

# 氟唑菌酰胺对斑马鱼(*Danio rerio*)鱼鳔发育的影响

苏梦岚<sup>1</sup>, 李文华<sup>1</sup>, 肖鹏<sup>2\*</sup>

(1. 华侨大学 生物医学学院 分子药物教育部工程研究中心 福建省分子医学重点实验室 厦门市海洋与基因工程药物重点实验室, 中国福建 厦门 361021; 2. 温州大学 生命与环境科学学院, 中国浙江 温州 325035)

**摘要:** 鱼鳔作为硬骨鱼类重要的功能器官, 其发育对多种环境污染物都较为敏感。氟唑菌酰胺(fluxapyroxad)是琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂家族的一员, 对鱼类具有神经、心血管和发育毒性。为探究氟唑菌酰胺对斑马鱼鱼鳔发育的潜在影响, 将斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的氟唑菌酰胺后, 记录斑马鱼幼鱼鱼鳔的表型, 通过组织学切片染色手段检测幼鱼鱼鳔的形态差异, 并采用整体原位杂交实验比较鱼鳔发育关键基因的表达图式变化。结果表明, 氟唑菌酰胺暴露会引起斑马鱼幼鱼鱼鳔发育异常、鱼鳔充气受阻及鱼鳔发育标记基因 *elov11a* 和 *anxa5b* 的表达水平显著降低。该研究对于评估氟唑菌酰胺对斑马鱼幼鱼鱼鳔发育的影响提供了有价值的参考, 并可能有助于深入了解氟唑菌酰胺对水生生态系统构成的潜在风险。

**关键词:** 氟唑菌酰胺; 斑马鱼; 幼鱼; 鱼鳔; 发育毒性

中图分类号: Q17, Q958

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)01-0012-06

## Fluxapyroxad Disrupts Zebrafish (*Danio rerio*) Swim Bladder Development

SU Menglan<sup>1</sup>, LI Wenhua<sup>1</sup>, XIAO Peng<sup>2\*</sup>

(1. School of Biomedical Sciences, Engineering Research Center of Molecular Medicine of Ministry of Education, Key Laboratory of Fujian Molecular Medicine, Key Laboratory of Xiamen Marine and Gene Drugs, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China; 2. College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China)

**Abstract:** As an essential organ for teleost fish, the swim bladder is highly susceptible to various environmental pollutants. Fluxapyroxad, a type of fungicide that inhibits succinate dehydrogenase, has been found to have toxic effects on fish nervous system, cardiovascular system and development. In order to investigate the potential impact of fluxapyroxad on swim bladder development in zebrafish, zebrafish embryos were exposed to different concentrations of the fungicide. The resulting swim bladder phenotypes in the zebrafish larvae were documented. Hematoxylin-eosin staining was used to examine histological changes in the swim bladder of the larvae, while whole-mount *in situ* hybridization was used to compare changes in the expression patterns of marker genes involved in swim bladder development after embryonic exposure to fluxapyroxad. The findings revealed that exposure to fluxapyroxad led to abnormal development of the swim bladder in the zebrafish larvae and significantly suppressed the expression levels of marker genes (*elov11a* and *anxa5b*) involved in swim bladder development. This study provides valuable references for evaluating the impact of fluxapyroxad on the swim bladder development of zebrafish larvae, and may contribute to a better understanding of the potential risks of fluxapyroxad to aquatic ecosystems.

**Key words:** fluxapyroxad; zebrafish; larva; swim bladder; developmental toxicity

(*Life Science Research*, 2024, 28(1): 012-017)

收稿日期: 2023-05-30; 修回日期: 2023-08-24; 网络首发日期: 2024-01-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目(ZQN923)

作者简介: 苏梦岚(1998-), 女, 福建泉州人, 硕士研究生, 主要从事药物毒理学研究; \*通信作者: 肖鹏(1987-), 男, 湖北孝感人, 博士, 副研究员, 主要从事环境微生物与药物毒理学研究, E-mail: pxiao@wzu.edu.cn.

氟唑菌酰胺(fluxapyroxad, 分子式为  $C_{18}H_{12}F_5N_3O$ ) 是一种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂, 其主要通过抑制病菌线粒体呼吸链复合物 II 中的琥珀酸脱氢酶来干扰菌体的呼吸作用, 具有高效、广谱、持效及选择性强等优点<sup>[1-2]</sup>。氟唑菌酰胺对哺乳动物是安全的(大鼠经口半数致死剂量  $>2\ 000\ mg/kg$ ), 且对人类不具有致癌性。然而, 它对包括鱼类、水生无脊椎动物和水生植物在内的水生物种却有一定的毒性作用<sup>[3]</sup>。氟唑菌酰胺对黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)和糠虾(*Americamysis bahia*)的 96 h 半数致死质量浓度分别为  $0.466\ mg/L$  和  $3.6\ mg/L$ <sup>[4]</sup>。在用  $0.174\sim 0.694\ mg/L$  氟唑菌酰胺处理斑马鱼胚胎后, 斑马鱼胚胎会出现氧化应激、细胞凋亡和线粒体损伤<sup>[5]</sup>。Li 等<sup>[6-7]</sup>发现, 氟唑菌酰胺( $1\ \mu mol/L$ 、 $2\ \mu mol/L$  和  $4\ \mu mol/L$ )会导致斑马鱼胚胎在早期发育过程中出现氧化应激并引起发育迟缓, 随后会导致心脏发育畸形及心脏功能异常。Yu 等<sup>[8]</sup>将斑马鱼胚胎暴露于  $0.5\ mg/L$ 、 $0.75\ mg/L$  和  $1\ mg/L$  的氟唑菌酰胺 96 h 后发现, 斑马鱼幼鱼出现严重的运动异常, 同时伴随着多巴胺水平的降低, 且参与神经传递和神经发育的关键基因表达异常。Qiu 等<sup>[9]</sup>将斑马鱼胚胎暴露于  $0.03\ \mu mol/L$ 、 $0.3\ \mu mol/L$  和  $3\ \mu mol/L$  的氟唑菌酰胺后发现, 斑马鱼的眼睛神经节细胞层的细胞密度增加, 内核层和外核层的基因表达紊乱, 眼睛细胞过度凋亡, 并引起小眼症。此外, 有研究报道,  $3\ \mu mol/L$  的氟唑菌酰胺也会引起红细胞发生异常<sup>[10]</sup>。由此可见, 氟唑菌酰胺对鱼类的危害不可小觑。

农药在常规施用后极易残留于土壤和农作物中, 同时也会通过雨水冲刷等途径进入到水生生态系统<sup>[11]</sup>。氟唑菌酰胺具有环境持久性, 其在土壤中的半衰期为 183 d, 且其在水沉积物系统中的存留时间更是超过 847 d<sup>[12]</sup>。氟唑菌酰胺的地下水普遍存在性分值(groundwater ubiquity score, GUS)为 2.57, 暗示它具有浸出至地下水的潜力<sup>[4]</sup>。上述研究表明具有环境持久性的氟唑菌酰胺对鱼类具有较高的毒性, 然而, 目前关于氟唑菌酰胺对鱼类的毒性效应以及潜在的毒性机制仍尚未完全阐明。

鱼鳔是一种充气的囊状结构, 可调节硬骨鱼的浮力和游泳行为, 对鱼类的生存和生长至关重要<sup>[13-14]</sup>。鱼鳔的发育和充气过程对环境污染物较为敏感, 极易受到影响而导致发育异常<sup>[15]</sup>。目前, 尚没有研究报道氟唑菌酰胺对硬骨鱼类鱼鳔发育的影响。为了探索其对鱼鳔发育的影响, 本研究以斑

马鱼为研究对象, 对氟唑菌酰胺暴露( $0.03\ \mu mol/L$ 、 $0.3\ \mu mol/L$  和  $3\ \mu mol/L$ )后的斑马鱼幼鱼进行了表型分析, 利用组织切片及苏木精-伊红染色手段研究了氟唑菌酰胺对鱼鳔组织学的影响, 并通过整体原位杂交技术检测了氟唑菌酰胺暴露后鱼鳔标记基因的表达变化。本研究结果将为氟唑菌酰胺的水环境风险评估提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 斑马鱼

野生型斑马鱼饲养于斑马鱼养殖系统(上海海圣生物实验设备有限公司), 水温控制在  $(28\pm 0.5)\ ^\circ C$ , 光周期设置为 14 h 光照和 10 h 黑暗。成体斑马鱼每天饲喂 3 次新鲜孵化的丰年虾。在性成熟期, 将 1 只雌性和 4 只雄性成体斑马鱼分隔开放置于同一孵化盒中过夜, 并于次日灯亮时移去隔离板, 让雄性斑马鱼追逐雌性使其自然产卵。

### 1.2 氟唑菌酰胺暴露

将氟唑菌酰胺粉末(CAS: 907204-31-3, 纯度 99.50%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)溶于二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中配置成  $10\ g/L$  的母液,  $4\ ^\circ C$  冰箱避光保存。在每次开展暴露实验前, 按照所需量, 将母液用水稀释成  $10\ mg/L$ 。在预实验中, 我们观察到氟唑菌酰胺对斑马鱼胚胎的发育具有延迟作用, 能减少色素、降低心率, 并引起鱼鳔发育迟缓、眼睛直径减小、心包水肿等畸形, 在不致死的前提下确定了最终的给药浓度。3 个给药浓度梯度分别为  $0.03\ \mu mol/L$ 、 $0.3\ \mu mol/L$  和  $3\ \mu mol/L$ 。使用 M205FA 型体视显微镜(德国 Leica 公司)随机挑选健康且发育时间为受精后 3 小时(3 hours post fertilization, 3 hpf)的斑马鱼胚胎用于药物暴露, 暴露总时长为 96 h。在直径 90 mm 的一次性培养皿中, 随机分配 70 个胚胎。对照组暴露于无氟唑菌酰胺的体积分数为 0.011 36% 的 DMSO 中。每个暴露实验至少重复 3 次。在实验过程中, 每天都需更换暴露溶液。本研究经华侨大学动物保护委员会和福利委员会的批准与支持(A2021046)。

### 1.3 表型分析

将 96 hpf 的斑马鱼幼鱼用 0.03% MS-222 麻醉剂(上海毕得医药科技有限公司)麻醉后, 置于 M205FA 型体视显微镜下拍摄白光表型。斑马鱼鱼鳔的垂直长度使用显微镜配套的 Application Suite X 软件进行测量。

#### 1.4 组织病理学分析

将 96 hpf 的斑马鱼幼鱼麻醉后放置于 4% 的多聚甲醛溶液中固定 24 h, 然后包埋于石蜡中进行切片(矢状切面), 切片的厚度为 5  $\mu\text{m}$ 。染色步骤按照苏木精-伊红染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)内的说明书进行。染色完成后使用 Axio Observer 型倒置显微镜(德国 Zeiss 公司)进行观察并拍照。

#### 1.5 胚胎整体原位杂交

使用地高辛标记的 RNA 探针合成试剂盒(德国 Roche 公司)合成 *hprt1l* (GenBank: NM\_001002056.1)、*elov1a* (GenBank: NM\_001005989.3) 和 *anxa5b* (GenBank: BC046873.1) 基因的探针, 具体引物序列见参考文献[16]。将 72 hpf 的斑马鱼幼鱼用 4% 多聚甲醛溶液固定过夜, 第 2 天下午进行脱色处理, 然后将幼鱼置于甲醇溶液中长期保存。用磷酸盐吐温缓冲液(PBS-Tween, PBST)梯度替换原有甲醇溶液并用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白酶 K (美国 Sigma-Aldrich 公司)在室温下消化 6 min, 清洗后置于 60  $^{\circ}\text{C}$  的杂交箱中预杂交 3 h。随后, 将幼鱼与相应的反义探针在 60  $^{\circ}\text{C}$  的杂交箱中杂交至少 16 h, 每组中每个探针至少杂交 15 个胚胎。用 65  $^{\circ}\text{C}$  预热的杂交缓冲液进行梯度冲洗并用封闭液室温封闭 3~4 h, 加入抗体溶液(抗地高辛-AP, 美国 Sigma-Aldrich 公司)后于 4  $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜。隔天用 PBST 缓冲液冲洗, 使用 BCIP/NBT 显色试剂盒(上海碧云

天生物技术有限公司)进行避光染色。显色过程中需时刻观察显色情况。显色成功后, 用梯度甲醇洗去多余底物并进行脱色处理, 最后置于甘油中 4  $^{\circ}\text{C}$  摇床透化过夜。

#### 1.6 统计分析

使用 SPSS 26 统计软件进行非参数 Kruskal-Wallis 检验, 分析样品间的显著性,  $P < 0.05$  表示差异显著。使用 GraphPad Prism 6 软件进行绘图。所有数据均表示为平均值( $\bar{x}$ ) $\pm$ 标准误( $s^{\bar{}}$ )。

## 2 结果

### 2.1 氟唑菌酰胺暴露引起斑马鱼鱼鳔缺陷

从图 1 可知, 对照组、0.03  $\mu\text{mol}/\text{L}$  和 0.3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  氟唑菌酰胺处理组的幼体斑马鱼在 96 hpf 时均有一个椭圆形、透明且充满气体的鱼鳔; 而 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  氟唑菌酰胺对幼鱼鱼鳔的影响较为严重, 其中有 73.68% 的幼鱼鱼鳔未充气(黑色箭头)。此外, 对照组以及 0.03  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  和 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  氟唑菌酰胺处理组的斑马鱼幼鱼鱼鳔的平均垂直长度分别为(0.237 8 $\pm$ 0.004 3) mm、(0.236 8 $\pm$ 0.009 1) mm、(0.229 0 $\pm$ 0.004 2) mm 和(0.088 7 $\pm$ 0.006 6) mm; 在 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  氟唑菌酰胺处理后, 鱼鳔的垂直长度显著减少( $n=8$ ,  $P < 0.001$ )。

从 96 hpf 时的鱼鳔纵向切片的苏木精-伊红染色结果(图 2)可知, 对照组、0.03  $\mu\text{mol}/\text{L}$  和 0.3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  氟唑菌酰胺处理组的鱼鳔都有出现扩

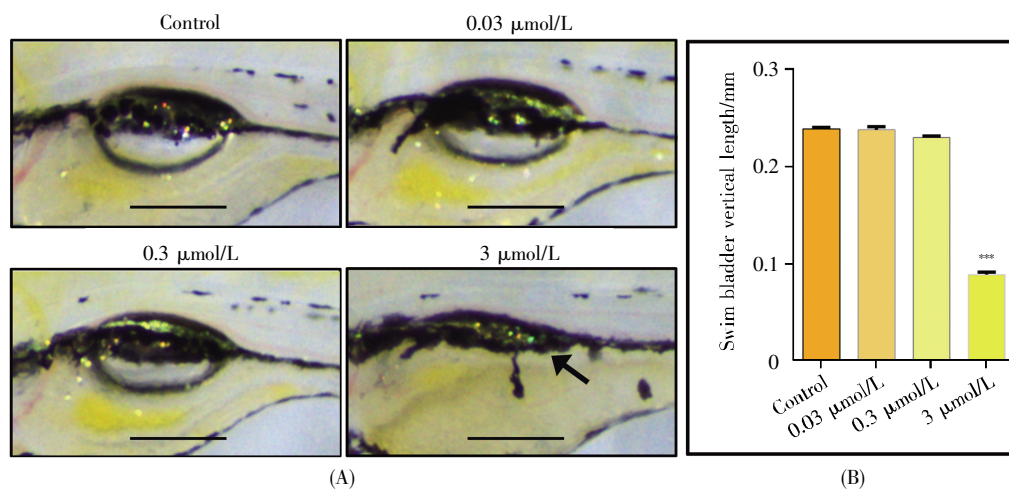


图 1 氟唑菌酰胺暴露影响斑马鱼幼鱼鱼鳔大小

(A) 96 hpf 时, 对照组以及 0.03  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  和 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  氟唑菌酰胺处理组幼鱼的侧面视图; (B) 96 hpf 时, 各组幼鱼鱼鳔的垂直长度( $n=8$ )。Control 为 DMSO 处理的对照组; 黑色箭头指示畸形鱼鳔; 比例尺=250  $\mu\text{m}$ 。\*\*\*:  $P < 0.001$  vs. 对照组。

#### Fig.1 Fluazapyroxad affects the size of swim bladder in zebrafish larvae

(A) Lateral views of the control, 0.03  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 0.3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  and 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  fluxapyroxad-treated larvae at 96 hpf, respectively; (B) Vertical lengths of larval swim bladder at 96 hpf ( $n=8$ ). Control: The DMSO-treated group. The black arrow indicates the deformed swim bladder. Scale bar=250  $\mu\text{m}$ . \*\*\*:  $P < 0.001$ , compared with the control group.

张且膨胀的管腔,同时大管腔周围有一层薄层细胞;相比之下,暴露于 3  $\mu\text{mol/L}$  氟唑菌酰胺的幼鱼仅发育出一个小、未充气且其壁较厚的鱼鳔(图 2 黑色箭头),说明 3  $\mu\text{mol/L}$  氟唑菌酰胺暴露严重影响了鱼鳔的整体结构。

## 2.2 氟唑菌酰胺暴露抑制斑马鱼鱼鳔标记基因表达

研究报道,基因 *hprt1l*、*elov11a* 和 *anxa5b* 调控鱼鳔间皮层的分化<sup>[17-18]</sup>。为了深入探究氟唑菌酰胺对斑马鱼幼鱼鱼鳔发育和充气的潜在影响机

制,本研究合成了鱼鳔标记基因 *hprt1l*、*elov11a* 和 *anxa5b* 的 RNA 探针,并通过整体原位杂交实验,检测了氟唑菌酰胺暴露后鱼鳔标记基因的表达图式变化。如图 3 所示,对照组 *hprt1l*、*elov11a* 和 *anxa5b* 三个基因均表达于幼鱼的鱼鳔位置;在不同浓度氟唑菌酰胺暴露后,*hprt1l* 的表达水平都没有受到明显影响;在 3  $\mu\text{mol/L}$  氟唑菌酰胺暴露后,*elov11a* 和 *anxa5b* 这两个基因的表达水平显著下降(图 3 箭头所示),而 0.03  $\mu\text{mol/L}$  和 0.3  $\mu\text{mol/L}$  氟唑菌酰胺暴露对 *elov11a* 和 *anxa5b* 的表达无明显

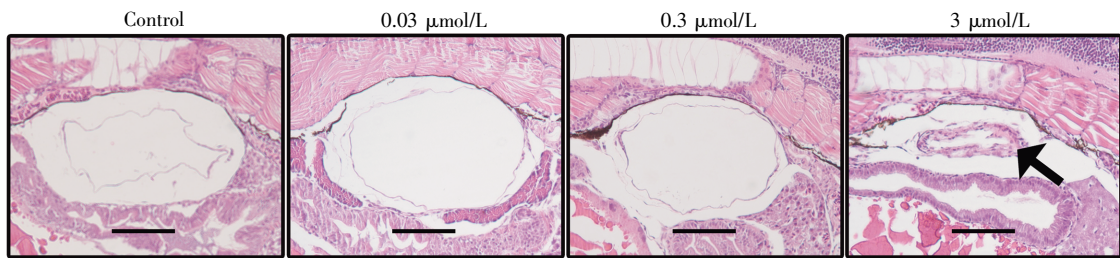


图 2 氟唑菌酰胺暴露影响斑马鱼幼鱼鱼鳔发育

96 hpf 时,对照组以及 0.03  $\mu\text{mol/L}$ 、0.3  $\mu\text{mol/L}$  和 3  $\mu\text{mol/L}$  氟唑菌酰胺处理组幼鱼鱼鳔组织苏木精-伊红染色的侧面视图。Control 为 DMSO 处理的对照组;黑色箭头指示未充气的鱼鳔;比例尺=100  $\mu\text{m}$ 。

### Fig.2 Fluxapyroxad affects swim bladder development in zebrafish larvae

Side views of the swim bladder tissues stained by hematoxylin and eosin in the control, 0.03  $\mu\text{mol/L}$ , 0.3  $\mu\text{mol/L}$ , and 3  $\mu\text{mol/L}$  fluxapyroxad-treated larvae at 96 hpf, respectively. Control: The DMSO-treated group. The black arrow indicates the uninflated swim bladder. Scale bar=100  $\mu\text{m}$ .

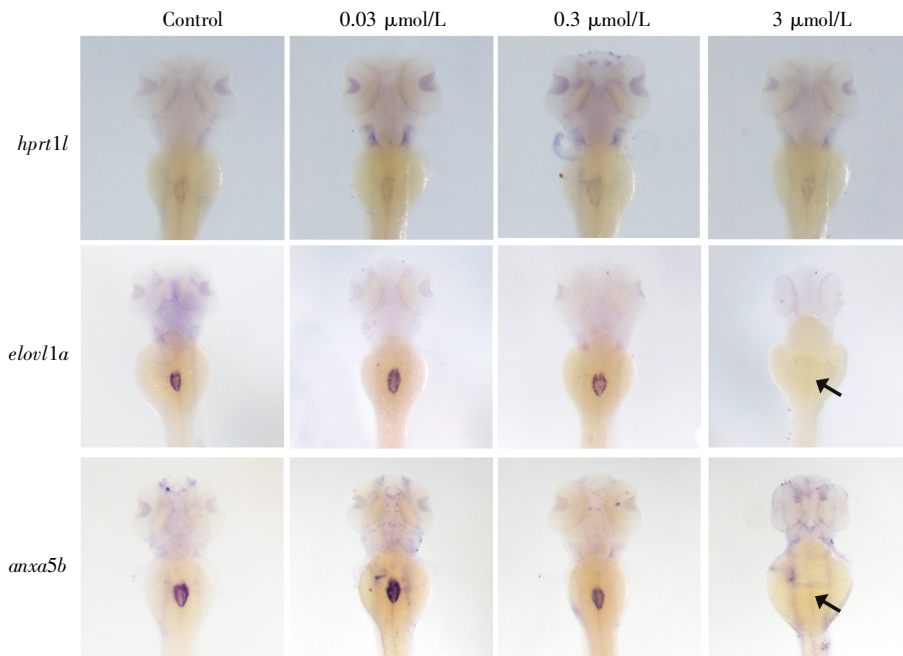


图 3 氟唑菌酰胺暴露抑制鱼鳔标记基因的表达

基因 *hprt1l*、*elov11a* 和 *anxa5b* 在 72 hpf 的表达图式(背视图)。Control 为 DMSO 处理的对照组;箭头指示基因表达信号减弱的位置。

### Fig.3 Fluxapyroxad inhibits the expression of swim bladder marker genes

Expression of the genes *hprt1l*, *elov11a* and *anxa5b* at 72 hpf (dorsal view). Control: The DMSO-treated groups. The arrows indicate where the gene expression signal in the larva is weakened.

显影响。

### 3 讨论

作为一种高效、哺乳动物低毒的杀菌剂, 氟唑菌酰胺的广泛使用增加了其在环境中的检出概率。目前, 研究人员已在环境中检测到较高的氟唑菌酰胺残留浓度<sup>[19-20]</sup>, 暗示氟唑菌酰胺对生态环境可能具有一定的负面影响。在本研究中, 氟唑菌酰胺(3  $\mu\text{mol/L}$ )暴露后, 斑马鱼幼鱼鱼鳔发育异常且无法正常充气(图 1 和 2), 暗示氟唑菌酰胺能特异性干扰斑马鱼鱼鳔的发育过程。

虽然在氟唑菌酰胺(3  $\mu\text{mol/L}$ )暴露后的幼鱼中可以观察到鱼鳔膜和气管, 但其形成的鱼鳔要比对照组小得多(图 1 和 2)。鱼鳔是一种腔体中充满气体的器官, 用以维持鱼的浮力, 该器官对鱼类的生存和运动非常重要<sup>[21]</sup>。幼鱼阶段鱼鳔充气失败可能会对幼鱼的存活造成严重影响<sup>[22]</sup>。在另一种琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂异氟吡喃暴露斑马鱼后, 研究人员也同样观察到幼鱼鱼鳔不充气的现象<sup>[23]</sup>。综上所述, 鱼鳔的发育可能是琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的毒性作用靶点, 可用于评估琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂对鱼类发育的毒性。

关键基因突变或表达受到抑制, 可能会导致相关器官或结构的形成异常。因此, 斑马鱼在暴露于氟唑菌酰胺后, 可能出现与鱼鳔发育相关的基因表达异常, 导致鱼鳔发育异常。模式生物斑马鱼的早期鱼鳔发育过程主要分为 3 个阶段, 即出芽阶段(36~65 hpf)、延长阶段(65~96 hpf)和充气阶段(96~120 hpf)<sup>[18]</sup>。基因 *hprt1l*、*elovl1a* 和 *anxa5b* 的正常表达对于鱼鳔的发育是必需的, 它们调控着鱼鳔间皮层的发育过程<sup>[17-18]</sup>。在 72 hpf, 氟唑菌酰胺(3  $\mu\text{mol/L}$ )暴露后 *elovl1a* 和 *anxa5b* 的表达水平显著下调(图 3), 表明氟唑菌酰胺可能直接且特异地抑制幼鱼鱼鳔的发育。此外, Yin 等<sup>[17]</sup>报道, Wnt 信号通路在鱼鳔发育过程中发挥着关键的调控作用, 干扰 Wnt 信号通路的基因表达会影响鱼鳔组织层的分化。Li 等<sup>[7]</sup>报道, 在斑马鱼胚胎暴露于 4  $\mu\text{mol/L}$  氟唑菌酰胺后, 大量差异表达基因富集于 Wnt 信号通路。这些结果表明, 氟唑菌酰胺暴露导致的鱼鳔发育异常可能是通过影响斑马鱼幼鱼中的 Wnt 通路实现的。

总的来讲, 本研究揭示了氟唑菌酰胺对斑马鱼幼鱼鱼鳔发育和充气的影响, 研究结果将为氟

唑菌酰胺在水环境的生态风险评估提供实验数据支撑。不过, 有关氟唑菌酰胺暴露影响斑马鱼幼鱼鱼鳔发育和充气的潜在分子机制仍有待进一步研究。

### 4 结论

1) 斑马鱼的鱼鳔发育对杀菌剂氟唑菌酰胺较为敏感, 当氟唑菌酰胺暴露浓度提升到 3  $\mu\text{mol/L}$  时, 会引起斑马鱼鱼鳔发育异常。

2) 氟唑菌酰胺暴露引起斑马鱼幼鱼鱼鳔的垂直长度缩短, 即导致斑马鱼幼鱼鱼鳔充气障碍。

3) 氟唑菌酰胺暴露引起斑马鱼幼鱼鱼鳔组织学形态异常, 并抑制斑马鱼幼鱼鱼鳔间皮层标记基因的表达。

### 参考文献(References):

- [1] OLIVEIRA M S, CORDOVA L G, PERES N A. Efficacy and baseline sensitivity of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicides for management of *Colletotrichum* crown rot of strawberry[J]. *Plant Disease*, 2020, 104(11): 2860-2865.
- [2] HAGERTY C H, KLEIN A M, REARDON C L, *et al.* Baseline and temporal changes in sensitivity of *Zyloseptoria tritici* isolates to benzovindiflupyr in Oregon, U.S.A., and cross-sensitivity to other SDHI fungicides[J]. *Plant Disease*, 2021, 105(1): 169-174.
- [3] European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluxapyroxad (BAS 700 F)[J]. *EFSA Journal*, 2012, 10(1): 2522.
- [4] LEWIS K A, TZILIVAKIS J, WARNER D J, *et al.* An international database for pesticide risk assessments and management[J]. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2016, 22(4): 1050-1064.
- [5] LIN H, LIN F R, YUAN J, *et al.* Toxic effects and potential mechanisms of fluxapyroxad to zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 769: 144519.
- [6] LI W H, WU Y Q, YUAN M R, *et al.* Fluxapyroxad induces developmental delay in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*, 2020, 256: 127037.
- [7] LI W H, GUO S S, MIAO N. Transcriptional responses of fluxapyroxad-induced dysfunctional heart in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(60): 90034-90045.
- [8] YU H L, ZHANG J H, CHEN Y H, *et al.* The adverse effects of fluxapyroxad on the neurodevelopment of zebrafish embryos[J]. *Chemosphere*, 2022, 307(Pt 1): 135751.
- [9] QIU T T, CHEN X, XIAO P, *et al.* Effects of embryonic exposure to fluxapyroxad on zebrafish (*Danio rerio*) ocular development[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2022, 181: 105018.
- [10] CHEN X, QIU T T, PAN M J, *et al.* Fluxapyroxad disrupt erythropoiesis in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 247: 114259.
- [11] SCHRIEVER C A, LIESS M. Mapping ecological risk of agricultural pesticide runoff[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 384(1/2/3): 264-279.
- [12] International Union of Pure and Applied Chemistry. Fluxapyroxad (Ref: BAS 700F)[DB/OL]. (2023-02-09) [2023-03-10]. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/2002.htm>.

- [13] CASS A N, SERVETNICK M D, MCCUNE A R. Expression of a lung developmental cassette in the adult and developing zebrafish swimbladder[J]. *Evolution & Development*, 2013, 15(2): 119–132.
- [14] ZHENG W L, WANG Z Y, COLLINS J E, *et al.* Comparative transcriptome analyses indicate molecular homology of zebrafish swimbladder and mammalian lung[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e24019.
- [15] 韩建, 何秋霞, 韩利文, 等. 化学污染物对鱼鳔的毒理学研究进展[J]. *生态毒理学报*(HAN Jian, HE Qiuxia, HAN Liwen, *et al.* Review on toxicology of chemical pollutants on fish swimbladder[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*), 2016, 11(6): 37–43.
- [16] 陈鑫, 李文华. 氟唑菌酰胺干扰斑马鱼(*Danio rerio*)鱼鳔的发育[J]. *生态毒理学报*(CHEN Xin, LI Wenhua. Metaflumizone disrupts swim bladder development in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*), 2022, 17(3): 454–461.
- [17] YIN A, KORZH S, WINATA C L, *et al.* Wnt signaling is required for early development of zebrafish swimbladder[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18431.
- [18] WINATA C L, KORZH S, KONDRYCHYN I, *et al.* Development of zebrafish swimbladder: the requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers[J]. *Developmental Biology*, 2009, 331(2): 222–236.
- [19] SJERPS R M A, KOIJ P J F, VAN LOON A, *et al.* Occurrence of pesticides in Dutch drinking water sources[J]. *Chemosphere*, 2019, 235: 510–518.
- [20] HE M, JIA C H, ZHAO E C, *et al.* Concentrations and dissipation of difenoconazole and fluxapyroxad residues in apples and soil, determined by ultrahigh–performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(6): 5618–5626.
- [21] ROBERTSON G N, LINDSEY B W, DUMBARTON T C, *et al.* The contribution of the swimbladder to buoyancy in the adult zebrafish (*Danio rerio*): a morphometric analysis[J]. *Journal of Morphology*, 2008, 269(6): 666–673.
- [22] GOOLISH E M, OKUTAKE K. Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air–water interface[J]. *Journal of Fish Biology*, 1999, 55(5): 1054–1063.
- [23] CHEN X, QIU T T, XIAO P, *et al.* Retinal toxicity of isoflucypram to zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2022, 243: 106073.

## (上接第 11 页)

- [73] SHI Y Q, KATSEV S, CAI C L, *et al.* BMP signaling is required for heart formation in vertebrates[J]. *Developmental Biology*, 2000, 224(2): 226–237.
- [74] TIAN Y, COHEN E D, MORRISEY E E. The importance of Wnt signaling in cardiovascular development[J]. *Pediatric Cardiology*, 2010, 31(3): 342–348.
- [75] AHMAD S M. Conserved signaling mechanisms in *Drosophila* heart development[J]. *Developmental Dynamics*, 2017, 246(9): 641–656.
- [76] PARK S, BUSTAMANTE E L, ANTONOVA J, *et al.* Specification of *Drosophila* corpora cardiaca neuroendocrine cells from mesoderm is regulated by notch signaling[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(8): e1002241.
- [77] PIERPONT M E, BRUECKNER M, CHUNG W K, *et al.* Genetic basis for congenital heart disease: revisited: a scientific statement from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2018, 138(21): e653–e711.
- [78] COWAN J R, WARE S M. Genetics and genetic testing in congenital heart disease[J]. *Clinics in Perinatology*, 2015, 42(2): 373–393.
- [79] HOMSY J, ZAIDI S, SHEN Y F, *et al.* De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies[J]. *Science*, 2015, 350(6265): 1262–1266.
- [80] JIN S C, HOMSY J, ZAIDI S, *et al.* Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands[J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(11): 1593–1601.
- [81] SOUIDI A, JAGLA K. *Drosophila* heart as a model for cardiac development and diseases[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3078.
- [82] ZHU J Y, FU Y L, NETTLETON M, *et al.* High throughput *in vivo* functional validation of candidate congenital heart disease genes in *Drosophila*[J]. *eLife*, 2017, 6: e22617.
- [83] AKASAKA T, OCORR K, LIN L Z, *et al.* Overexpression of *Kif1A* in the developing *Drosophila* heart causes valvar and contractility defects: implications for human congenital heart disease[J]. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 2020, 7(2): 22.
- [84] SCHROEDER A M, ALLAHYARI M, VOGLER G, *et al.* Model system identification of novel congenital heart disease gene candidates: focus on *RPL13J*. *Human Molecular Genetics*, 2019, 28(23): 3954–3969.
- [85] KLINKE N, MEYER H, RATNAVADIVEL S, *et al.* A *Drosophila melanogaster* model for *TMEM43*–related arrhythmic right ventricular cardiomyopathy type 5[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, 79(8): 444.
- [86] AUXERRE–PLANTIÉ E, NIELSEN T, GRUNERT M, *et al.* Identification of *MYOM2* as a candidate gene in hypertrophic cardiomyopathy and tetralogy of Fallot, and its functional evaluation in the *Drosophila* heart[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2020, 13(12): dmm045377.
- [87] BHARUCHA K N. The epicurean fly: using *Drosophila melanogaster* to study metabolism[J]. *Pediatric Research*, 2009, 65(2): 132–137.
- [88] BIRSE R T, CHOI J, REARDON K, *et al.* High–fat–diet–induced obesity and heart dysfunction are regulated by the TOR pathway in *Drosophila*[J]. *Cell Metabolism*, 2010, 12(5): 533–544.
- [89] PICHÉ M E, TCHERNOF A, DESPRÉS J P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases[J]. *Circulation Research*, 2020, 126(11): 1477–1500.
- [90] GUIDA M C, BIRSE R T, DALL’AGNESE A, *et al.* Intergenerational inheritance of high fat diet–induced cardiac lipotoxicity in *Drosophila*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 193.
- [91] ZARNDT R, WALLS S M, OCORR K, *et al.* Reduced cardiac *calcineurin* expression mimics long–term hypoxia–induced heart defects in *Drosophila*[J]. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2017, 10(5): e001706.
- [92] PATERNOSTRO G, VIGNOLA C, BARTSCH D U, *et al.* Age–associated cardiac dysfunction in *Drosophila melanogaster*[J]. *Circulation Research*, 2001, 88(10): 1053–1058.
- [93] CANNON L, ZAMBON A C, CAMMARATO A, *et al.* Expression patterns of cardiac aging in *Drosophila*[J]. *Aging Cell*, 2017, 16(1): 82–92.
- [94] OCORR K, REEVES N L, WESSELLS R J, *et al.* KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2007, 104(10): 3943–3948.
- [95] TANG M, YUAN W Z, FAN X W, *et al.* Pygopus maintains heart function in aging *Drosophila* independently of canonical Wnt signaling[J]. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2013, 6(5): 472–480.