

食物供应量对转红色荧光蛋白基因唐鱼生存和生长的影响

樊佳佳 白俊杰* 简清 叶星

中国水产科学研究院珠江水产研究所

中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室 广州 510380

摘要:选取雄性杂合子转红色荧光蛋白基因唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) (简称:转基因唐鱼)与雌性非转基因唐鱼交配产卵,出膜 7 d 后,在水温 (25.0 ± 2.0) °C 条件下,选择健康仔鱼进行饱食(食物供应量大)、半饥饿(食物供应量中)和饥饿(食物供应量低)3 种处理,结果显示:(1)出膜后 7 ~ 72 d 的唐鱼饱食组与半饥饿组死亡率无显著差异 ($P > 0.05$),但饥饿组唐鱼死亡率均显著高于饱食组和半饥饿组 ($P < 0.01$),表明食物供应量影响唐鱼的生存能力;(2)红色荧光蛋白基因在唐鱼体内表达,肉眼观察,最早出现在出膜后第 30 天。在出膜后的 72 d,对 3 个处理组中没有表达红色荧光蛋白的唐鱼进行 PCR 验证,均没检测到沉默表达个体,此时 3 个处理组转基因唐鱼与非转基因唐鱼数量比均接近 1:1,符合经典的孟德尔单显性基因遗传模式,说明食物供应量多寡对转基因唐鱼与非转基因唐鱼生存影响效应是一致的;(3)出膜后 28、42、57 和 72 d,对 3 个不同处理组的唐鱼幼鱼体长进行比较,结果均是饱食组 > 半饥饿组 > 饥饿组,且组间差异显著或极显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而对 72 d 唐鱼幼鱼 3 个处理组内转基因唐鱼和非转基因唐鱼体长进行统计分析表明,3 个处理组内转基因唐鱼和非转基因唐鱼体长差异均不显著 ($P > 0.05$),表明食物供应量多寡对转基因唐鱼与非转基因唐鱼生长影响效应也是一致的。综上所述,食物供应量对唐鱼生存和生长是有影响的,但对转基因唐鱼和非转基因唐鱼影响效应是一致的,可见转基因唐鱼在食物供应量缺乏条件下并没有生存竞争优势。

关键词:转基因唐鱼;食物供应量;适合度;死亡率

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)02-108-06

Effects of Food Supply Level on Survival and Growth of Transgenic *Tanichthys albonubes* Expressing the Red Fluorescent Protein

FAN Jia-Jia BAI Jun-Jie* JIAN Qing YE Xing

Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,

Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fish Breeding & Cultivation, CAFS, Guangzhou 510380, China

Abstract: We assessed fitness of transgenic *Tanichthys albonubes* to food supply level using 7-days healthy larvae from crossing heterozygous transgenic *T. albonubes* expressing the red fluorescent protein to non-transgenic *T. albonubes*. The larvae were randomly divided into three groups: satiation group (high food supply level),

基金项目 国家高技术研究发展计划项目(No. 2009AA10Z105);

* 通讯作者, E-mail: jjbai@163.net;

第一作者介绍 樊佳佳,女,实习研究员;研究方向:水产动物繁育;E-mail: fanjiajiaok@163.com。

收稿日期:2010-09-14,修回日期:2010-12-29

semi-starvation group (medium food supply level) and starvation group (low food supply level) under $(25.0 \pm 2.0) ^\circ\text{C}$. The results showed that: (1) the mortality rate of 72-days of larvae in satiation group was not significantly different from those in semi-starvation group ($P > 0.05$), but larvae in starvation group was significant difference from both satiation group and semi-starvation group ($P < 0.01$). It indicates that food supply level affect the mortality rate of *T. albonubes*. (2) The red fluorescent protein was initially expression at 30-days larvae with visual inspection. The PCR method was used to make sure that there was no recessive expression in the three treatments at 72-days larval. At this point the number of transgenic and non-transgenic *T. albonubes* was close to the 1:1 ratio, and consistent with classical Mendelian inheritance model, which indicates that transgenic and non-transgenic *T. albonubes* are equally effected by food supply level. (3) The body length at 28-, 42-, 57- and 72-days larvae was satiation group > semi-starvation group > starvation group at significant or very significant level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The larvae body length of 72-days larvae has no significantly between transgenic and non-transgenic ones within the same food supply level group. In summary, the food supply level had similar influence on survival and growth of *T. albonubes* for both transgenic and non-transgenic. We speculate that transgenic *T. albonubes* have no competition advantage in the low food availability.

Key words: Transgenic *Tanichthys albonubes*; Food supply level; Fitness assessment; Mortality rate

自从 1984 年朱作言等^[1]率先研制出世界首例转基因鱼以来,研究者对许多鱼类品种进行了转基因研究。转基因鱼具有很多优良的经济性状,但在国内迄今尚无一例作为商品鱼释放到自然水体中进行商品化养殖,其原因之一在于对转基因鱼可能的生态风险的担忧。Muri 等^[2-5]提出,自然生态系统中种群生存力与繁殖力是转基因鱼生态风险评价重要的适合度参数,包括:幼鱼生存力、成鱼生存力、性成熟年龄、雌鱼怀卵量、雄鱼受精率和交配优势,该观点提出后,陆续有学者对转基因青鳉 (*Oryzias latipes*)^[6]、转基因银大马哈鱼 (*Onchorhynchus kisutch*)^[7] 和转基因鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)^[8] 等进行生态风险评估,均表明转基因鱼的生态风险较低。

2003 年本实验室简清等^[9]将红色荧光蛋白基因转入唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) 的受精卵,获得了可稳定遗传的红色体色的转红色荧光蛋白基因唐鱼(简称:转基因唐鱼)新品系,对该品系红色荧光蛋白基因的遗传传递规律进行研究表明,红色荧光蛋白基因在后代中能稳定遗传,分离规律符合孟德尔单显性基因遗传模式,外源基因属于单位点整合^[10];对转基因唐鱼和非转基因唐鱼的形态、生长速度、怀卵

量、产卵量及孵化率进行比较,结果显示均不存在显著性差异^[11];对转基因唐鱼在集群、性选择、耐温限度和窒息点方面的研究表明,转红色荧光蛋白基因的插入和表达对宿主唐鱼的影响不显著,其在生长、繁殖、集群、性选择和抗逆性方面均没有显著优势^[12-14]。但转基因唐鱼在食物缺乏的环境中的生存能力与非转基因唐鱼相比是否发生了变化并不清楚。

本文采用单因素实验设计,对同一家系后代中转红色荧光蛋白基因唐鱼和非转基因唐鱼幼鱼在不同食物供应量下的生存能力及生长速度进行了分析,探讨转基因唐鱼和非转基因唐鱼幼鱼在不同食物供应量环境下的适合度。

1 材料与方法

1.1 实验鱼 转基因唐鱼 F0 代是经显微注射将斑马鱼肌球蛋白轻链 2 启动子与红色荧光蛋白基因导入唐鱼受精卵获得的^[9,15]。选择 F5 代雄性杂合子转基因唐鱼和雌性非转基因唐鱼作为亲鱼鱼种,以“一配一”模式,把亲鱼置于玻璃缸配对繁殖,注水深度约 15 cm,水中放置水葫芦做鱼巢。观察繁殖缸中亲鱼的活动情况,见其交尾产卵后将受精卵吸出,置于培养皿中培养。待出膜仔鱼能够“平游”后转移到

1 000 ml 烧杯中喂以源牌 B. P. (广东越群海洋生物研究开发有限公司), 在出膜后第 7 天, 选择游泳正常、健康的仔鱼约 400 尾用以实验。

1.2 实验器材 规格为 30 cm × 20 cm × 18 cm 玻璃缸、1 000 ml 烧杯、水银温度计(精确到 0.1℃)、培养皿、吸管、解剖镜(Leiza zoom 2000)、SPX-430 智能型生物培养箱和佳能数码相机(Canon Power Shot-S3IS)等。

1.3 实验方法

1.3.1 实验鱼的饲养 实验在室内完成, 室温保持在(22 ~ 27)℃, 光照周期为 14L:10D, 在 30 cm × 20 cm × 18 cm 玻璃缸中培育, 注水深度约 12 cm, 养殖容积约为 7 200 cm³。实验期间 7 ~ 14 d 的幼鱼投喂源牌 B. P., 14 ~ 21 d 的幼鱼投喂源牌 B. P. 和丰年虾, 21 ~ 72 d 直接投喂丰年虾。每天投喂 3 次, 投喂时间分别为 8:30、13:30、16:30 时。实验用水为曝气 24 h 的自来水, 水温(25.0 ± 2.0)℃, 每天换水一次, 换水 1/3 ~ 2/3。连续充气, 仅在投喂时短暂暂停气。

1.3.2 实验设计 实验共设 3 组, 分别为饱食组(把源牌 B. P. 或丰年虾用水稀释放于烧杯, 搅匀, 然后用滴管逐滴投喂, 直到幼鱼由聚集抢食到散开沉入杯底, 停止投喂, 记下投喂量)、半饥饿组(投喂相同稀释浓度的源牌 B. P. 或丰年虾, 投喂方式同饱食组, 投喂量是饱食组的 1/2)和饥饿组(投喂相同稀释浓度的源牌 B. P. 或丰年虾, 投喂方式同饱食组, 投喂量是饱食组的 1/4), 实验时间是从唐鱼出膜后第 7 天到第 72 天。每组 30 尾幼鱼, 分别设 3 个重复。

1.3.3 PCR 扩增检测 对出膜后第 72 天没有表达红色荧光蛋白的唐鱼幼鱼剪取鳍条, 采用 TIANGEN 离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒介绍的方法提取基因组 DNA, 然后选择能够鉴别红色荧光蛋白基因的特异性引物 Red 对其进行特异性扩增(选取表达红色荧光蛋白基因唐鱼作为阳性对照), 扩增过程参照文献^[11], 鉴别是否有沉默表达个体。引物序列如下:

Red-F: 5'-GTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGT-3',

Red-R: 5'-CTACGGAACAGGTGGTGGCGG-3'。

1.4 数据统计 实验过程中每 7 天统计一次幼鱼的死亡率: 死亡率(%) = (初始实验幼鱼总数 - 计数时幼鱼总数) / 初始实验幼鱼总数 × 100%。采用 SPSS 17.0 统计软件的单因素方差分析(One-way ANOVA)对实验数据进行分析 and 作图, 分析每个处理组唐鱼幼鱼的死亡率和生长性状是否存在差异, 当达到显著差异时($P < 0.05$), 再进行 Duncan 多重比较, 检验组间差异, 数据均用平均值 ± 标准误表示。

2 结果

2.1 PCR 鉴定结果 用特异性引物 Red 对出膜后第 72 天没有表达红色荧光蛋白基因唐鱼幼鱼进行 PCR 扩增, 并设一表达红色荧光蛋白基因唐鱼作为对照, 结果表明表达红色荧光蛋白基因唐鱼能扩增出特异的 487 bp 片段, 而所有没有表达红色荧光蛋白唐鱼均没有扩增出该片段, 说明出膜后第 72 天的唐鱼无沉默表达现象, 部分扩增结果见图 1。

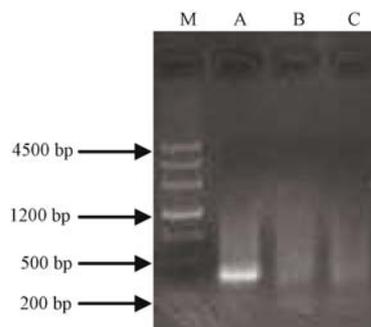


图 1 引物 Red PCR 扩增电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis analysis with primer Red

M: 核酸分子量标准; A: 表达红色荧光蛋白基因唐鱼的 PCR 扩增结果; B 和 C: 未表达红色荧光蛋白基因唐鱼的 PCR 扩增结果。

M: Marker; A: *Tanichthys albonubes* expressing the red fluorescent protein; B and C: *T. albonubes* no expressing the red fluorescent protein.

2.2 食物供应量对实验鱼死亡率影响 所观察的 3 种食物供应量下幼鱼死亡率的变化规律见图 2, 7 ~ 21 d 的唐鱼幼鱼在 3 个实验组死亡

率均较高,21 d 后各组死亡率均有所下降,但饥饿组死亡率明显高于饱食组和半饥饿组,而饱食组和半饥饿组之间死亡率变化差异不显著。

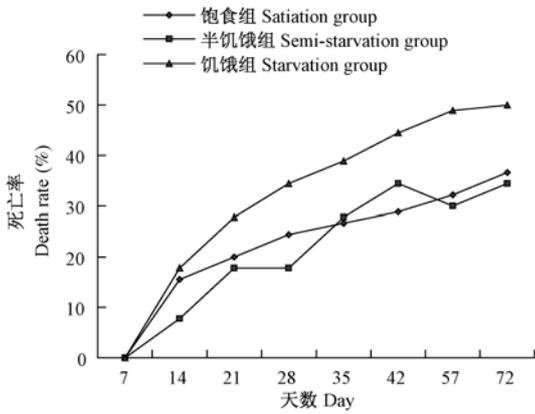


图2 不同食物供应量下幼鱼的死亡率变化
Fig.2 Change of death rate of larvae in different food supply level

2.2 食物供应量对实验鱼红色荧光蛋白表达的影响 对各实验组进行观察,发现肉眼可观察到红色荧光蛋白表达的唐鱼最早出现在出膜后第30天,对出膜后42、57和72 d时,3个实验组的表达个体数进行统计分析(图3),结果表明,随着实验时间增加,3个实验组中表达红色荧光蛋白的唐鱼数量逐渐增加,饱食组和半饥饿组在42、57和72 d红色荧光的表达比例基本一样,但饥饿组在42 d和57 d表达红色荧光蛋白唐鱼的比例相对饱食组和半饥饿组要低。在出膜后72 d时,表达红色荧光蛋白基因的唐鱼均接近群体的50%。

2.3 食物供应量对转基因唐鱼生长影响 从出膜后第28天开始对3个实验组鱼体的体长进行统计(图4),结果表明,3个实验组体长均表现出饱食组 > 半饥饿组 > 饥饿组,通过统计

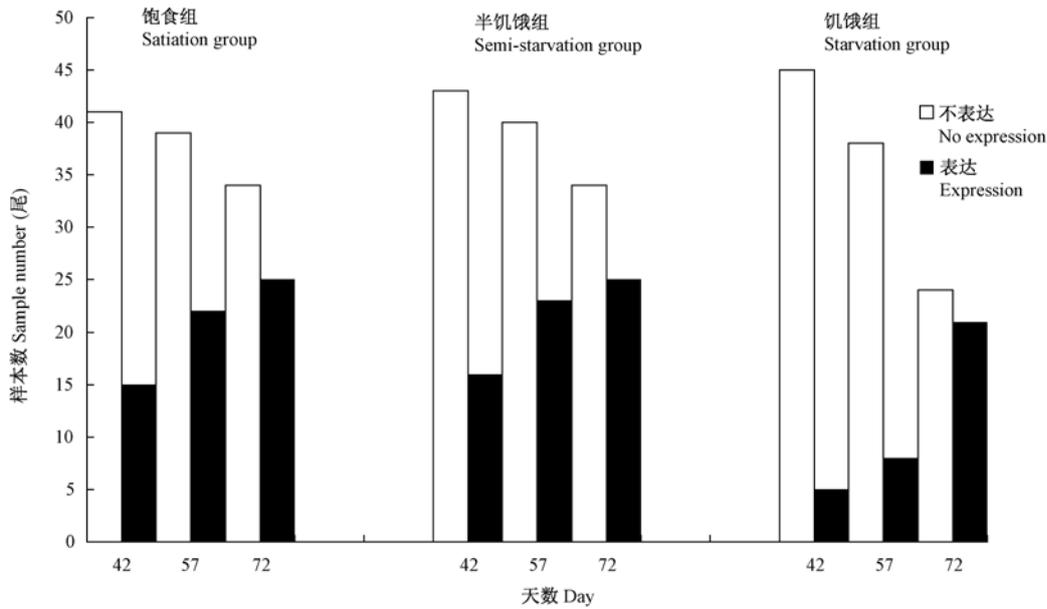


图3 不同食物供应量下的表达结果
Fig.3 The results of positive rate in different food supply level

分析得到,出膜后42、57和72 d 3个实验组体长的差异均极显著($P < 0.01$)。

对出膜后42、57和72 d表达红色荧光蛋白和不表达红色荧光蛋白唐鱼幼鱼的体长进行统计分析(表1),表明在出膜后42 d,饱食组、

半饥饿组和饥饿组中表达红色荧光蛋白的唐鱼和不表达红色荧光蛋白的唐鱼的体长差异均显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且均是表达红色荧光蛋白唐鱼个体显著大于不表达红色荧光蛋白唐鱼个体;而出膜后57 d和72 d唐鱼

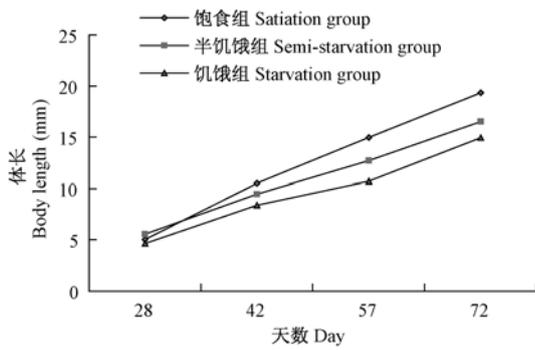


图 4 转基因唐鱼幼鱼的生长曲线
Fig. 4 The growth curves of juvenile transgenic *Tanichthys albonubes*

幼鱼在 3 个实验组中表达红色荧光蛋白唐鱼和不表达红色荧光蛋白唐鱼的体长差异均不显著 ($P > 0.05$), 但出膜后 57 d 幼鱼均是表达红色荧光蛋白唐鱼平均值略大于不表达红色荧光蛋白唐鱼, 而出膜后 72 d 红色转基因唐鱼和非转基因唐鱼的体长基本一致。

3 讨 论

全同胞家系因遗传背景基本一致, 是进行相关性状分析的理想实验材料^[16-19], 本研究对转基因唐鱼测交后代中有红色荧光蛋白基因表达的转基因唐鱼幼鱼和未有红色荧光蛋白基

表 1 不同表现型唐鱼的体长的多重比较

Table 1 Multiple comparisons of body length in different phenotypic *Tanichthys albonubes*

天数 Day	显性 Color development	体长 Body length (mm)		
		饱食组 Satiating group	半饥饿组 Semi-starvation group	饥饿组 Starvation group
42	表达 Expression	12.25 ± 0.76 ^a	10.89 ± 0.47 ^A	11.31 ± 0.80 ^A
	不表达 No expression	10.06 ± 0.40 ^b	8.93 ± 0.29 ^B	7.79 ± 0.36 ^B
57	表达 Expression	15.66 ± 0.72 ^a	13.38 ± 0.60 ^a	11.29 ± 0.77 ^a
	不表达 No expression	14.48 ± 0.63 ^a	12.33 ± 0.45 ^a	10.51 ± 0.48 ^a
72	表达 Expression	20.03 ± 0.73 ^a	17.29 ± 0.42 ^a	14.57 ± 0.45 ^a
	不表达 No expression	18.92 ± 0.56 ^a	15.95 ± 0.36 ^a	15.26 ± 0.41 ^a

同一列数值中, 上标含相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

The values with the same superscript letters in the same column were not significantly different ($P > 0.05$), the different small letter represents $P < 0.05$, the different capital letter represents $P < 0.01$.

因表达的非转基因唐鱼幼鱼在相同环境胁迫下生存和生长性能进行比较, 因转基因唐鱼除含有外源基因外, 与非转基因唐鱼的遗传背景基本相同, 从而消除不同的遗传背景对实验的影响。

本研究对唐鱼幼鱼在不同食物供应量下的生存能力和生长性能进行比较得出饥饿唐鱼幼鱼的死亡率要明显高于饱食和半饥饿状态的唐鱼, 而饱食和半饥饿状态唐鱼幼鱼的生存率基本一样, 这表明唐鱼具有较强的耐饥饿能力, 这与陈国柱等^[20-21]的研究结果一致。而转红色荧光蛋白基因唐鱼和非转基因唐鱼在不同食物供应量下的成活率是没有差异的。

分析不同食物供应量下表达红色荧光蛋白

唐鱼幼鱼的生长性状, 结果表明, 在食物供应量低的环境下, 唐鱼生长受一定程度影响, 红色荧光蛋白表达也相对推迟, 但最终 3 个实验组的红色荧光蛋白表达率均接近 50%, 说明食物供应量对转基因唐鱼与非转基因唐鱼生长的影响效果是一样的。换句话说, 在食物供应量比较低的情况下, 红色荧光蛋白基因表达时间会推迟, 但对转基因唐鱼和非转基因唐鱼的生长影响效果是一致的。从食物供应量对转基因唐鱼的仔鱼成活率和生长效果的研究结果我们推测即使将转基因唐鱼释放到野外, 并不存在比野生唐鱼有更强的生存竞争优势。

本文通过比较在不同食物供应量下转基因唐鱼生存竞争能力, 为转基因唐鱼生态安全评

估奠定基础,但对转基因唐鱼进入到野外环境中是否会对环境和生态造成潜在威胁,还要进一步对其游泳能力、躲避敌害能力和捕食能力等方面进行全面安全评估,以期尽快实现转基因唐鱼的商品化做好坚实基础。

参 考 文 献

- [1] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 1985, 1: 31 - 34.
- [2] Muir W M, Howard R D. Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: sexual selection and the Trojan gene hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(24): 13853 - 13856.
- [3] Stokstad E. Engineered fish: Friend or foe of the environment? *Science*, 2002, 297(5588): 1797 - 1798.
- [4] Maclean N, Laight R J. Transgenic fish: An evaluation of benefits and risks. *Fish and Fisheries*, 2000, 1(2): 146 - 172.
- [5] Kapuscinski A R. Current scientific understanding of the environmental biosafety of transgenic fish and shellfish. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 2005, 24(1): 309 - 322.
- [6] Muir W M, Howard R D. Fitness components and ecological risk of transgenic release: a model using Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *American Nature*, 2001, 158(1): 1 - 16.
- [7] Devlin R H, D' Andrade M, Uh M, et al. Population effects of growth hormone transgenic coho salmon depend on food availability and genotype by environment interactions. *Ecology*, 2004, 101(25): 9303 - 9308.
- [8] Li D L, Fu C Z, Hu W, et al. Rapid growth cost in "all-fish" growth hormone gene transgenic carp: Reduced critical swimming speed. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(11): 1501 - 1506.
- [9] 简清, 白俊杰, 叶星, 等. 斑马鱼 Myl2 启动子的克隆与转绿色荧光蛋白基因鱼的构建. *中国水产科学*, 2004, 11(5): 391 - 395.
- [10] 陈敏, 白俊杰, 姜鹏, 等. 红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼中的表达. *大连水产学院学报*, 2009, 24(1): 59 - 63.
- [11] 陈敏, 白俊杰, 何小平, 等. 转红色荧光蛋白基因唐鱼的遗传分析和生物学研究. *上海海洋大学学报*, 2009, 18(6): 649 - 654.
- [12] 姜鹏, 陈敏, 白俊杰, 等. 外源性红色荧光蛋白基因在转基因唐鱼中的整合分析. *农业生物技术学报*, 2010, 18(5): 968 - 974.
- [13] 姜鹏, 白俊杰, 樊佳佳. 转红色荧光蛋白基因与野生型唐鱼耐温限度及窒息点的比较研究. *水生态学杂志*, 2010, 3(6): 92 - 95.
- [14] Jiang P, Bai J J, Ye X, et al. Shoaling and mate choice of wild-type *Tanichthys albonubes* in the presence of the red fluorescent transgenic conspecifics. *Journal of Fish Biology*, 2011, 78(1): 127 - 137.
- [15] 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立. *中国科学: B 辑*, 1989, (2): 147 - 155.
- [16] 张存善, 杨小刚, 宋坚. 虾夷扇贝家系的建立及不同家系的早期生长研究. *南方水产*, 2008, 4(5): 44 - 50.
- [17] 闫喜武, 王琦, 张跃环, 等. 中国蛤蚧的家系建立及早期生长发育. *水产学报*, 2010, 34(4): 521 - 530.
- [18] 陈松林, 田永胜, 徐田军. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定. *水产学报*, 2008, 32(5): 665 - 673.
- [19] 张吕平, 吴立峰, 沈琪, 等. 凡纳滨对虾全同胞家系的建立及生长比较. *水产学报*, 2009, 33(6): 932 - 939.
- [20] 陈国柱, 方展强, 马广智. 唐鱼仔鱼对饥饿的应对策略研究. *华南师范大学学报: 自然科学版*, 2006, (1): 108 - 113.
- [21] 陈国柱, 方展强. 饥饿对唐鱼仔鱼摄食和生长的影响. *动物学杂志*, 2007, 4(5): 49 - 61.