

DOI: 10.12264/JFSC2023-0290

秦岭细鳞鲑子二代与野生群体视网膜结构及视蛋白基因表达特征

郭星辰^{1,4}, 王艺舟¹, 张林^{1,4}, 宋荣群^{1,4}, 熊冬梅², 李志刚³, 姜海波^{1,4}, 安苗^{1,4}, 邵俭^{1,4}

1. 贵州大学动物科学学院渔业资源与环境保护实验室, 高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵阳 550025;
2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;
3. 宝鸡市水产工作站, 陕西 宝鸡 722300;
4. 贵州大学特种水产研究所, 贵州 贵阳 550025

摘要: 为深入了解秦岭细鳞鲑(*Brachymystax tsinlingensis* Li, 1966)在不同生境的视觉特征, 以人工繁育的秦岭细鳞鲑子二代[体重(51.50 ± 10.86) g, 体长(15.40 ± 0.75) cm]与自然生境野生群体[体重(85.68 ± 31.81) g, 体长(18.17 ± 2.34) cm]为研究对象, 分别利用传统组织学方法和荧光定量 PCR 技术研究其视网膜组织结构特征及其视觉形成中起关键作用的 5 种视蛋白(Opsin)基因: 视紫红质(Rhodopsin, *RH1*)、绿色敏感蛋白(Rhodopsin-like pigments, *RH2*)、紫外线敏感蛋白(Short wavelength-sensitive pigments, *SWS1*)、蓝色敏感视蛋白(*SWS1*-like pigments, *SWS2*)和红色敏感视蛋白(Long wavelength-sensitive pigments, *LWS*)在 11 种组织中的表达特征。结果显示: 秦岭细鳞鲑子二代与野生群体的视网膜无明显差异, 均具有完整的十层结构, 且子二代群体视网膜中视锥细胞数(C.)和外核层细胞核数(O.N.)极显著高于野生群体($P < 0.01$), 神经节细胞数(G.)显著高于野生群体($P < 0.05$)。野生群体 *RH1* 的相对表达量极显著低于子二代群体($P < 0.01$), 且 *RH1* 在两个群体的 5 种视蛋白基因中表达量最高; 视锥蛋白基因 *RH2*、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* 中, 除 *RH2* 的相对表达量无显著差异外, 子二代群体 *SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因的转录水平都极显著高于野生群体($P < 0.01$); 子二代群体视锥蛋白基因的表达比例由高到低依次为 *LWS* > *SWS1* > *SWS2* > *RH2*, 而野生群体为 *LWS* > *SWS2* > *RH2* > *SWS1*, *LWS* 基因在两个群体中的表达均占主导地位, 超过表达总量的 60%; *RH1*、*RH2*、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因均在秦岭细鳞鲑子二代与野生群体眼组织中特异性表达, 而在其他非眼组织中未表达。本研究表明秦岭细鳞鲑子二代与野生群体两者都具有较强的光敏感特性, 能可塑性地调节视蛋白基因表达谱引发光谱敏感性变化来应对不同栖息生境, 且子二代表现特征更显著; 其畏光行为可能是对不同环境的适应性策略, 而光敏感性则表明其行为活动在很大程度上依赖于视觉交流。本研究结果可为秦岭细鳞鲑资源增殖与养护提供重要参考。

关键词: 秦岭细鳞鲑; 子二代群体; 野生群体; 视蛋白; 光敏感性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)12-1445-12

视觉是生物获得外界信息的重要来源, 在交配、觅食和躲避天敌等行为方面发挥重要作用, 是大多生物体最重要的感觉器官^[1-2]。视觉系统的结构决定了其特定的功能, 由多层神经元组成的视网膜是视觉形成的生理基础, 主要包含视锥细

胞和视杆细胞两种基本感光细胞类型, 光感受器能够捕捉光子将光信号转换成电信号经神经传递给大脑皮层形成视觉^[3]。视网膜内的变化可以反映对特定环境的视觉适应, 这些适应可能发生在细胞水平, 涉及视网膜细胞类型的大小、数量和

收稿日期: 2023-11-06; 修订日期: 2023-11-21.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32002392).

作者简介: 郭星辰(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为渔业资源与环境. E-mail: guoxingchenn@163.com

通信作者: 邵俭, 副教授, 研究方向为渔业资源与环境. E-mail: shaojian5098@163.com

分布或关于视蛋白基因的分子水平^[4]。视蛋白是一类属于 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)超家族的 7 次跨膜蛋白, 其与发色团共价结合介导了视觉传递的第一步, 在分子水平上构成了视觉的核心^[5-7]。大多数鱼类具有 5 种基本视蛋白, 根据其最大吸收波长的不同可分为: (1) RH1 (rhodopsin): 视杆蛋白, 是杆状光感受器细胞中表达的光色素, 主要介导暗视觉; 在相对明亮的光线下介导颜色视觉的视锥细胞拥有多种视锥视蛋白, 用于可见光谱的不同区域, 包括: (2) RH2 (rhodopsin-like pigments): 视紫红质样蛋白, 又称为绿色敏感视蛋白; (3) SWS1 (short wavelength-sensitive pigments): 紫外线敏感视蛋白; (4) SWS2 (SWS1-like pigments): 蓝色敏感视蛋白; (5) LWS (long wavelength-sensitive pigments): 红色敏感性视蛋白, 这 4 种视锥蛋白是鱼类区分颜色的分子基础^[8-10]。关于鱼类视蛋白的研究主要集中在其组成、分类、分布、功能、表达调控及与环境的适应性关系等方面^[11-17], 目前国内对斑马鱼、笛鲷属和鲷科等鱼类开展了相关研究^[18-22]。

水生栖息地比陆生栖息地具有更多样化的光环境, 其不同的入射光光谱构成对生活在其中的动物的视觉系统有着深远的影响, 鱼眼作为最直接的感光器官, 可能会在进化的时间尺度上发生细胞或分子水平的变化来反映对特定环境的视觉适应^[4]。随着感觉驱动成种假说的提出使得鱼类视觉系统与栖息环境间的互作关系成为了当前研究热点^[23-25]。有研究发现, 在进化过程中鱼类的视觉能力因其不同生境得到优化, 特别是光环境且能适应其一生中光照条件的定期变化, 如个体发生或季节变化等^[4]。为与栖息环境中的可用光谱相匹配, 鱼类具有调节其视蛋白表达谱的能力, 称为表型可塑性, 这使得生物体能够快速适应不断变化的光环境, 从而满足其摄食、防御、生殖、洄游和集群等生物行为活动^[10,26]。例如, 鲑科鱼类在生命周期特定阶段于海洋和淡水间迁徙, 剧烈的环境变化塑造了其视觉特性。为进入更深的水域做准备, 其视网膜中紫外敏感的视锥细胞在变态过程中消失, 并在其性成熟并返回浅水层后

重新出现^[27-29]。也有研究报道大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)早期发育过程中, 会经历由浮游生活转变为底栖生活的变态过程, 其栖息环境尤其光照环境变化巨大, 表达占主导地位的视蛋白基因, 逐渐由 LWS 转变为 RH2b1, 其光谱敏感性可能由红色敏感向绿色敏感转变从而适应变态后深海短光谱为主的光照环境^[22]。

秦岭细鳞鲑(*Brachymystax tsinlingensis* Li, 1966)隶属鲑形目(Salmoniformes)、鲑科(Salmonidae)、细鳞鲑属(*Brachymystax*), 俗称梅花鱼, 为我国特有的陆封型冷水性鱼类, 是一种河川型洄游的山麓鱼类, 主要栖息在河流海拔为 900~2300 m 以上水流湍急、水质清澈、水底多为大型砾石的山涧溪流中^[30-34]。受自然环境和人为活动因素影响, 秦岭细鳞鲑资源受到严重破坏, 1988 年被列入国家Ⅱ级野生保护动物^[35], 保护和恢复其资源极为迫切。当前, 经长期开展秦岭细鳞鲑人工繁育与资源养护, 我国已系统掌握了秦岭细鳞鲑人工繁育技术并成功获得秦岭细鳞鲑子二代苗种^[36-37], 但过程中发现该物种具有明显的畏光行为及强光致死等特性, 成为制约其资源增殖及养护效率重要影响因素之一。秦岭细鳞鲑是典型的视觉摄食者, 由于在自然与人工养殖环境下其生存环境、光谱组成、敌害情况及食物来源等不同, 可能直接反映在其视觉器官对环境的适应性, 尤其是在视觉中起重要作用的视网膜结构特征及视觉视蛋白基因的表达水平可能存在较大差异。然而, 目前对秦岭细鳞鲑的研究主要在物种有效性^[33-34]、人工繁殖^[36-38]、年龄与生长^[39]、亲缘鉴定^[40]、毒理学^[41]等方面, 有关该物种视觉方面研究报道较少, 仅见视网膜结构描述^[42]和光视觉行为记录等^[43]。

本研究选取秦岭细鳞鲑子二代与野生群体为对象, 分别通过传统组织学方法和荧光定量 PCR 技术对其视网膜组织结构及在视觉形成中起关键作用的视蛋白基因表达特征等开展研究, 揭示秦岭细鳞鲑视觉器官的结构和基本功能, 以及不同生境下视蛋白基因的表达特征, 以期为其人工繁育及资源养护中光生境条件选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

秦岭细鳞鲑子二代是 2021 年 4 月在陕西省太白县白云峡秦岭细鳞鲑人工繁育实验基地, 通过对人工驯养的子一代亲鱼催产、孵化所得, 其体重(51.50 ± 10.86) g、全长(17.47 ± 1.10) cm、体长(15.40 ± 0.75) cm、体高(3.43 ± 0.33) cm ($n=6$); 野生群体来自陕西太白渭水河水生野生动物自然保护区, 其体重 (85.68 ± 31.81) g、全长(21.07 ± 2.68) cm、体长(18.17 ± 2.34) cm、体高(3.77 ± 0.58) cm ($n=6$)。取其 11 种组织, 分别为眼球、肝、脾、肾、脑、皮肤、鳔、性腺、鳃、心、肌肉, 每种组织分成 3 份, 浸没在 RNA Later 中先 4 ℃过夜后于-20 ℃保存, 再分别将两个群体各组织的样品研磨混样后提取各组织总 RNA 用以视蛋白 qPCR 分析; 取另侧眼球组织用 4%多聚甲醛溶液固定 24 h 后换成 70%乙醇保存于 4 ℃以备视网膜组织切片实验用。

1.2 视网膜组织学切片及视网膜细胞计数

将固定好的样品经过乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋等步骤后进行厚度为 5 μm 的连续石蜡切片, 通过 HE 染色后使用中性树脂封片, 利用 Nikon 80i 正置三光源显微镜和 Nikon NIS-Elements BR5.01 软件观察切片结构并拍照。在 CaseViewer 软件中将上述拍照所得视野内视网膜平均分成等长的 5 份, 平均计算 5 次两群体视网膜同一区域每个等长份中 100 μm 单位长度中的视锥细胞(C.)、外核层细胞核(O.N.)和神经节细胞(G.)的分布数量^[44]。

1.3 引物设计合成

在 NCBI 数据库中搜索虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) 5 种视蛋白基因的 CDS 序列: *RH1* (NM_001124319.1)、*RH2* (NM_001124323.2)、*SWS1* (NM_001124321.1)、*SWS2* (NM_001124322.2)、*LWS* (NM_001124320.1), 运用 Primer Premier 5.0 分别设计半定量引物和荧光定量引物, 引物序列信息如表 1 和表 2 所示, 所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 样品总 RNA 提取和反转录

采用 GeneJET RNA Purification Kit (Thermo

表 1 秦岭细鳞鲑视蛋白基因半定量引物序列

Tab. 1 Semi-quantitative primer sequences of opsin genes of *Brachymystax tsinlingensis*

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence of primer (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature
RH1-F	ATGAACGGCACAGAGGGACCAGA	62.15
RH1-R	TTATGCAGGAGCCACGGAGCTGG	65.01
RH2-F	ATGCAGAACGGCACAGAAGGA	60.09
RH2-R	CTATGCAGGGCCACAGAAGA	59.97
SWS1-F	ATGGGAAAGGACTTCCATCTGTAC	57.23
SWS1-R	TTAGGCTGTGGAGACCTCTGTCTT	60.96
SWS2-F	ATGAACACAATGAGGTCAAATGCTC	58.17
SWS2-R	TTAACCAGCAGAAGACACTTGAGTG	59.88
LWS-F	ATGGCAGAAAGCTGGGGGAAGT	59.21
LWS-R	TTATGCAGGTGCCACAGAGGA	58.91

表 2 秦岭细鳞鲑视蛋白基因荧光定量 PCR 引物序列

Tab. 2 Fluorescence quantitative primer sequences of opsin genes of *Brachymystax tsinlingensis*

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence of primers (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature
RH1-qF	CGGCTTCACCACTACGAT	60
RH1-qR	CAAACGACCAACCACCT	
RH2-qF	CAACCCCTCAACTTCATTCT	60
RH2-qR	TCTCTCAACAGCCAGCACTAC	
SWS1-qF	CTGAGACAACCGCTGAACT	60
SWS1-qR	TGACACCAACCCTGCTATT	
SWS2-qF	CATCACTTCACTCAGCCCCT	60
SWS2-qR	CCATCTTTCAAACGCCACTAC	
LWS-qF	TGGCAAGCACCATCAGCGT	60
LWS-qR	GCAGACCAGACCCAGGAGA	
β-actin-qF	AAGATGAAATCGCCGCAC	60
β-actin-qR	TTGGCTTTGGGGTTGAGG	

Scientific)试剂盒提取总 RNA, 使用 Nanodrop2000 核酸定量仪对其浓度和纯度进行检测, 浓度在 100~500 ng/μL 之间, 纯度 A260/280 为 1.8~2.0。再吸取 1~2 μL 电泳检测总 RNA 质量, 根据 28S 和 18S 的比值判断 RNA 的完整性。采用 RevertAid 反转录预混液(Thermo Scientific)试剂盒去除所提样本 RNA 中的基因组 DNA 后反转录 cDNA 第一链, 将合成的 cDNA 置于-20 ℃保存备用。

1.5 引物适用性分析

如图 1 和图 2 所示, 通过引物设计提供的 Tm

值共设计 10 个退火温度(T_m 范围 54~60 °C), 随机选取秦岭细鳞鲑 cDNA 样品对各基因半定量及荧光定量引物进行适应性筛选。反应体系为 20 μ L: 其中 2×Faster sTaq PCR Master Mix 10 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 无

菌去离子水 7.4 μ L。反应程序: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 72 °C 终延伸 10 min, 共进行 35 个循环。扩增完毕, 吸取 3 μ L PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 置于凝胶成像系统中拍照。

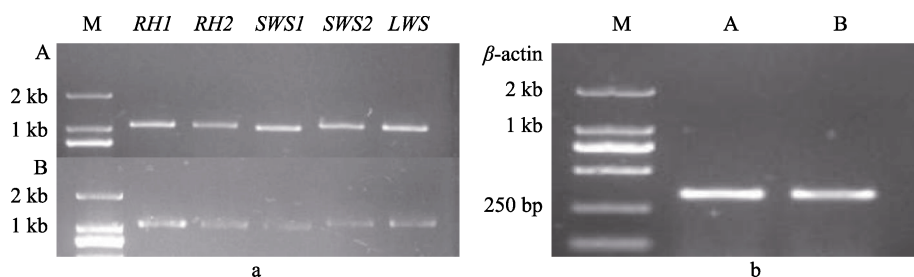


图 1 秦岭细鳞鲑视蛋白基因半定量 PCR 引物适用性验证

5 种视蛋白基因(a)和 β -actin 基因(b)半定量引物在秦岭细鳞鲑子二代和野生群体中的适用性验证;

A 为秦岭细鳞鲑子二代群体; B 为秦岭细鳞鲑野生群体; M 为 DL2000 DNA 分子量标准。

Fig. 1 Applicability of semi-quantitative PCR primers of opsin genes of *Brachymystax tsinlingensis*
Applicability of semi-quantitative PCR primers of five opsin genes (a) and β -actin gene (b) of *B. tsinlingensis*;
A represents the second filial generation population (SFGP) of *B. tsinlingensis*; B represents the wild population (WP) of *B. tsinlingensis*; M represents DNA Marker (DL2000).

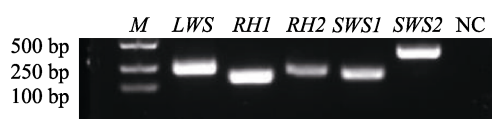


图 2 秦岭细鳞鲑视蛋白基因荧光定量 PCR 引物适用性验证

M 为 DL2000 DNA 分子量标准; NC 为阴性对照。

Fig. 2 Applicability of fluorescence quantitative PCR primers of opsin genes of *Brachymystax tsinlingensis*
M represents DNA Marker (DL2000);
NC represents negative control.

1.6 实时荧光定量 PCR

通过引物适用性 PCR 筛选, 并在 54~60 °C 温度梯度范围摸索出五种视蛋白基因和 β -actin 基因引物共同的最适退火温度 T_m 为 60 °C。 β -actin 作为内参基因, 以秦岭细鳞鲑野生和人工养殖群体 cDNA 为模板, 采用两步法进行定量实验, 每个样品设置 4 个平行, 同时设置阴性空白对照, 以降低由于加样和仪器产生的系统误差, 用 LightCycle 96 (Roche) 荧光 PCR 定量仪检测 5 种视蛋白基因在野生和人工养殖群体的 mRNA 水平, 实验步骤参考武汉赛维尔生物科技有限公司的 2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix (G3326) 试剂盒说明书。反应体系如下: 总体系为

10 μ L, 其中 2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 5 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 无菌去离子水 3 μ L。荧光定量反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火/延伸 30 s, 共进行 40 个循环。

1.7 组织表达谱

以表 1 各基因半定量引物对秦岭细鳞鲑野生和人工养殖群体 11 种组织中 5 个视蛋白基因的表达到量进行 PCR 检测。PCR 反应体系及程序同 1.5, 其中 *RH1/RH2/SWS1/SWS2/LWS* 的退火温度分别为 62.2/60/57.2/58.2/59 °C, 延伸时间为 15 s。PCR 反应结束后, 吸取 3 μ L 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测, 并拍照记录。

1.8 数据统计与分析

根据 LightCycler 96 SW 1.1 软件的定量结果 (C_q 值), 以 β -actin 作为参照基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 法计算 *RH1*、*RH2*、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因在两个群体的相对表达水平, 首先求出每个群体目的基因 C_q 值和内参基因 C_q 值的差值并进行单因素方差分析, 该差值能反应出该基因相对表达水平, 再将差值最大的基因设为对照与其他基因进行比

较得出各基因的相对表达量。使用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 26.0 统计软件对数据进行处理和统计分析, 所得数据用 GraphPad Prism 8 软件作图。实验数据均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示(其中 $\bar{x}$ 为平均值, SD 为标准差), $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 子二代与野生群体视网膜结构特征

秦岭细鳞鲑子二代与野生群体的视网膜均具十层结构, 从外向内依次为: 色素上皮层(retinal pigment epithelium, PEL)、视锥视杆层(photoreceptor

layer, RCL)、外界膜(external limiting membrane, OLM)、外核层(outernuclear layer, ONL)、外网层(outer plexiform layer, OPL)、内核层(inner nuclear layer, INL)、内网层(inner plexiform layer, IPL)、神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)、神经纤维层(nerve fiber layer, NFL)和内界膜(inner limiting membrane, ILM), 两个群体视网膜的整体结构组成无明显差异(图 3)。通过对两个群体视网膜 100 μm 单位长度进行细胞计数发现子二代群体视网膜中视锥细胞数(C.)和外核层细胞核数(O.N.)极显著高于野生群体($P < 0.01$), 神经节细胞数(G.)显著高于野生群体($P < 0.05$)(图 4)。

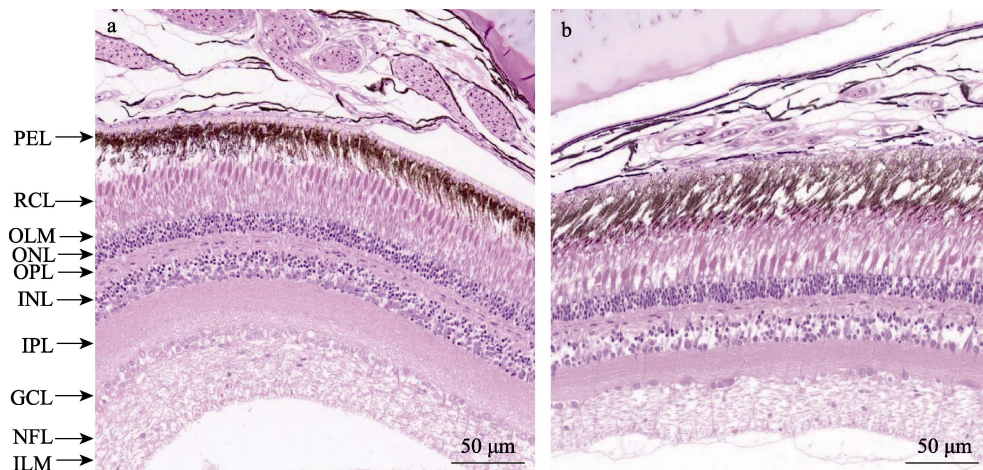


图 3 秦岭细鳞鲑子二代与野生群体视网膜结构图

a. 秦岭细鳞鲑子二代群体; b. 秦岭细鳞鲑野生群体; PEL: 色素上皮层; RCL: 视锥视杆层; OLM: 外界膜; ONL: 外核层; OPL: 外网层; INL: 内核层; IPL: 内网层; GCL: 神经节细胞层; NFL: 神经纤维层; ILM: 内界膜。

Fig. 3 Retinal structure of the second filial generation population (SFGP) and wild population (WP) of *Brachymystax tsinlingensis*. a. The second filial generation population (SFGP) of *B. tsinlingensis*; b. The wild population (WP) of *Brachymystax tsinlingensis*.

PEL: retinal pigment epithelium; RCL: photoreceptor layer; OLM: external limiting membrane; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; NFL: nerve fiber layer; ILM: inner limiting membrane.

2.2 子二代与野生群体视紫红质基因表达量的差异

秦岭细鳞鲑子二代与野生群体视紫红质基因 *RHI* 相对表达量分别为 1385.36 ± 52.32 和 1101.84 ± 96.88 , 野生群体 *RHI* 的相对表达量极显著低于子二代群体($P < 0.01$)(图 5)。

2.3 子二代与野生群体视锥蛋白基因表达量的差异

秦岭细鳞鲑子二代与野生群体四种视锥蛋白基因相对表达量如图 6 所示, 其中子二代群体

RH2、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因的相对表达量分别为 1.78 ± 0.12 、 13.13 ± 0.67 、 11.19 ± 1.30 、 41.46 ± 1.68 ; 野生群体 *RH2*、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因的相对表达量分别为 1.52 ± 0.09 、 1.10 ± 0.12 、 1.21 ± 0.03 、 9.16 ± 0.80 。在 4 种视锥蛋白中, 子二代与野生群体除了 *RH2* 基因的相对表达量无显著差异外, 野生群体 *SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因的转录水平都极显著低于子二代群体($P < 0.01$)。 *LWS* 基因的相对表达量在子二代与野生群体中均为最高。

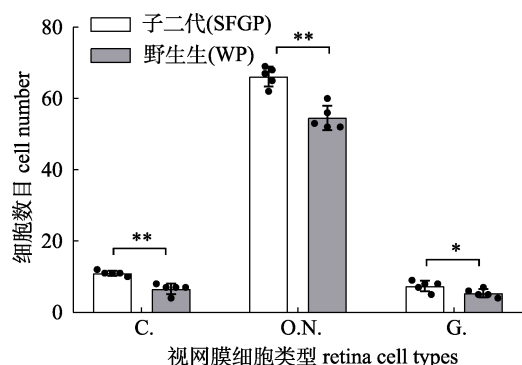


图 4 秦岭细鳞鲑子二代与野生群体视网膜每 100 μm 单位长度内视锥细胞(C.)、外核层细胞核(O.N.)和神经节细胞(G.)的数量
柱状图上圆点为可视化数据标签, 表示各细胞数目重复值; * 代表显著差异 ($P<0.05$); ** 代表极显著差异 ($P<0.01$).

Fig. 4 The number of cones (C.), nuclei of the outer nuclear layer (O.N.) and ganglion cell (G.) per 100 μm unit length in the retina of the second filial generation population (SFGP) and wild population (WP) of *Brachymystax tsinlingensis*. The dots on the bar chart are visual data labels, indicating the repeated value of the number of cells; * represent significant difference ($P<0.05$); ** represents very significant difference ($P<0.01$).

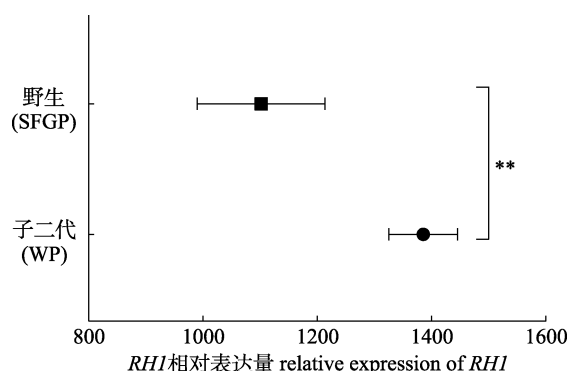


图 5 秦岭细鳞鲑子二代与野生群体视紫红质基因相对表达量

* 代表显著差异 ($P<0.05$); ** 代表极显著差异 ($P<0.01$).

Fig. 5 Relative expression of *RH1* of the second filial generation population (SFGP) and wild population (WP) of *Brachymystax tsinlingensis*

* represent significant difference ($P<0.05$); ** represents very significant difference ($P<0.01$).

2.4 子二代与野生群体视锥蛋白基因表达比例的差异

秦岭细鳞鲑视锥蛋白基因中, 子二代群体 *RH2*、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因表达比例分别为 2.64%、19.43%、16.56%、61.37%; 野生群体 *RH2*、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因的表达比例分别为 11.69%、8.47%、9.32%、70.53% (图 7)。野生群

体视锥蛋白基因的表达比例由高到低依次为 *LWS*>*SWS2*>*RH2*>*SWS1*; 而子二代群体为 *LWS*>*SWS1*>*SWS2*>*RH2*, *LWS* 基因在两个群体中的表达均占主导地位, 超过总量的 60%, 而另 3 个基因在两个群体中的表达比例各具差异。

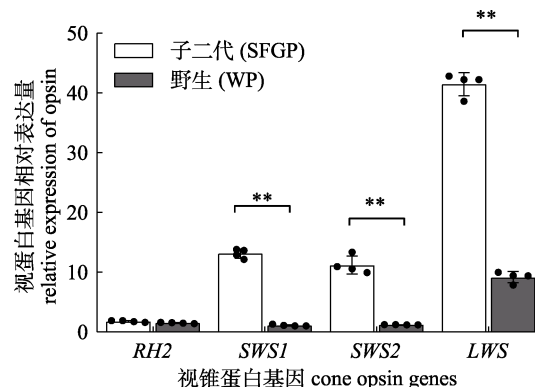


图 6 秦岭细鳞鲑子二代与野生群体视锥蛋白基因相对表达量

柱状图上圆点为可视化数据标签, 表示各基因相对表达量重复值; * 代表显著差异 ($P<0.05$); ** 代表极显著差异 ($P<0.01$).

Fig. 6 Relative expression of cone opsins of the second filial generation population (SFGP) and wild population (WP) of *Brachymystax tsinlingensis*

The dots on the bar chart are visual data labels that represent the relative expression repeat values of each gene; * represent significant difference, ($P<0.05$); ** represents very significant difference, ($P<0.01$).

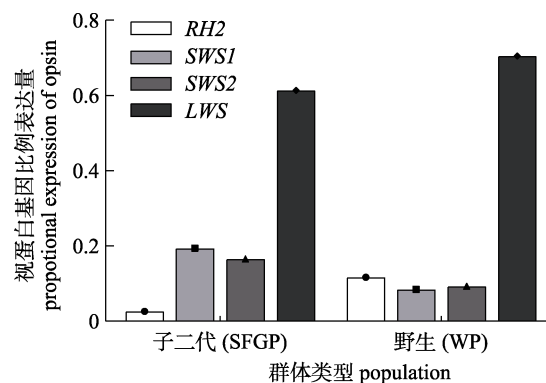


图 7 秦岭细鳞鲑子二代与野生群体视锥蛋白基因表达比例

* 代表显著差异 ($P<0.05$); ** 代表极显著差异 ($P<0.01$).

Fig. 7 Proportional expression of cone opsins of the second filial generation population (SFGP) and wild population (WP) of *Brachymystax tsinlingensis*

* represent significant difference ($P<0.05$); ** represents very significant difference ($P<0.01$).

2.5 子二代与野生群体视蛋白基因组织表达谱的差异

通过半定量 PCR 对 5 种视蛋白基因在秦岭细

鳞鲑子二代与野生群体的 11 种组织(眼球、肝、脾、肾、脑、皮肤、鳃、性腺、鳃、心、肌肉)中的表达水平检测, 如图 8 所示, 结果发现 *RH1*、

RH2、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* mRNA 均在秦岭细鳞鲑子二代与野生群体眼组织中特异性表达, 而在其他非眼组织中未检测到表达。

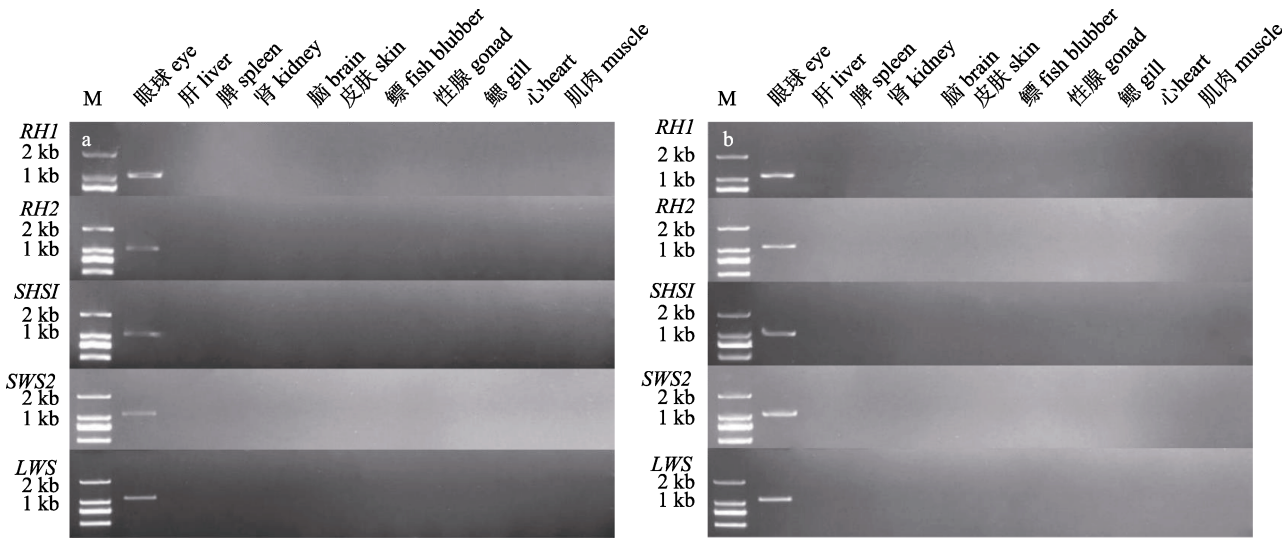


图 8 秦岭细鳞鲑子二代与野生群体视蛋白基因组织表达谱

a. 秦岭细鳞鲑子二代群体; b. 秦岭细鳞鲑野生群体; M: DL2000 DNA 分子量标准.
Fig. 8 Tissue expression profile of opsins of the second filial generation (SFGP) and wild population (WP) of *Brachymystax tsinlingensis*
a represents the second filial generation population (SFGP) of *B. tsinlingensis*; b represents the wild population (WP) of *B. tsinlingensis*; M: DNA Marker (DL2000).

3 讨论

3.1 子二代与野生群体视网膜结构及视网膜细胞数量特征

鱼类视觉系统中感知光线和辨识目标物清晰程度的能力分别称为光敏度(light sensitivity)和视锐度(visual acuity), 视网膜中感光细胞的种类、结构、数量和排列方式对鱼类光敏度和视锐度起决定性作用, 栖息生境的差异也会影响鱼类的视网膜结构与细胞数量^[45-47]。一般来说, 动物视网膜中锥体和滤光体的类型因栖息地而异, 通常与可用的光谱相匹配以便对可用波长光的视觉灵敏度达到最大化^[48-49], 对比秦岭细鳞鲑子二代和野生群体视网膜层次结构发现, 两个群体的视网膜结构与其他鱼类相似均具有高度保守且完整的十层结构, 但子二代群体视网膜中视锥细胞数(C.)和外核层细胞核数(O.N.)均显著高于野生群体。群体中特定视蛋白的高表达与匹配的锥型的高频率相

对应^[50], 本研究结果中秦岭细鳞鲑子二代群体中高表达的视蛋白基因水平与其高密度的视网膜细胞数相互对应, 共同作用于视觉及行为的形成产生进而使其光敏度最大程度适应栖息地的光谱环境变化, 充分说明了不同生境对视网膜结构和基本功能产生了定向选择结果。

但需强调的是, 大多数鱼类在某些情况下可以通过一种补偿模式即调整光感受器的数量和/或光感受器尖端的长度, 以保持恒定的光子捕获^[51-52], 在这种情况下, 特定波长光的减少伴随着对该波长敏感的光感受器(或光色素尖端的长度)数量的增加^[52], 这可能是秦岭细鳞鲑子二代群体在人工养殖环境下视网膜结构及细胞数不同于野生群体的主要原因之一。

3.2 子二代与野生群体视蛋白基因表达特征

脊椎动物依靠眼睛视网膜中特殊的感光细胞将外界光线转换为神经信号, 而位于光感受器外段的视色素负责破译光信息起始光视觉过程^[53-54],

辨别和响应不同波长的光的能力取决于分布在视网膜上的这两种视觉光感受器所表达的不同视蛋白^[14]。本研究结果显示, 秦岭细鳞鲑子二代(大于 2 年)经长期人工驯养, 仍保留了野生状态下和亲本(大于 10 年)相同的视蛋白表达模式: 两个群体都共表达五种视蛋白基因并高表达介导暗视觉的 *RHI* 基因, 且对长波长敏感的 *LWS* 基因在两个群体中的表达比例均占主导地位(超过视锥蛋白表达比例的 60%), 表明两者都具有较强的光敏感特性, 尤其是红光敏感, 子二代表现特征更为显著。视紫红质是表达于杆状光感受器中对光非常敏感的光吸收蛋白, 主要在昏暗的光线下调节视觉, 可帮助鱼类调节其视觉敏感性以适应黑暗环境, 同时在发现敌害方面等具有重要作用。有研究表明, 视杆蛋白是哺乳动物视网膜中最丰富的视蛋白^[55], 秦岭细鳞鲑也具有该特性, 这与其警觉, 具有畏光特性, 喜无光或弱光环境的生活习性相匹配^[30-32, 56]。秦岭细鳞鲑子二代和野生群体主要生存在光线以长波长为主的全光谱环境下的表中层水域, 为适应该光谱环境, 两个群体的视觉系统均表现出了对长波长光敏感的视觉偏好, 而视红蛋白的高表达则更有益于其营山涧溪流栖息生境, 满足视觉需求从而利于快速觅食、自由跳跃、躲避敌害、栖息繁衍等行为活动。

水生生境提供了比陆地生境更具多样化的光照环境, 水体具有选择性吸收光的特性, 悬浮或溶解在水中的物质也可以吸收和散射光^[57]。鱼类生活在水生环境中, 为适应不同栖息地中复杂各异的光谱变化, 通常依靠视蛋白基因表达的可塑性来应对由于短暂事件(如生活史转变、栖息地之间的移动或栖息地的季节性变化)而产生的不同光环境^[2]。本研究发现秦岭细鳞鲑子二代和野生群体视蛋白基因具有相似的表达模式, 均表现出了调节其视蛋白表达谱的能力, 使其能够快速适应栖息地中不断变化的光环境。但在不同生境条件下, 秦岭细鳞鲑子二代群体 *RHI*、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因的转录水平都极显著高于野生群体 ($P < 0.01$)。这说明秦岭细鳞鲑子二代与野生群体分别在人工养殖与自然环境下其生存环境、光谱组

成、敌害情况及食物来源等不同, 最先表征在视蛋白基因表达水平上差异。秦岭细鳞鲑自然群体栖息环境水域宽阔、水质清澈, 其喜好溪流两岸具遮蔽度较高的灌木、植被处水体, 可有效避免阳光照射而引起的水温上升, 同时植被中栖息着数量众多的陆生昆虫, 满足秦岭细鳞鲑栖息、藏匿及摄食等习性^[58-59]。比较人工养殖与野生群体生境, 其主要差异表现为水深、水体暴露(无藏匿地点)、入射光光谱、栖息生存密度和摄食竞争等方面, 均造成了光强度和光谱的本质差异, 因此, 不同群体视蛋白会表现出对不同色彩的响应偏好, 将通过调节视蛋白的差异表达来适应不同的栖息地环境, 其视蛋白基因的表达特征也与其视觉生态学中的主要模式相关联。

此外, 硬骨鱼类中具有如松果体器官和深部脑等非视网膜光感受器, 这些光敏结构也能将感知到的光刺激通过神经信号或激素信号介导鱼类的生理行为, 但视网膜仍是主要的感光器官^[60]。有研究表明, 大多数鱼类的视蛋白基因主要在视网膜的感光细胞中表达, 刘雪媚(2013)^[20]研究发现 *RH* 视蛋白在红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)各组织中的表达情况与其他鱼类相似, 在视网膜中表达量最高, 而陈新页等^[21](2015)通过对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)各组织的定量检测发现视蛋白基因不仅在牙鲆视网膜中高度表达, 且在表皮组织中也大量表达。本研究首次发现 5 种视蛋白基因在秦岭细鳞鲑子二代及野生群体眼组织中特异性表达, 而在其他组织均无表达, 表明视网膜是秦岭细鳞鲑最直接最主要的光感受器, 其余组织不具有感光能力, 综上得知秦岭细鳞鲑的行为活动在很大程度上依赖于视觉交流。秦岭细鳞鲑子二代和野生群体生活在不同生境下, 其视蛋白基因表现出对不同波长的偏好性, 并且与子二代群体视锥细胞和外核层细胞核的数量极显著高于野生群体这一结构特征相对应, 表明该物种视网膜在细胞水平的结构特征和分子水平的表达特征均与其生活、捕食习性等具有对应关系, 两个群体视觉系统表现出了不同的环境适应性策略, 因此从视网膜结构及其视蛋白基因表达研究这一

角度对于测试环境对陆封型鲑科鱼类视觉敏感性的影响方面具有一定意义和参考价值。

参考文献:

- [1] Lythgoe J N. The Ecology of Vision[M]. Oxford: Oxford University Press, 1979.
- [2] Hauser F E, Chang B S. Insights into visual pigment adaptation and diversity from model ecological and evolutionary systems[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2017, 47: 110-120.
- [3] Boll P F. On the anatomy and physiology of the retina[J]. Vision Research, 1977, 17(11-12): 1249-1265.
- [4] Fogg L G, Cortesi F, Gache C, et al. Developing and adult reef fish show rapid light-induced plasticity in their visual system[J]. Molecular Ecology, 2023, 32(1): 167-181.
- [5] Yokoyama S. Evolution of dim-light and color vision pigments[J]. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2008, 9: 259-282.
- [6] Lamb T D. Evolution of the genes mediating phototransduction in rod and cone photoreceptors[J]. Progress in Retinal and Eye Research, 2020, 76: 100823.
- [7] Rennison D J, Owens G L, Taylor J S. Opsin gene duplication and divergence in ray-finned fish[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2012, 62(3): 986-1008.
- [8] Sakmar T P, Franke R R, Khorana H G. Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(21): 8309-8313.
- [9] Ward M N, Churcher A M, Dick K J, et al. The molecular basis of color vision in colorful fish: Four long wave-sensitive (LWS) opsins in guppies (*Poecilia reticulata*) are defined by amino acid substitutions at key functional sites[J]. BMC Evolutionary Biology, 2008, 8(1): Article No.210.
- [10] Carleton K L, Escobar-Camacho D, Stieb S M, et al. Seeing the rainbow: Mechanisms underlying spectral sensitivity in teleost fishes[J]. Journal of Experimental Biology, 2020, 223(8): jeb193334.
- [11] Stell W K, Hárosi F I. Cone structure and visual pigment content in the retina of the goldfish[J]. Vision Research, 1976, 16(6): 647-657.
- [12] Bowmaker J K, Kunz Y W. Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in the brown trout (*Salmo trutta*): Age-dependent changes[J]. Vision Research, 1987, 27(12): 2101-2108.
- [13] Chinen A, Hamaoka T, Yamada Y, et al. Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish[J]. Genetics, 2003, 163(2): 663-675.
- [14] Yokoyama S. Molecular evolution of vertebrate visual pigments[J]. Progress in Retinal and Eye Research, 2000, 19(4): 385-419.
- [15] Yokoyama S, Tada T. Adaptation evolution of the African and Indonesian coelacanths to deep-sea environments[J]. Gene, 2000, 261(1): 35-42.
- [16] Porter M L, Roberts N W, Partridge J C. Evolution under pressure and the adaptation of visual pigment compressibility in deep-sea environments[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2016, 105: 160-165.
- [17] Cortesi F, Mitchell L J, Tettamanti V, et al. Visual system diversity in coral reef fishes[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2020, 106: 31-42.
- [18] Zhang Y Q, Wang Y X, Jiang Q, et al. Development of retinal photoreceptors and expression of opsin in the zebrafish[J]. Chinese Journal of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, 2008, 8(2): 84-86, 139. [张艳琼, 王跃祥, 蒋璐, 等. 斑马鱼视网膜感光细胞的发育及视蛋白的表达[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2008, 8(2): 84-86, 139.]
- [19] Qu Y. Roles of rhodopsin in the zebrafish circadian clock[D]. Suzhou: Soochow University, 2022. [区玥. 视蛋白 Rhodopsin 在斑马鱼生物钟中的作用[D]. 苏州: 苏州大学, 2022.]
- [20] Liu X M. The evolution and expression of opsin genes in *Lutjanus* fish[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013. [刘雪媚. 笛鲷属鱼类视蛋白基因的进化与表达分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013.]
- [21] Chen X Y, Guo H, Bao B L. Cloning of *SWS1* gene and expression of five opsin genes in larval flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(5): 641-649. [陈新页, 郭华, 鲍宝龙. 牙鲆仔鱼 *SWS1* 基因克隆及 5 个视蛋白基因的表达[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(5): 641-649.]
- [22] Wang Y N, Li X, Wu L L, et al. Expression Characteristics of opsin genes in different developmental stages of *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(1): 186-192. [王雨浓, 李贤, 吴乐乐, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)不同发育阶段视蛋白基因表达特征研究[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(1): 186-192.]
- [23] Endler J A. Signals, signal conditions, and the direction of evolution[J]. American Naturalist, 1992, 139: S125-S153.
- [24] Wang Z D. The molecular phylogenetics of Lutjanid fishes of the genus *Lutjanus* from China[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2009. [王中锋. 中国笛鲷属鱼类的分子系统学[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2009.]
- [25] Cummings M E, Endler J A. 25 years of sensory drive: The evidence and its watery bias[J]. Current Zoology, 2018,

- 64(4): 471-484.
- [26] Li P, Temple S, Gao Y, et al. Circadian rhythms of behavioral cone sensitivity and long wavelength opsin mRNA expression: A correlation study in zebrafish[J]. The Journal of Experimental Biology, 2005, 208: 497-504.
- [27] Cheng C L, Flamarique I N. Opsin expression: New mechanism for modulating colour vision[J]. Nature, 2004, 428(6980): 279.
- [28] Cheng C L, Flamarique I N, Hárosi F I, et al. Photoreceptor layer of salmonid fishes: Transformation and loss of single cones in juvenile fish[J]. Journal of Comparative Neurology, 2006, 495(2): 213-235.
- [29] Cheng C L, Flamarique I N. Chromatic organization of cone photoreceptors in the retina of rainbow trout: Single cones irreversibly switch from UV (SWS₁) to a blue (SWS₂) light sensitive opsin during natural development[J]. The Journal of Experimental Biology, 2007, 210: 4123-4135.
- [30] Li S Z. On a new subspecies of fresh-water trout, *Brachymystax lenok tsinlingensis*, from Taipaishan, Shenxi, China[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1966, 3(1): 92-94. [李思忠. 陕西太白山细鳞鲑的一新亚种[J]. 动物分类学报, 1966, 3(1): 92-94.]
- [31] Li S Z. Discussion on geographical distribution of Salmonidae in China[J]. Chinese Journal of Zoology, 1984, 19(1): 34-37. [李思忠. 中国鲑科鱼类地理分布的探讨[J]. 动物学杂志, 1984, 19(1): 34-37.]
- [32] Zhao Y H, Zhang C G. Threatened fishes of the world: *Brachymystax lenok tsinlingensis* Li, 1966 (Salmonidae)[J]. Environmental Biology of Fishes, 2009, 86(1): 11-12.
- [33] Xing Y C, Lv B B, Ye E Q, et al. Revalidation and redescription of *Brachymystax tsinlingensis* Li, 1966 (Salmoniformes: Salmonidae) from China[J]. Zootaxa, 2015, 3962(1): 191-205.
- [34] Xiong D M, Meng Y X, Zhang X M, et al. The validity of species of *Brachymystax tsinlingensis* Li based on mitochondria control region and microsatellite[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(5): 809-818. [熊冬梅, 蒙彦晓, 张鑫森, 等. 基于线粒体控制区和微卫星标记探讨秦岭细鳞鲑物种有效性[J]. 水生生物学报, 2023, 47(5): 809-818.]
- [35] Yue P Q, Chen Y Y. China red data book of endangered animals: Pisces[M]. Beijing: Science Press, 1998: 35-37. [乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书(鱼类)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 35-37.]
- [36] Shao J, Wei Q W, Wu J M, et al. A method of artificial propagation of *Brachymystax tsinlingensis*: CN104041457B[P]. 2016-04-06. [邵俭, 危起伟, 吴金明, 等. 一种秦岭细鳞鲑人工繁殖方法: CN104041457B[P]. 2016-04-06.]
- [37] Shao J, Wei Q W, Wang F, et al. A method of seedling breeding of *Brachymystax tsinlingensis*: CN105557595B[P]. 2018-06-15. [邵俭, 危起伟, 王丰, 等. 一种秦岭细鳞鲑苗种的培育方法: CN105557595B[P]. 2018-06-15.]
- [38] Shi D L, Wei Q W, Sun Q L, et al. Early ontogenesis of *Brachymystax lenok tsinlingensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(4): 557-567. [施德亮, 危起伟, 孙庆亮, 等. 秦岭细鳞鲑早期发育观察[J]. 中国水产科学, 2012, 19(4): 557-567.]
- [39] Xue C, Wei Q W, Sun Q L, et al. Age and growth of *Brachymystax lenok tsinlingensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 743-749. [薛超, 危起伟, 孙庆亮, 等. 秦岭细鳞鲑的年龄与生长[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 743-749.]
- [40] Shao J, Luo W, Wei Q, et al. Assignment of parentage by microsatellite analysis in the endangered *Brachymystax lenok tsinlingensis* (Salmonidae)[J]. Aquatic Biology, 2017, 26: 69-73.
- [41] Guo X C, Chu Z P, Song R Q, et al. Toxicity of common biocides used in aquaculture to embryos and larvae of *Brachymystax tsinlingensis* Li[J]. Journal of Fish Biology, 2023: 1-10.
- [42] Shi D L. Study on the early ontogenesis of *Brachymystax lenok tsinlingensis*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012. [施德亮. 秦岭细鳞鲑早期发育研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.]
- [43] Zhang L, Lan K Y, Song R Q, et al. Selective behavior of juvenile *Brachymystax tsinlingensis* depends on substrate color, light intensity, and light Color[J]. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 179-187. [张林, 兰开勇, 宋荣群, 等. 秦岭细鳞鲑稚鱼对底质颜色、光照强度及光色的选择行为[J]. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 179-187.]
- [44] Blaxter J H S, Jones M P. The development of the retina and retinomotor responses in the herring[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1967, 47(3): 677-697.
- [45] Evans B I, Browman H I. Variation in the development of the fish retina[C]//American Fisheries Society Symposium, 2004, 40: 145-166.
- [46] Douglas R H, Partridge J C, Marshall N J. The eyes of deep-sea fish I: Lens pigmentation, tapeta and visual pigments[J]. Progress in Retinal and Eye Research, 1998, 17(4): 597-636.
- [47] Caves E M, Brandley N C, Johnsen S. Visual acuity and the evolution of signals[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2018, 33(5): 358-372.

- [48] Yokoyama S, Radlwimmer F B. The molecular genetics of red and green color vision in mammals[J]. *Genetics*, 1999, 153(2): 919-932.
- [49] Cronin T W, Caldwell R L. Tuning of photoreceptor function in three mantis shrimp species that inhabit a range of depths. II. Filter pigments[J]. *Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 2002, 188(3): 187-197.
- [50] Fuller R C, Carleton K L, Fadool J M, et al. Population variation in opsin expression in the bluefin killifish, *Lucania goodei*: A real-time PCR study[J]. *Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 2004, 190(2): 147-154.
- [51] Penn J S, Williams T P. Photostasis: Regulation of daily photon-catch by rat retinas in response to various cyclic illuminances[J]. *Experimental Eye Research*, 1986, 43(6): 915-928.
- [52] Kröger R H H, Bowmaker J K, Wagner H J. Morphological changes in the retina of *Aequidens pulcher* (Cichlidae) after rearing in monochromatic light[J]. *Vision Research*, 1999, 39(15): 2441-2448.
- [53] Wald G. The molecular basis of visual excitation[J]. *Nature*, 1968, 219(5156): 800-807.
- [54] Musilova Z, Salzburger W, Cortesi F. The visual opsin gene repertoires of teleost fishes: Evolution, ecology, and function [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2021, 37: 441-468.
- [55] Macke J P, Davenport C M, Jacobson S G, et al. Identification of novel rhodopsin mutations responsible for retinitis pigmentosa: Implications for the structure and function of rhodopsin[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1993, 53(1): 80-89.
- [56] Shao J. Study on the cultivation biology of four endemic fishes in the plateau[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. [邵俭. 四种高原土著鱼类养殖生物学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.]
- [57] Jerlov N G. *Marine Optics*[M]. The 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Oceanography Series, 1976: 1-231.
- [58] Hou F. Study on the conservation biology of *Brachymystax lenok tsinlingensis* in Gansu Province[D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2009. [侯峰. 甘肃秦岭细鳞鲑保护生物学研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2009.]
- [59] Sun Q L. Conservation biology of *Brachymystax lenok tsinlingensis*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014. [孙庆亮. 秦岭细鳞鲑保护生物学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.]
- [60] Bowmaker J K. The visual pigments of fish[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 1995, 15(1): 1-31.

Retinal structure and opsin expression characteristics of the second filial generation and wild population of *Brachymystax tsinlingensis* Li, 1966

GUO Xingchen^{1,4}, WANG Yizhou¹, ZHANG Lin^{1,4}, SONG Rongqun^{1,4}, XIONG Dongmei², LI Zhigang³, JIANG Haibo^{1,4}, AN Miao^{1,4}, SHAO Jian^{1,4}

1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region; Laboratory of Fishery Resources and Environmental Protection, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;
3. Fishery Workstation of Baoji, Baoji 722300, China;
4. Special Fisheries Research Institute, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: *Brachymystax tsinlingensis* (Li 1966) is a landlocked Salmonidae fish endemic to China. Based on long-term artificial breeding and resource conservation studies, it was found that *B. tsinlingensis* has obvious photophobic behavior and light-sensitive characteristics. To further understand the visual characteristics of *B. tsinlingensis* in different habitats, this study studied the second filial generation population (SFGP) [body weight: (51.50 ± 10.86) g, body length: (15.40 ± 0.75) g] and wild population (WP) [weight: (85.68 ± 31.81) g, body length: (18.17 ± 2.34) cm] of *B. tsinlingensis* under artificial breeding and natural environment. Traditional histological methods have been used to study the structural characteristics of the retina, and fluorescence quantitative PCR technology has been used to identify five key opsin genes that play a crucial role in visual formation: rhodopsin (*RH1*), rhodopsin-like pigments (*RH2*), short wavelength-sensitive pigments (*SWS1*), SWS1-like pigments (*SWS2*), and long wavelength-sensitive pigments (*LWS*). The results showed that there was no significant difference in the retina between SFGP and WP. The number of cones (C.) and outer nuclear layer (O.N.) in the retina of SFGP was significantly higher than that of WP ($P < 0.01$), and the number of ganglion cells (G.) was significantly higher than that of WP ($P < 0.05$). The relative expression level of *RH1* in WP was significantly lower than that in SFGP ($P < 0.01$), and *RH1* had the highest expression level among the five opsin genes in both populations. In cone opsin genes *RH2*, *SWS1*, *SWS2*, and *LWS* were significantly different; no significant difference in relative expression of *RH2* was observed. The transcription levels of *SWS1*, *SWS2*, and *LWS* genes were significantly higher than those of WP ($P < 0.01$). The expression ratio of cone opsins in the SFGP was *LWS* > *SWS1* > *SWS2* > *RH2* from high to low, whereas that in the WP was *LWS* > *SWS2* > *RH2* > *SWS1*. The expression of *LWS* was dominant in both populations, accounting for more than 60% of total expression. Five opsin mRNA were specifically expressed in the retinas of the two populations. This study indicated that both the SFGP and WP of *B. tsinlingensis* have strong photosensitive characteristics that can regulate the expression profile of opsin genes to trigger spectral sensitivity changes to cope with different habitats, and the performance characteristics of the SFGP are more significant. The exhibited photophobic behavior may be an adaptive strategy for different environments, and photosensitivity indicates that behavior depends largely on visual communication. The results of the present study provide a vital reference for the proliferation and maintenance of *B. tsinlingensis*.

Key words: *Brachymystax tsinlingensis*; second-generation filial population; wild population; opsin; photosensitivity

Corresponding author: SHAO Jian. E-mail: shaojian5098@163.com