholesterol biosynthetic process; 2. positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway; 3. vitamin D metabolic process; 4. vitamin metabolic process; 5. oxidation-reduction process; 6. lymphocyte chemotaxis; 7. cholesterol metabolic process; 8. protein unfolding; 9. positive regulation of eosinophil migration; 10. positive regulation of fibronectin-dependent thymocyte migration; 11. dTTP diphosphatase activity; 12. nucleoside-triphosphate diphosphatase activity; 13. immunoglobulin receptor binding; 14. NADH pyrophosphatase activity; 15. antigen binding; 16. heme binding; 17. insulin-like growth factor receptor binding; 18. procollagen-proline 4-dioxygenase activity; 19. nucleotide diphosphatase activity; 20. alcohol dehydrogenase (NAD) activity; 21. phagolysosome; 22. immunoglobulin complex, circulating; 23. alpha9-beta1 integrin-adam8 complex; 24. dense core granule membrane; 25. external side of plasma membrane; 26. phosphatidylinositol 3-kinase complex; 27. lipid particle; 28. tertiary granule; 29. extracellular space; 30. sperm annulus. (c) 1. response to bacterium; 2. vitamin metabolic process; 3. vitamin D metabolic process; 4. vitamin D catabolic process; 5. protein folding; 6. insulin catabolic process; 7. osteoblast differentiation; 8. ether lipid metabolic process; 9. regulation of synaptic receptor localization; 10. protein stabilization; 11. somatostatin receptor binding; 12. biotinidase activity; 13. kinase inhibitor activity; 14. thyroxine 5-deiodinase activity; 15. low density lipoprotein receptor activity; 16. iron ion binding; 17. sterol esterase activity; 18. unfolded protein binding; 19. cAMP response element binding; 20. ankyrin repeat binding; 21. plasma membrane; 22. endoplasmic reticulum chaperone complex; 23. postsynaptic membrane; 24. closed connection; 25. phagolysosome; 26. cell surface; 27. varicosity; 28. axon starting segment; 29. extracellular region; 30. inner dynein arm.

内源性凋亡信号通路的正调控和氧化还原等, 分子功能类别中的 dTTP 二磷酸酶活性、核苷三磷酸二磷酸酶活性和免疫球蛋白受体结合等, 以及细胞组分类别中的吞噬溶酶体和免疫球蛋白复合

物等。在低盐胁迫的大黄鱼中, 低盐驯化 (AL vs. CL) 诱导的差异基因显著富集在生物过程类别中的对细菌的反应、维生素代谢和蛋白质折叠等, 分子功能类别中的生长抑素受体结合、生物素酶

活性和激酶抑制剂活性等, 以及细胞组分类别中的质膜、内质网伴侣复合物和突触后膜等。

## 2.5 KEGG 富集通路分析

对所有差异基因进行了 KEGG 富集通路分析, 低盐驯化后 (A vs. C), 差异基因显著富集在 GnRH 信号通路、噬菌体、不饱和脂肪酸生物合成和 PPAR 信号通路等。低盐应激后 (CL vs. C), 差异基因显著富集在类固醇生物合成、氨基酸代谢和 PPAR 信号通路等 (图 5)。在低盐胁迫的大黄鱼中, 低盐驯化 (AL vs. CL) 诱导的差异基因显著富集在类固醇生物合成、神经活性配体-受体相互作用和甘油酯代谢等。

## 2.6 聚类分析

为了更深刻地理解低盐驯化对大黄鱼低盐胁迫耐受性的影响, 实验对一些关键通路中的差异基因进行了聚类分析。GnRH 信号通路中的大部分基因表达不受低盐驯化 (A vs. C) 的影响; 低盐胁迫 (CL vs. C) 上调了 *calml4a* 和 *cacna1da* 基因表达, 下调了 *adc4*、*june*、*camk2b* 和 *egr1* 等基因表达; 这些基因在 AL vs. CL 中的表达模式呈现出与 CL vs. C 相反的趋势 (图 6)。PPAR 信号通路中的大部分基因表达不受低盐驯化的影响; 低盐胁迫 (CL vs. C) 上调了 *pparab*、*slc27a2a* 和 *fabp6* 基因表达, 下调了 *scd*、*hmgcs1* 和 *angptl4* 基因表达;

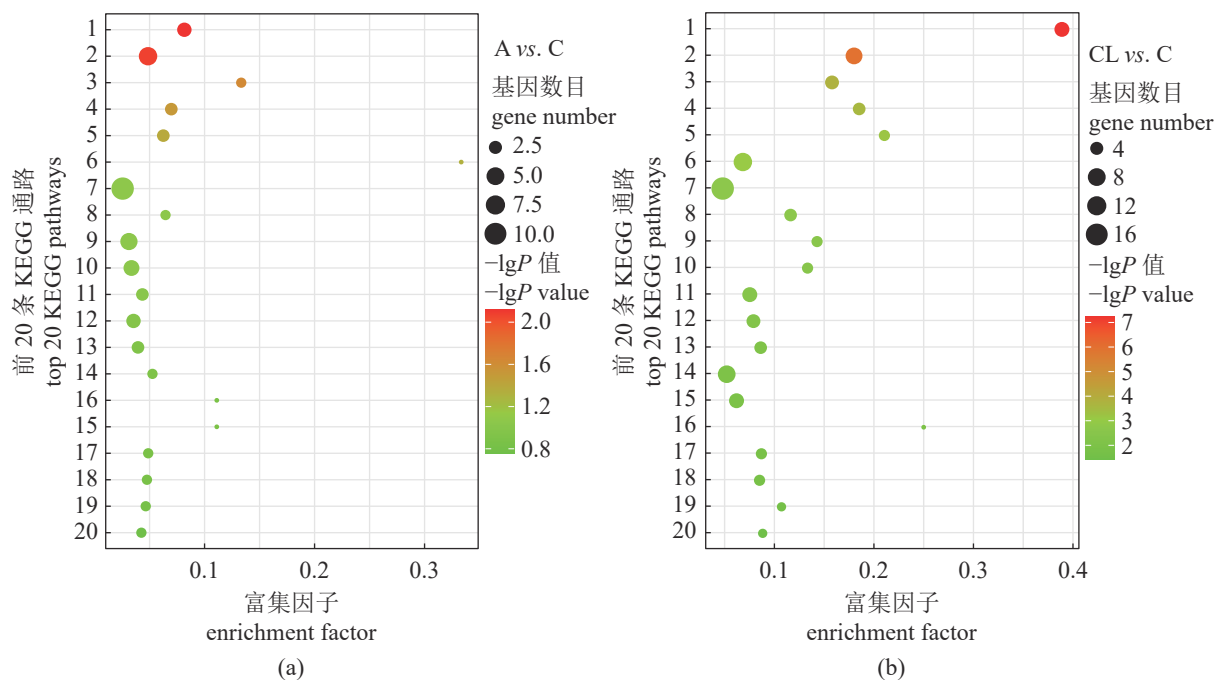
这些基因在 AL vs. CL 中的表达模式呈现出与 CL vs. C 相反的趋势。凋亡、MAPK 信号通路和 Toll 样受体信号通路中的大部分基因表达不受低盐驯化的影响, 低盐胁迫 (CL vs. C) 下调了凋亡、MAPK 信号通路和 Toll 样受体信号通路中的大部分基因表达, 而低盐驯化 (AL vs. CL) 则上调了这些通路中的大部分基因表达。

## 2.7 qRT-PCR 验证

通过 qRT-PCR 技术相对定量法检测了 10 个差异基因在 AL vs. CL 中的表达水平 (图 7), 这些基因的表达模式与转录组测序获得的结果基本一致, 两种检测方法所获得的结果相关性 ( $R^2$ ) 为 0.962 2, 表明转录组测序结果准确可信。

## 3 讨论

ROS 和 LPO 作为氧化损伤标志物, 低盐胁迫导致大黄鱼 ROS 和 LPO 大量产生, 表明低盐胁迫诱导机体氧化损伤<sup>[17]</sup>。大黄鱼对环境变化非常敏感<sup>[18]</sup>, 盐度骤降易破坏细胞内渗透压平衡, 诱导线粒体膜超极化, 从而导致细胞氧化应激。低盐驯化不影响 ROS 和 LPO 含量, 表明大黄鱼已经适应了盐度从 25 降至 20 的变化。值得注意的是, 低盐驯化下调了低盐胁迫下大黄鱼的 ROS 和 LPO 含量, 表明低盐驯化缓解了低盐胁迫对机体的氧化损伤。基于“毒物兴奋效应”, 实验推测



(图 5 Fig. 5)

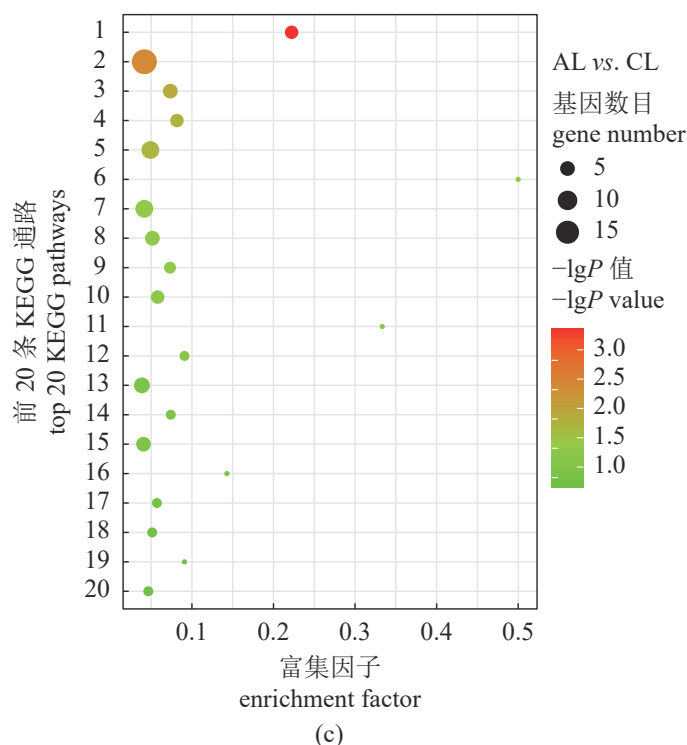


图 5 差异表达基因富集的前 20 条 KEGG 通路

(a) 1. GnRH 信号通路; 2. 噬菌体; 3. 不饱和脂肪酸生物合成; 4. PPAR 信号通路; 5. 谷胱甘肽代谢; 6. 生物素代谢; 7. 神经活性配体-受体相互作用; 8. 初级胆汁酸生物合成; 9. 细胞因子-细胞因子受体相互作用; 10. 溶酶体; 11. Notch 信号通路; 12. 视黄醇代谢; 13. 花生四烯酸代谢; 14. 酪氨酸代谢; 15. 硫代谢; 16. 酮体合成与降解; 17. 光转导; 18. 高甘露糖型 N-聚糖生物合成; 19. 烟酸和烟酰胺代谢; 20. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢。(b) 1. 类固醇生物合成; 2. 精氨酸和脯氨酸代谢; 3. 酪氨酸代谢; 4. PPAR 信号通路; 5. 萜类骨架生物合成; 6. 细胞凋亡; 7. MAPK 信号通路; 8. GnRH 信号通路; 9. 细胞色素 P450 对外源性物质的代谢; 10. 丙酸代谢; 11. Toll 样受体信号通路; 12. 药物代谢-细胞色素 P450; 13. 半胱氨酸和蛋氨酸代谢; 14. 细胞因子受体相互作用; 15. 烟酸和烟酰胺代谢; 16. 核黄素代谢; 17. 色氨酸代谢; 18. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; 19. 生产 IgA 的肠道免疫网络; 20. 淀粉和蔗糖代谢。(c) 1. 类固醇生物合成; 2. 神经活性配体-受体相互作用; 3. 甘油酯代谢; 4. 范科尼贫血途径; 5. 细胞黏附分子; 6. MAPK 信号通路; 7. 细胞因子-细胞因子受体相互作用; 8. 甘油磷脂代谢; 9. Toll 样受体信号通路; 10. Notch 信号通路; 11. 生物素代谢; 12. 戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化; 13. 胰岛素信号通路; 14. 药物代谢——细胞色素 P450; 15. 卵母细胞减数分裂; 16. 维生素 B<sub>6</sub> 代谢; 17. DNA 复制; 18. 类固醇激素生物合成; 19. 糖鞘脂生物合成-globo 系列; 20. 花生四烯酸代谢。

Fig. 5 Top 20 KEGG enriched pathway of differential expressed genes

(a) 1. GnRH signaling pathway; 2. bacteriophage; 3. unsaturated fatty acid biosynthesis; 4. PPAR signaling pathway; 5. glutathione metabolism; 6. biotin metabolism; 7. neuroactive ligand- receptor interaction; 8. primary bile acid biosynthesis; 9. cytokine-cytokine receptor interaction; 10. lysosome; 11. Notch signaling pathway; 12. retinol metabolism; 13. arachidonic acid metabolism; 14. tyrosine metabolism; 15. sulfur metabolism; 16. ketone body synthesis and degradation; 17. phototransduction; 18. high mannose-type N-glycan biosynthesis; 19. niacin and nicotinamide metabolism; 20. glycine, serine and threonine. (b) 1. steroid biosynthesis; 2. arginine and proline metabolism; 3. tyrosine metabolism; 4. PPAR signaling pathway; 5. terpenoid backbone biosynthesis; 6. apoptosis; 7. MAPK signaling pathway; 8. GnRH signaling pathway; 9. metabolism of exogenous substances by cytochrome P450; 10. propionic acid metabolism; 11. Toll-like receptor signaling pathway; 12. drug metabolism-cytochrome P450; 13. half cystine and methionine metabolism; 14. cytokine receptor interaction; 15. niacin and nicotinamide metabolism; 16. riboflavin metabolism; 17. tryptophan metabolism; 18. glycine, serine and threonine metabolism; 19. gut immune network producing IgA; 20. Starch and sucrose metabolism. (c) 1. steroid biosynthesis; 2. neuroactive ligand-receptor interaction; 3. glycerolipid metabolism; 4. Fanconi anemia pathway; 5. cell adhesion molecule; 6. MAPK signaling pathway; 7. cytokine-cytokine receptor interaction; 8. glycerophospholipid metabolism; 9. Toll-like receptor signaling pathway; 10. Notch signaling pathway; 11. biotin metabolism; 12. interconversion of pentose and glucuronic acid ; 13. Insulin signaling pathway; 14. drug metabolism - cytochrome P450; 15. oocyte meiosis; 16. vitamin B<sub>6</sub> metabolism; 17. DNA replication; 18. steroid hormone biosynthesis; 19. glycosphingolipid biology synthesis-globo series; 20. arachidonic acid metabolism.

低盐驯化激活了一系列功能基因和信号通路来维持细胞结构和功能完整性, 保护细胞免受氧化损伤, 从而提高其低盐胁迫耐受性。于是, 实验利

用 RNA-Seq 技术从整体水平来探索大黄鱼对低盐适应的分子机制。

GnRH 信号通路在调节离子和物质运输方面

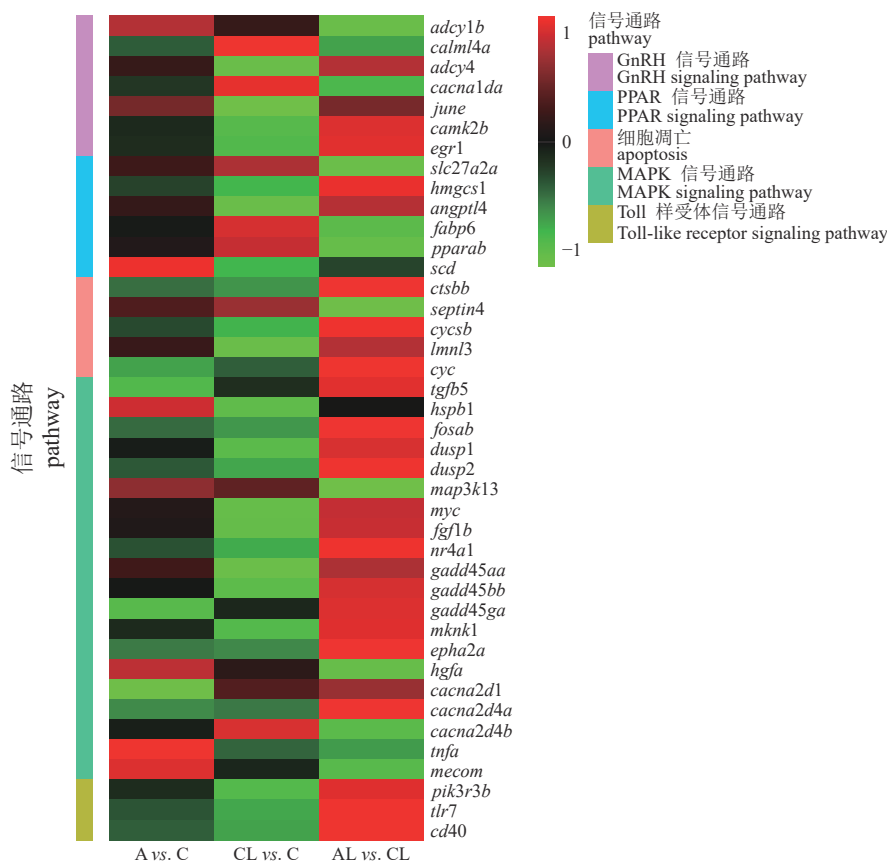


图 6 关键通路中的基因表达变化

基因表达上调显示红色, 基因表达下调显示绿色。*adcyl1b*.腺苷酸环化酶 1b; *calml4a*.钙调素样 4a; *adcyl4*.腺苷酸环化酶 4 型; *june*.早期生长反应因子; *cacna1da*.L 型电压门控钙通道的  $\alpha 1D$  亚基; *camk2b*.钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II  $\beta$ ; *egr1*.早期生长反应因子 1; *slc27a2a*.溶质载体家族 27 成员 2a; *hmgcs1*.3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 1; *angptl4*.血管生成素样 4; *fabp6*.脂肪酸结合蛋白 6; *ctsb*.组织蛋白酶 Bb; *septin4*.具有 GTPase 活性的基因家族; *cycsb*.细胞色素 c 体细胞 b; *cyc*.细胞色素 c; *tgfb5*.转化生长因子  $\beta 5$ ; *hspb1*.热休克蛋白 1; *fosab*.鼠骨肉瘤病毒癌基因同源物 Ab; *dusp1*.双特异性磷酸酶 1; *dusp2*.双特异性磷酸酶 2; *map3k13*.丝裂原活化蛋白激酶 13; *myc*.原癌基因 bHLH 转录因子; *fgf1b*.成纤维细胞生长因子 1b; *nr4a1*.核受体亚家族 4 组 A 成员 1; *gadd45aa*.生长停滞和 DNA 损伤诱导型  $\alpha$ ; *gadd45bb*.生长停滞和 DNA 损伤诱导型  $\beta$ ; *gadd45ga*.生长停滞和 DNA 损伤诱导型  $\gamma$ ; *mknk1*.相互作用的丝氨酸/苏氨酸激酶 1; *epha2a*.受体 A2a; *hgfa*.肝细胞生长因子 a; *cacna2d1*.钙通道  $\alpha 2\delta 1$  亚基; *cacna2d4a*.钙通道  $\alpha 2/\delta$  亚基 4a; *cacna2d4b*.钙通道  $\alpha 2/\delta$  亚基 4b; *tnfa*.肿瘤坏死因子 a; *mecom*.MDS1 和 EVI1 复合基因座; *pparab*.过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha b$ ; *scd*.硬脂酰辅酶 A 去饱和酶; *pik3r3b*.磷酸肌醇-3-激酶调节亚基 3b $\gamma$ ; *tlr7*.toll 样受体 7; *cd40*.TNF 受体超家族成员 5。

Fig. 6 Changes in the gene expressions involved in key pathway

Genes shown in red are up-regulated, and those shown in green are down-regulated. *adcyl1b*. adenylate cyclase 1b; *calml4a*. calmodulin-like 4a; *adcyl4*. adenylyl cyclase type 4; *june*. early growth response protein 1; *cacna1da*. calcium channel,voltage-dependent, L type, alpha 1D subunitJune a; *camk2b*. calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta; *egr1*. early growth response 1; *slc27a2a*. solute carrier family 27 member 2a; *hmgcs1*. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble); *angptl4*. angiopoietin-like 4; *fabp6*. fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin); *ctsb*. cathepsin Bb; *septin4*. gene family with GTPase activity; *cycsb*. cytochrome c somatic b; *cyc*. cytochrome c; *tgfb5*. transforming growth factor, beta 5; *hspb1*. heat shock protein, alpha-crystallin-related,1; *fosab*. v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog Ab; *dusp1*. dual specificity phosphatase 1; *dusp2*. dual specificity phosphatase 2; *map3k13*. mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13; *myc*. MYC proto-oncogene,bHLH transcription facto; *fgf1b*. fibroblast growth factor 1b; *nr4a1*. nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1; *gadd45aa*. growth arrest and DNA-damage-inducible,alpha a; *gadd45bb*. growth arrest and DNA-damage-inducible, beta b; *gadd45ga*. growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma a; *mknk1*. MAPK interacting serine/threonine kinase 1 MAPK; *epha2a*. eph receptor A2 a; *hgfa*. hepatocyte growth factor a; *cacna2d1*. calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2/delta 1; *cacna2d4a*. calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 4a; *cacna2d4b*. calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 4b; *tnfa*. tumor necrosis factor a (TNF superfamily, member 2); *mecom*. MDS1 and EVI1 complex locus; *pparab*. peroxisome proliferator-activated receptor alpha b; *scd*. stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase); *pik3r3b*. phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3b (gamma); *tlr7*. toll-like receptor 7; *cd40*. molecule, TNF receptor superfamily member 5.



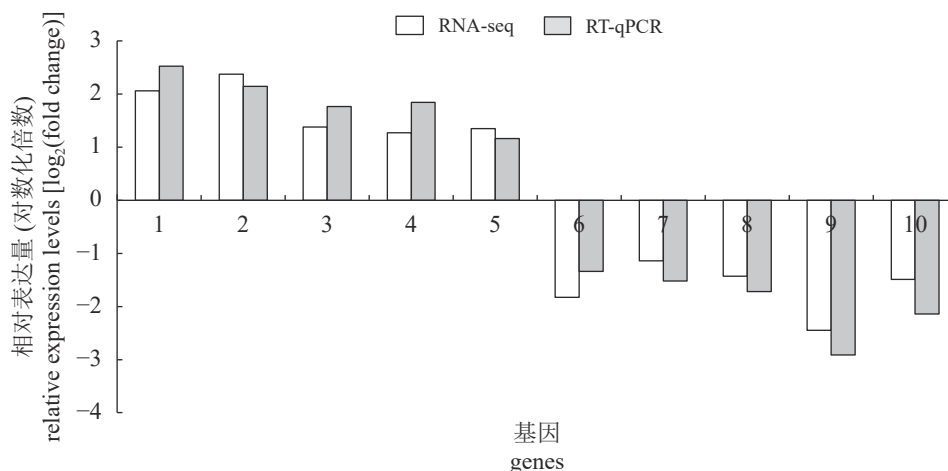


图 7 qRT-PCR 与转录组测量基因差异倍数的比较

1. *ccnb2*. 细胞周期蛋白 B2; 2. *cox2*. 细胞色素 c 氧化酶亚基 II; 3. *tlr5s*. toll 样受体 5; 4. *sqlea*. 角鲨烯环氧酶 a; 5. *pfk*. 磷酸果糖激酶; 6. *sod3*. 超氧化物歧化酶 3; 7. *foxo3b*. 叉头盒 O3b; 8. *hsf1*. 热休克转录因子 1; 9. *tnfa*. 肿瘤坏死因子 a; 10. *ppara*. 过氧化物酶体增殖物激活受体 a.

Fig. 7 Comparative analysis of differentially expressed genes by qRT-PCR and transcriptome

1. *ccnb2*. cyclin B2; 2. *cox2*. cytochrome c oxidase subunit II; 3. *tlr5s*. toll-like receptor 5; 4. *sqlea*. squalene epoxidase a; 5. *pfk*. phosphofructokinase; 6. *sod3*. superoxide dismutase 3; 7. *foxo3b*. forkhead box O3b; 8. *hsf1*. heat shock transcription factor 1; 9. *tnfa*. tumor necrosis factor a; 10. *ppara*. peroxisome proliferator-activated receptor alpha a.

发挥重要作用。一方面, 腺苷酸环化酶 (*adcy*) 可以利用 ATP 合成第二信使 cAMP, cAMP 通过磷酸化蛋白激酶 A 来激活 Cl<sup>-</sup>通道、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 等通道蛋白、转运蛋白和转运酶, 从而实现物质和离子跨膜转运<sup>[19]</sup>。另一方面, 钙调蛋白 (*calm*) 与 Ca<sup>2+</sup>结合后构象发生改变, 通过激活钙调蛋白依赖性蛋白激酶 (*camk*) 来诱导离子转运酶表达, 从而维持渗透压平衡<sup>[20]</sup>。在本研究中, 低盐 (CL vs. C) 上调了类钙调素 4a (*calml4a*) 和钙通道基因 (*cacna1a*), 下调了钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II beta (*camk2b*) 和腺苷酸环化酶 4 型 (*adcy4*), 表明低盐胁迫破坏了细胞离子和物质平衡。低盐驯化 (A vs. C) 上调了 *adcy1b* 基因表达, 表明低盐驯化影响了物质和离子的跨膜转运。低盐驯化 (AL vs. CL) 下调了盐度胁迫下大黄鱼 *calml4a*、*cacna1a* 和 *adcy1b* 基因表达, 上调了 *camk2b* 和 *adcy4* 基因表达, 表明低盐驯化可以调节通道蛋白、转运蛋白和转运酶来重新维持细胞渗透压的平衡, 使线粒体膜去极化, 减少 ROS 的产生。

鱼类对盐度应激的适应主要通过合成渗透压调节相关的酶和蛋白来实现, 这一过程需要消耗大量的能量<sup>[21]</sup>。鱼类所需求的能量主要由糖类、脂类和蛋白质等营养物质通过新陈代谢来提供。转录因子 PPAR 在脂类的合成和分解代谢过程中具有重要的调控作用<sup>[22]</sup>。在本研究中, 低盐胁迫 (CL vs. C) 差异基因显著富集在胆固醇生物合成、

PPAR 信号通路、氨基酸代谢、淀粉和蔗糖代谢等过程中 (图 4, 图 5), 表明低盐胁迫影响了大黄鱼的糖类、脂类和蛋白质代谢。在 A vs. C 中的差异基因显著富集在不饱和脂肪酸的生物合成和 PPAR 信号通路; 在 AL vs. CL 中的差异基因显著富集在甘油酯代谢、甘油磷脂代谢 (图 5)。无论鱼类是否经历低盐胁迫, 低盐驯化 (A vs. C 或 AL vs. CL) 均能显著影响脂类代谢, 表明低盐驯化主要通过改变脂类代谢通路来提高大黄鱼的低盐胁迫耐受性。与脂类相比, 机体可以迅速动员糖类, 因此胁迫初期主要由糖类代谢提供能量, 而胁迫后期则主要通过脂类代谢产生能量<sup>[23]</sup>。

盐度胁迫可破坏细胞线粒体的结构和功能, 迅速产生大量的 ROS。若过量的 ROS 得不到有效控制, 将会对机体产生氧化应激反应, 最终影响鱼类的生理功能<sup>[24]</sup>。鱼类可以通过修复机制来应对盐度诱导的氧化损伤, 从而维持细胞内稳态。自噬可以将氧化损伤的细胞器降解成小分子物质, 不但可以减少氧化应激, 还能为细胞提供重构和能量代谢原料<sup>[25]</sup>。MAPK 可被环境因子诱导表达, 从而激活靶基因来调控细胞的增殖、分化、凋亡和炎症反应等<sup>[26]</sup>。Toll 样受体信号通路可以通过激活多种免疫细胞来激活非特异性免疫反应<sup>[27]</sup>。在本研究中, 低盐胁迫 (CL vs. C) 的差异基因显著富集在内源性凋亡信号通路、氧化还原过程、蛋白质去折叠、免疫球蛋白受体结合、吞噬溶酶体

和免疫球蛋白复合物等(图4), 并抑制了细胞凋亡、MAPK 信号通路和 Toll 样受体信号通路中的大部分基因表达(图5, 图6), 表明低盐胁迫诱导的 ROS 降低了大黄鱼的抗氧化能力、自噬和非特异性免疫等修复功能, 这可能会进一步对机体产生氧化损伤, 从而形成恶性循环。低盐驯化(A vs. C)差异基因显著富集在补体激活、吞噬作用和免疫调节、噬菌体、谷胱甘肽代谢、细胞因子-细胞因子受体相互作用和溶酶体等(图4, 图5), 表明鱼类可以通过抗氧化系统和非特异性免疫来适应小幅度的盐度变化。在低盐胁迫鱼类中, 低盐驯化(AL vs. CL)上调了凋亡、MAPK 信号通路和 Toll 样受体信号通路中的大部分基因表达(图5, 图6), 表明低盐驯化可以通过提高细胞凋亡和非特异性免疫等途径来增强大黄鱼的低盐耐受性。

#### 4 结论

本研究首次采用转录组学方法研究低盐驯化对大黄鱼低盐胁迫耐受性的影响, 低盐胁迫诱导机体产生大量的 ROS, 低盐驯化通过调节离子和物质运输相关的 GnRH 信号通路、脂类代谢相关的 PPAR 信号通路、非特异性免疫相关的凋亡、MAPK 信号通路和 Toll 样受体信号通路来抑制低盐胁迫对大黄鱼的氧化损伤, 为低盐驯化改善大黄鱼低盐胁迫耐受性的作用机制提供新的见解。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 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. 2020 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 22.
- Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Promotion Station, China Fisheries Society. Chinese fishery statistical yearbook (2020)[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020: 22 (in Chinese).
- [2] 宋炜, 殷雷明, 陈雪忠, 等. 运用超声波标志法分析水槽养殖条件下大黄鱼行为特性[J]. 水产学报, 2020, 44(1): 79-84.
- Song W, Yin L M, Chen X Z, *et al.* Behavioral characteristics of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in tank by ultrasound pinger system[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(1): 79-84 (in Chinese).
- [3] He L Y, Shi X L, Zeng X Y, *et al.* Characterization of the glucocorticoid receptor of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its expression in response to salinity and immune stressors[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2022, 265: 111124.
- [4] 刘家富. 大黄鱼养殖与生物学 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2013: 8-14.
- Liu J F. Culture and Biology of large yellow croaker[M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2013: 8-14 (in Chinese).
- [5] Costantini D. Does hormesis foster organism resistance to extreme events?[J]. Frontiers in Ecology and the Environment, 2014, 12(4): 209-210.
- [6] Niu C J, Rummer J L, Brauner C J, *et al.* Heat shock protein (Hsp70) induced by a mild heat shock slightly moderates plasma osmolarity increases upon salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2008, 148(4): 437-444.
- [7] Zeng L, Ai C X, Wang Y H, *et al.* Abrupt salinity stress induces oxidative stress via the Nrf2-Keap1 signaling pathway in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(4): 955-964.
- [8] Zeng L, Ai C X, Zhang J S, *et al.* Pre-hypoxia exposure inhibited copper toxicity by improving energy metabolism, antioxidant defence and mitophagy in the liver of the large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Science of the Total Environment, 2020, 708: 134961.
- [9] 朱婷芳, 管峰, 苗亮, 等. 大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)单核巨噬细胞低氧胁迫比较转录组学分析[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(2): 335-344.
- Zhu T F, Guan F, Miao L, *et al.* Comparative transcriptome analysis of mo/mφ in response to low oxygen stress in mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(2): 335-344 (in Chinese).
- [10] 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.

- [11] Zhang Y, Shen W L, Li J, *et al.* Effect of fasting on protein metabolism in muscle tissue of *Larimichthys crocea* revealed by transcriptome and proteome[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2021, 39(5): 1972-1984.
- [12] Zeng L, Ai C X, Zheng J L, *et al.* Cu pre-exposure alters antioxidant defense and energy metabolism in large yellow croaker *Larimichthys crocea* in response to severe hypoxia[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 687: 702-711.
- [13] Zeng L, Li W C, Zhang H, *et al.* Hypoxic acclimation improves mitochondrial bioenergetic function in large yellow croaker *Larimichthys crocea* under Cu stress[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 224: 112688.
- [14] Wu C W, Zhang D, Kan M Y, *et al.* The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 5227.
- [15] Leng N, Dawson J A, Thomson J A, *et al.* EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(8): 1035-1043.
- [16] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [17] Bal A, Panda F, Pati S G, *et al.* Modulation of physiological oxidative stress and antioxidant status by abiotic factors especially salinity in aquatic organisms[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2021, 241: 108971.
- [18] Ao J Q, Mu Y N, Xiang L X, *et al.* Genome sequencing of the perciform fish *Larimichthys crocea* provides insights into molecular and genetic mechanisms of stress adaptation[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(4): e1005118.
- [19] Klinger S, Breves G. Resveratrol inhibits porcine intestinal glucose and alanine transport: potential roles of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, protein Kinase A, AMP-activated protein kinase and the association of selected nutrient transport proteins with detergent resistant membranes[J]. *Nutrients*, 2018, 10(3): 302.
- [20] Leone F A, Lucena M N, Fabri L M, *et al.* Osmotic and ionic regulation, and modulation by protein kinases, FXYD2 peptide and ATP of gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity, in the swamp ghost crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 250: 110507.
- [21] Xiong Y H, Dong S L, Huang M, *et al.* Growth, osmoregulatory response, adenine nucleotide contents, and liver transcriptome analysis of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) under different salinity acclimation methods[J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 734937.
- [22] Huang D Y, Liang H L, Ren M C, *et al.* Effects of dietary lysine levels on growth performance, whole body composition and gene expression related to glycometabolism and lipid metabolism in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* fry[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735806.
- [23] Li M X, Wang X D, Qi C L, *et al.* Metabolic response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute and chronic hypoxia stress[J]. *Aquaculture*, 2018, 495: 187-195.
- [24] Zeng L, Zhang J S, Zheng J L, *et al.* Pre-acclimation to low copper mitigated immunotoxic effects in spleen and head-kidney of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) when exposed subsequently to high copper[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 144: 54-61.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Chu Q, Xu T J. MicroRNA regulation of Toll-like receptor, RIG-I-like receptor and Nod-like receptor pathways in teleost fish[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(4): 2177-2193.

## Effects of low-salt acclimation on the transcriptome of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under hypo-saline stress

ZENG Lin<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>2,3</sup>, SONG Wei<sup>2,3\*</sup>, XIONG Yifei<sup>2</sup>, XIE Zhengli<sup>4</sup>, HUANG Weiqing<sup>5</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Bengbu University, Bengbu 233030, China;

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

3. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

4. Fishery Machinery and Instrument Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200092, China;

5. School of Life Sciences, Ningde Normal University, Ningde 352100, China)

**Abstract:** Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) is an important marine fish species. The reduction of salinity can promote fish growth and reduce the risk of *Cryptocaryon irritans* infection. This study evaluated the effects of low-salt acclimation on oxidative damage and transcriptome in the liver of *L. crocea* under hypo-saline stress. Fish with an average weight of (52.46±1.47) g were pre-exposed to salinity 25 or 20 for 7 d, and subsequently were subjected to salinity 10 for another 24 h. The results indicated that hypo-saline stress increased reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (LPO), low-salt acclimation had no effect on ROS and LPO. Interestingly, low-salt acclimation with hypo-saline stress reduced ROS and LPO when compared with hypo-saline stress, suggesting low-salt acclimation alleviated hypo-saline stress induced oxidative damage. A total of 356, 478 and 484 differentially expressed genes (DEGs) were obtained from low-salt acclimation group vs. control, hypo-saline stress group vs. control, low-salt acclimation with hypo-saline stress group vs. hypo-saline stress group., respectively. The results of GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment showed that DEGs were significantly enriched in GnRH signaling pathway, PPAR signaling pathway, apoptosis, MAPK signaling pathway and Toll-like receptor signaling pathway, indicating low-salt acclimation improved hypo-saline stress tolerance of large yellow croaker by regulating ion and material transport, lipid metabolism, apoptosis and nonspecific immunity. Those findings revealed the regulation mechanism of low-salt acclimation enhanced hypo-saline stress adaptation, and also provided scientific basis for factory farming and inland farming of *L. crocea* in fresh or brackish water.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; salinity; stress; transcriptome; hormesis; signaling pathway

**Corresponding author:** SONG Wei. E-mail: songw@ecsf.ac.cn

**Funding projects:** National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900904); Marine S & T Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2022QNL30001); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-47); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD76)