



水产学报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

DOI: 10.11964/jfc.20190311681



· 综述 ·

耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展

常玉梅, 梁利群*

(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, 农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 中国水产科学研究院特殊生境鱼类种质特性与抗逆育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:耐盐碱鱼类生理和分子适应机制的解析, 是培育适于中、高碱度盐碱水域增殖养殖的先决条件。围绕世界各国适于中、高碱度盐碱湖泊养殖的鱼类代表种, 从组织结构的微观调整、血液离子和渗透压调节、特殊氨基酸代谢的形成、酸碱调节、激素调节以及基因组特定区域的选择性表达和适应等方面进行归纳总结, 提出耐盐碱鱼类的盐碱适应机制具有多样、复杂、系统性强的特点。建议借助先进的基因功能研究方法, 系统整合耐盐碱鱼类在生理、表型、行为和各种组学的遗传信息, 将相关性探索研究拓展到基因水平的因果关系确定, 推动耐碱鱼类的分子遗传基础与分子适应性进化机制的研究进程。

关键词:耐盐碱鱼类; 盐碱适应; 离子和渗透压调节; 氨基酸代谢; 基因组进化

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

盐碱地(水)的开发利用对提高国土资源价值具有重要的生态、经济和社会意义。据统计, 目前全球有 1 947 Mhm² 退化土地, 其中盐碱地占 970 Mhm², 至少覆盖 100 多个国家和地区^[1-2]。中国有盐碱地 99 130 khm², 其中低洼盐碱水域 45 870 khm², 约占全国湖泊总面积的 55%^[3-4]。盐碱水具有高碳酸盐碱度(HCO₃⁻和CO₃²⁻)、高pH、离子组成复杂等理化特点, 生物资源贫瘠, 渔业生产力低^[3]。研究发现, 碱盐(NaHCO₃和Na₂CO₃)比中性盐(NaCl和Na₂SO₄)对生物的破坏性大, 高碱度能够诱发淡水鱼类呼吸和代谢碱中毒, 严重影响鱼类的生长、生存和繁殖^[5-7]。因此, 目前仅有不足 2%, 碱度在~10 mmol/L 的低盐碱水域通过移植驯化常规的淡水和海水水

产经济动物被开发利用, 大部分碱度>10 mmol/L 的中、高盐碱水域仍处于荒芜闲置状态, 开发利用迫在眉睫^[8]。

然而, 世界上许多中、高碱度盐碱湖泊仍有一些鱼类长期栖息并形成优势种群。如肯尼亚马加迪湖(pH 10.0)的马加迪罗非鱼(*Oreochromis alcalicus*)^[9]、美国皮拉米德湖(pH 9.4)的钩吻鲟(*Oncorhynchus clarkii*)^[6]、土耳其凡湖(pH 9.8)的卡拉白鱼(*Chalcalburnus tarichi*)^[10]、我国青海湖(pH 9.1~9.5)的裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[11]和内蒙古达里湖(pH 9.6)的瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)和鲫(*Carassius auratus*)^[12]等, 都是中、高碱度盐碱湖泊的主要代表种。掌握这些天然耐盐碱鱼类盐碱适应的生理和分子机

收稿日期: 2019-03-08 修回日期: 2020-04-01

资助项目: 国家自然科学基金项目(31602136); 黑龙江省自然科学基金项目(C2016070); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2019ZD0601)

第一作者: 常玉梅(照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: changyumei@hrfri.ac.cn

通信作者: 梁利群, E-mail: liangliqun@hrfri.ac.cn



制, 是培育适于中、高碱度盐碱水域增殖殖种的先决条件。虽然我国学者也对一些广盐性鱼类如尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[13-14]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[15]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[16-17] 等通过盐碱胁迫, 开展了一些耐盐碱分子和生理机制相关研究, 但与长期适应盐碱湖泊的天然种质相比, 盐碱耐受机制可能存在适应性进化上的本质区别^[18]。因此, 本文将主要围绕长期生活在、高碱度盐碱湖泊的鱼类代表种, 从组织结构、离子和渗透压调节、氨氮代谢、酸碱调节、内分泌激素调节及基因组适应性进化等角度出发, 总结耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展, 同时纳入一些淡水和海水鱼类的相关研究, 综合分析耐盐碱鱼类盐碱耐受机制的特殊性及其未来可能的研究方向。

1 组织结构的适应性改变

与陆生动物相比, 鱼类为了适应水环境各种盐度、碱度、离子组成和不同的 pH, 必须拥有高效的离子和渗透压调节机制, 以保持体内的酸碱平衡^[19]。研究发现, 鳃、肾、肠是硬骨鱼类渗透压调节的重要器官, 其形态结构在适应外界复杂环境过程中能够发生显著的变化, 是鱼类适应能力建立过程中的重要组成部分。Oğuz^[20] 在观察卡拉白鱼胚胎渗透压调节器官发育过程中发现, 线粒体富集细胞, 又称离子细胞 (mitochondria-rich cells, MRC) 最早出现在胚胎卵黄囊和皮肤中, 随后在鳃、肠道和肾中依次出现, 而且随着发育过程的递进, 卵黄囊和皮肤中的离子细胞逐渐减少, 并转移至鳃、肠道和肾参与卡拉白鱼幼鱼的渗透压调节。

1.1 鳃

鱼类鳃组织直接与外界水体接触, 对水体的物理和化学变化非常敏感, 是鱼类进行离子和渗透压调节、氨氮排泄、气体交换、激素水平调控的重要组织^[21-22]。研究发现, 青海湖裸鲤为了适应高盐碱、低氧、食物匮乏的生活习性, 其鳃组织形态结构包括鳃耙和鳃丝都发生了适应性改变: 鳃耙数多、密集且较长; 鳃丝内充满血管和毛细血管以适应低氧环境^[23-25]; 达里湖瓦氏雅罗鱼为了保持鳃结构的完整性和生理功能正常, 高碱度 (30~50 mmol/L) 胁迫下其鳃丝变

宽、鳃小片变长、鳃小片间距变大^[26]。

从微观结构来看, 鱼类鳃组织主要有离子细胞、黏液细胞 (mucous cells, MC)、扁平上皮细胞 (pavement cells, PVC)、柱细胞 (pillar cells, PC)、血细胞 (blood cells, BC) 等细胞组成。其中, MRC 细胞是一类特殊的离子细胞, 是鱼类鳃离子主动转运的主要场所。最早是由 Keys 等^[27] 在欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) 鳃上皮细胞中发现, 主要行使泌氯功能, 所以早期称之为氯细胞。后来大量研究发现, 这种细胞存在很多亚型, 负责不同离子的转运。目前已在斑马鱼 (*Danio rerio*)^[28]、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[29] 等鱼类中鉴定了多种 MRC 细胞类型。其中以斑马鱼为模式生物, 成功鉴定了负责 H^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 等离子转运的特定离子细胞, 并对其离子转运机制提供了证据^[30]。

国内外学者也对耐盐碱鱼类鳃 MRC 细胞的形态结构开展了一些探索性研究。Maina^[31] 发现马加迪罗非鱼鳃上皮细胞有 2 种 MRC 细胞, 在不同环境刺激下, 其拓扑结构、超微结构、线粒体数量和大小存在显著差异; 而且, 在碱水环境中 MRC 细胞类似于海水型, 表面呈蜂窝状, 微绒毛少。当适应 pH 中性环境一段时间后, MRC 细胞会发生微绒毛增多等变化, 形态特征向淡水型转变; 张仁意等^[25] 观察了青海湖裸鲤鳃 MRC 细胞特征, 发现其为典型的海水型 MRC 细胞特征, 数量多于淡水型; 高珊等^[26] 对达里湖瓦氏雅罗鱼鳃 MRC 细胞结构进行了电镜观察, 发现其亦为海水型 MRC 细胞特征 (图 1-a, b); 离子细胞标记蛋白 $Na^+-K^+-ATPase$ (NKA) 荧光定位显示, MRC 主要分布在一级结构鳃丝上, 二级结构鳃小片上几乎消失 (图 1-c), 这与海水型大西洋鲑^[29] MRC 细胞的分布相似。

鱼类鳃上皮细胞中, 90% 为 PVC 细胞, 主要分布在二级结构鳃小片上, 与 PC 细胞、BC 细胞交替排列形成血管通道保证气体交换畅通无阻^[32]。研究发现, 鳃小片较薄的表皮细胞有利于环境和血液的气体交换和扩散, 但在环境胁迫时则会产生细胞增生抵御水体毒物进入体内^[33]。高珊等^[26] 通过组织切片研究发现, 高碱度胁迫下达里湖瓦氏雅罗鱼 PVC 细胞发生增生, 可能阻止水体 HCO_3^- 和 pH 进入血液, 保持细胞结构和生理功能的完整性, 达到适应高碱环境的目的^[26]。

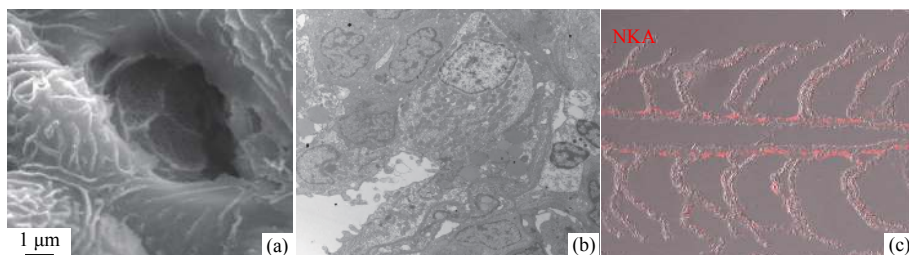


图1 达里湖瓦氏雅罗鱼鳃 MRC 细胞的形态结构特征及分布

除了 MRC 细胞外, MC 细胞也可能在鱼类离子和渗透压调节中发挥重要作用。研究发现, MC 细胞的增加和分泌与鱼类盐度^[34]、pH、氨浓度^[35]的增加及病原微生物和寄生虫感染^[36]显著相关;近期,王瑞芳等^[37]和 Oğuz^[38]通过比较盐碱湖群体和淡水生殖洄游群体研究发现,瓦氏雅罗鱼和卡拉白鱼湖水群体鳃小片基部分布着大量的 MC 细胞,而淡水洄游群体 MC 细胞数量显著减少。高珊等^[26]通过不同碱度胁迫实验发现,随着碱度增加,达里湖瓦氏雅罗鱼鳃耙上皮的 MC 细胞由大而稀疏转为小而密集,数量显著增加。这些研究表明, MC 细胞可能通过分泌黏液,形成一个功能表面,参与鱼类在盐碱环境下的离子和渗透压调节。

1.2 肾

鱼类的渗透压调节,多数研究集中于鳃组织,对肾组织的相关研究较少。鱼类肾组织虽不像哺乳动物那样划分为皮质和髓质,但也是由不同功能的独立部分组成。硬骨鱼类肾主要分布在身体的背腹和腹膜后区域,一个肾单元包括 4 个不同区域:肾小球、近端管、远端管和集合小管^[39]。Oğuz^[40]比较了盐碱湖洄游至淡水产卵的卡拉白鱼肾组织的微观结构,发现湖水群体进入淡水后,肾小球和集合小管的直径明显增大,加强了肾小球的过滤速率;而湖水群体肾小球结构萎缩,集合小管皱缩,肾单元的过滤速率显著降低。NKA 标记 MRC 细胞发现, NKA 在卡拉白鱼近端管、远端管和集合小管均有分布,而且淡水族群信号更强,表明淡水较少的离子被肾组织重吸收;而湖水群体和青海湖裸鲤一样, NKA 活性下降了 30%,肾功能被明显抑制^[41]; Galat 等^[42]比较了生活在不同盐碱湖泊的钩吻鲟的肾组织显微结构,结果发现其肾组织均出现了不同程度的退化,肾小球缩小甚至消失;高珊等^[26]通过不同碱度胁迫实验发

现,随着碱度增加,达里湖瓦氏雅罗鱼的肾小球直径和第二近曲小管管径显著变小,尤其在接近达里湖碱度的条件下 (~50 mmol/L),各肾单元界限间隙增大,收缩更加明显^[43]。这与盐度对鱼类肾功能影响的一些研究结果相似^[44-45]。可以看出,鱼类肾脏的萎缩程度与水体环境的渗透压呈正相关,盐碱水和海水均属于高渗环境,鱼类部分肾功能受阻也是对环境适应性改变。

1.3 肠

高渗环境下,海水鱼类会通过饮水补偿水分的被动损失,并将盐积极分泌出去^[46]。肠道在海水鱼类渗透压调节方面发挥建设性作用,它能有效地吸收液体弥补高渗环境造成的脱水^[47]。Wood 等^[48]研究发现,马加迪罗非鱼的行为生理与海水鱼类相似,以 (8.01 ± 1.29) kg/h 速率吞饮湖水并通过鳃泌盐,保持体内较低的渗透压;随后 Wood 等^[41]在青海湖裸鲤的前肠部分收集到液体,并发现其肠内的 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 浓度均高于血浆含量,认为裸鲤与海水鱼类的肠道离子吸收机制相似,但是肠内 NKA 活性却与淡水对照组无明显差异^[11, 41]。近期王萍等^[49]通过室内碱度短期胁迫实验发现,湖水组直肠排泄物的 HCO_3^- 浓度最高,支持裸鲤肠道在其渗透压调节中的重要作用,但是与 HCO_3^- 转运相关基因 (*slc4a1*、*slc4a2*、*slc4a4* 和 *slc26a6*) 均呈现先上升后回落的表达趋势,与表型关联不紧密;另外,王燕等^[50]通过比较碱度胁迫下尼罗罗非鱼 HCO_3^- 转运家族在鳃、肾、肠的组织特异性表达发现, *slc4* 和 *slc26* 只在鳃和肾中表达,未在肠组织中表达。高珊等^[26]近期测定 $NaHCO_3$ 碱度 (50 mmol/L, pH 9.0~9.14) 驯养 20 d 的瓦氏雅罗鱼肠道 pH 发现,其前、中、后肠的 pH 为 7.30、7.36、7.22,远低于水环境 pH,并与淡水对照组无明显差异,研究结果尚不支持肠道参与瓦氏雅罗鱼耐碱过程的渗透压调节^[43]。

通过调查盐碱湖泊的微生物种类发现, 盐碱湖泊浮游植物组成以藻类居多^[51-52], 而且早期有学者发现罗非鱼肠道在 pH<2.0 时对藻类的消化能力最强, 这就与吞饮湖水调节渗透压相矛盾^[53]。Bergman 等^[53]研究发现, 为了适应高盐碱环境, 马加迪罗非鱼的肠道由食管、胃和十二指肠组成特殊的“T”结构。这种功能上的三叉结构可使吸收的碱水绕过满胃, 避免与胃部酸性消化液混合, 降低对满胃的干扰, 这样就很好地解决了摄食和渗透压调节的双重矛盾。但是除了马加迪罗非鱼存在特殊的肠组织结构外, 其他耐盐碱鱼类尚未见特殊肠组织结构的相关报道。因此就目前的研究结果而言, 肠组织在鱼类盐碱适应中如何调节摄食和渗透压的功能性转换尚需更多的解剖学和分子生物学证据。

2 血液离子和渗透压调节机制

面临水环境离子和渗透压的实时动态变化, 鱼类通过鳃、肾、肠等组织参与“血液-水”的离子、分子和水的跨膜转运, 调节体内血液和外界水环境的渗透压平衡。海水的渗透压最高 (~1 050 mOsm/kg), 目前已知有两种渗透压调节方式, 一种是海水软骨鱼类 (elasmobranchs) 和腔棘鱼类 (lobe-finned coelacanth) 的等渗调节机制 (Osmoconformity), 保持血浆和海水一样的渗透压或稍高于海水的渗透压, 但是血液 NaCl 浓度只有海水

的 1/3^[54]; 另一种是海水硬骨鱼类的渗透调节机制 (osmoregulation), 其渗透压 (~320 mOsm/kg) 显著低于海水渗透压, 吞饮海水和肠道的离子吸收机制维持较低的渗透压^[46-47]。

比较和分析盐碱湖泊和耐盐碱鱼类的渗透压数据发现, 耐盐碱鱼类渗透压数据符合海水鱼类的两种机制: 马加迪湖和土耳其凡湖碱度最高 (380~153 mmol/L), 其对应的渗透压也最高, 接近海水的一半, 相应地马加迪罗非鱼和卡拉白鱼的血液渗透压低于湖水渗透压, 符合海水鱼类的渗透调节机制; 而其余碱度在 23~56 mmol/L 的盐碱湖泊, 其存活土著鱼的渗透压高于或接近湖水渗透压 (钩吻鲟不详), 符合海水鱼类的等渗调节机制 (表 1)。

另外从盐碱湖的离子含量和组成来看, 所有的盐碱湖泊都是 Na⁺和 Cl⁻含量最高, Ca²⁺和 Mg²⁺含量都非常低 (表 1)。相应地, 其特有土著种的血浆离子浓度组成与湖水离子浓度和组成也是相似的, 即一价离子浓度显著高于二价离子浓度。根据不同的渗透压调节方式来看, 马加迪罗非鱼和卡拉白鱼生活在高渗环境下, 为了维持其体内较低的渗透压, 其血液 Na⁺和 Cl⁻含量低于湖水对应离子浓度, 这样有助于通过饮水, 开启肠道保水排盐机制, 同时将 Na⁺和 Cl⁻转运至血液中通过鳃转运出去^[46,47]; 而其余耐盐碱鱼类的渗透压高于湖水渗透压, 但是血液 Na⁺

表 1 不同盐碱湖泊水质理化参数及其土著鱼类血浆离子浓度变化参数

Tab. 1 Physicochemical parameters of water quality in different saline lakes and plasma ion concentration of indigenous fish

	马加迪湖		凡湖		皮拉米德湖		达里湖		青海湖	
	水样	血浆	水样	血浆	水样	血浆	水样	血浆	水样	血浆
pH	9.92	8.08	9.6	7.89	9.4	8.05	9.5	7.25	9.3	
碱度/(mmol/L) alkalinity	380		153		23.08		56		29	
盐度 salinity			18.6		4.43		6		13	
渗透压(mOsm/kg) osmosis	525	351	543	483			260.7	286.45	375	447.5
Na ⁺ /(mmol/L)	356	175	296.03	235.26	58.2	139.71	115.8	144.5	200	222
Cl ⁻ /(mmol/L)	112	168	178.92	146.54	59.7	104.17	60.2	108.3	173	208.9
K ⁺ /(mmol/L)			8.78	7.02	2.9	1.74	5.45	1.07	5.3	4.35
Ca ²⁺ /(mmol/L)	0.65	3.06	0.365		0.15	3.32	0.16	3.02	0.23	3.53
Mg ²⁺ /(mmol/L)	0.04	0.98	2.79		5.61	3.54	1.1	2.68	36	11.96
参考文献 references	[48,57,58]		[38,40,59-60]		[61-62]		本研究		[41]	

和 Cl^- 含量高于湖水离子浓度, 与海水软骨鱼类血液较低的 Na^+ 和 Cl^- 含量的等渗调节机制明显不同。耿龙武等^[55] 和刘济源等^[56] 对大鳞鲃 (*Barbus capito*) 和裸鲤进行不同浓度 NaHCO_3 胁迫发现, 碱度对这 2 种耐盐碱鱼类的血浆渗透压、 Na^+ 和 Cl^- 含量均无明显影响, 这与 Wood 等^[57] 发现人工配置的不同浓度 NaHCO_3 水体对马加迪罗非鱼在自然水体的跨膜电势 ($\sim +7 \text{ mV}$) 无影响的研究结果一致, 而且 Na^+ 是维持正值跨膜电势的主要离子。海水软骨鱼类通过高浓度的有机渗透剂尿素与氧化三甲胺维持高渗透压, 但在耐盐碱鱼类如瓦氏雅罗鱼和湖裸鲤血液中并没有检测到较高的尿素氮含量^[11], 说明水体缓冲力较差的这些盐碱湖泊的鱼类可能通过维持较高的 Na^+ 含量而非尿素氮参与“血液-水”的渗透压平衡。

3 特殊的排氨氮机制

氨(包括气体 NH_3 和 NH_4^+) 是体内不能消化吸收的蛋白质或氨基酸的主要代谢终产物, 对所有的脊椎动物是有毒性的^[63]。因此, 及时有效的排氨, 是保持动物体内生理稳态的重要机制。

排氨通常有两种方式, 陆生动物将其分解成尿素或尿酸的形式排出体外, 而大多数淡水和海水硬骨鱼类主要通过鳃将 $\sim 80\%$ 的氮废物以氨的形式排出到水体中^[64-65]。正常条件下淡水鱼类排氨是没有问题的, H^+ 捕获的 NH_3 扩散是清除氮废物的主要途径 ($\text{NH}_3 + \text{H}^+ = \text{NH}_4^+$), 但在高 pH 高碱条件下, H^+ 捕获短路, 鱼体正常的“血液-水”的 NH_3 扩散梯度 (ΔP_{NH_3}) 发生下降或逆转, 导致血浆和组织内氨的大量积累, 引发氨中毒甚至死亡^[6,66]。氨中毒已经被证明是某些鱼类无法适应高盐碱环境的主要原因^[6-7]。因此, 进化出高效排氨机制成为一些高盐碱环境适应性鱼类的重要策略^[9]。

研究发现, 来自马加迪湖的罗非鱼通过肝脏中参与“鸟氨酸-尿素”循环的特有酶类将氨转化为尿素从鳃组织中排出体外, 巧妙解决了其在高盐碱环境下的排氨难题^[9]; 然而“鸟氨酸-尿素”循环途径并不被广泛采用, 其他高盐碱水域的鱼类, 如凡湖的卡拉白鱼^[10]、青海湖的裸鲤^[11] 和达里湖的瓦氏雅罗鱼^[67] 仍以抗 ΔP_{NH_3} 梯度的方式, 积极主动排氨。

对比生存环境发现, 这些鱼类生存环境的

pH 都比较相近 (9.0~10.0), 而水体碱度(缓冲强度) 却存在较大差异。如马加迪湖的碱度高达 380 mmol/L , 而其他盐碱湖泊的碱度大约在 $23\sim 153 \text{ mmol/L}$ (表 1)。因此, Wang 等^[11] 认为, 水体的缓冲强度可能是造成耐盐碱鱼类氨氮排泄策略出现差异的主要原因。已有研究发现, 在淡水中加入 10 mmol/L 的 Hepes 缓冲液 (pH 8.0), 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 在 12 h 之内的排氨速率下降了 71% ^[68]; 在海水中分别加入 1 和 5 mmol/L 的 Tricine 缓冲液 (pH 8.0), 海水驯化的青鳞幼鱼胚胎表面的 H^+ 梯度会被显著消除, 排氨速率则被抑制了 35% 和 42% ^[69]。这些研究表明, 水体的缓冲强度通过抑制鳃上皮细胞酸化层的形成, 间接影响鱼体的排氨速率; 近期, 有研究发现, 马加迪罗非鱼虽然 100% 排尿素, 但在其鳃组织中依然发现了 3 种 Rh 蛋白亚型的存在, 而且高氨胁迫证实它们参与体内血浆-鳃组织的氨转运过程, 但无法解释为什么鳃组织的 Rh 蛋白不能将氨转运出去^[70]。这是否可以从另一个角度说明由于水体的高碱度完全消除了鳃表面的酸化层, 所以即使存在 Rh 蛋白, 也无法实现转氨外排。

尽管如此, 这些以排氨而非排尿素为主的耐盐碱鱼类, 也有自己独特的氨氮代谢机制。

第一, 对抗 ΔP_{NH_3} 梯度, 继续主动排氨: ①降低排氨速率。鳃-水界层的碱化有效地抑制了 ΔP_{NH_3} , 排氨速率严重受阻^[7]。如与淡水族群相比, 湖裸鲤的排氨速率下降了 50% ^[11], 达里湖瓦氏雅罗鱼的排氨速率下降了 26.7% ^[67]; ②提高内氨耐受力。排氨速率的下降, 意味着体内氨氮含量的急剧上升, 如马加迪罗非鱼 LC_{50} 氨耐受实验中的氨氮含量是其他常规硬骨鱼类的 6 倍、卡拉白鱼血液氨氮含量高达 $\sim 1300 \mu\text{mol/L}$, 远高于虹鳟 $\sim 400 \mu\text{mol/L}$ ^[7]; 湖裸鲤血浆氨氮含量是其淡水族群的 7 倍, 且肝、脑和肌肉组织也具有较高的氨氮含量^[7,11]。内氨的上升有助于推动“血液-水”的 ΔP_{NH_3} , 促使鱼体内氨持续外排; ③提高载体介导氨转运能力。由于鳃-水界层的碱化效应, 内氨的被动扩散 (diffusion) 受限, 因此需借助载体介导转运。近年研究发现, 水通道蛋白 AQP 家族和 Rh 蛋白家族参与氨的跨膜转运, 在氨排泄、离子调节过程中发挥重要作用^[65-66]。如马加迪湖罗非鱼虽然 100% 排尿素, 但在其鳃组织中依然发现了 3 种 Rh 蛋白亚型的存在, 而

且高氨胁迫证实它们参与体内血浆-鳃组织的氨转运过程^[70]; 鲤和达里湖瓦氏雅罗鱼鳃组织中参与鱼体排氨过程的 4 种 Rh 基因 (*Rhag*, *Rhbg*, *Rhcg1* 和 *Rhcg2*) 在碳酸盐碱度胁迫下, 全部富集上调表达^[71-72]。

第二, 将积累的内源性氨转化成毒性较弱的谷氨酰胺、游离氨基酸或尿素: 由于排氨速率的下降, 导致血浆及组织氨含量的增加, 这在湖裸鲤、卡拉白鱼、钩吻鲟和达里湖瓦氏雅罗鱼中均有报道。但是, 尽管能够耐受体内较高的氨含量, 耐盐碱鱼类进化出一系列的机制降低或避免氨中毒。①降低内源性氨的产生。盐碱环境下, 鱼体可能降低整体的代谢速率。如青海湖裸鲤耗氧率只有淡水的 60%, 代谢速率整体降低; 另外选择性地降低蛋白氧化速率, 使 ammonia-N 合成小于 30%^[11,41]; 达里湖瓦氏雅罗鱼在不同碱度的胁迫下, 耗氧率均显著低于淡水对照组^[72]; ②转换成毒性较弱的谷氨酰胺或游离的氨基酸。脑组织是氨中毒最为敏感的组织, 通过一个高效的谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH)/谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GSase) 解毒系统降低内源性氨的产生, 并将过多的氨转变成毒性较弱的谷氨酰胺或游离的氨基酸。谷氨酰胺可以储存在组织中被用以正常条件下的氧化反应产物, 氨基酸可以作为能量代谢底物参与供能^[73-75]。Wang 等^[11]等发现青海湖裸鲤湖水族群和淡水族群 GDH 和 GSase 虽没有显著差别, 但是 GDH 比其不利于氨排泄的硬骨鱼类高出 5~10 倍, 肝脏中的 GSase 活性与耐高氨的蟾鱼 (*Opsanus*) 活性相当。而且发现裸鲤肌肉中氨含量最高, 可充当氨的沉积池, 以此削弱在其他组织的氨水平。达里湖瓦氏雅罗鱼在 NaHCO_3 碱度 (50 mmol/L) 的长期胁迫下, 血浆游离氨基酸含量显著增加, 其中非必需氨基酸含量作为能量代谢底物增加更为明显^[76]; ③转换成毒性弱的尿素。在一些鱼类中, 通过尿酸分解产生尿素用于去除过多的氨, 这已经在尿素生成途径中得以鉴定, 如马加迪罗非鱼、蟾鱼、弹涂鱼 (*Periophthalmodon schlosseri*) 等, 通过鸟氨酸-尿素循环将氨全部或部分转换成毒性较小的尿素, 排除体外^[9,75]; 然而, Wang 等^[11]虽在裸鲤高氨实验中发现血液、肝、肌肉等组织的尿素含量有所增加, 但未检测到尿素排泄

速率, 但是在淡水族群中检测到较低的排尿素速率 [$50 \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$], 推测其淡水族群可能采用尿酸分解途径将 NH_3 转换呈毒性较弱的尿素; 高珊等^[26]通过 NaHCO_3 碱度 (50 mmol/L) 处理达里湖瓦氏雅罗鱼 7 d, 发现随着胁迫时间的延长, 瓦氏雅罗鱼血液 Urea-N 含量呈先增加后下降的趋势, 相应地其排尿素速率也呈此趋势; 而相同碱度处理下的淡水族群则呈完全相反态势, 这与 Wang 等^[11]在裸鲤不同族群发现的结果一致, 说明这些仍以排氨为主的耐盐碱鱼类, 在高盐碱环境下合成尿素解毒的能力很弱。

4 酸碱调节

许多研究表明, 淡水和海水硬骨鱼类的酸碱调节与渗透压调节和氨氮排泄紧密相关。鳃作为酸碱调节的主要组织, 可将酸碱对应物 (H^+ 、 NH_4^+ 和 HCO_3^-) 转运到水体中参与酸碱调节^[77-79]。近年来, 一些转运蛋白和酶类包括 H^+ -ATPase (HA)、 Na^+/H^+ 交换蛋白 (NHE)、碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase, CA) 和阴离子交换蛋白 (anion exchanger, AE) 被发现参与淡水鱼类离子细胞排酸机制^[21, 27, 79]。尽管海水鱼类大量的 HCO_3^- 主要通过肠道分泌到体外, 而 H^+ 被认为主要通过鳃组织转运到体外^[79]。近期, Liu 等^[79]从分子水平证实海水驯化的青鳉胚胎离子细胞具有和淡水鱼类相似的排酸机制, 即 NHE、CA 和 AE 同时参与离子细胞的渗透压调节和酸碱调节。

CA 可以快速催化 CO_2 和 H_2O 的可逆反应 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$), 该化学反应被证实鱼类酸碱调节中发挥重要作用^[22, 80]。当暴露到高 pCO_2 时 (酸性水体), 大部分鱼类能够主动分泌 H^+ 和积累体内 HCO_3^- 来缓冲由呼吸或代谢性酸中毒产生的过剩质子, 保持细胞间 pH 稳态^[81-82]。斑马鱼有 2 种 CA 亚型 (CA2a 和 CA15a) 参与 Na^+ 吸收和排酸, 海水鱼类如欧川鲽 (*Platichthys flesus*)^[83]、弹涂鱼^[84] 和河豚 (*Tetraodon nigroviridis*)^[85] 均为同一种 CA 亚型 (CA2-like) 参与排酸。

盐碱湖泊的高碳酸盐碱度能够诱发淡水鱼类呼吸和代谢碱中毒, 高 pH 阻止氨氮排泄^[6-7, 9]。因此, 耐盐碱鱼类必须拥有高效的酸碱调节、氨氮排泄及渗透压调节能力才能规避碱中毒。Yao 等^[86]首次克隆了裸鲤 CAc 的全长 cDNA 序列, 由淡水转移至盐水和盐碱水研究发现, 裸鲤鳃、

肾 CAC 的酶活及基因表达量均显著下调,由此推测裸鲤肾 CAC 下调表达可降低肾对 HCO_3^- 的重吸收能力,这与盐碱条件下鱼类肾结构萎缩,功能受到抑制的结果相符。鳃 CAC 下调表达可弥补呼吸碱中毒。

淡水和海水硬骨鱼类暴露到高 pCO_2 水体,血浆 Cl^- 含量下降, HCO_3^- 含量则等量增加,二者比例接近 1:1^[81-82, 87]。盐碱水与酸性水体理化性质相反,所以得到的结果也完全不同。另外,转录组差异表达谱分析显示,瓦氏雅罗鱼鳃 NHE 和 HA 基因显著低表达,而介导 Cl^- 和 HCO_3^- 转运的基因,如阴离子家族 SLC4 (AE 和 NBC) 及 SLC26 部分基因均上调表达^[71]。这些结果表明瓦氏雅罗鱼为了避免碱中毒,通过关闭 H^+ 外排通道保酸 (NHE、CA、HA 不表达或低表达),积极主动地排碱 (AE、NBC、SLC26a5 高表达),保持体内离子和酸碱平衡,但是该推论还需对参与排碱的基因或蛋白进行细胞定位及基因敲降等实验加以佐证。

5 内分泌激素调节

鱼类拥有复杂的离子、渗透压调节和酸碱调节机制以维持体液稳态。许多内分泌激素如生长激素 (growth hormone, GH)、类胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF-I)、催乳素 (prolactin, PRL) 和皮质醇 (cortisol, COR) 等被证实通过直接或间接介导 MRC 细胞的增殖和分化,从不同分子水平正向或负向调控离子转运^[88-89]。但是由于鱼类 MRC 细胞种类多、离子转运通路机制不详、MRC 细胞增殖和分化的分子通路认识不清等原因,大多数鱼类的激素调节离子转运机制缺乏有力的分子生理证据。目前只有模式生物斑马鱼和青鳉在这方面有所突破^[88-89]。如 Lin 等^[90] 首次从分子水平证实皮质醇与其糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 结合共同介导斑马鱼 NCC 细胞的表达,间接调控 Na^+ 的吸收。

虽然其他鱼类尚不能提供激素参与离子和酸碱调节的有力分子证据,但通过监测其在不同盐度或碱度环境下的表现形式,也可以从不同角度阐释其参与离子和酸碱调节的重要性,广盐性鱼类在这方面的研究较多。大多数耐盐碱鱼类为广盐性鱼类,需要洄游到淡水河道产卵。研究发现,达里湖瓦氏雅罗鱼转入河水 24 h

内血清 PRL、IGF-I 水平显著升高,随后恢复至洄游前状态,表明这 2 种激素只是短暂表达,当体内离子水平达到稳态时,激素水平也适应性降低^[37]。有研究发现,在湖水-河水交界处渗透压交替刺激下,高体雅罗鱼 (*Leuciscus idus*) 类固醇激素 (皮质类固醇激素和性类固醇激素) 显著高表达^[91],参与渗透压调节和性激素的合成^[91],从而说明达里湖瓦氏雅罗鱼由盐碱水洄游至淡水产卵时,其类固醇激素在基因转录表达和代谢组水平均呈现高表达。但随着洄游路径的延长,除性激素及其合成前体含量未下降外,其余大部分激素含量缓慢回落。Cao 等^[92] 发现,裸鲤在河水-湖水洄游过程中, GH 和 IGF-I 水平显著提高。这些研究表明,当水环境盐碱度发生改变时,耐盐碱鱼类能够快速启动激素应答水平,通过改变 MRC 细胞的数量,调控离子转运及气体交换,维持鱼类在盐碱水和淡水转换过程中的体液稳态。

6 基因组的适应性进化

长期生活在极端环境的生物,通常会通过表型的可塑性和遗传修饰等一系列适应性机制降低或抵抗外界环境带来的不利影响^[93-94]。有研究认为,极端生物首先通过行为和表型响应环境胁迫,然后对环境诱导的有利性状固定并进行遗传同化^[95-96]。面对极端环境,耐盐碱鱼类从组织、血液生理、渗透压、行为 (洄游产卵)、氨氮排泄等采取了一系列生理适应性机制。如拥有高效的鳃离子和渗透压调节能力,既能在淡水又能在盐碱水存活;拥有抵抗不良环境的氨氮排泄能力、排氨或将其转换成毒性较弱的尿素、氨基酸、谷氨酸盐辅以解毒。

近几年来,随着高通量测序技术的发展,从组学角度解析耐盐碱鱼类响应复杂多变环境的适应性机制研究越来越多。国外学者利用比较转录组学的方法,分析了马加迪罗非鱼和其淡水近缘种鳃组织的差异表达谱,发现二者在 400 万年以前出现分化,并在鳃组织鉴定了所有参与尿素排泄的基因,为鸟氨酸-尿素循环途径找到了完整的基因链^[97]。我国学者利用比较转录组学的方法,比较分析了瓦氏雅罗鱼湖水族群和淡水族群在鳃、肾、肝等不同组织的差异表达情况,发现了大量碱胁迫应答候选基因^[71, 98-99];

由于栖息地相通, 群体存在基因交流, 适应性进化分析仅发现几十个基因受到自然选择作用差异表达, 而且主要分布在肝脏和肾组织^[99]。池炳杰等^[100]曾采用微卫星标记对分布在黑龙江流域和达里湖流域的 6 个瓦氏雅罗鱼群体进行遗传结构和遗传分化显示, 达里湖流域和黑龙江流域存在明显的遗传分化, 但是流域内各群体间无明显分化, 表明地理隔离而不是水质因子(碱度)是造成两大流域群体产生分化的主要原因。随后 Xu 等^[101]利用重测序技术从基因组尺度比较分析了达里湖瓦氏雅罗鱼和黑龙江瓦氏雅罗鱼差异的 SNP 位点, 发现大量参与离子和渗透压调节、酸碱调节、尿素排泄等生理过程的基因受到正向选择; 另外, 通过构建瓦氏雅罗鱼基因组框架图, 发现达里湖瓦氏雅罗鱼基因组存在大量的高突变率的长末端重复序列及基因扩增现象。这些研究结果为瓦氏雅罗鱼适应高碱环境的基因组机制提供了全面的认识。此外, 我国学者也对裸鲤的盐碱适应性机制开展了组学研究。郭雯翡等^[102]采用抑制消减杂交技术, 研究了裸鲤鳃组织在高盐碱胁迫下转录水平上的基因表达差异; Tong 等^[103]采用转录组高通量测序方法, 分析了青海湖裸鲤鳃和肾两种组织的差异表达谱, 研究发现大量同源片段为免疫相关基因, 有 56 270 单基因被定位到免疫相关代谢通路。这与黑龙江野鲤^[104]在抵抗低温环境, 诱导表达大量免疫相关基因的研究结果相似, 进一步表明免疫相关基因的诱导表达可能是极端环境生存鱼类的另一重要适应性机制。

高通量测序技术的发展推动了耐盐碱硬骨鱼类盐碱适应机制的解析, 通过挖掘基因组信息, 很好地将基因和表型可塑性建立了关联, 同时还发现了一些无法从表型鉴定的新机制, 如大量高突变率的重复序列、基因扩增、免疫调控基因富集表达等, 为鱼类适应盐碱环境的多样化机制提供了新的研究方向。

7 存在问题和展望

盐碱水环境的高 pH、高碱度、离子比例失衡、昼夜温差大等生境特点给水生生物带来很大的生存压力, 活下来的鱼类则进化出独特的生理和遗传机制。从组织结构的微观调整、生殖洄游渗透压的自主调节、血液离子、氨氮和

酸碱平衡稳态的维持以及基因组特有区域的选择性表达和适应, 使耐盐碱鱼类的盐碱适应机制具有多样、复杂、系统性强的特点。目前国内科学家虽从各个研究领域都有所涉及, 但系统性不强等现象, 如国外科学家前期注重基础生理研究, 国内科学家注重基因组适应性进化及基因差异表达研究。另外, 大多数耐盐碱鱼类都是当地特有的土著鱼类, 有些种类甚至濒临灭绝, 被列为濒危保护物种, 如土耳其凡湖的卡拉白鱼、我国青海湖裸鲤均为国家濒危物种, 这在一定程度上影响了鱼类耐盐碱遗传机制研究的深入推进, 尤其在盐碱适应相关基因/蛋白的功能验证方面表现得尤为突出。因此, 生态环境的复杂性、鱼类适应机制的多样性以及实验材料不易获取的现状, 使耐盐碱鱼类盐碱适应的生理、表型和行为适应机制很难和基因组遗传修饰建立紧密关联, 导致鱼类耐盐碱的生理和分子机制研究相对滞后。

随着科研数据的积累以及先进的分子生物学技术的快速发展, 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究已然过渡到系统整合的研究层面, 即系统整合耐盐碱鱼类在生理、表型、行为和各种组学的遗传信息, 全面深入地解析其适应性进化机制; 另外, 模式生物斑马鱼或青鳉研究平台的引入, 将有助于推动盐碱适应相关基因/蛋白的功能验证研究; 再者, 基因编辑、非损伤微测技术 (non-invasive Micro-test Technique, NMT) 和其他一些新的基因功能鉴定技术将为耐碱鱼类研究从相关性探索扩展到基因水平的因果关系确定提供了新的技术途径, 相信很多研究将采取这种技术路线来揭示耐碱鱼类的分子遗传基础与分子适应性进化机制, 推动耐盐碱鱼类的分子机制理论迈向一个新台阶。

参考文献 (References):

- [1] Purakayastha T J, Bhaduri D, Aishwath O P, *et al.* Soil management strategies to enhance carbon sequestration potential of degraded lands[J]. *Indian Journal of Agronomy*, 2016, 61(4): 407-419.
- [2] Jia H X. Soil salinization control and sustainable agriculture in north-west endoland region of China[J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2003, 23(6): 1063-1068.
- [3] 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. Effect of saline-alkaline water resource on the development of fisheries in Cangzhou and Yundong[J]. *Hebei Fisheries*, 2003(5): 16-18(in Chinese).
- [4] 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.
- [5] 石德成, 殷立娟. 盐(NaCl)与碱(Na₂CO₃)对星星草胁迫作用的差异[J]. *植物学报*, 1993, 35(2): 144-149.
- Shi D C, Yin L J. Difference between salt (NaCl) and alkaline (Na₂CO₃) stresses on *Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) scribn. et merr. plants[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1993, 35(2): 144-149(in Chinese).
- [6] Wilkie M P, Wright P A, Iwama G K, *et al.* The physiological adaptations of the Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*) following transfer from well water to the highly alkaline waters of Pyramid Lake, Nevada (pH 9.4)[J]. *Physiological Zoology*, 1994, 67(2): 355-380.
- [7] 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.
- [8] 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(in Chinese).
- [9] 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.
- [10] Danulat E, Kempe S. Nitrogenous waste excretion and accumulation of urea and ammonia in *Chalcalburnus tarichi* (Cyprinidae), endemic to the extremely alkaline Lake Van (Eastern Turkey)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1992, 9(5-6): 377-386.
- [11] Wang Y 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.
- [12] 何志辉, 姜宏, 毕凤山. 达里湖水化学和水生生物学再调研[J]. *大连水产学院学报*, 1996, 11(2): 1-13.
- He Z H, Jiang H, Bi F S. Restudies on the hydrochemistry and hydrobiology of Dali Lake[J]. *Journal of Dalian Fisheries College*, 1996, 11(2): 1-13(in Chinese).
- [13] Yan B, Zhao L H, Guo J T, *et al.* miR-429 regulation of osmotic stress transcription factor 1 (OSTF1) in tilapia during osmotic stress[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 426(3): 294-298.
- [14] Zhao Y, Wu J W, Wang Y, *et al.* Role of miR-21 in alkalinity stress tolerance in tilapia[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 471(1): 26-33.
- [15] 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(in Chinese).
- [16] Yao Z L, Wang H, Chen L, *et al.* Transcriptomic profiles of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to alkalinity stress[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11(3): 2200-2246.
- [17] Yao Z L, Lai Q F, Hao Z R, *et al.* Carbonic anhydrase 2-like and Na⁺-K⁺-ATPase α gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) under carbonate alkalinity stress[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(6): 1491-1500.
- [18] Chang Y M, Tang R, Sun X W, *et al.* Genetic analysis of population differentiation and adaptation in *Leuciscus waleckii*[J]. *Genetica*, 2013, 141(10-12): 417-429.
- [19] Hwang P P, Lee T H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 148(3): 479-497.
- [20] Oğuz A R. Development of osmoregulatory tissues in the Lake van fish (*Alburnus tarichi*) during larval development[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 2018, 44(1): 227-233.
- [21] 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.
- [22] Gilmour K M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills[J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2012, 184(3): 223-230.
- [23] Matey V, Richards J G, Wang Y X, *et al.* The effect of hypoxia on gill morphology and ionoregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2008, 211(7): 1063-1074.
- [24] 秦桂香, 魏青, 余家庆. 青海湖裸鲤肌肉和鳃组织结构特征[J]. *青海大学学报 (自然科学版)*, 2010, 28(2): 4-7.
- Qin G X, Wei Q, Yu J Q. Histological characterization muscular and gill of *Gymnocypris przewalskii*[J]. *Journal of Qinghai University (Nature Science)*, 2010, 28(2): 4-7(in Chinese).
- [25] 张仁意, 李国刚, 张存芳, 等. 不同生境下青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 两亚种鳃形态差异及其功能适应[J]. *动物学研究*, 2013, 34(4): 387-391.
- Zhang R Y, Li G G, Zhang C F, *et al.* Morphological differentiations of the gills of two *Gymnocypris przewalskii* subspecies in different habitats and their functional adaptations[J]. *Zoological Research*, 2013, 34(4): 387-391(in Chinese).
- [26] 高珊, 常玉梅, 赵雪飞, 等. 不同NaHCO₃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 waleckii*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(4): 736-743(in Chinese).
- [27] Keys A, Willmer E N. 'Chloride secreting cells' in the gills of fishes, with special reference to the common eel[J]. *Journal of Physiology*, 1932, 76(3): 368-378.
- [28] Hwang P P, Lee T H, Lin L Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms[J]. *American Journal of Physiology*, 2011, 301(1): R28-R47.
- [29] Hiroi J, McCormick S D. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish[J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2012, 184(3): 257-268.
- [30] Hwang P P, Chou M Y. Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis[J]. *Pflügers Archiv -European Journal of Physiology*, 2013, 465(9): 1233-1247.
- [31] Maina J N. A study of the morphology of the gills of an extreme alkalinity and hyperosmotic adapted teleost *Oreochromis alcalicus grahami* (Boulenger) with particular emphasis on the ultrastructure of the chloride cells and their modifications with water dilution: A SEM and TEM study[J]. *Anatomy and Embryology*, 1990, 181(1): 83-98.
- [32] Carmona R, García-Gallego M, Sanz A, *et al.* Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens[J]. *Journal of Fish Biology*, 2004, 64(2): 553-566.
- [33] Cengiz E I, Unlu E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2006, 21(3): 246-253.
- [34] Roberts S D, Powell M D. Comparative ionic flux and gill mucous cell histochemistry: effects of salinity and disease status in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2003, 134(3): 525-537.
- [35] Lease H M, Hansen J A, Bergman H L, *et al.* Structural changes in gills of Lost River suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 134(4): 491-500.
- [36] Díaz A O, García A M, Devincenti C V, *et al.* Mucous cells in *Micropogonias furnieri* gills: histochemistry and ultrastructure[J]. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2001, 30(3): 135-139.
- [37] 王瑞芳, 刘玉辉, 王俊, 等. 瓦氏雅罗鱼生殖洄游过程中离子调节相关生理变化研究[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(4): 832-840.
- Wang R F, Liu Y H, Wang J, *et al.* Physiological regu-

- lation of ionic in amur ide (*Leuciscus waleckii*) during their spawning migration[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(4): 832-840(in Chinese).
- [38] Oğuz A R. Histological changes in the gill epithelium of endemic Lake Van Fish (*Chalcalburnus tarichi*) during migration from alkaline water to freshwater[J]. *North-Western Journal of Zoology*, 2015, 11(1): 51-57.
- [39] 徐豪, 马淑懿. 四种淡水养殖鱼肾组织的细微结构[J]. *中山大学学报*, 1983(2): 129-134.
- Xu H, Ma S Y. The fine structure of the renal tissue in four species of fresh-water fish[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1983(2): 129-134(in Chinese).
- [40] Oğuz A R. A histological study of the kidney structure of Van fish (*Alburnus tarichi*) acclimated to highly alkaline water and freshwater[J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2015, 48(2): 135-144.
- [41] Wood C M, Du J Z, Rogers J, *et al.* Przewalski's naked carp (*Gymnocypris przewalskii*): an endangered species taking a metabolic holiday in Lake Qinghai, China[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2007, 80(1): 59-77.
- [42] Galat D L, Post G, Keefe T J, *et al.* Histological changes in the gill, kidney and liver of Lahontan cut-throat trout, *Salmo clarki henshawi*, living in lakes of different salinity-alkalinity[J]. *Journal of Fish Biology*, 1985, 27(5): 533-552.
- [43] 高珊, 赵雪飞, 常玉梅, 等. 不同NaHCO₃碱度对瓦氏雅罗鱼肾和肠组织显微结构的影响[J]. *水产学杂志*, 2020, 33(03): 24-30.
- Gao S, Zhao X F, Chang Y M, *et al.* Effect of different bicarbonate alkalinities on microstructures of kidney and intestine in Amur ide *Leuciscus waleckii*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2020, 33(03): 24-30(in Chinese).
- [44] Camargo M M P, Martinez C B R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream[J]. *Neotropical Ichthyology*, 2007, 5(3): 327-336.
- [45] 杨建, 徐伟, 耿龙武, 等. 盐度对5种幼鱼的生存及鳃、肾组织的影响[J]. *淡水渔业*, 2014, 44(4): 7-12.
- Yang J, Xu W, Geng L W, *et al.* Effects of salinity on survival, gill and kidney tissue in juveniles of 5 species[J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(4): 7-12(in Chinese).
- [46] Evans D H. A brief history of the study of fish osmoregulation: the central role of the Mt. Desert Island Biological Laboratory[J]. *Frontiers in Physiology*, 2010, 1: 1-10.
- [47] Whittamore J M. Osmoregulation and epithelial water transport: lessons from the intestine of marine teleost fish[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(1): 1-39.
- [48] Wood C M, Wilson P, Bergman H L, *et al.* Ionoregulatory strategies and the role of urea in the Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*)[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2002, 80(3): 503-515.
- [49] 王萍, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱环境下青海湖裸鲤肠道HCO₃⁻分泌相关基因表达差异[J]. *海洋渔业*, 2015, 37(4): 341-348.
- Wang P, Lai Q F, Yao Z L, *et al.* Differential expressions of genes related to HCO₃⁻ secretion in the intestine of *Gymnocypris przewalskii* during saline-alkaline water transfer[J]. *Marine Fisheries*, 2015, 37(4): 341-348(in Chinese).
- [50] 王燕, 赵金良, 吴俊伟, 等. 碱度胁迫对尼罗罗非鱼鳃离子细胞形态以及鳃、肾和肠中HCO₃⁻转运因子的影响[J]. *动物学杂志*, 2016, 51(6): 1027-1037.
- Wang Y, Zhao J L, Wu J W, *et al.* Effects of alkalinity on morphology of gill ionocytes and HCO₃⁻ transporters in gill, kidney and intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2016, 51(6): 1027-1037(in Chinese).
- [51] 缪丽梅, 刘鹏斌, 张笑晨, 等. 达里湖水质和生物资源量监测及评价[J]. *内蒙古农业科技*, 2013(6): 53-55, 67.
- Miao L M, Liu P B, Zhang X C, *et al.* Monitoring and evaluation on water quality and biology resource quantity in DaLi Lake[J]. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*, 2013(6): 53-55, 67(in Chinese).
- [52] Nkambo M, Bugenyi F W, Naluwayiro J, *et al.* Planktonic and fisheries biodiversity of alkaline saline crater lakes of western Uganda[J]. *Biodiversity Journal*, 2015, 6(1): 95-104.
- [53] Bergman A N, Laurent P, Otiang'a-Owiti G, *et al.* Physiological adaptations of the gut in the Lake Magadi

- tilapia, *Alcolapia grahami*, an alkaline- and saline-adapted teleost fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2003, 136(3): 701-715.
- [54] Grosell M. Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(15): 2813-2827.
- [55] 耿龙武, 徐伟, 李池陶, 等. 盐碱对大鳞鲃血清渗透压、离子含量及鳃丝 Na^+/K^+ -ATP酶活力的影响[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(2): 458-465.
- Geng L W, Xu W, Li C T, *et al.* Influence of salinity and alkalinity on serum ion concentrations, serum osmosis and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of *Barbus capito*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(2): 458-465(in Chinese).
- [56] 刘济源, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤耗氧率、血浆渗透浓度和离子浓度的影响[J]. *生态学杂志*, 2012, 31(3): 664-669.
- Liu J Y, Yao Z L, Lai Q F, *et al.* Effects of saline-alkali stress on the oxygen consumption and plasma osmolality and ion concentrations of *Gymnocypris przewalskii* [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(3): 664-669(in Chinese).
- [57] Wood C M, Bergman H L, Bianchini A, *et al.* Transepithelial potential in the Magadi tilapia, a fish living in extreme alkalinity[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(2): 247-258.
- [58] Wood C M, Bergman H L, Laurent P, *et al.* Urea production, acid-base regulation and their interactions in the Lake Magadi tilapia, a unique teleost adapted to a highly alkaline environment[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1994, 189(1): 13-36.
- [59] Arabacı M, Çağırhan H, Sarı M, *et al.* Serum ionic content of endemic *Chalcalburnus tarichi* during spawning, prespawning and postspawning terms, living in highly alkaline waters of Lake Van (pH 9.8), Turkey[J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2001, 1(1): 53-57.
- [60] Oğuz A R. Environmental regulation of mitochondria-rich cells in *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811) during reproductive migration[J]. *The Journal of Membrane Biology*, 2013, 246(3): 183-188.
- [61] Wright P A, Iwama G K, Wood C M. Ammonia and urea excretion in Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*) adapted to the highly alkaline Pyramid Lake (pH9.4)[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1993, 175: 153-172.
- [62] Iwama G K, McGeer J C, Wright P A, *et al.* Divalent cations enhance ammonia excretion in Lahontan cutthroat trout in highly alkaline water[J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 50(5): 1061-1073.
- [63] Ip Y K, Chew S F. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review[J]. *Frontiers in Physiology*, 2010, 1: 134.
- [64] Wilkie M P. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 293(3): 284-301.
- [65] Nakada T, Hoshijima K, Esaki M, *et al.* Localization of ammonia transporter Rhcg1 in mitochondrion-rich cells of yolk sac, gill, and kidney of zebrafish and its ionic strength-dependent expression[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative & Comparative Physiology*, 2007, 293(4): 1743-1753.
- [66] Sashaw J, Nawata M, Thompson S, *et al.* Rhesus glycoprotein and urea transporter genes in rainbow trout embryos are upregulated in response to alkaline water (pH 9.7) but not elevated water ammonia[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 96(4): 308-313.
- [67] 安晓萍, 齐景伟, 罗旭光, 等. 不同水体中瓦氏雅罗鱼的氨氮排泄率以及血液和组织中氨氮含量研究[J]. *现代农业科技*, 2014(4): 244-245, 247.
- An X P, Qi J W, Luo X G, *et al.* Study on ammonia nitrogen excretion rate and ammonia nitrogen content in blood and tissue of *Arachis wallichii* in different water bodies[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2014(4): 244-245, 247(in Chinese).
- [68] Nawata C M, Wood C M. The effects of CO_2 and external buffering on ammonia excretion and Rhesus glycoprotein mRNA expression in rainbow trout[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2008, 211(20): 3226-3236.
- [69] 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 & Comparative Physiology*, 2010, 299(4): R1011-R1018.

- Physiology, 2013, 305(3): 242-251.
- [70] Wood C M, Michele N C, Wilson J M, *et al.* Rh proteins and NH_4^+ -activated Na^+ -ATPase in the Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*), a 100% ureotelic teleost fish[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(16): 2998-3007.
- [71] 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.
- [72] 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 alkalinities 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(in Chinese).
- [73] Peng K W, Chew S F, Lim C B, *et al.* The mudskippers *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti* can tolerate environmental NH_3 concentrations of 446 and 36 μM , respectively[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1998, 19(1): 59-69.
- [74] Iwata K, Kajimura M, Sakamoto T. Functional ureogenesis in the gobiid fish *Mugilogobius abei*[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2000, 203(24): 3703-3715.
- [75] Wang Y X, Walsh P J. High ammonia tolerance in fishes of the family *Batrachoididae* (Toadfish and Midshipmen)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 50(3): 205-219.
- [76] 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 waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 117-124(in Chinese).
- [77] Wu S C, Horng J L, Liu S T, *et al.* Ammonium-dependent sodium uptake in mitochondrion-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) larvae[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2010, 298(2): C237-C250.
- [78] Hsu H H, Lin L Y, Tseng Y C, *et al.* A new model for fish ion regulation: identification of ionocytes in freshwater- and seawater-acclimated medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Cell and Tissue Research*, 2014, 357(1): 225-243.
- [79] Liu S T, Horng J L, Chen P Y, *et al.* Salt secretion is linked to acid-base regulation of ionocytes in seawater-acclimated medaka: new insights into the salt-secreting mechanism[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31433.
- [80] Gilmour K M, Perry S F. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(11): 1647-1661.
- [81] Claiborne J B, Edwards S L, Morrison - Shetlar A I. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 293(3): 302-319.
- [82] Ishimatsu A, Hayashi M, Lee K S, *et al.* Physiological effects on fishes in a high - CO_2 world[J]. *Journal of Geophysical Research*, 2005, 110: C09S09.
- [83] Sender S, Böttcher K, Cetin Y, *et al.* Carbonic anhydrase in the gills of seawater-and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: purification, characterization, and immunohistochemical localization[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1999, 47(1): 43-50.
- [84] Wilson J M, Randall D J, Donowitz M, *et al.* Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*)[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2000, 203(15): 2297-2310.
- [85] Tang C H, Lee T H. The novel correlation of carbonic anhydrase II and anion exchanger 1 in gills of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2007, 307A(7): 411-418.
- [86] Yao Z L, Guo W F, Lai Q F, *et al.* *Gymnocypris przewalskii* decreases cytosolic carbonic anhydrase expression to compensate for respiratory alkalosis and osmoregulation in the saline-alkaline lake Qinghai[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2016, 186(1): 83-95.
- [87] Brauner C J, Baker D W. Patterns of acid-base regulation

- tion during exposure to hypercarbia in fishes[M]//Glass M L, Wood S C. Cardio-Respiratory Control in Vertebrates. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009: 43-63.
- [88] Guh Y J, Lin C H, Hwang P P. Osmoregulation in zebrafish: Ion transport mechanisms and functional regulation[J]. *EXCLI Journal*, 2015, 14: 627-659.
- [89] Guh Y J, Hwang P P. Insights into molecular and cellular mechanisms of hormonal actions on fish ion regulation derived from the zebrafish model[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 251: 12-20.
- [90] Lin C H, Hu H J, Hwang P P. Cortisol regulates sodium homeostasis by stimulating the transcription of sodium-chloride transporter (NCC) in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 422: 93-102.
- [91] Chen B H, Xu J, Cui J, *et al.* Transcriptional differences provide insight into environmental acclimatization in wild amur ide (*Leuciscus waleckii*) during spawning migration from alkalized lake to freshwater river[J]. *Genomics*, 2019, 111(3): 267-276.
- [92] Cao Y B, Chen X Q, Wang S, *et al.* Growth hormone and insulin-like growth factor of naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) in Lake Qinghai: expression in different water environments[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(3): 400-406.
- [93] Chevin L M, Lande R, Mace G M. Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory[J]. *PLoS Biology*, 2010, 8(4): e1000357.
- [94] Yampolsky L Y, Schaer T M M, Ebert D. Adaptive phenotypic plasticity and local adaptation for temperature tolerance in freshwater zooplankton[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, 281(1776): 20132744.
- [95] Badyaev A V. Stress-induced variation in evolution: from behavioural plasticity to genetic assimilation[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 272(1566): 877-886.
- [96] Lande R. Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2009, 22(7): 1435-1446.
- [97] Kavembe G D, Franchini P, Irisarri I, *et al.* Genomics of adaptation to multiple concurrent stresses: insights from comparative transcriptomics of a Cichlid fish from one of earth's most extreme environments, the hypersaline soda Lake Magadi in Kenya, East Africa[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2015, 81(3-4): 90-109.
- [98] Xu J, Ji P F, Wang B S, *et al.* Transcriptome sequencing and analysis of wild amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting an extreme alkaline-saline lake reveals insights into stress adaptation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e59703.
- [99] Xu J, Li Q, Xu L M, *et al.* Gene expression changes leading extreme alkaline tolerance in Amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting soda lake[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 682.
- [100] 池炳杰, 常玉梅, 闫学春, 等. 瓦氏雅罗鱼达里湖群体和乌苏里江群体的遗传多样性和遗传结构分析[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(2): 228-235.
- Chi B J, Chang Y M, Yan X C, *et al.* Genetic variability and genetic structure of *Leuciscus waleckii* Dybowski in Wusuli River and Dali Lake[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(2): 228-235(in Chinese).
- [101] Xu J, Li J T, Jiang Y L, *et al.* Genomic basis of adaptive evolution: the survival of amur ide (*Leuciscus waleckii*) in an extremely alkaline environment[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(1): 145-159.
- [102] 郭雯翡, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫下青海湖裸鲤鳃基因表达差异[J]. *海洋渔业*, 2012, 34(2): 137-144.
- Guo W F, Yao Z L, Lai Q F, *et al.* Differential gene expression of *Gymnocypris przewalskii* under saline-alkali stress[J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(2): 137-144(in Chinese).
- [103] Tong C, Zhang C F, Zhang R Y, *et al.* Transcriptome profiling analysis of naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) provides insights into the immune-related genes in highland fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 366-377.
- [104] Liang L Q, Chang Y M, He X L, *et al.* Transcriptome analysis to identify cold-responsive genes in Amur carp (*Cyprinus carpio haematopterus*)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130526.

Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water

CHANG Yumei, LIANG Liqun *

(National & Local United Engineering Laboratory of Freshwater Fish Breeding; Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Fish Stress Resistance Breeding and Germplasm Characteristics on Special Habitats, Chinese Academy of Fishery Sciences; Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Aquaculture is one of the important ways to utilize alkali-saline water or land effectively. It is important to clarify the physiological and molecular mechanisms of fish alkali-saline adaptation, which is the prerequisite to breed new varieties for aquaculture in alkali-saline water with middle or high alkalinity. This paper summarized the advances of research of physiological and molecular mechanisms in several representative fish species inhabiting alkali-saline lakes around the world, including tissues micro-changing, plasma iono-osmoregulation, ammonia nitrogen metabolism, acid-base regulation, hormone regulation and genome adaptations. Based on these latest advances, we consider that the alkali-saline tolerant fish have evolved characteristics of strong phenotypic plasticity, complexity and integrity due to living in extreme hypersaline-alkali habitats for a long time. It is suggested that the research of correlation exploration should be extended to the determination of causality at gene level, through systematically integrating the information of physiology, phenotype, behavior and various omics, which will promote the research of the mechanisms of alkali-saline adaptation molecularly and evolutionarily for alkali-saline tolerant fish in the future.

Key words: alkali-saline tolerant fish; alkali-saline adaptation; iono-osmoregulation; ammonia nitrogen metabolism; genomic evolution

Corresponding author: LIANG Liqun. E-mail: liangliqun@hrfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31602136); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (C2016070); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019ZD0601)