

DOI: 10.12264/JFSC2024-0219

## 铜暴露对黄条鮰胚胎和初孵仔鱼发育的毒性效应

靳智欣<sup>1</sup>, 徐永江<sup>1,2</sup>, 崔爱君<sup>1,2</sup>, 姜燕<sup>1,2</sup>, 王滨<sup>1,2</sup>, 刘新富<sup>1,2</sup>

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋科技中心, 山东 青岛 266237

**摘要:** 为研究铜对黄条鮰(*Seriola aureovittata*)胚胎和初孵仔鱼发育的生理生态毒性效应, 将胚胎和初孵仔鱼分别暴露于 0 (对照)、0.034、0.060、0.107、0.192、0.340、0.600、1.070 mg/L 的 CuSO<sub>4</sub> 溶液中 60 h 和 5 d, 分析 Cu 暴露对胚胎发育、孵化率和初孵仔鱼的生长发育、存活、营养利用以及畸形率的影响, 分别计算 Cu 对胚胎和初孵仔鱼的半致死质量浓度(LC<sub>50</sub>)、安全质量浓度(SC)。同时, 利用转录组测序分析了卵黄囊仔鱼对 Cu 暴露胁迫的分子应答特性。结果显示: (1) Cu 胁迫下黄条鮰出现胚胎发育畸形与孵化率低、初孵仔鱼畸形率高及卵黄囊利用率快等现象。(2) 胚胎阶段 Cu<sup>2+</sup> 的 48h-LC<sub>50</sub> 为 0.08 mg/L 远低于初孵仔鱼阶段(0.60 mg/L), Cu 对黄条鮰初孵仔鱼的 SC 为 0.034 mg/L。(3) Cu 暴露下, 胚胎中差异表达基因(DEGs)主要富集在氧化磷酸化信号通路上, 初孵仔鱼中 DEGs 主要富集在细胞周期以及光信号传导通路中。研究结果为黄条鮰早期发育阶段铜制剂的安全使用浓度以及水环境的生物监测提供理论依据。

**关键词:** 黄条鮰; 铜暴露; 胚胎发育; 仔鱼生长; 急性毒性效应; 转录组分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)10-1186-18

随着人类社会发展和工业化的加速, 因工厂排放、农药大量使用等原因带来的水生态系统重金属污染日益严重, 其中铜是较为常见的重金属之一。铜作为农业生产中的原材料以及农业生产中的饲料、肥料和农药被广泛应用, 同时也是水生生物的必需微量元素, 对其生长发育、新陈代谢和环境适应都有重要的影响。水产养殖中, 硫酸铜(CuSO<sub>4</sub>)也作为控制水中藻类以及杀灭寄生虫的渔药使用<sup>[1-4]</sup>。然而, 水环境中过量的铜离子会对鱼类产生生理生态毒害作用, 包括抗氧化能力减弱、应激反应、生长发育受阻、代谢与生殖系统损伤等, 严重的可引发死亡<sup>[5-6]</sup>。已有研究表明, 鱼类的胚胎和仔鱼等早期生活史阶段对水环境中重金属污染物的响应为敏感, 如铜的暴露会造成

白鲟(*Acipenser transmontanus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、胖头鱼(*Pimephales promelas*)、青鳉(*Oryzias latipes*)等鱼类胚胎发育畸形、孵化率下降、初孵仔鱼畸形率升高、仔鱼生长速度减慢等不利后果<sup>[7-8]</sup>, 因而可利用鱼类胚胎、仔鱼的生理生态应答来实现对铜等重金属污染物的生物监测, 这也成为国际上评价水环境中重金属污染效应的重要方法之一, 并建立了生物早期预警系统<sup>[9-10]</sup>, 对于水环境中重金属污染的监测、预警和水质调控等具有重要的应用价值。随着分子生物学技术的发展, 利用转录组、蛋白组、代谢组等组学手段来解析重金属等污染物对海洋生物的致毒机理成为了可能, 也为环境重金属的监测提供了新的方法<sup>[7,11]</sup>。

收稿日期: 2024-07-21; 修订日期: 2024-08-25.

基金项目: 国家海水鱼产业技术体系项目(CARS-47); 山东省重点研发计划项目(2023TZXD050, 2021SFGC0701); 泰山产业领军人才工程、青岛市海洋科技创新专项(24-1-3-hygg-22-hy); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2023TD51, 2024XT0701).

作者简介: 靳智欣(1998-), 硕士, 研究方向为鱼类环境适应机制. E-mail: jinzhixin98@163.com

通信作者: 徐永江, 博士, 研究员, 研究方向为鱼类生殖生物学与设施化养殖技术. E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

黄条鲷(*Seriola aureovittata*)属鲈形目(Perciformes)鲹科(Carangidae)鲹属(*Seriola*), 是一种体型大、生长速度快、营养丰富、经济价值高的大洋性洄游鱼类, 在我国沿海均有分布, 适宜网箱、围栏、工船、工厂化等多种养殖生产方式, 是适宜深远海养殖的优良鱼种<sup>[12]</sup>。本研究通过急性毒性实验研究 Cu 暴露对黄条鲷胚胎及初孵仔鱼生长发育的生理生态影响, 确定了 Cu 对胚胎以及初孵仔鱼的半致死质量浓度(LC<sub>50</sub>)以及安全质量浓度(SC), 并分析了可能的分子机制, 以期为苗种培育及养殖过程中铜制剂的科学使用和水环境监测与调控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

黄条鲷受精卵来自于大连富谷食品有限公司培育的亲鱼自然产卵, 亲鱼培育和产卵的水质条件: 水温 21~22 °C、盐度 28、pH 7.8~8.2、溶解氧≥6 mg/L。挑选同批次发育正常且同步的受精卵以及活力好的初孵仔鱼用于实验。实验用硫酸铜(CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O≥98.0%)试剂为分析纯(国药集团化学试剂有限公司, 中国), 试剂在实验前配成质量浓度为 200 mg/L 的母液作为储备液, 再用过滤海水按比例稀释, 现用现配。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 胚胎急性毒性实验** 胚胎毒性实验按照《OECD 化学品测试准则 No. 236 鱼类胚胎急性毒性实验》<sup>[13]</sup>要求进行。根据预实验结果, 在 Cu<sup>2+</sup> 暴露最小 100%致死浓度和不引起死亡的最大浓度之间按等对数间距设置对照组和 7 个实验组, 分别为 Cu<sup>2+</sup> 浓度 0 (对照组)、0.034、0.060、0.107、0.192、0.340、0.600、1.070 mg/L。实验用 2000 mL 玻璃烧杯, 采用静水生物测试法, 实验期间不换水。每个实验组设置 6 个重复, 烧杯中各随机放入 60 粒初始发育至高囊胚期的受精卵。每个实验组(6 个重复)放入 1 个 80 cm×60 cm×40 cm 白色泡沫箱中, 使用控温仪控制孵化水温(21±0.5) °C, 盐度 29±1。实验持续时间为 60 h。实验过程中分别在 2、4、8、12、24、48、60 h, 在解剖镜下(Nikon SMZ800, Japan)观察胚胎发育情况并拍照, 记录

各实验组胚胎发育时序、畸形数和死亡情况, 随时捡出死亡胚胎(白浊且沉到烧杯底部)以免水质变坏。统计实验结束时的孵化率和初孵仔鱼畸形率, 并继续观察不同实验组中初孵仔鱼在 24、48 h 的死亡率, 以寇氏法<sup>[14]</sup>计算 24h-LC<sub>50</sub>、48h-LC<sub>50</sub>。

**1.2.2 初孵仔鱼急性毒性实验** 参考《OECD 化学品测试准则 No. 210 鱼类早期发育阶段急性毒性实验》<sup>[15]</sup>设计初孵仔鱼毒性实验, Cu<sup>2+</sup> 浓度设置以及实验用容器与胚胎毒性实验一致, 每实验组设置 6 个重复。每个实验烧杯中各随机放入 60 尾初孵仔鱼, 放入同等规格的泡沫箱以控温仪调节海水温度为(23±0.5) °C, 盐度 29±1。实验持续时间为 5 d。实验过程中, 分别在 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 观察初孵仔鱼发育情况, 用解剖镜观察并测量各浓度组仔鱼卵黄囊的变化情况, 随时观察、记录并捡出死亡初孵仔鱼以免水质变坏。采用寇氏法<sup>[14]</sup>, 计算 24 h、48 h、96 h 的 LC<sub>50</sub> 和 95%置信区间。SC 按下式计算: SC=96h-LC<sub>50</sub>×0.1。

每隔 24 h 观察并测量各浓度组仔鱼卵黄囊的变化情况, 参照 Alderdice 等<sup>[16]</sup>的方法计算:

$$V=4/3 \cdot \pi \cdot (r/2)^2 R_1 / 2$$

式中 r 为短径, R<sub>1</sub> 为长径。

### 1.3 转录组分析

**1.3.1 样品采集与保存** 胚胎毒性实验结束后, 在有仔鱼存活的对照组、0.060 mg/L 浓度组(设定为低浓度组, 近 48h-LC<sub>50</sub> 值)、0.192 mg/L 浓度组(设定为高浓度组)各随机取 20 尾分别混合为一个样本并放入液氮中保存, 用于后续转录组测序分析。各实验组存活的仔鱼在原烧杯内继续进行原位静水培育, 待 5 d 时再对对照组、0.034 mg/L 浓度组(设定为低浓度组, 近 SC 值)、0.340 mg/L 浓度组(设定为高浓度组, 近 96h-LC<sub>50</sub> 值)存活的所有仔鱼进行取样, 每组的仔鱼(10~15 尾)作为一个样本, 共计 18 个样品进行转录组测序分析。

**1.3.2 RNA 提取与测序文库构建** 使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国)提取仔鱼的总 RNA。使用 Nanodrop2000 (Thermo, 美国)和琼脂糖凝胶电泳(胶浓度为 1.2%)检查 RNA 的浓度和纯度(浓度≥50 ng/μL, 1.8<OD260/OD280<2.0), 使用 Agilent2100

(Agilent, 美国)测定 RIN 值。利用带有 Oligo (dT) 的磁珠从总 RNA 中分离出 mRNA。随后用片段化试剂(Fragmentation Buffer)将 mRNA 随机打成短片段。利用随机引物, 以 mRNA 为模板反转合成双链的 cDNA 链。采用 End Repair Mix 将双链 cDNA 末端修复、加尾并连接测序接头(Invitrogen, 美国)。对连接后的产物进行纯化, 并通过 PCR 扩增富集获得测序文库。

**1.3.3 转录组测序和功能富集分析** 在上海美吉生物医药科技有限公司对文库进行 Illumina Nova Seq6000 测序(读取长度为  $2 \times 150$  bp)。对原始序列(raw reads)进行过滤, 滤掉原始数据中的接头序列和低质量读数, 获得质控后序列(clean reads), 使用 HISAT2 软件<sup>[17]</sup>, 将各组 clean reads 与黄条鮰的参考基因组(JAIQDC010000001.1-JAIQDC010000031.1)进行比对, 获得用于后续转录本组装、表达量计算等的定位序列, 对转录组测序的比对结果进行质量评估。使用 RSEM 软件<sup>[18]</sup>分别对基因和转录本的表达水平进行定量分析, 以便后续分析不同样本间基因/转录本的差异表达情况。使用 DEGseq 软件<sup>[19]</sup>进行差异表达分析, 将  $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$  且  $\text{FDR} < 0.01$  作为筛选标准, 从而筛选出显著的差异表达基因(DEG), 进行 DEGs 的富集分析。分别使用 Goseq<sup>[20]</sup>和 KOBAS 软件<sup>[21]</sup>对 DEGs 进行 GO 功能显著性富集分析和 KEGG 信号通路富集分析。

**1.3.4 实时荧光定量 PCR 验证分析** 为验证转录组数据的准确性, 随机选取 5 个具有差异表达的基因(表 1)进行实时荧光定量 PCR (qPCR)。以 ARP 为参考基因, 使用 LightCycle480 型定量 PCR 仪进行基因的定量扩增分析。PCR 反应体系为 10  $\mu\text{L}$ , 包括 10  $\mu\text{mol/L}$  的上、下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ ; 5  $\mu\text{L}$  的 TB Green Premix Ex Taq; 1  $\mu\text{L}$  的 cDNA 模版; 3.2  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s 共 40 个循环。所有样本设置 3 个重复。目的基因表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算。

#### 1.4 数据统计分析

采用 SPSS 19.0 软件(IBM, 美国)进行统计分析, 所有数据均表示为平均值±标准差( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )。通过 *t*-检验(*t*-test)、单因素方差分析(one-way

表 1 实时荧光定量 PCR 差异基因验证引物序列

Tab. 1 Primers sequences for qPCR analysis

基因名称 gene name	引物序列(5'-3') sequence of the primers (5'-3')	
	上游引物 forward	下游引物 reverse
ARP	TGCCATTGTCATACA CTTGCTG	GGGGAACCATTGAAAT CTTGAG
NDUFB4	AACAAACCGCTCAG GAAAG	CTGCTCCTCCTTCCTAT TCC
NDUFA4	GAGACTCGTCGCCA AACAG	GGCTCAGGGTTGTTCT TGC
NDUFA11	GGTTGGTTCAGCCTA TCACATC	TTCAGTGGGTCACTG GAGC
GUCA1	CTGGACCGACAGGA AGTAA	TGTCGTTATTCTTGTCC ACC
RCVRN	CAAGAACGGATAACA TCACCA	AGTTTATCTGCCCTCTT CTCA

ANOVA)和 Duncan 多重比较分析方法进行样本间显著性差异分析, 设定差异显著性水平  $P=0.05$ , 当  $P<0.05$  时认为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cu<sup>2+</sup>对黄条鮰早期发育阶段的生态毒性

胚胎在不同实验组暴露 60 h 后的死亡情况见表 2。高浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露组(0.6 mg/mL 与 1.07 mg/L)原肠末期(12 h)开始出现死亡, 并在神经胚时期(14 h)出现大量死亡。最高浓度组(1.070 mg/L)48 h 内全部死亡; 0.192 mg/L、0.340 mg/L、0.600 mg/L 浓度组 48 h 死亡率达 80%以上; Cu<sup>2+</sup>胁迫下胚胎的 24 h、48 h 的 LC<sub>50</sub> 分别为 0.48 mg/L、0.08 mg/L, 95%置信区间分别为 0.46~0.50、0.07~0.08 (表 3)。

表 2 Cu<sup>2+</sup>对黄条鮰早期胚胎的生态毒性结果

Tab. 2 The eco-toxicity of Cu<sup>2+</sup> to *Seriola aureovittata* embryos

组编号 group number	质量浓度/(mg/L) concentration	校正死亡率/% corrected mortality rate	
		24 h	48 h
对照 control	0	0.00	0.00
I	0.034	1.44	20.93
II	0.060	0.86	46.51
III	0.107	3.74	71.51
IV	0.192	3.16	79.42
V	0.340	8.33	93.60
VI	0.600	73.56	95.06
VII	1.070	97.13	100.00

注: 校正死亡率(%)=(处理死亡率-对照死亡率)/(1-对照死亡率)×100%。

Note: Corrected mortality rate (%)=(treatment mortality rate-control mortality rate)/(1-control mortality rate)×100%.

**表3 Cu<sup>2+</sup>对黄条鮰胚胎毒性的 LC<sub>50</sub>**  
**Tab. 3 The LC<sub>50</sub> values of Cu<sup>2+</sup> for *Seriola aureovittata* embryos**

暴露时间/h exposure time	半致死浓度 (LC <sub>50</sub> )/(mg/L) half lethal concentration	95%置信区间/(mg/L) 95% confidence interval
24	0.48	0.46~0.50
48	0.08	0.07~0.08

初孵仔鱼在不同实验组暴露24 h内均出现死亡, 1.070 mg/L浓度组在48 h死亡率为54.32%, 并在96 h死亡率高达84% (表4); Cu<sup>2+</sup>对黄条鮰卵黄囊仔鱼的24 h、48 h、72 h和96 h的LC<sub>50</sub>分别为0.98 mg/L、0.60 mg/L、0.38 mg/L、0.34 mg/L, 95%置信区间分别为0.93~1.02、0.57~0.63、0.37~0.41、0.32~0.36。SC为0.034 mg/L (表5)。

**表4 Cu<sup>2+</sup>对黄条鮰卵黄囊仔鱼的生态毒性结果**  
**Tab. 4 The eco-toxicity of Cu<sup>2+</sup> for yolk sac larvae of *Seriola aureovittata***

组编号 group number	质量浓度/ (mg/L) concentration	校正死亡率/% corrected mortality rate			
		24 h	48 h	72 h	96 h
对照 control	0	0.00	0.00	0.00	0.00
I	0.034	0.93	2.89	4.58	4.81
II	0.060	0.34	2.23	6.40	7.20
III	0.107	2.46	5.45	13.10	16.16
IV	0.192	8.66	13.28	22.17	25.61
V	0.340	8.91	22.61	31.88	34.54
VI	0.600	19.70	49.57	72.64	77.01
VII	1.070	24.83	54.32	77.03	84.00

**表5 Cu<sup>2+</sup>对黄条鮰卵黄囊仔鱼毒性的 LC<sub>50</sub> 与 SC**  
**Tab. 5 The SC and LC<sub>50</sub> values of Cu<sup>2+</sup> for yolk sac larvae of *Seriola aureovittata***

暴露时间/h exposure time	半致死浓度 LC <sub>50</sub> /(mg/L) half lethal concentration	95%置信区间/ (mg/L) 95% confidence interval	安全浓度/ (mg/L) safe concentration
24	0.98	0.93~1.02	
48	0.60	0.57~0.63	0.034
72	0.38	0.36~0.41	
96	0.34	0.32~0.36	

## 2.2 Cu<sup>2+</sup>胁迫对胚胎孵化率和初孵仔鱼畸形率的影响

**2.2.1 Cu<sup>2+</sup>胁迫下胚胎孵化率和初孵仔鱼畸形率** 随Cu<sup>2+</sup>暴露浓度的升高, 高浓度组的胚胎孵化率显

著降低, 且初孵仔鱼畸形率显著升高( $P<0.01$ )。实验结束后, 0.340 mg/L、0.600 mg/L、1.070 mg/L浓度组胚胎全部死亡。其他 Cu<sup>2+</sup>浓度组中, 胚胎孵化率较低, 对照组胚胎孵化率在80%以上, 0.340 mg/L组胚胎孵化率在60%以下, 显著低于对照组 ( $P<0.05$ ), 0.06 mg/L、0.107 mg/L、0.192 mg/L组胚胎孵化率都低于50% ( $P<0.01$ ), 且初孵仔鱼畸形率较高达50%以上( $P<0.01$ )。0.034 mg/L组初孵仔鱼的畸形率相对较低(10.1%,  $P<0.05$ )(图1)。

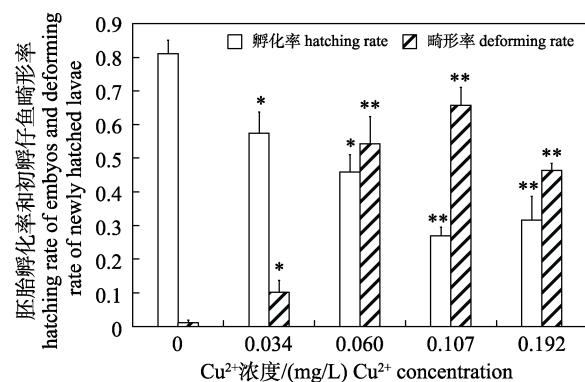


图1 不同浓度Cu<sup>2+</sup>处理对胚胎孵化率和初孵仔鱼畸形率的影响

\*表示不同处理组之间差异显著  
(\*P<0.05, \*\*P<0.01).

Fig. 1 Effects of copper exposure on hatching rate of embryos and deforming rate of newly hatched larvae  
\*indicate significant difference (\*P<0.05, \*\*P<0.01) in different treatments.

**2.2.2 Cu<sup>2+</sup>胁迫对胚胎发育和初孵仔鱼的致畸作用** Cu<sup>2+</sup>胁迫下胚胎出现卵黄萎缩、胚胎解体、模糊变形的现象(图2b, 2c)。大多数胚胎在一定浓度的Cu<sup>2+</sup>处理组中可以继续发育至完全或部分破膜而出, 但初孵仔鱼的活力差, 且在短时间内死亡。另外, 不同Cu<sup>2+</sup>暴露浓度组引发的初孵仔鱼畸形状态也不同, 主要包括脊椎弯曲成“V”形、“S”形、“L”形发育不完全身体器官畸形等(图2e)。

## 2.3 Cu<sup>2+</sup>胁迫下仔鱼的卵黄囊体积变化

随Cu<sup>2+</sup>浓度增加, 仔鱼卵黄囊吸收加速。其中1.070 mg/L、0.600 mg/L、0.340 mg/L浓度组1~5 d仔鱼卵黄囊体积明显减小( $P<0.05$ )。2~5 d仔鱼在浓度为0.192 mg/L时, 卵黄囊体积显著低于对照组( $P<0.05$ ), 0.192 mg/L浓度组1 d仔鱼卵黄囊

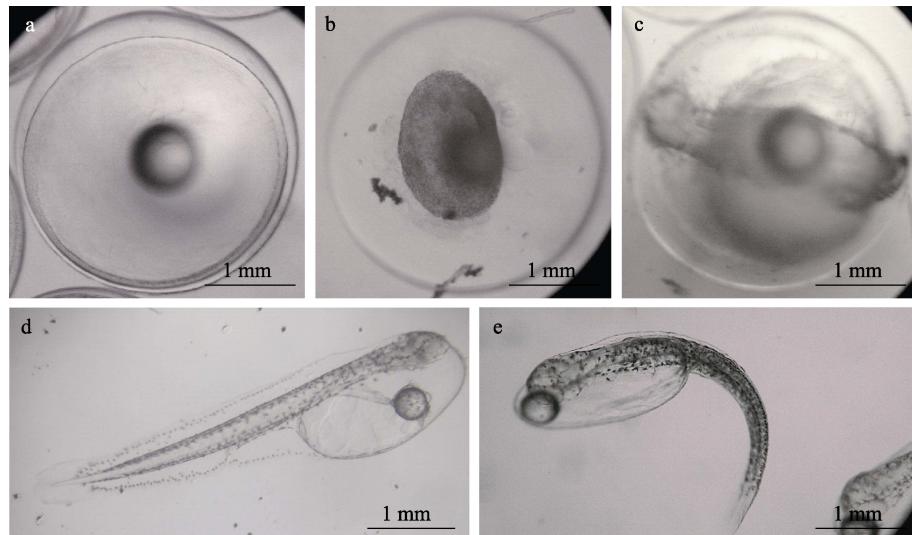


图 2 不同 Cu 处理组下黄条鮰胚胎和初孵仔鱼的形态异常

a. 正常胚胎(原肠早期), b-c. 畸形胚胎, d. 正常仔鱼, e. 畸形仔鱼.

Fig. 2 Morphological abnormalities of *Seriola aureovittata* embryos and larvae after exposing embryos to different copper concentration

a. Normal embryo (early gastrula stage), b-c. Abnormal embryos, d. Normal larvae, e. Abnormal larvae.

表 6 不同浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露下黄条鮰仔鱼卵黄囊体积的变化Tab. 6 Yolk sac volume of *Seriola aureovittata* larvae under different Cu<sup>2+</sup> concentrationsmm<sup>3</sup>

浓度/(mg/L) concentration	初孵仔鱼 newly hatched larvae	1 d 仔鱼 larvae of 1 <sup>st</sup> day	2 d 仔鱼 larvae of 2 <sup>nd</sup> day	3d 仔鱼 Larvae of 3 <sup>rd</sup> day	4d 仔鱼 Larvae of 4 <sup>th</sup> day	5d 仔鱼 Larvae of 5 <sup>th</sup> day
0	0.4859±0.0139 <sup>cde</sup>	0.2485±0.0062 <sup>d</sup>	0.0194±0.0017 <sup>c</sup>	0.0131±0.0004 <sup>d</sup>	0.0115±0.0008 <sup>e</sup>	0.0053±0.0002 <sup>d</sup>
0.034	0.4490±0.0051 <sup>abc</sup>	0.2244±0.0057 <sup>d</sup>	0.0150±0.0017 <sup>b</sup>	0.0080±0.0006 <sup>bc</sup>	0.0067±0.0005 <sup>c</sup>	0.0054±0.0000 <sup>d</sup>
0.060	0.4267±0.0072 <sup>ab</sup>	0.2391±0.0090 <sup>d</sup>	0.0189±0.0021 <sup>bc</sup>	0.0083±0.0007 <sup>c</sup>	0.0079±0.0003 <sup>d</sup>	0.0048±0.0000 <sup>d</sup>
0.107	0.4292±0.0083 <sup>a</sup>	0.2332±0.0094 <sup>d</sup>	0.0103±0.0006 <sup>a</sup>	0.0097±0.0006 <sup>c</sup>	0.0058±0.0004 <sup>bc</sup>	0.0048±0.0000 <sup>d</sup>
0.192	0.4642±0.0218 <sup>bcd</sup>	0.2332±0.0057 <sup>d</sup>	0.0113±0.0014 <sup>a</sup>	0.0082±0.0006 <sup>bc</sup>	0.0062±0.0002 <sup>bc</sup>	0.0039±0.0003 <sup>bc</sup>
0.340	0.5042±0.0108 <sup>de</sup>	0.1510±0.0060 <sup>c</sup>	0.0072±0.0006 <sup>a</sup>	0.0061±0.0004 <sup>a</sup>	0.0050±0.0002 <sup>b</sup>	0.0046±0.0000 <sup>cd</sup>
0.600	0.5097±0.0128 <sup>c</sup>	0.0794±0.0042 <sup>a</sup>	0.0067±0.0003 <sup>a</sup>	0.0064±0.0071 <sup>a</sup>	0.0058±0.0002 <sup>bc</sup>	0.0038±0.0004 <sup>bc</sup>
1.070	0.4908±0.0145 <sup>cde</sup>	0.1147±0.0160 <sup>b</sup>	0.0075±0.0009 <sup>a</sup>	0.0067±0.0003 <sup>ab</sup>	0.0037±0.0003 <sup>a</sup>	0.0028±0.0003 <sup>a</sup>

注: 不同小写字母表示不同处理组之间差异显著( $P<0.05$ ).Note: Different lowercase superscripts indicate significant difference ( $P<0.05$ ) in different treatments.

体积小于对照组( $P>0.05$ )。低浓度 Cu<sup>2+</sup> 处理组(0.034 mg/L、0.060 mg/L、0.107 mg/L)仔鱼的卵黄囊被吸收速度都高于对照组(表 6)。

#### 2.4 Cu<sup>2+</sup> 暴露下黄条鮰仔鱼的转录组分析

**2.4.1 转录组数据质量分析** 铜暴露后初孵仔鱼和 5 d 仔鱼转录组分析分别获得 66.39 Gb 和 64.33 Gb Clean reads, 各样品 Clean reads 均达到 6.3 Gb 以上,  $Q_{30}>93.48\%$ , 表明本次测序数据质量较高。将 Clean reads 与黄条鮰参考基因组比对,

结果显示有 92.34%~93.76% reads 成功映射到参考基因组, 表明参考基因组选择合适且质量较高, 满足后续分析要求(表 7)。

利用 BLASTX 软件检索 NR、Swiss-Prot、Pfam、EggNOG、GO 和 KEGG 等公共数据库, 对组装的基因进行功能注释。共注释基因 20944 个, 其中 GO、KEGG、COG、NR、Swiss-Prot、Pfam 数据库对基因的注释占比分别为 59.16%、71.22%、88.15%、92.20%、85.27% 和 84.15%。

表 7 测序数据质量和序列比对情况  
Tab.7 Sequencing data quality and sequence alignment

样本 sample	质控后序列数/M clean reads	质控后碱基数/G clean bases	错误率/% error rate	Q20 值/% Q20	Q30 值/% Q30	GC 碱基含量/% GC content	n=3, $\bar{x} \pm S.D.$
							总序列定位/% total mapped
D0_CK	45.92±1.61	6.22±0.22	0.0252±0.00036	97.93±0.13	93.94±0.37	50.94±0.11	95.33±0.25
D0_LC	46.95±4.04	6.71±0.56	0.0246±0.00003	98.15±0.01	94.56±0.03	51.12±0.05	95.72±0.07
D0_HC	50.84±2.06	7.27±0.29	0.0246±0.00009	98.14±0.03	94.52±0.09	51.04±0.20	95.96±0.13
D5_CK	46.07±4.19	6.64±0.61	0.0254±0.00007	97.8±0.04	93.78±0.09	48.66±0.14	93.02±0.12
D5_LC	46.45±2.65	6.71±0.37	0.0254±0.00028	97.82±0.11	93.85±0.26	48.97±0.24	93.09±0.20
D5_HC	45.91±2.34	6.62±0.31	0.0250±0.00013	97.94±0.06	94.17±0.14	49.13±0.30	93.29±0.40

注: D0: 初孵仔鱼, D5: 5d 仔鱼; CK: 对照组, LC: 低浓度组, HC: 高浓度组。

Note: D0: newly hatched larvae, D5: larvae of 5<sup>th</sup> day. CK: control check, LC: low concentration, HC: high concentration..

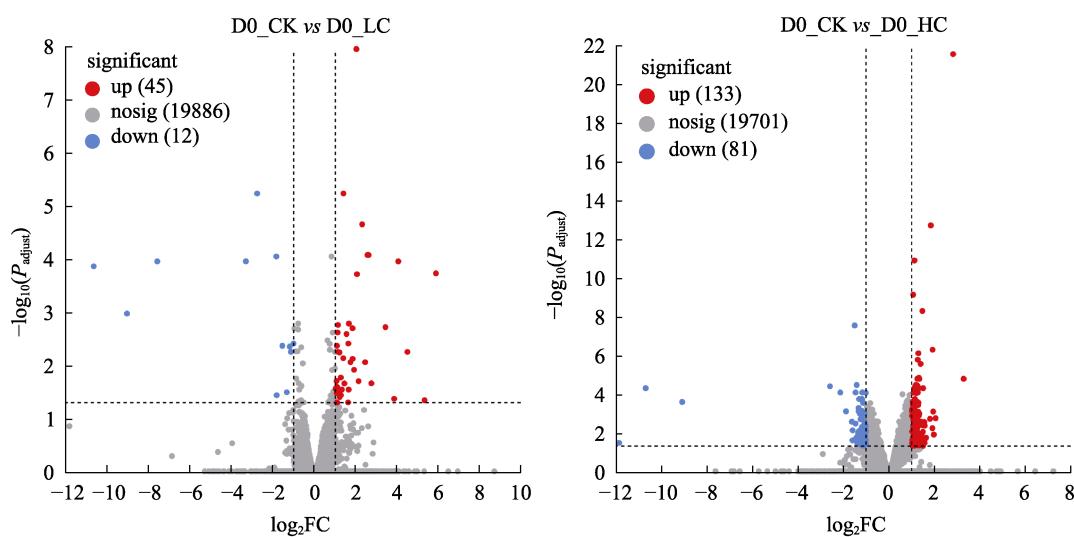
#### 2.4.2 差异表达基因分析 黄条鮰初孵仔鱼和

5 d 仔鱼对照组分别与其对应的低浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露组和高浓度组进行比较分析, 发现在高浓度 Cu<sup>2+</sup>胁迫下比低浓度 Cu<sup>2+</sup>胁迫产生更多的 DEGs。与对照组相比, 初孵仔鱼在低浓度组的 DEGs 共计 57 个, 其中上调 45 个, 下调 12 个(图 3a), 高浓度组共发现 214 DEGs, 其中上调 133 个, 下调 81 个(图 3b); 5 d 仔鱼在低浓度组发现 160 个 DEGs, 其中上调 143 个, 下调 17 个(图 3c), 高浓度组发现 309 个 DEGs, 其中上调 149 个, 下调 160 个(图 3d)。

#### 2.4.3 GO 富集与 KEGG 通路分析 对 Cu<sup>2+</sup>胁迫下初孵仔鱼和 5 d 仔鱼 DEGs 做 GO 功能富集分析表明, DEGs 富集到 3 大功能类别中, 主要包括生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC) 和分子功能(molecular function,

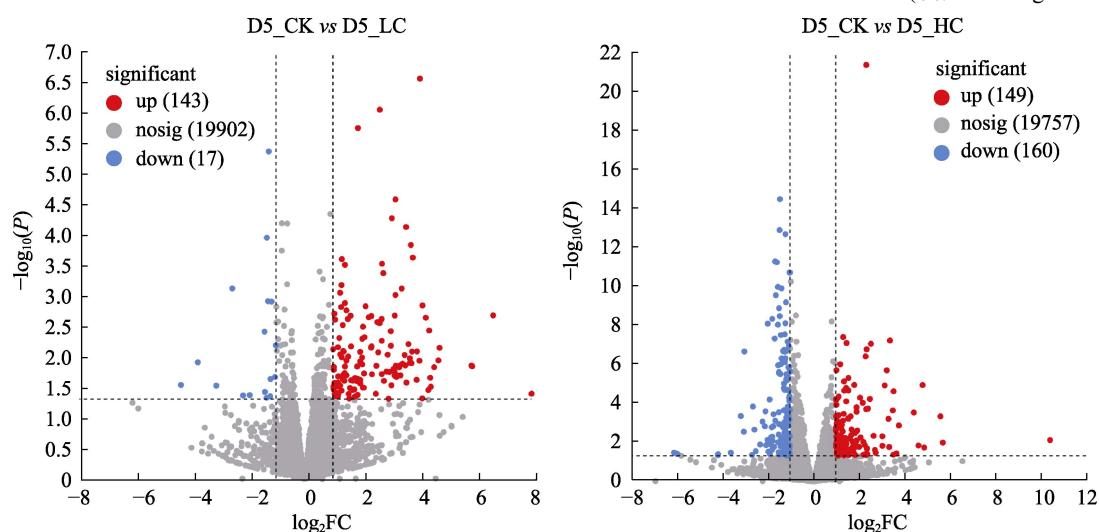
MF)(图 4)。

从 KEGG 富集分析中选取富集最显著的 20 条信号途径(pathway), 发现低浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露组 DEGs 主要集中在流体剪切应力与动脉粥样硬化(fluid shear stress and atherosclerosis)、雌性激素信号传导途径(estrogen signaling pathway)等信号通路上(图 5a)。高浓度组 DEGs 主要在核糖体(ribosome)、氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)、朊病毒病(prion disease)等疾病相关途径中富集(图 5b)。5 d 仔鱼在低浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露组 DEGs 主要在胰腺分泌、蛋白质的消化和吸收、脂肪的消化和吸收等途径富集(图 5c), 而高浓度组 DEGs 主要富集在细胞周期(cell cycle)、DNA 复制(DNA replication)、光信号转导(phototransduction)等信号通路上(图 5d)。



(待续 to be continued)

(续图3 Fig. 3 continued)

图3 黄条鲷仔鱼不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  暴露实验组差异表达基因火山图

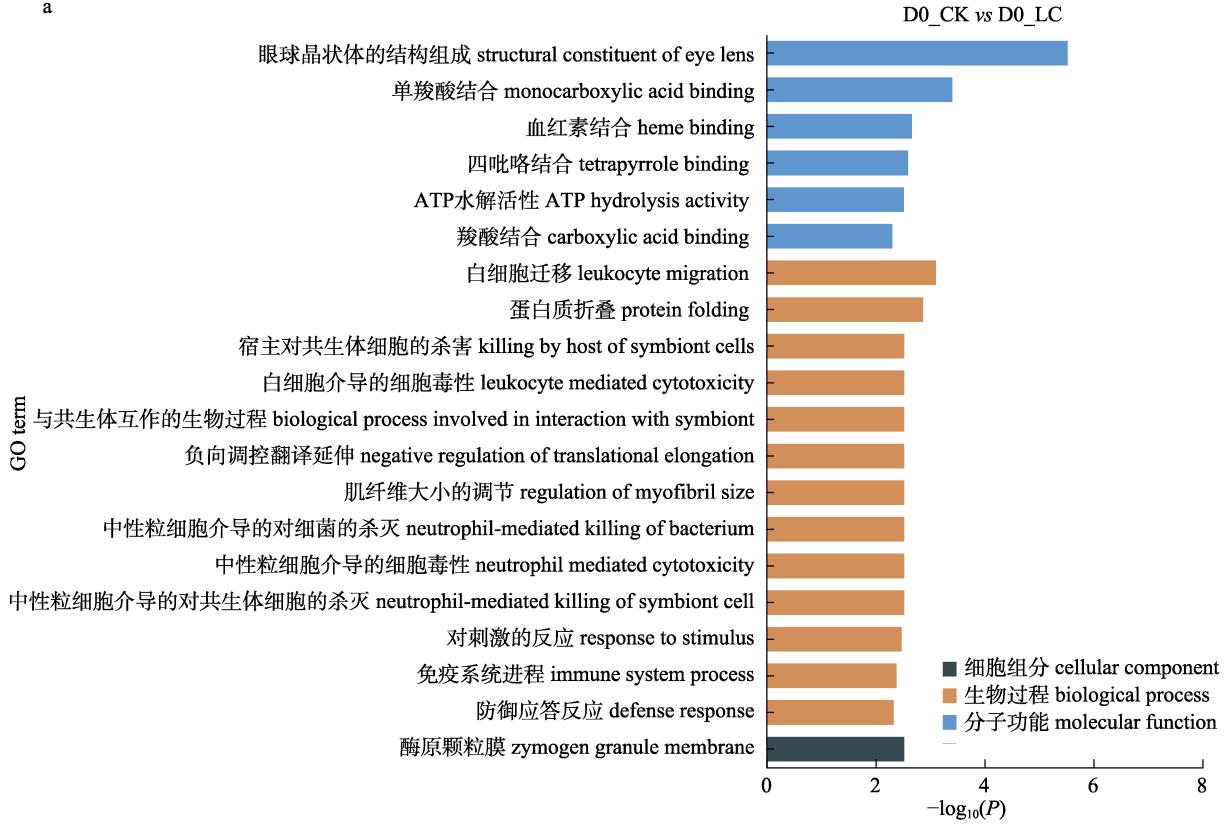
D0: 初孵仔鱼, D5: 5 d 仔鱼; CK: 对照组, LC: 低浓度组, HC: 高浓度组。 $\log_2\text{FC}$  代表基因在两个样本间表达差异倍数;  $-\log_{10}(P)$  代表基因表达量变化的统计学显著程度。图中每个点代表一个特定的基因, 红色点表示显著上调的 DEGs, 蓝色点表示显著下调的 DEGs, 灰色点为非显著差异基因。

Fig. 3 Volcano map of differential expressed genes for *Seriola aureovittata* larvae under  $\text{Cu}^{2+}$  exposure

D0: Newly hatched larvae, D5: Larvae of 5<sup>th</sup> day; CK: control check, LC: low concentration, HC: high concentration.

The  $\log_2\text{FC}$  represents the fold of gene expression difference between two samples, The  $-\log_{10}(P)$  represents the statistical significance of gene expression change. Each dot represents one gene, the red dots represent significantly upregulated DEGs, the blue dots represent significantly downregulated DEGs, and the gray dots represent insignificantly DEGs.

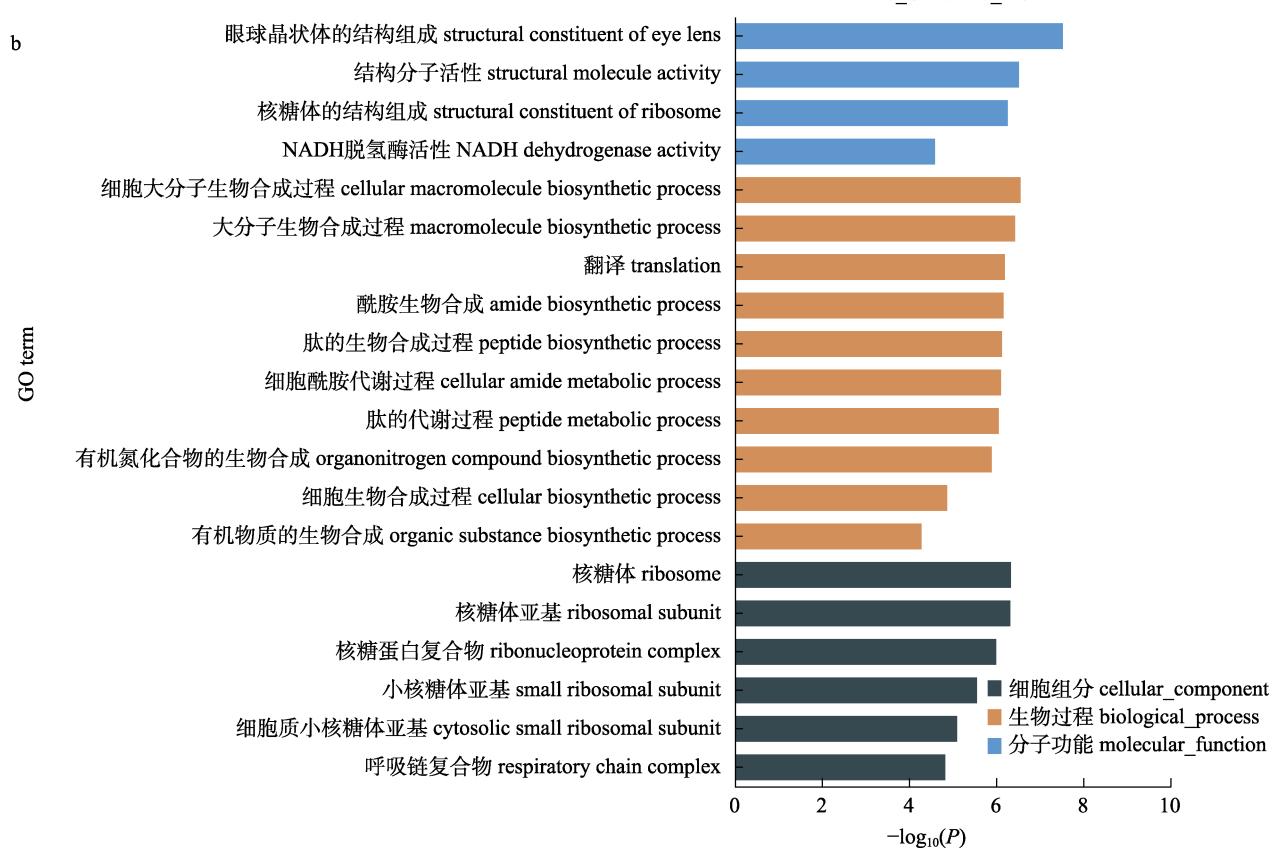
a



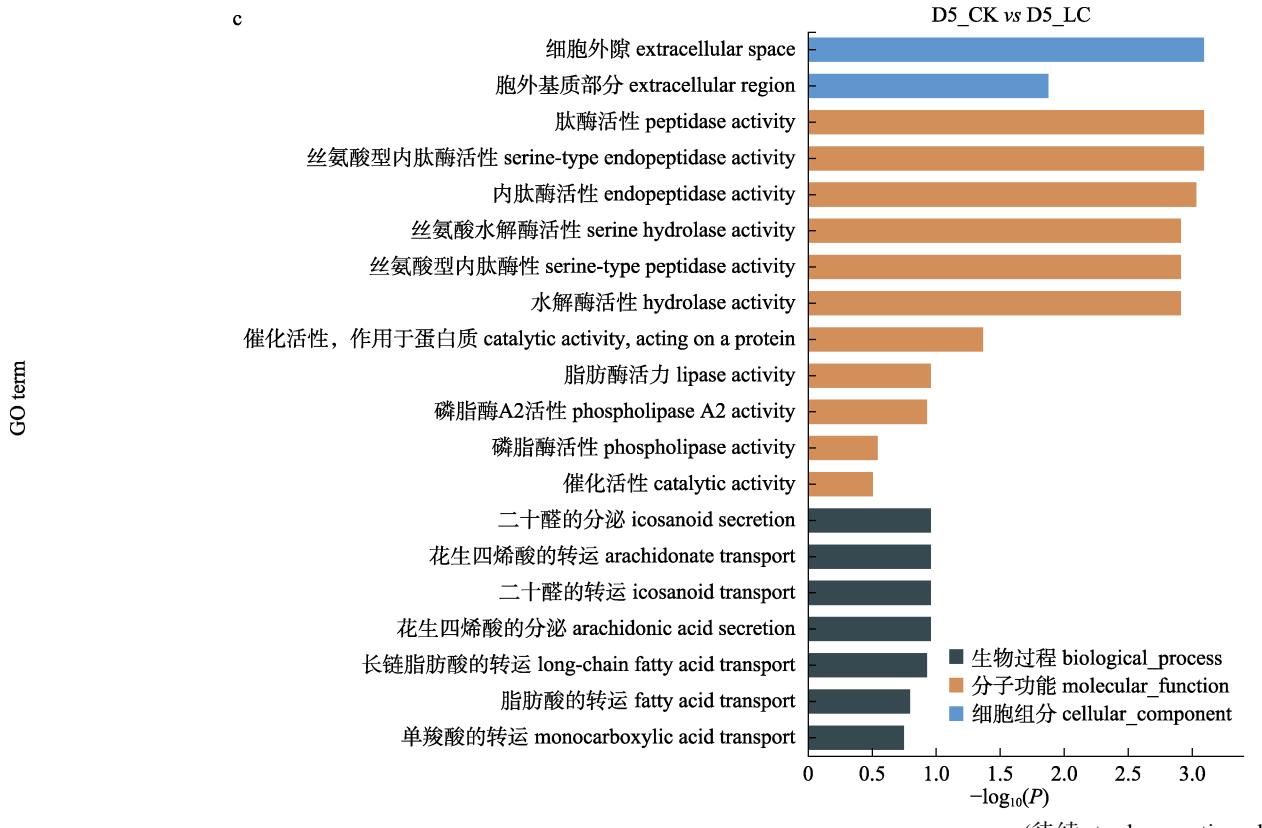
(待续 to be continued)

(续图 4 Fig. 4 continued)

D0\_CK vs D0\_HC



c



(待续 to be continued)

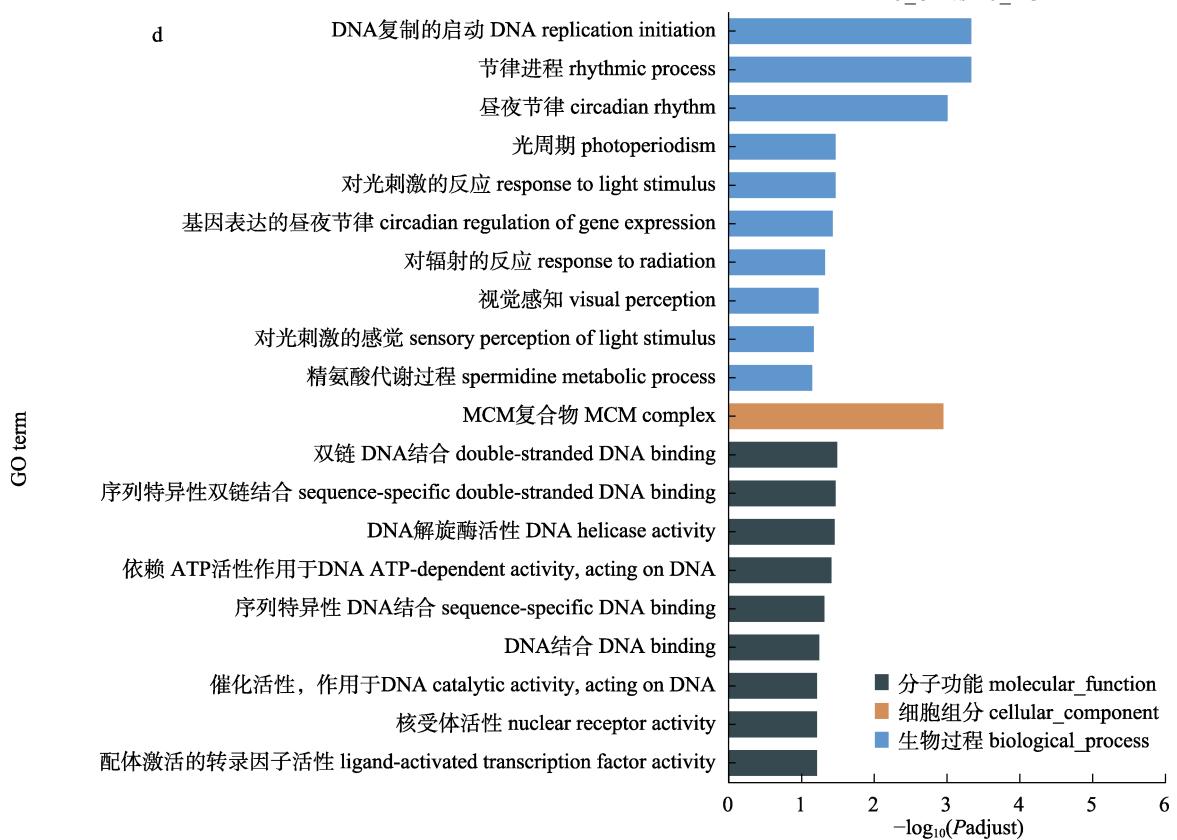
(续图 4 Fig. 4 continued)  
D5\_CK vs D5\_HC

图 4 Cu 胁迫下黄条鲷初孵仔鱼(a-b)和 5 d 仔鱼(c-d)差异表达基因 GO 富集分析柱状图

纵坐标表示 GO term, 横坐标表示富集的显著性水平,  $-\log_{10}$  值越大, 该 GO term 越显著富集.

3 个颜色表示 3 大分类, 分别是生物过程(BP), 细胞组分(CC)和分子功能(MF).

Fig. 4 GO enrichment results of differentially expressed genes of *Seriola aureovittata* newly hatched larvae (a-b) and larvae of 5-day (c-d) under copper exposure stress

The vertical coordinate indicates the GO term and the horizontal coordinate indicates the significance level of enrichment, the larger the value of  $-\log_{10}$ , the more significantly enriched the GO term is. The three colors indicate the three major classifications, which are biological process (BP), cellular component (CC) and molecular function (MF).

#### 2.4.4 信号通路分析

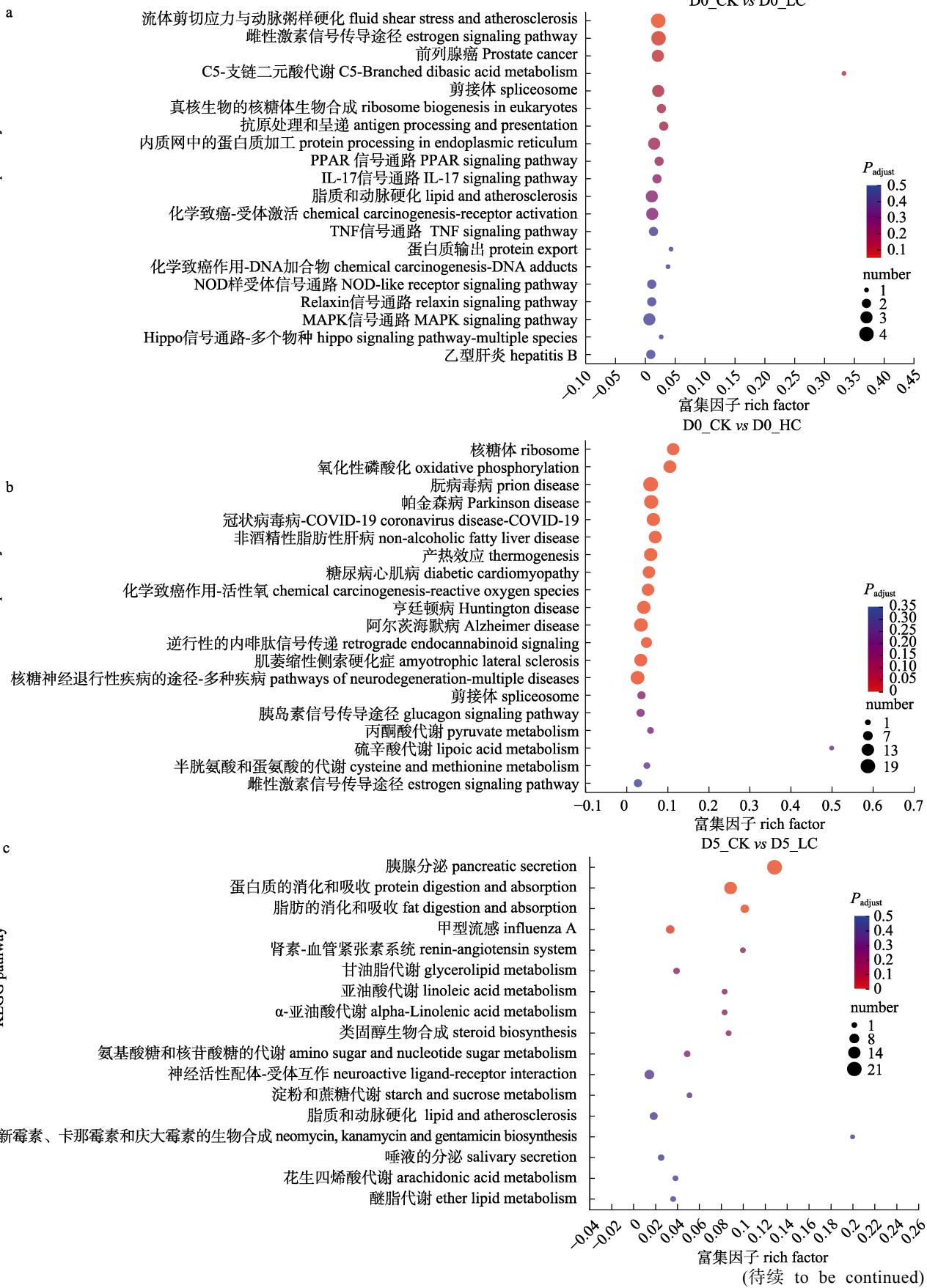
(1)氧化磷酸化通路。氧化磷酸化在线粒体中发生, 主要参与细胞生物氧化过程中三磷酸腺苷(ATP)的生成。高浓度 Cu 暴露组初孵仔鱼 DEGs 主要富集在氧化磷酸化信号通路上(图 6), 其中复合体 I (CXI)中 *Ndufs6*、*Ndufa4*、*Ndufa11*、*Ndufb1*、*Ndufb2*、*Ndufb3*、*Ndufb4*、*Ndufb7* 和 *Ndufc2* 基因, 复合体 III (CXIII)中 *QCR9* 基因, 复合体 IV (CXIV)中 *COX6B*、*COX7A*、*COX8* 基因, 以及复合体 V (CXV)中 *ATPeFG* (g)基因均为显著上调。

(2)细胞周期通路。细胞分裂的过程是具有周期性的, 在细胞周期的不同阶段都会启动相应的

信号使细胞进行有序性的增殖。初孵仔鱼急性毒性实验中, 高浓度 Cu 暴露组 DEGs 主要富集在细胞周期信号通路上(图 7)。其中 *KIP1*、*SMC1* 基因显著上调, *MYC*、*E2F1*、起始识别复合物(ORC)中 *ORC1*、MCM 复合体中 *MCM2*、*MCM3*、*MCM4*、*MCM5*、*MCM6* 基因显著下调。

(3)光信号转导通路。光信号转导是外界光能转化为电信号的过程。高浓度 Cu 暴露组 5 d 仔鱼 DEGs 在光信号转导通路中的分布情况, 其中 *CNGB1* (*CNG*)基因显著上调, *RCVRN* (*Rec*)、*GRK1\_7* (*RK*)、*GUCA1* (*GCAP*)基因显著下调(图 8)。

KEGG pathway



(待续 to be continued)

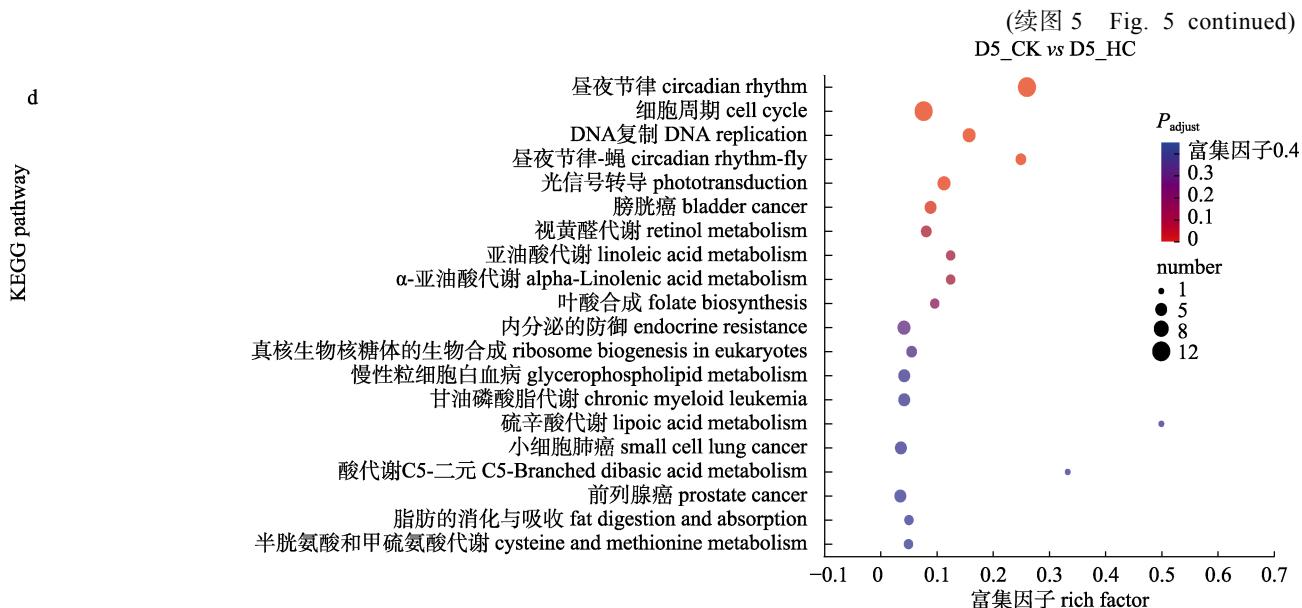


图 5 Cu 胁迫下黄条鮰初孵仔鱼(a-b)和 5d 仔鱼(c-d)差异表达基因 KEGG 富集分析散点图

P-adjust 大小由点的颜色表示. P-adjust 越小, 颜色越接近红色. 每个途径中包含的差异基因数量由点的大小表示.

Fig. 5 KEGG enrichment results of differentially expressed genes of of *S. aureovittata* newly hatched larvae (a-b) and larvae of 5-day (c-d) under copper exposure stress

The size of P-adjust is represented by the color of dots. The smaller the P-adjust, the closer the color is to red.

The number of differential genes contained in each pathway is represented by the size of dots.

**2.4.5 转录组数据的 qPCR 验证** qPCR 检测转录组分析结果中 5 个表达差异显著的基因, 结果表明其表达趋势与转录组分析结果一致, 说明 RNA-Seq 结果的可靠性(图 9)。

### 3 讨论

#### 3.1 Cu<sup>2+</sup>暴露对黄条鮰胚胎发育的急性毒性

已有研究表明, 重金属暴露可导致鱼类胚胎在囊胚期等早期阶段发生大量死亡<sup>[22]</sup>, Cao 等<sup>[23]</sup>报道 Cu<sup>2+</sup>胁迫下真鲷(*Pagrus major*)胚胎在发育后期出现大量死亡, 这可能由于胚胎中 Cu<sup>2+</sup>的生物累积增加, 卵膜的逐渐崩解造成的。本研究发现, 在 Cu<sup>2+</sup>胁迫下, 黄条鮰胚胎主要在神经胚时期(胚体形成)出现大量死亡, 表明黄条鮰的胚体形成期是 Cu<sup>2+</sup>暴露敏感的发育阶段。先前研究表明, 重金属经卵膜渗入卵内影响鱼类胚胎正常发育, 甚至造成胚胎死亡, 因而使孵化率降低<sup>[24]</sup>。Sfakianakis 等<sup>[25]</sup>报道, Cu<sup>2+</sup>等重金属在器官发生期会影响胚胎发育并导致器官畸形, 从而导致初孵仔鱼畸形率增高。本研究发现, 胚胎孵化率随 Cu<sup>2+</sup>暴露浓度的升高显著降低, 初孵仔鱼畸形率

显著升高, 并且高浓度 Cu<sup>2+</sup>胁迫下, 孵化率和畸形率与对照组相比差异极显著, 这与黄伟<sup>[26]</sup>对褐牙鲆早期胚胎以及 Barjhoux 等<sup>[8]</sup>对青鳉(*Oryzias latipes*)初孵仔鱼的研究结果一致, 表明 Cu<sup>2+</sup>污染会造成胚胎的孵化率降低甚至死亡, 从而可能会导致其种群的生态平衡紊乱甚至是种群灭绝。

LC<sub>50</sub> 作为衡量某种药物对特定物种毒性大小的重要参数, 主要以 96h-LC<sub>50</sub> 作为标准<sup>[27]</sup>。陈玉翠等<sup>[28]</sup>报道 Cu<sup>2+</sup>对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎的 96h-LC<sub>50</sub> 为 0.08 mg/L, Wang 等<sup>[29]</sup>研究发现, Cu<sup>2+</sup>对黑点青鳉(*Oryzias melastigma*)胚胎的 LC<sub>50</sub> 为 0.138 mg/L, 而仔鱼的 LC<sub>50</sub> 为 10.15 mg/L, 这说明不仅种的差异性会导致 Cu<sup>2+</sup>对鱼类的急性毒性效应不同, 鱼类的不同生长发育阶段同样会造成对 Cu<sup>2+</sup>暴露的敏感性差异。有学者认为胚胎卵膜可阻止 Cu<sup>2+</sup>进入从而起到一定的保护作用, 而初孵仔鱼是直接暴露于污染物之中, 因此鱼类的仔鱼阶段比胚胎阶段对 Cu<sup>2+</sup>暴露更敏感<sup>[23,29-30]</sup>。而其他研究者发现胚胎阶段的卵膜更容易被污染物渗透, 从而增加了处于发育中的胚胎对污染物的敏感性<sup>[31-32]</sup>。

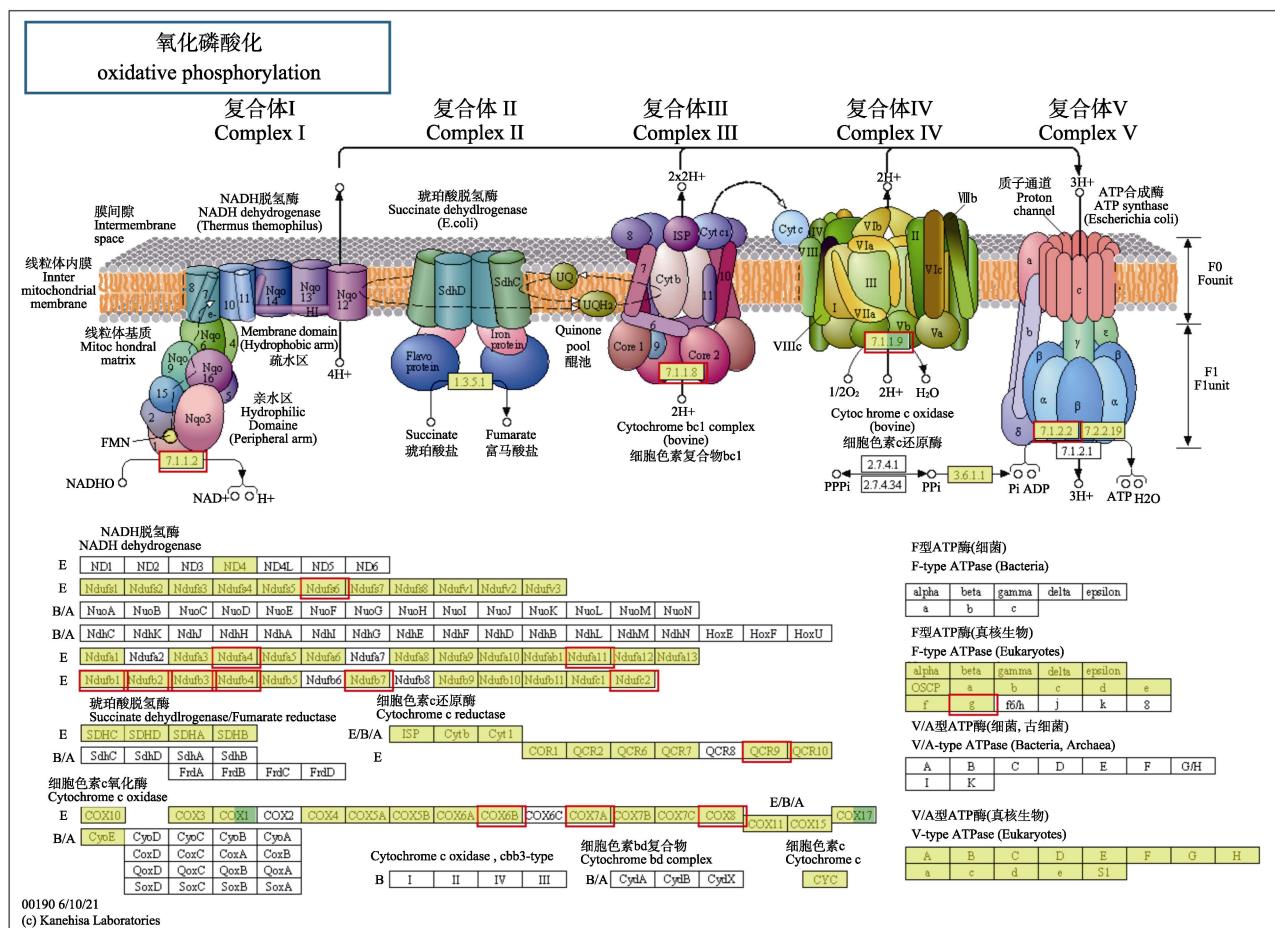


图 6 氧化磷酸化通路图

红色边框表示该基因为上调基因，蓝色边框表示该基因为下调基因，黄色背景色表示已知基因/已知转录本，黄色+绿色背景色表示已知+新基因/转录本。

Fig. 6 Oxidative phosphorylation pathway

Red border indicates that the gene is up-regulated, blue border indicates that the gene is down-regulated, yellow background color indicates known genes/known transcripts, yellow + green background color indicates known + new genes/transcripts.

### 3.2 Cu<sup>2+</sup>暴露对黄条鮰仔鱼发育的急性毒性

本研究结果显示, Cu<sup>2+</sup>对黄条鮰仔鱼的48h-LC<sub>50</sub>是0.60 mg/L, 是胚胎48h-LC<sub>50</sub>的7倍以上(0.08 mg/L)。这与曹亮<sup>[33]</sup>对褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的研究结果类似, 说明黄条鮰在胚胎阶段比仔鱼阶段对Cu<sup>2+</sup>更为敏感。本研究中Cu<sup>2+</sup>对黄条鮰仔鱼96h-LC<sub>50</sub>为0.34 mg/L, 张志杰等<sup>[34]</sup>认为污染物对生物的96h-LC<sub>50</sub>在0.1~1.0 mg/L区间内为高毒浓度, 因此在黄条鮰早期发育阶段应严格控制硫酸铜的用量并重视培育水体中Cu<sup>2+</sup>含量的监测, 保障铜制剂的安全和科学使用。

本实验室先前研究表明, 黄条鮰仔鱼从孵化后5 d为卵黄囊仔鱼期, 主要依靠卵黄囊的内源性营养生存, 卵黄囊的体积可体现除仔鱼对内源性营养物质的吸收利用速率<sup>[12]</sup>。有研究表明重金属暴露会抑制卵黄囊吸收过程<sup>[34-35]</sup>, 而本研究发现Cu<sup>2+</sup>暴露使黄条鮰仔鱼卵黄囊吸收加速, 这与黑点青鳉<sup>[30]</sup>及圆腹雅罗鱼(*Leuciscus idus*)<sup>[36]</sup>的研究结果相似, 指出Cu<sup>2+</sup>胁迫下仔鱼对卵黄囊的高利用率主要与激活金属螯合、储存和排泄的代谢机制有关。因此, 黄条鮰卵黄囊时期仔鱼可能通过提高自身代谢来抵抗高浓度Cu<sup>2+</sup>的损害。

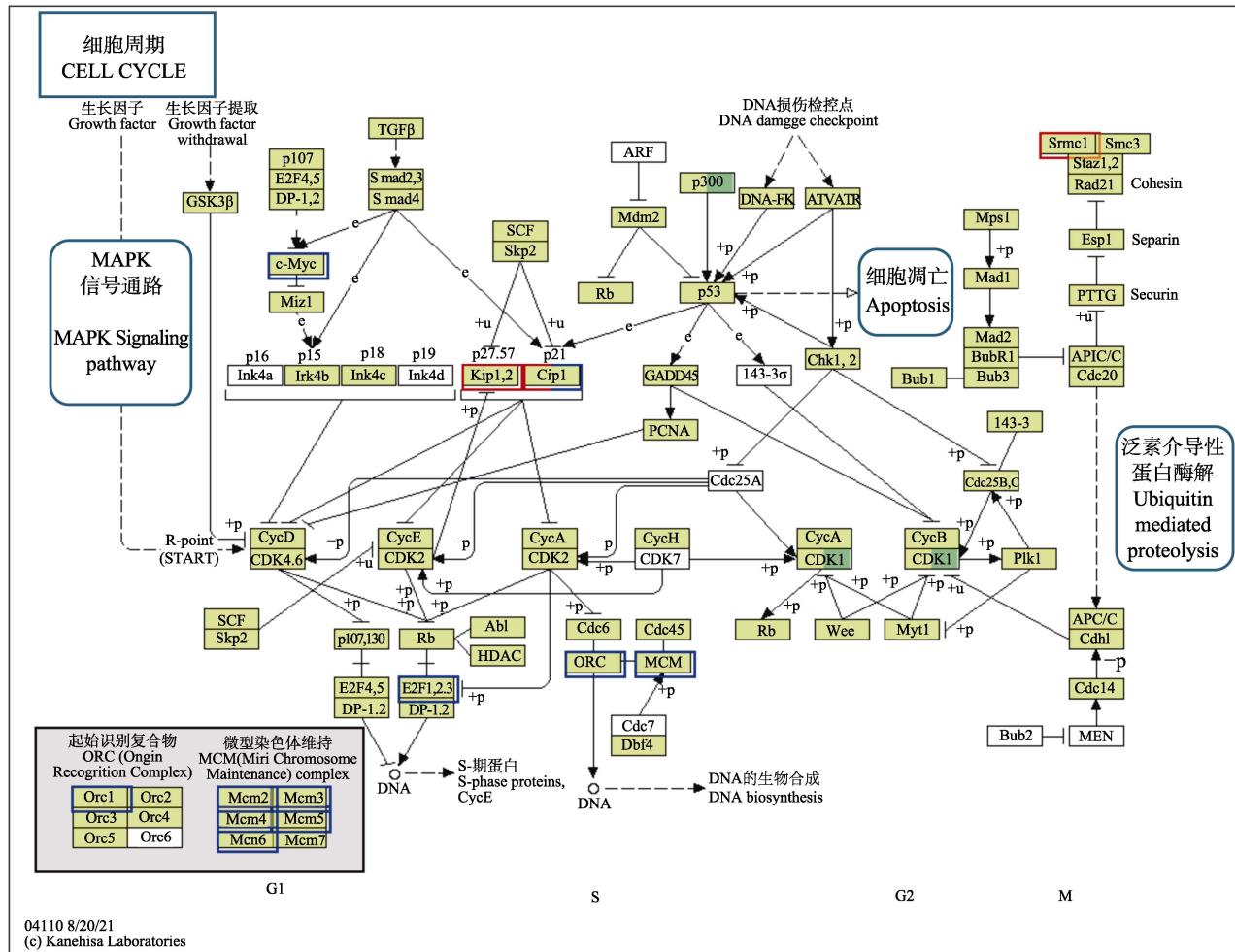


图 7 细胞周期通路图

红色边框表示该基因为上调基因, 蓝色边框表示该基因为下调基因, 黄色背景色表示已知基因/已知转录本, 黄色+绿色背景色表示已知+新基因/转录本。

Fig. 7 Cell cycle pathway

Red border indicates that the gene is up-regulated, blue border indicates that the gene is down-regulated, yellow background color indicates known genes/known transcripts, yellow + green background color indicates known + new genes/transcripts.

### 3.3 Cu<sup>2+</sup>胁迫下黄条鮰卵黄囊仔鱼的转录组分析

本研究分别选取了低浓度以及高浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露组与对照组比较并分析差异基因的表达情况。其中, 低浓度 Cu<sup>2+</sup>胁迫下初孵仔鱼 GO 功能分析发现, DEGs 主要在白细胞迁移和宿主对共生体细胞的杀灭功能显著富集, 表明低浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露可诱导黄条鮰胚胎免疫系统增强。而在高浓度组中 KEGG 富集分析发现, DEGs 主要在与疾病的信号通路以及氧化磷酸化途径中显著富集。先前研究表明, 线粒体电子传递链(electron transport chain, ETC)通过氧化磷酸化生成细胞三磷酸腺苷(ATP)和活性氧(ROS), 过量 ROS 产生则会造成氧

化应激<sup>[37]</sup>。本研究发现, 高浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露下氧化磷酸化信号通路中编码 CXI (*Ndufs6*、*Ndufa4*、*Ndufa11*、*Ndufb1*、*Ndufb2*、*Ndufb3*、*Ndufb4*、*Ndufb7* 和 *Ndufc2* 基因), CXIII (*QCR9* 基因) 和 CXIV (*COX6B*、*COX7A*、*COX8* 基因) 的相关基因上调表达, 而 ETC 大量生成 ROS 主要是由于电子从 CxI、CxII 和 CxIII 中过早释放, 从而介导单电子氧化还原为超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 因此本研究结果表明, 高浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露导致黄条鮰早期胚胎发育过程出现较强的氧化应激。Kong 等<sup>[38]</sup>研究发现, 鲫 (*Carassius auratus*) 胚胎在低浓度 Cu<sup>2+</sup>暴露下抗氧化系统增强从而除去多余的 ROS, 而超出阈值的

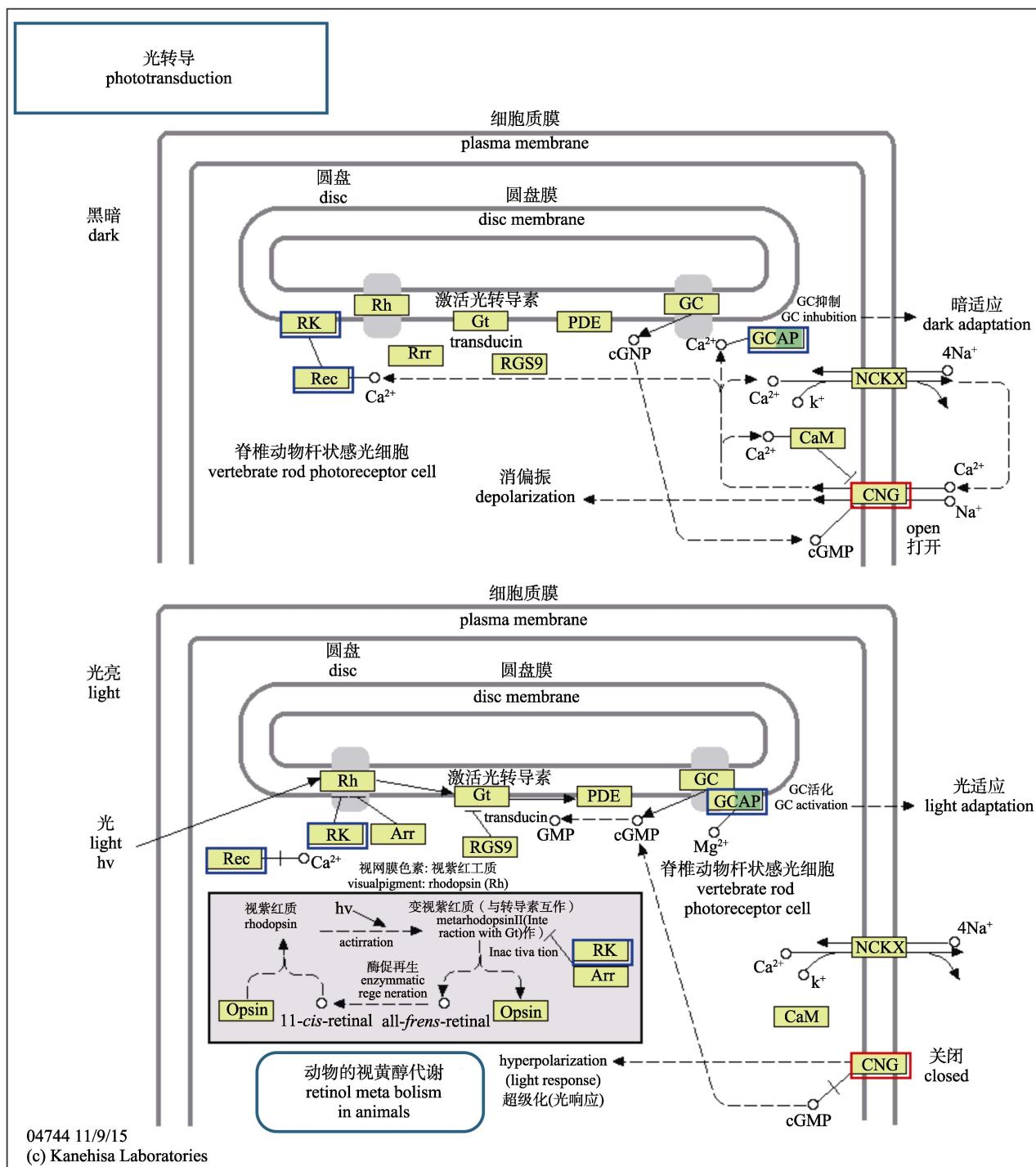


图 8 光传导通路图

红色边框表示该基因为上调基因，蓝色边框表示该基因为下调基因，黄色背景色表示已知基因/已知转录本，黄色+绿色背景色表示已知+新基因/转录本。

Fig. 8 Phototransduction pathway

Red border indicates that the gene is up-regulated, blue border indicates that the gene is down-regulated, yellow background color indicates known genes/known transcripts, yellow + green background color indicates known + new genes/transcripts.

Cu 暴露会导致早期胚胎出现氧化应激，说明早期胚胎中免疫相关通路参与了低浓度 Cu<sup>2+</sup> 胁迫下的

适应性调节过程，而在高浓度 Cu<sup>2+</sup> 胁迫下，氧化磷酸化通路参与其适应性调节过程。

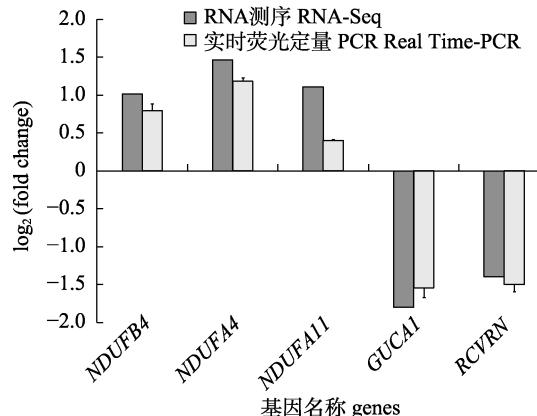


图 9 RNA-Seq 与 Real Time-PCR 差异倍数的比较分析  
Fig. 9 Comparative analysis of DEGs between RNA-Seq and real time-PCR analysis

KEGG 分析发现, 高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  暴露下 5 d 仔鱼 DEGs 主要在细胞周期、DNA 复制和光信号转导通路上显著富集。众所周知, 细胞周期信号通路中, MCM 复合体对真核生物的 DNA 复制至关重要<sup>[39]</sup>。MCM2-MCM7 为 MCM 复合物的核心, 由起始识别复合物(origin recognition complex, ORC)等在复制起始处加载, 进而形成复制前复合物<sup>[40]</sup>。本研究发现, 细胞周期信号通路中, 高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  暴露下导致编码 MCM 复合体(*MCM2*、*MCM3*、*MCM4*、*MCM5*、*MCM6*)、编码 OCR (*OCRI*)相关基因以及 *E2F1* 基因的下调, 从而抑制了 DNA 复制起始。*MCMs* 基因与启动子区的细胞转录因子 E2F 结构域结合是其转录所必须的步骤<sup>[41]</sup>, 而 *E2F1* 作为编码 E2F 转录因子的基因, 其下调进一步影响 *MCMs* 基因转录, 从而抑制 DNA 的生成。这与本研究中 GO 功能分析在 MCM 复合物、双链 DNA 结合以及 DNA 复制的启动功能显著富集结果一致。魏亚丽<sup>[42]</sup>研究表明, 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 在高温胁迫下 DNA 损伤造成细胞周期阻滞从而抑制 DNA 生成。殷健<sup>[43]</sup>研究表明,  $\text{Cu}^{2+}$  暴露胁迫促进斑马鱼 (*Danio rerio*) 细胞凋亡和细胞周期阻滞, 导致免疫细胞被破坏, 从而造成免疫抑制。因此本研究认为, 高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  暴露下可能造成了黄条鰤仔鱼 DNA 损伤, 抑制 DNA 生成以及破坏免疫系统, 影响仔鱼的生长发育和存活。

黄条鰤 5 d 仔鱼 DEGs 同样在光信号转导通路

上显著富集。高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫下, 光信号转导通路中, *CNGBI* (*CNG*) 基因显著上调, *RCVRN* (*Rec*)、*GRK1\_7* (*RK*)、*GUCA1* (*GCAP*) 基因显著下调。朱圣庚等<sup>[44]</sup>认为, 自然界中许多最强毒素作用于离子通道从而对神经信号转导产生十分显著的效应。黑暗下  $\text{Cu}^{2+}$  作用与光信号转导通路中环核苷酸门控离子通道(Cyclic nucleotide-gated channel, CNG 通道), 诱导 *CNGBI* 基因上调, 导致  $\text{Ca}^{2+}$  的大量增加, *RCVRN* (*Rec*)、*GRK1\_7* (*RK*) 基因下调, 从而影响仔鱼暗适应能力。而光照下, *GRK1\_7* (*RK*) 下调, 视紫红质(Rhodopsin, Rh)激活被抑制, cGMP 进一步推动 CNG 通道的异常打开, 导致细胞不能正常超级化, 从而影响仔鱼光信号的转导<sup>[45]</sup>。Zhang<sup>[46]</sup>表明,  $\text{Cu}^{2+}$  暴露导致斑马鱼仔鱼光信号转导通路相关基因下调, 导致仔鱼出现头部和眼睛发育不良等现象, 因此推测高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  暴露可能影响了黄条鰤仔鱼视觉器官的发育和感光能力。

#### 参考文献:

- [1] Fu Z Y, Feng C L, Zhao X L, et al. Ecological risks and management countermeasures of copper and zinc in water environment of China[J]. Environmental Engineering, 2019, 37(11): 70-74. [符志友, 冯承莲, 赵晓丽, 等. 我国流域水环境中铜、锌的生态风险及管理对策[J]. 环境工程, 2019, 37(11): 70-74.]
- [2] Santos S W, Cachot J, Gourves P Y, et al. Sub-lethal effects of waterborne copper in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 170: 778-788.
- [3] Chen D S, Chan K M. Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 104(3-4): 270-277.
- [4] Li Z C, Jiang B, Zhong Z H, et al. Treatment of amyloidiniosis in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) by copper sulfate[J]. South China Fisheries Science, 2021, 17(3): 108-114. [李志成, 江飚, 钟志鸿, 等. 硫酸铜治疗卵形鲳鲹淀粉卵泡虫病的研究[J]. 南方水产科学, 2021, 17(3): 108-114.]
- [5] Zeng L, Wang Y H, Song W, et al. Effects of Cu acclimation on oxidative damage in the large yellow croaker under cold stress based on transcriptome analysis[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(10): 1425-1436. [曾霖, 王永红, 宋伟, 等. 基于转录组解析铜驯化对低温胁迫下大黄鱼氧化损伤的影响[J]. 中国水产科学, 2022, 29(10): 1425-1436.]

- 1436.]
- [6] Yan Z Y, Deng Z D, Zhang J, et al. Environmental copper on growth performance, lipid metabolism, hepatopancreas and spleen histology of gift *Tilapia(Oreochromis niloticus)*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(11): 1631-1641. [颜子渊, 邓真德, 张竞, 等. 环境铜离子对吉富罗非鱼生长性能、脂代谢、肝胰脏和脾脏组织的影响[J]. 水生生物学报, 2022, 46(11): 1631-1641.]
- [7] Vardy D W, Oellers J, Doering J A, et al. Sensitivity of early life stages of white sturgeon, rainbow trout, and fathead minnow to copper[J]. *Ecotoxicology*, 2013, 22(1): 139-147.
- [8] Barjhoux I, Baudrimont M, Morin B, et al. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 79: 272-282.
- [9] Vardy D W, Tompsett A R, Sigurdson J L, et al. Effects of subchronic exposure of early life stages of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to copper, cadmium, and zinc[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(11): 2497-2505.
- [10] Huang W, Cao L, Dou S Z. Studies of toxicity effects of heavy metals on early life stages of fish: A review[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(8): 1272-1288. [黄伟, 曹亮, 窦硕增. 重金属对鱼类早期发育的生态毒理效应[J]. 水产学报, 2016, 40(8): 1272-1288.]
- [11] Liu J, Chen Y X, Ma L. Fishes of the Bohai Sea and Yellow Sea[M]. Beijing: Science Press, 2015. [刘静, 陈咏霞, 马琳. 黄渤海鱼类图志[M]. 北京: 科学出版社, 2015.]
- [12] Xu Y J, Zhang Z R, Liu X Z, et al. Morphometric characteristics of the embryonic and postembryonic development of yellowtail kingfish, *Seriola aureovittata*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 172-182. [徐永江, 张正荣, 柳学周, 等. 黄条鰈早期生长发育特征[J]. 中国水产科学, 2019, 26(1): 172-182.]
- [13] Oecd. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test[M]. Paris: OECD, 2013.
- [14] Stephan C E. Methods for calculating an LC<sub>50</sub>[M]//Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Philadelphia: ASTM International, 1977: 65-84.
- [15] Oecd. Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test[M]. Paris: OECD, 2013.
- [16] Alderdice D F, Rosenthal H, Velsen F P J. Influence of salinity and cadmium on capsule strength in Pacific herring eggs[J]. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 1979, 32(1): 149-162.
- [17] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [18] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [19] Young M D, Wakefield M J, Smyth G K, et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14.
- [20] Li B, Dewey C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [21] Xie C, Mao X Z, Huang J J, et al. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Web Server issue): W316-W322.
- [22] Ugowska K, Witeska M. The effect of copper exposure during embryonic development on deformations of newly hatched common carp larvae, and further consequences[J]. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Series Fisheries*, 2004, 7: 2.
- [23] Cao L, Huang W, Liu J H, et al. Toxicity of short-term copper exposure to early life stages of red sea bream, *Pagrus major*[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010, 29(9): 2044-2052.
- [24] Williams N D, Holdway D A. The effects of pulse-exposed cadmium and zinc on embryo hatchability, larval development, and survival of Australian crimson spotted rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*)[J]. *Environmental Toxicology*, 2000, 15(3): 165-173.
- [25] Sfakianakis D G, Renieri E, Kentouri M, et al. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review[J]. *Environmental Research*, 2015, 137: 246-255.
- [26] Huang W. Toxicological effects of mercury, lead and zinc on the early development of brown turbot (*Paralichthys olivaceus*)[D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2010. [黄伟. 汞、铅、锌对褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)早期发育过程毒理作用的研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.]
- [27] China veterinary medical association 2011 test guide for qualification examination of licensed veterinarians (aquatic animals) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2011: 282-301. [中国兽医协会组编 2011 年执业兽医资格考试应试指南 (水生动物类)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 282-301.]
- [28] Chen Y C, Chen J Y. Toxic effect of heavy metal ions of Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> on embryo development of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(3): 35-42. [陈玉翠, 陈锦云. 重金属 Cu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>对斑马

- 鱼胚胎发育的毒性效应[J]. 南方水产科学, 2016, 12(3): 35-42.]
- [29] Wang R F, Zhu L M, Zhang J, et al. Developmental toxicity of copper in marine medaka (*Oryzias melastigma*) embryos and larvae[J]. Chemosphere, 2020, 247: 125923.
- [30] Jezierska B, Ługowska K, Witeska M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2009, 35(4): 625-640.
- [31] Oliva M, Garrido M D, Pérez E, et al. Evaluation of acute copper toxicity during early life stages of gilthead seabream, *Sparus aurata*[J]. Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2007, 42(4): 525-533.
- [32] Johnson A, Carew E, Sloman K A. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos[J]. Aquatic Toxicology, 2007, 84(4): 431-438.
- [33] Cao L. Toxic effects of cadmium and copper to early life stages of flounder (*Paralichthys olivaceus*)[D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanography), 2010. [曹亮. 铜、镉对褐牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 早期发育阶段的毒理效应研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2010.]
- [34] Zhang Z J, Zhang W P. Biological monitoring and evaluation of environmental pollution[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1991. [张志杰张维平. 环境污染生物监测与评价[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1991.]
- [35] Williams N D, Holdway D A. The effects of pulse-exposed cadmium and zinc on embryo hatchability, larval development, and survival of Australian crimson spotted rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*)[J]. Environmental Toxicology, 2000, 15(3): 165-173.
- [36] Witeska M, Sarnowski P, Ługowska K, et al. The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of ide *Leuciscus idus* L.[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(1): 151-163.
- [37] Nolfi-Donegan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement[J]. Redox Biology, 2020, 37: 101674.
- [38] Kong X H, Jiang H X, Wang S P, et al. Effects of copper exposure on the hatching status and antioxidant defense at different developmental stages of embryos and larvae of goldfish *Carassius auratus*[J]. Chemosphere, 2013, 92(11): 1458-1464.
- [39] Deegan T D, Diffley J F. MCM: One ring to rule them all[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2016, 37: 145-151.
- [40] Hyrien O. How MCM loading and spreading specify eukaryotic DNA replication initiation sites[J]. F1000 Research, 2016, 5: F1000FacultyRev-F1000Faculty2063.
- [41] Wang M G, Mao D W, Zhang R Z, et al. MCM2-7 complex participates in the mechanism and control of DNA replication[J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2017, 26(7): 809-811. [王明刚, 毛德文, 张荣臻, 等. MCM2-7复合体参与DNA复制机制及调控特点[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2017, 26(7): 809-811.]
- [42] Wei Y L. Transcriptome analysis of brain and liver in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reveals the response to high temperature by RNA-seq[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [魏亚丽. 基于RNA-seq的高温条件下尼罗罗非鱼脑和肝脏的转录组分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [43] Yin J. Study on toxic effect and mechanism of heavy metals on zebrafish[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2014. [殷健. 重金属对斑马鱼的毒性效应及作用机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.]
- [44] Zhu S G, Xu C F. Biochemistry 4th ed[M]. Beijing: Higher Education Press, 2017. [朱圣庚, 徐长法. 生物化学-上册 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2017.]
- [45] Leskov I B, Klenchin V A, Handy J W, et al. The gain of rod phototransduction reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements[J]. Neuron, 2000, 27(3): 525-537.
- [46] Zhang Y J, Ding Z C, Zhao G, et al. Transcriptional responses and mechanisms of copper nanoparticle toxicology on zebrafish embryos[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 344: 1057-1068.

## Effects of copper exposure on embryonic and yolk-sac larval development of *Seriola aureovittata*: Ecological and molecular toxicity

JIN Zhixin<sup>1</sup>, XU Yongjiang<sup>1,2</sup>, CUI Ajun<sup>1,2</sup>, JIANG Yan<sup>1,2</sup>, WANG Bin<sup>1,2</sup>, LIU Xinfu<sup>1,2</sup>

1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China

**Abstract:** Copper is an important heavy metal and an essential trace element for aquatic organisms and is found at low concentrations in aquatic ecosystems. In aquaculture, copper sulfate is used as a therapeutic agent to reduce parasitic infections in cultured fish. However, exposure to heavy metals beyond a safe concentration range can cause a series of physiological and biochemical stresses in aquatic animals, including death. Fish are generally most sensitive to the effects of Cu<sup>2+</sup> exposure during early life stages, especially during embryonic and larval development, which can result in reduced fertilization success, chromosomal abnormalities, DNA injury, increased incidence of yolk membrane ruptures, reduced hatching success and survival, altered time to hatching, embryonic and larval teratogenicity, inhibited growth, abnormal larval behaviors. Yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*) is a fast-growing marine species widely distributed in temperate and subtropical regions of the oceans. It has a large body size, superior flesh quality, high economic value, and can be cultured in sea cages, indoor recirculating aquaculture systems, aquaculture crafts, and other culture modes. Therefore, *S. aureovittata* is a promising candidate for open-ocean aquaculture in China. To investigate the effects of copper exposure on the early life stages of *S. aureovittata*, embryos and yolk sac larvae were exposed to copper concentrations of 0, 0.034, 0.060, 0.107, 0.192, 0.340, 0.600, and 1.070 mg/L for 60 h and 5 d under laboratory conditions in the present study. The half-lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and safe concentration (SC) were determined for embryos and newly hatched larvae of *S. aureovittata*, respectively. In addition, differential gene expression patterns and related signaling pathways were investigated in embryos and yolk-sac larvae to elucidate possible molecular mechanisms. The results showed that: (1) Low hatching rate of embryos, high malformation rate of newly hatched larvae, and high utilization speed of yolk sacs during the early developmental stage of *S. aureovittata* under copper exposure stress. (2) The 48 h-LC<sub>50</sub> of copper for *S. aureovittata* embryos was 0.08 mg/L, which was much lower than that of yolk sac larvae (48 h-LC<sub>50</sub> = 0.60 mg/L). The SC of Cu<sup>2+</sup> in *S. aureovittata* yolk sac larvae was 0.034 mg/L. (3) Transcriptome sequencing analysis revealed that differentially expressed genes (DEGs) were mainly enriched in the oxidative phosphorylation pathway during the embryonic development stage of *S. aureovittata*, whereas in the yolk sac larval stage, DEGs were mainly enriched in the cell cycle and phototransduction pathways, indicating that excessive copper exposure may injure the antioxidative ability of embryos and cause DNA injury and phototransduction inhibition in larvae. The present study determined the safe concentration of copper sulfate during the early developmental stages of *S. aureovittata* and revealed the molecular responses of embryos and yolk sac larvae to copper exposure stress. These results could provide theoretical support for the scientific and staged application of copper agents in the aquaculture of *S. aureovittata* and technical guidance for monitoring aquaculture and marine environments.

**Key words:** *Seriola aureovittata*; copper exposure; embryonic development; larval development; acute toxic effects transcriptome analysis

**Corresponding author:** XU Yongjiang. E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn