

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20201215003

董姗姗, 章嫡妮, 于赐刚, 等. 转 *Cry1Ie* 基因玉米和转 *CP4-EPSPS* 基因大豆对斑马鱼的生态毒性[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(5): 271-284

Dong S S, Zhang D N, Yu C G, et al. Ecotoxicological effects of transgenic *Cry1Ie* maize and transgenic *CP4-EPSPS* soybean on zebrafish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(5): 271-284 (in Chinese)

转 *Cry1Ie* 基因玉米和转 *CP4-EPSPS* 基因大豆对斑马鱼的生态毒性

董姗姗, 章嫡妮, 于赐刚, 王长永, 刘燕*

生态环境部南京环境科学研究所, 环境保护生物安全重点实验室, 南京 210042

收稿日期: 2020-12-15 录用日期: 2021-01-29

摘要: 为评估转 *Cry1Ie* 基因抗虫玉米和转 *CP4-EPSPS* 基因耐除草剂大豆对鱼类的生态毒理效应, 以斑马鱼 (*Danio rerio*) 为受试动物, 配制 4 种分别含有转基因玉米、转基因大豆以及相应非转基因亲本的试验饲料, 并以商业饲料为对照, 通过 98 d 喂养实验, 调查斑马鱼的摄食、生长、繁殖和抗氧化酶活性, 分析不同喂养阶段斑马鱼的组织病理和敏感蛋白 mRNA 表达水平。结果表明: 抗虫转基因玉米和耐除草剂转基因大豆对斑马鱼的生长表现、肝脏、肠道和性腺的组织病理、产卵量和受精卵孵化率均无显著影响。转基因大豆组斑马鱼肝脏中的超氧化物歧化酶(SOD)活性显著高于非转基因大豆组和商业饲料组, 且雄鱼显著高于雌鱼 ($P < 0.05$)。斑马鱼脏器组织中敏感蛋白 mRNA 的表达水平, 没有随时间呈现明显的规律性变化, 喂养时间与组别和性别之间存在显著的交互作用。试验饲料组斑马鱼的生长表现、肝脏中 SOD 活性以及 mRNA 表达量与商业饲料组相比有显著差异, 可能与饲料的适口性和营养成分上的差异有关。总体上看, 转 *Cry1Ie* 基因抗虫玉米和转 *CP4-EPSPS* 基因耐除草剂大豆对斑马鱼没有明显的生态毒性效应。

关键词: 抗虫转基因玉米; 耐除草剂转基因大豆; 斑马鱼; 生态毒理效应

文章编号: 1673-5897(2021)5-271-14 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Ecotoxicological Effects of Transgenic *Cry1Ie* Maize and Transgenic *CP4-EPSPS* Soybean on Zebrafish

Dong Shanshan, Zhang Dini, Yu Cigang, Wang Changyong, Liu Yan*

Key Laboratory on Biosafety of Environmental Protection, Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China

Received 15 December 2020 accepted 29 January 2021

Abstract: To evaluate the ecotoxicological effects of transgenic *Cry1Ie* insect-resistant maize and transgenic *CP4-EPSPS* herbicide-tolerant soybean on fish, zebrafish (*Danio rerio*) was used as a model animal and four experimental diets, including genetically modified (GM) maize, GM soybean, and corresponding near-isogenic non-GM lines were prepared respectively. A commercial feed was used as a reference diet. The feed intake, growth, reproduction, and antioxidant enzyme activity were investigated during a 98-day feeding trial. The histopathology and mRNA expression levels of sensitive protein were analyzed at different feeding stages. The results revealed that insect-resistant

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08011-003); 国家环境保护公益性行业科研专项(201309038)

第一作者: 董姗姗(1982—), 女, 博士研究生, 研究方向为转基因生物安全, E-mail: dongss306@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: liuyan@nies.org

ant GM maize and herbicide-resistant GM soybean had no significant effects on growth performance, histopathology of the liver, intestinal tract, and brain, fecundity, and hatching rate of fertilized eggs. The activity of superoxide dismutase (SOD) was significantly higher in the liver of zebrafish fed with GM soybean compared with in those fed with the non-GM soybean and commercial diets, and was higher in male than in female fish ($P < 0.05$). There were no obvious regular changes over time of mRNA expression levels of sensitive protein in zebrafish organ tissues. There were significant interaction effects between feeding duration, diet, and sex. When comparing experimental diets and commercial feed, we detected significant differences in growth performance, SOD activity in the liver, and mRNA expression levels, which may be related to the differences in palatability and nutrient composition of diets. In general, transgenic *CryIle* insect-resistant maize and transgenic *CP4-EPSPS* herbicide-tolerant soybean have no obvious ecotoxicological effects on zebrafish.

Keywords: insect-resistant GM maize; herbicide-resistant GM soybean; zebrafish; ecotoxicology

以转基因技术为核心的现代生物技术为保障粮食安全、推动农业可持续发展提供了新的途径。2019年,全球4种主要转基因作物——棉花、大豆、玉米和油菜的平均应用率为52.8%,其中转基因大豆和转基因玉米的应用率分别为74%和31%^[1]。转基因作物大规模商业化种植的潜在生态环境风险已引起了人们的广泛关注。目前,转基因作物的环境安全评价仍主要集中在陆地生态系统,对水生生态系统的研究相对匮乏。

转基因作物中的外源蛋白可通过植物残体、花粉和根际分泌物等途径进入农田土壤和水体,并随地表径流和地表径流沉积物进入邻近水域。已有研究显示,转 *Bt* 玉米田间的地表水和沉积物中 *Cry1Ab* 蛋白浓度可分别达 $130 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $143 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[2-4],玉米田附近河流中淡水河蚌的腮、性腺和消化腺等组织内均能检测到 *cry1Ab* 基因的存在^[5]。转基因蛋白在水体中的存续和累积可能对水生生物的安全构成潜在风险。此外,转基因作物的凋落物和残体可以为水生动物直接或间接地提供食物,是其邻近水域内生物群落重要的能量和营养来源,长期大规模种植转基因作物可能会诱发影响水生动物群落结构、种群数量以及摄食行为等诸多因子的变化^[6]。鱼类是水生生态系统的重要生物组成之一,通过检测鱼类生理和行为反应可以有效监测水环境质量的变化^[7]。近年来,已有研究以鱼类为模式动物评价转基因作物的生态毒理效应,大多数研究是通过开展转基因作物的饲喂实验,调查鱼类的生长表现、组织病理、脏器发育、运动行为、应激和免疫反应以及繁殖能力等,评估转基因作物的外源基因及其表达蛋白对鱼类的安全性^[8-9]。在调查鱼类的各项指标时,通常是在饲喂实验结束时,集中采集样本

进行检测分析,没有对喂养期间鱼类的生长、发育、病理以及生理等方面的变化进行动态监测,这可能会影响最终的结果判定。而且,在鱼类的不同生长发育时期,其摄取转基因饲料后的反应可能会不同^[10-11]。对喂养期间鱼类的生长发育、生理等指标进行跟踪监测,更有利于全面评估转基因作物的潜在生态毒性或非预期效应。

斑马鱼(*Danio rerio*)基因组与人类基因组具有较高同源性,是发育生物学、毒理学、基因功能以及人类代谢疾病研究中的理想模型^[12-13]。由于斑马鱼体型小、世代周期短、易于饲养和繁殖,近些年也被推荐作为转基因作物安全性评价中的模式动物^[14-15]。本研究以斑马鱼为受试动物,以我国自主研制的转 *CryIle* 基因玉米 IE09S034 和转 *CP4-EPSPS* 基因大豆中作 J9331 为原料分别配制饲料,检测转基因饲料的营养成分和霉菌毒素含量,通过 98 d 的喂养实验,调查斑马鱼的摄食、生长、抗氧化酶活性和繁殖等指标,分析不同喂养阶段斑马鱼的组织病理及敏感蛋白 mRNA 表达水平,探讨转基因作物对鱼类的生态毒理效应,为转基因作物对水生动物的环境安全评价提供技术支撑。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验材料

供试的玉米材料为转 *CryIle* 基因抗虫玉米 IE09S034 及其非转基因近等基因系综 31,供试的大豆材料为转 *CP4-EPSPS* 基因耐除草剂大豆中作 J9331 及其非转基因近等基因系中黄 30,均由中国农业科学院作物科学研究所提供。

受试动物为野生型 AB 品系斑马鱼,由中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心购买的种鱼所繁殖。幼鱼开口期的饵料为草履虫(*Parameci-*

um caudatum), 孵化出 20 d 后喂食丰年虫(*Artemia salina*), 每天早、中、晚喂食 3 次。幼鱼在静水中饲养 30 d 左右, 转移至斑马鱼养殖系统(Aquatic habitats ZF0601, Apopka, FL, USA)中养殖, 该系统为循环水, 每天换水量为 10%。鱼龄达到 60 d 时开始喂食商业颗粒饲料, 每天喂食量为其体质量(湿质量)的 4%。斑马鱼鱼龄达到 90 d 时开始试验, 测量受试鱼初始体质量和体长。

1.2 试验饲料的制备及检测

试验饲料制备前, 对所有玉米和大豆材料的主要营养成分进行检测, 为后续饲料配制提供参考。根据美国国家研究委员会(National Research Council, NRC)制定的鱼类营养需求标准配制人工饲料^[16], 饲料配方如表 1 所示。饲料加工前, 将玉米和大豆种子用商用磨粉机(FLBP-250, 上海菲力博)打磨成粉, 过 100 目筛网备用, 加工时先将明胶和加丽素红溶于 80 ℃ 左右的纯净水中, 搅拌均匀, 然后按照比例“由小到大”的顺序依次填加表 1 中的其他饲料成分, 添加过程中用搅拌机不断搅拌使其充分混合, 混合均匀的饲料用家用料理机制作成直径 1.5 mm 的条状, 平铺于托盘上, 置于阴凉处自然风干, 再根据斑马鱼口径大小进行研磨和过筛, 使饲料颗粒直径为 450 ~ 550 μm, 4 ℃ 冷藏。商业颗粒饲料

为购买自日清丸红(天津)饲料科技有限公司的热带鱼饲料, 主要成分为鱼粉、豆粕、小麦淀粉、鱼肝油、复合维生素及矿物质等。通过酶联免疫法(ELISA)检测抗虫转基因玉米饲料中的 Cry1IE 蛋白, ELISA 试验的单克隆抗体和检测方法均由中国农业科学院作物科学研究所刘允军博士提供。采用 CP4-EPSPS 蛋白检测试纸条(Agdia Elkhart, IN, USA)检测耐除草剂转基因大豆饲料中的 CP4-EPSPS 蛋白。同时, 采用转基因蛋白检测试纸条(Agdia Elkhart, IN, USA)检测了商业饲料中的 Cry1Ab/Ac 及 CP4-EPSPS 外源蛋白。对转基因和非转基因玉米饲料中伏马毒素 B1(FB1)、黄曲霉毒素 B1(AFB1)、玉米赤霉烯酮(ZEB)和呕吐毒素(DON)的含量也进行了检测(英格尔检测技术服务(上海)有限公司)。

1.3 试验设计

选择体质量和体长相近的斑马鱼随机分成 5 组, 即转基因玉米组(GMM)、非转基因玉米组(Non-GMM)、转基因大豆组(GMS)、非转基因大豆组(Non-GMS)和商业饲料对照组(CF), 每组设置 3 个平行(3 缸), 每缸 50 条斑马鱼(10 L)。试验期间的饲养条件与幼鱼期饲养条件保持一致, 试验周期为 98 d。每天喂食量为受试鱼初始体质量的 3% ~ 4%, 分 3 次投喂(8:30、12:30、16:30), 并根据受试鱼体质量的变化

表 1 试验饲料配方成分和比例(%)

Table 1 Composition and proportion (%) of the experimental feeds

成分 Ingredient	转基因玉米组(GMM) Genetically modified maize (GMM)	非转基因玉米组 (Non-GMM) Non-genetically modified maize (Non-GMM)	转基因大豆组 (GMS) Genetically modified soybean (GMS)	非转基因大豆组 (Non-GMS) Non-genetically modified soybean (Non-GMS)
转基因玉米 Genetically modified maize	22	—		
非转基因玉米 Non-genetically modified maize	—	22		
转基因大豆 Genetically modified soybean			22	—
非转基因大豆 Non-genetically modified soybean			—	22
鱼粉 Fish meal	23	23	20	20
酪蛋白 Casein sodium salt	28	28	20	20
明胶 Gelatin	12	12	12	12
花生油 Peanut oil	5	5		
淀粉 Starch			14	14
鱼肝油 Cod-liver oil	3	3	5	5
矿物质/维生素/氨基酸 Mineral mix/Vitamins/Amino acid mix	6	6	6	6
加丽素红 Carophyll red	1	1	1	1

调整喂食量。试验期间每天对斑马鱼的游动、集群、栖息水层、食性及外观的状况进行观察,并记录身体异常(如呼吸急促、不协调的游动和反常的静止)和死亡情况等。试验期间斑马鱼养殖系统的水温为 $(27.2 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, pH 为 7.2 ± 0.4 、电导率为 $(507 \pm 18) \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$,溶解氧为 $(10.2 \pm 1.1) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,符合斑马鱼生长条件。

1.4 生长指标的测定

在试验开始后的第14、28、42、56、70、84和98天,每缸随机选取10条斑马鱼称量(湿质量)、测量体长,并根据测得的数据计算特定增长率和饲料转化率。

1.5 组织病理学分析

在试验开始后的第28、56和98天,将斑马鱼禁食12h后,每缸随机选取4条固定于10%的福尔马林溶液中,脱水处理后将整条鱼横切成头、胸腹、臀和尾4段,然后用石蜡包埋机(HistoStar, Thermo Fisher Scientific, USA)进行组织蜡块包埋,再利用全自动石蜡切片机(Shandon Finesse, Thermo Fisher Scientific, USA)切为 $4 \mu\text{m}$ 左右的连续切片,采用苏木精-伊红(HE)将石蜡切片染色,最后在荧光显微镜(DX45, Olympus, Japan)下进行组织病理学检查。根据检查结果,按照病变由轻到重的程度进行打分,分别标记为1、2、3和4分,无明显病变为0分,极轻度病变为0.5分。

1.6 繁殖指标检测

每缸随机选取5对斑马鱼按照雌雄比1:2进行配对产卵,从试验的第70天开始至喂养结束,每14d配对一次,总共配3次,记录每对斑马鱼的产卵量、孵化率、孵化出仔鱼的畸形和异常行为等。

1.7 肝脏和肠道超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性测定

在试验开始后的第98天,每缸随机选取雌性和雄性斑马鱼各2条,大体解剖后取其肝脏和肠道组织样本,分别采用SOD试剂盒(Sigma, USA)和CAT试剂盒(Biovision, USA)检测雌、雄鱼肝脏和肠道组织中的SOD和CAT活性。

1.8 斑马鱼脏器组织中SOD、CAT和热激蛋白70(HSP70) mRNA表达量检测

在试验开始后的第28、56和98天,每缸随机选取雌性和雄性斑马鱼各3条,大体解剖后取其肝脏、肠道和性腺组织样本,采用微量RNA提取试剂盒(Qiagen, Germany)提取脏器组织的总RNA。通过微量分光光度计(DS-11, DeNovix, USA)和琼脂糖凝

胶电泳,检测RNA的纯度和完整性。RNA经反转录合成cDNA后,采用实时荧光定量PCR检测斑马鱼肝脏、肠道和性腺组织中SOD、CAT和HSP70的mRNA表达水平,以actin为内参基因,采用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算SOD、CAT和HSP70的mRNA表达量,其中 $\Delta\Delta C_T = (C_{T\text{目的基因}} - C_{T\text{内参基因}})_{\text{试验组}} - (C_{T\text{目的基因}} - C_{T\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$,各基因的特异性引物序列和检测方法均参照董姗姗等^[17]的方法。

1.9 数据统计与分析

根据斑马鱼体质量和摄食量计算特定生长率(special growth rate, SGR)和饲料转化率(feed conversion ratio, FCR),特定生长率和饲料转化率计算公式如下:

$$\text{SGR} = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100$$

$$\text{FCR} = C / (W_t - W_0)$$

式中: W_t 和 W_0 分别为试验结束时和试验开始时的鱼体湿质量(mg); t 为试验时间(d); C 为摄食量(mg)。

采用多因素方差分析(multi-way ANOVA)分别检验玉米组(包括转基因玉米组、非转基因玉米组和商业饲料对照组)和大豆组(包括转基因大豆组、非转基因大豆组和商业饲料对照组)中组别、性别、取样时间以及它们之间的交互作用对不同脏器组织中敏感蛋白mRNA表达量和抗氧化酶活性的影响。单因素方差分析(one-way ANOVA)检验不同组别斑马鱼的体质量、体长、特定生长率、饲料转化率、组织病理以及繁殖等指标的差异,显著性水平设为 $\alpha = 0.05$,若检验结果显著,则采用Tukey法进行不同组别间的多重比较。利用独立样本 T 检验(T -test)比较雌性和雄性斑马鱼脏器组织中敏感蛋白mRNA表达量及抗氧化酶活性的差异($\alpha = 0.05$)。以上分析均使用SPSS 19.0统计软件完成。试验数据用平均数 $\pm$ 标准误表示。

2 结果与分析(Results and analysis)

2.1 试验饲料的营养成分、霉菌毒素含量以及外源基因表达蛋白

饲料营养成分的分析结果显示,转基因饲料与相应的非转基因饲料在主要营养成分上没有明显差异,且都能够满足斑马鱼的生长需求(表2),但与商业饲料相比,人工饲料中的粗蛋白、粗脂肪和粗灰分含量明显偏低,而淀粉含量明显偏高。对转基因和非转基因玉米饲料中霉菌毒素的检测结果显示,非转基因玉米饲料中的FB1、DON和AFB1含量略高于转基因玉米饲料中的,不过两者均远低于《饲料

卫生标准》(GB 13078—2017)中规定的最高限量水平(表 2)^[18]。在转基因玉米饲料和转基因大豆饲料中均检测到了外源基因表达蛋白,而相应的非转基因饲料和商业饲料中 Cry1Ac 和 CP4-EPSPS 蛋白呈阴性(表 2)。

2.2 生长表现

受试斑马鱼的初始平均体质量和体长分别为(124.78±4.69) mg 和(23.0±0.3) mm,在试验期间各组斑马鱼的体质量和体长均呈明显增加趋势。转基因组与相应非转基因组斑马鱼的各项生长指标整体上无显著差异(图 1),但在试验 98 d 时,转基因玉米组斑马鱼体质量显著低于非转基因玉米组的($P<0.05$),与商业饲料组相比,人工饲料组斑马鱼的体长、体质量和特定生长率均显著偏低,饲料转化率显著偏高(图 1)。

2.3 组织病理

斑马鱼肝脏、肠道和脑组织的病理检测结果整体上为无明显病变、极轻度或轻度病变。肝脏病变主要表现为肝细胞脂变,多数为轻度,少数为中度,个别重度。少数斑马鱼肠壁黏膜上皮中的杯状细胞数量增多,提示肠道黏液分泌增加。各组斑马鱼脑组织神经细胞和白质未见明显病变,只在试验 28 d 时非转基因玉米组有 1 条受试鱼的个别神经细胞坏死。对组织病理评分的方差分析结果显示,在试验 56 d 时,商业饲料组斑马鱼肠道病变程度显著高于转基因大豆组($P<0.05$)(表 3),其他取样时间点各组

间斑马鱼肝脏、肠道和脑组织病变程度无显著差异。随着试验时间推移,各组肝脏病变(肝细胞脂变)程度有加重趋势(表 3)。

2.4 繁殖指标

斑马鱼配对产卵结果显示,在每组随机选取的 45 对斑马鱼中,转基因和非转基因玉米组有 75% 左右的雌鱼产卵,转基因和非转基因大豆组有 68% 左右的雌鱼产卵,商业饲料组有 84% 产卵,转基因饲料组与非转基因饲料组的平均产卵量和受精卵孵化率均无显著差异(图 2),不过试验饲料组的产卵量和孵化率与商业饲料组相比整体偏低(135±15 vs 175±23, (53.1±4.5)% vs (60.8±2.3)%),各组孵化出的幼鱼均未见身体畸形和明显异常行为。

2.5 肝脏和肠道中抗氧化酶活性

玉米组多因素方差分析结果显示(表 4),组别和性别对斑马鱼肠道中的 SOD 酶活有显著影响,非转基因玉米组斑马鱼 SOD 酶活显著高于商业饲料组的,商业饲料组雌鱼 SOD 酶活相对于雄鱼显著偏低。性别以及性别与组别的交互作用对玉米组斑马鱼肠道中的 CAT 酶活有显著影响,即在不同组别中,雌鱼和雄鱼的表现不一致, T 检验发现仅在转基因玉米组中雌鱼肠道中的 CAT 酶活显著高于雄鱼(图 3)。大豆组多因素方差分析结果显示(表 4),组别和性别对斑马鱼肝脏中的 SOD 酶活有显著影响,转基因大豆组显著高于非转基因大豆组和商业饲料组,雄鱼的 SOD 酶活显著高于雌鱼。

表 2 饲料的营养成分、外源蛋白和霉菌毒素含量

Table 2 Nutrient composition, exogenous protein and the content of mycotoxins of the diets

成分 Components	GMM	Non-GMM	GMS	Non-GMS	CF
干物质/% Dry matter/%	88.5	89	88.5	88.6	95.4
粗蛋白/% Crude protein/%	56	54.5	50.7	53	57.8
粗脂肪/% Crude lipid/%	9	11.2	11.1	10.9	15.9
淀粉/% Starch/%	10.3	11	12.4	12.2	1.2
粗灰分/% Crude ash/%	8	7.8	7.8	8.3	14
维生素 B6/(mg·kg ⁻¹) Vitamin B6/(mg·kg ⁻¹)	20.6	22.8	9.31	7.73	15
铁/(mg·kg ⁻¹) Iron/(mg·kg ⁻¹)	257	292	224	289	866
锰/(mg·kg ⁻¹) Manganese/(mg·kg ⁻¹)	12	12	17	17	53
锌/(mg·kg ⁻¹) Zinc/(mg·kg ⁻¹)	34	34	32	32	238
伏马毒素 B1/(mg·kg ⁻¹) Fumonisin B1/(mg·kg ⁻¹)	1.09	2.04	—	—	—
玉米赤霉烯酮/(μg·kg ⁻¹) Zearalenone/(μg·kg ⁻¹)	0.94	0.95	—	—	—
呕吐毒素/(μg·kg ⁻¹) Deoxynivalenol/(μg·kg ⁻¹)	3.65	28.29	—	—	—
黄曲霉毒素 B1/(μg·kg ⁻¹) Aflatoxin B1/(μg·kg ⁻¹)	ND	0.28	—	—	—
外源蛋白 Foreign protein	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative	阴性 Negative

注:CF 是商业饲料组。

Note: CF is commercial feed.

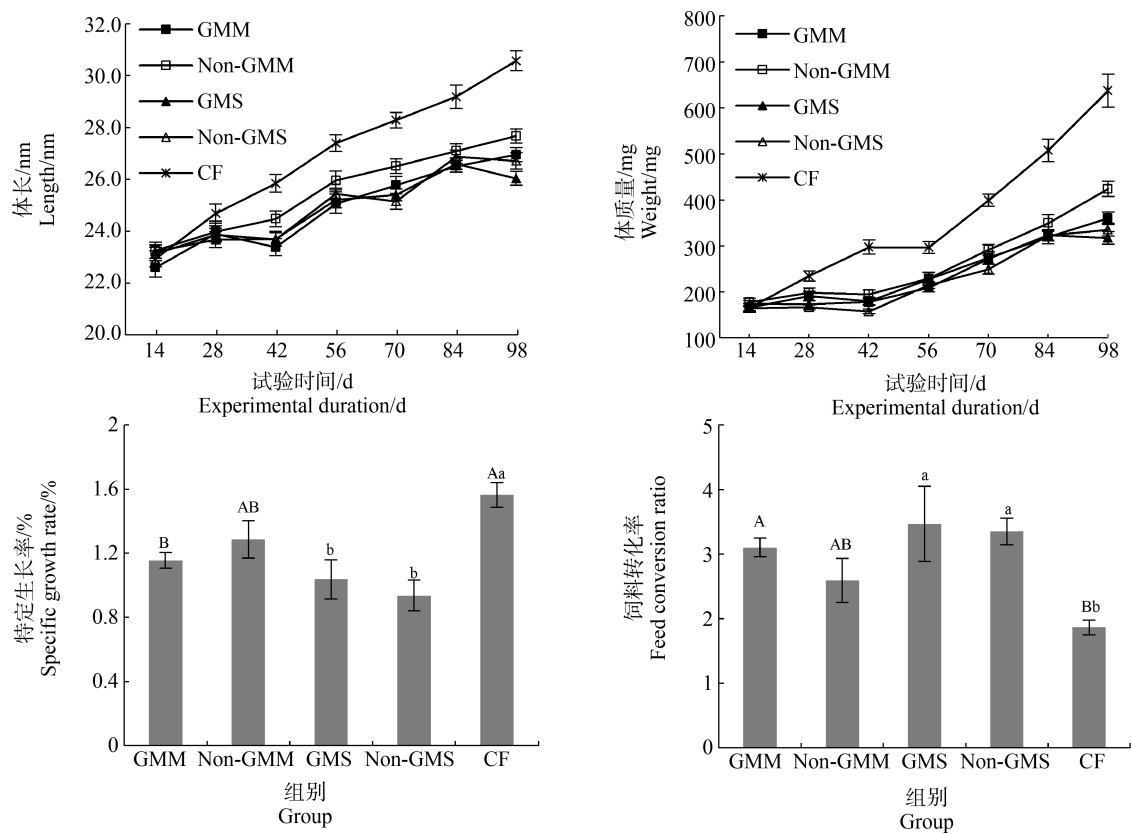


图 1 不同组别斑马鱼的体长、体质量、特定生长率和饲料转化率

注:不同大写字母表示转基因玉米组、非转基因玉米组和商业饲料组之间在 $P<0.05$ 水平上差异显著;
不同小写字母表示转基因大豆组、非转基因大豆组和商业饲料组之间在 $P<0.05$ 水平上差异显著;下同。

Fig. 1 Length, weight, specific growth rate and feed conversion ratio of zebrafish in different groups

Note: Different capital letters represent significant difference between GMM, Non-GMM and CF at $P<0.05$;
different lowercase letters represent significant difference between GMS, Non-GMS and CF at $P<0.05$; the same below.

表 3 不同组别斑马鱼肝脏、肠道和脑组织病理学检测结果

Table 3 Histopathological results of liver, intestinal tract and brain of zebrafish in different groups

试验时间/d Experimental duration/d	组别 Group	肝脏 Liver	肠道 Intestinal tract	脑 Brain
28	GMM	0.22±0.22	0.22±0.15	0.00±0.00
	Non-GMM	0.00±0.00	0.11±0.11	0.06±0.06
	GMS	0.00±0.00	0.22±0.15	0.00±0.00
	Non-GMS	0.00±0.00	0.11±0.11	0.00±0.00
	CF	0.33±0.24	0.33±0.24	0.00±0.00
56	GMM	0.50±0.33	0.22±0.22	0.00±0.00
	Non-GMM	0.89±0.45	0.33±0.24	0.00±0.00
	GMS	0.67±0.33	0.00±0.00b	0.00±0.00
	Non-GMS	0.00±0.00	0.22±0.15ab	0.00±0.00
	CF	0.28±0.15	0.67±0.22a	0.00±0.00
98	GMM	0.78±0.52	0.33±0.17	0.00±0.00
	Non-GMM	1.33±0.41	0.33±0.24	0.00±0.00
	GMS	0.11±0.11	0.00±0.00	0.00±0.00
	Non-GMS	0.22±0.22	0.11±0.11	0.00±0.00
	CF	0.61±0.23	0.11±0.11	0.00±0.00

注:不同小写字母表示转基因大豆组、非转基因大豆组和商业饲料组之间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters represent significant difference between GMS, Non-GMS and CF at $P<0.05$.

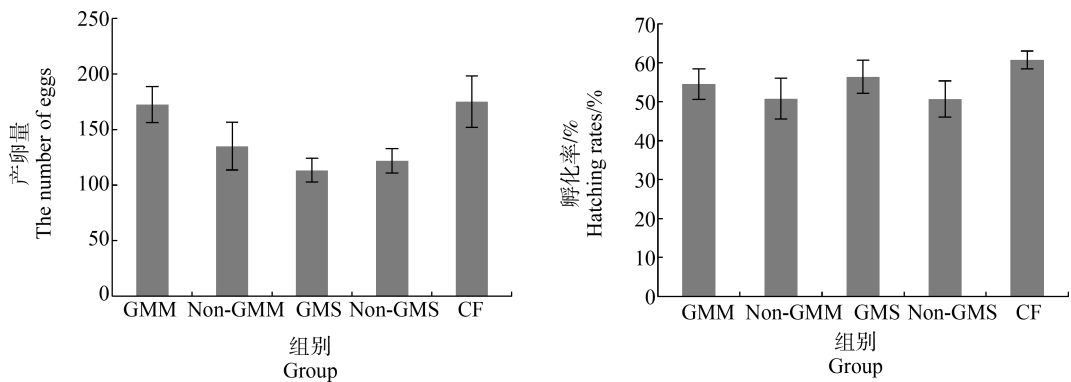


图 2 不同组别斑马鱼的产卵量和受精卵孵化率

Fig. 2 The egg-laying amount and hatching rates of fertilized eggs of zebrafish in different groups

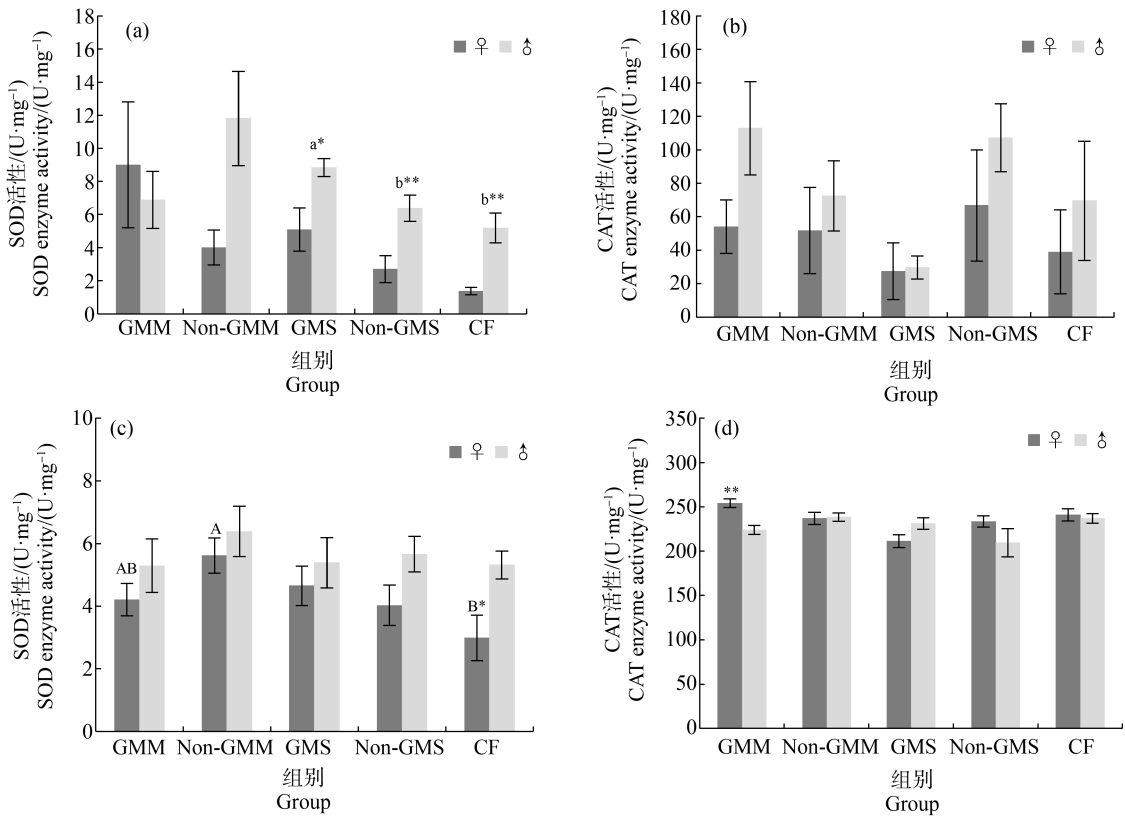


图 3 不同组别斑马鱼肝脏和肠道中超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性

注:(a)和(b)为肝脏,(c)和(d)为肠道;*和**分别表示同组雌鱼与雄鱼间在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平上差异显著。

Fig. 3 Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in the liver and intestinal tract of zebrafish in different groups

Note: (a) and (b) are liver, (c) and (d) are intestinal tract; * and ** represent significant difference between female and male zebrafish at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively.

2.6 不同脏器组织中 *SOD*、*CAT* 和 *HSP70* 的 mRNA 表达量

对玉米组斑马鱼肝脏、肠道和性腺组织中,敏感蛋白 mRNA 表达量的多因素方差分析结果显示(表 5),试验持续时间与组别和性别的交互作用对脏器组织中 *SOD*、*CAT* 和 *HSP70* mRNA 表达量有显著

影响,说明在不同取样时间点、不同组别和性别间差异的表现不同。例如:在试验 28 d 时,转基因玉米组斑马鱼肝脏中 *CAT* mRNA 表达量显著高于商业饲料组,但在 98 d 时,转基因和非转基因玉米组 *CAT* mRNA 表达量均显著低于商业饲料组;在 28 d 时,雌鱼肝脏中的 *HSP70* mRNA 表达水平与雄鱼相

表 4 组别和性别对斑马鱼肝脏和肠道中抗氧化酶活性影响的多因素方差分析
Table 4 Multi-way ANOVA of the effects of group and sex on the antioxidant enzymes activities in liver and intestinal tract of zebrafish

脏器 Organ	变异来源 Source of variation	玉米组 Maize		大豆组 Soybean	
		SOD	CAT	SOD	CAT
肝脏 Liver	G	3.144	0.745	10.110***	2.871
	S	3.283	3.154	30.356***	1.5
	G×S	2.722	0.35	0.004	0.328
肠道 Intestinal tract	G	3.977*	0.028	1.013	2.648
	S	6.467*	5.233*	8.814**	0.134
	G×S	0.764	4.222*	0.768	3.11

注:SOD 是超氧化物歧化酶,CAT 是过氧化氢酶;表中数值表示多因素方差分析所得 *F* 值,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$,*** 表示 $P<0.001$;G 代表组别,S 代表性别,G×S 代表两因素交互因子。

Note: SOD is superoxide dismutase; CAT is catalase; the values in the table represent the *F* value of the multi-way ANOVA, * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$ and *** represents $P<0.001$; G means group, S means sex, and G×S means the interaction factor of two factors.

表 5 组别、性别和试验时间对斑马鱼脏器组织中敏感蛋白 mRNA 表达水平影响的多因素方差分析
Table 5 Multi-way ANOVA of the effects of group, sex and experimental duration on mRNA expression levels in tissues of zebrafish

脏器 Organ	变异来源 Source of variation	玉米组 Maize			大豆组 Soybean		
		SOD	CAT	HSP70	SOD	CAT	HSP70
肝脏 Liver	G	1.65	1.6	1.74	3.64*	6.35**	1.71
	S	0.09	0.79	0.04	0.56	0.06	1.92
	D	3.41*	8.67***	1.75	2.1	1.82	0.39
	G×S	0.93	0.25	0.14	0.06	1.08	0.61
	G×D	0.59	3.32*	1.66	1.08	1.56	2.11
	S×D	0.95	2.69	15.21***	0.8	0.69	6.79**
	G×S×D	0.35	1.14	3.94**	0.13	1.04	1.78
肠道 Intestinal tract	G	1.01	2.51	2.64	6.65**	6.62**	0.95
	S	3.68	0.77	2.57	0.03	0.01	5.23*
	D	19.36***	8.39***	2.75	8.02***	2.34	7.25**
	G×S	1.81	2.15	1.29	0.40	0.57	1.29
	G×D	5.41***	1.94	1.35	2.10	1.99	1.26
	S×D	5.32**	4.53*	1.48	1.04	0.07	1.08
	G×S×D	1.62	1.52	0.71	0.98	0.81	2.34
性腺 Gonad	G	5.03**	20.40***	7.33**	0.99	26.05***	4.47*
	S	0.19	0.67	4.70*	0.65	11.98**	0.02
	D	18.27***	3.61*	0.08	13.89***	8.81***	7.23**
	G×S	0.22	0.24	2.93	0.83	0.57	0.36
	G×D	5.67***	3.63**	1.44	5.52***	4.37**	1.08
	S×D	2.95	2.78	1.69	4.63*	5.28**	2.38
	G×S×D	0.51	0.91	0.99	1.21	0.25	0.61

注:HSP70 是热激蛋白 70;表中数值表示多因素方差分析所得 *F* 值,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$,*** 表示 $P<0.001$;D 代表试验时间,G×D 和 S×D 代表两因素交互因子,G×S×D 代表三因素交互因子。

Note: HSP70 is heat shock protein 70; the values in the table represent the *F* value of the multi-way ANOVA, * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$ and *** represents $P<0.001$; D means experimental duration, G×D and S×D mean the interaction factor of two factors, and G×S×D means the interaction factor of three factors.

比显著偏高,到 98 d 时显著偏低(表 6)。大豆组的多因素方差分析结果显示(表 5),组别对斑马鱼肝脏和肠道中的 *SOD* 和 *CAT* mRNA 表达量有显著影响,转基因和非转基因大豆组的 *SOD* 和 *CAT* mRNA 表达量均显著低于商业饲料组(表 7),试验时间与组别和性别的交互作用显著影响性腺组织中 *SOD* 和 *CAT* mRNA 的表达水平,各组之间的差异在不同取样时间点没有一致的表现。通过对玉米组和大豆组中不同处理组间的多重比较,发现组别之间的差异主要来自人工饲料组与商业饲料组之间,而不是转基因与非转基因饲料组之间(表 8)。而且随着试验时间的推移,斑马鱼脏器组织中的敏感蛋白 mRNA 表达水平并没有表现出明显升高或下降的趋势。

3 讨论 (Discussion)

3.1 转基因作物对斑马鱼生长表现的影响

抗虫转基因玉米和耐除草剂转基因大豆对斑马鱼的体质量、体长、饲料转化率和特定生长率整体上没有显著影响,但在试验 98 d 时,转基因玉米组斑马鱼的体质量显著低于非转基因对照组。生长指标的变化通常被认为是生物体中各种生物因素综合变化的结果,并且可能作为评估鱼类生态毒性效应的终点指标^[19]。一般情况下,生长指标的降低会伴随着饲料摄取量和转化率的下降,本研究未发现转基因与非转基因玉米组斑马鱼的饲料转化率有显著差异,而且整个试验期间仅在最后一次调查中发现转基因玉米组的体质量显著偏低,这种差异可能是测量中的随机效应导致,没有生物学意义。在用含有抗虫转基因玉米(MON810)的饲料喂食大西洋鲑的研究中,同样发现转基因玉米组的最终体质量显著低于非转基因玉米组,推测可能是由于饲料中某些成分的差异,比如:直链淀粉与支链淀粉的比例或纤维素含量的差异等,可能会影响鱼类的消化率进而引起生长指标的变化^[10]。

值得注意的是,与 4 个试验饲料组相比,商业饲料组斑马鱼的生长表现更好,之前在以商业饲料作为对照的研究中也有类似结果^[17,20]。尽管我们配制的试验饲料能够满足斑马鱼的营养需求,但在加工工艺上与商业饲料有较大差别。为了最大限度保证转基因作物中的外源蛋白在饲料制备过程中不被降解,我们没有对试验饲料进行加热加压处理,而商业饲料是经高温、高压处理后的颗粒饲料,其适口性和消化率都优于试验饲料,这可能会直接影响斑马鱼

的摄食量和饲料利用率。此外,商业饲料中粗蛋白和粗脂肪的含量相对较高,可能更利于营养成分的吸收和利用^[21],从而提高斑马鱼的特定增长率。

3.2 转基因作物对斑马鱼组织病理的影响

98d 的喂养试验结果显示,抗虫转基因玉米和耐除草剂转基因大豆对斑马鱼肝脏、肠道和性腺的组织病理没有显著影响。但随着试验时间增加,各组斑马鱼肝细胞脂变程度表现出从无明显病变至轻度病变的趋势,推测与饲料中的脂肪和蛋白质配比、霉菌毒素、抗营养因子以及营养素(比如:胆碱、维生素)等因素有关,长期饲喂可能影响斑马鱼的脂肪代谢,导致肝脏脂肪沉积^[22-23]。已有文献报道,经过 7 个月的长期喂养,转基因大豆组和非转基因大豆组大西洋鲑肠道均出现轻微炎症,推测可能是大豆中抗营养因子诱发的炎症^[24]。在用含有抗虫转基因玉米的饲料连续喂食 2 代斑马鱼的研究中,转基因组和非转基因组子一代斑马鱼都有个别样本的肠道组织出现轻微炎症^[25]。

3.3 转基因作物对斑马鱼繁殖的影响

抗虫转基因玉米和耐除草剂转基因大豆对斑马鱼的繁殖性能无显著影响,各组斑马鱼的平均产卵量为 (144 ± 17) 粒,与文献报道的相近^[25]。但试验饲料组的产卵量和受精卵孵化率,与商业饲料组相比均略偏低,可能主要由于试验饲料与商业饲料在适口性和营养成分上的差异,影响斑马鱼的摄食、饲料转化和营养物质吸收,在一定程度上对其性腺等生殖器官的发育产生不利影响,导致产卵量和孵化率偏低^[26-27]。目前国际上在转基因作物对鱼类的饲用安全性研究中,涉及繁殖能力的还很少,主要因为大部分研究以大西洋鲑为受试动物,其性成熟时间较晚,仔鱼孵化期长,对环境条件要求较高,试验操作比较困难,而斑马鱼生育周期短、易于人工繁殖^[9]。一项以斑马鱼为模式动物,调查转 *Bt* 玉米对其繁殖能力影响的研究显示,尽管转基因玉米组亲鱼的产卵量略高于非转基因对照组($P > 0.05$),但 2 组胚胎的 DNA 甲基化水平和仔鱼的行为活动均无显著差异^[25]。

3.4 转基因作物对斑马鱼脏器组织中抗氧化酶活性和 mRNA 表达水平的影响

斑马鱼脏器组织中敏感蛋白 mRNA 的表达水平,没有随时间呈现明显的规律性变化,各组间 mRNA 表达量的差异(92.6%)主要来自于试验饲料组与商业饲料组之间,转基因作物对其没有显著影响。这与 Sagstad 等^[23]对大西洋鲑的研究结果相似,他们

表 6 不同组别斑马鱼肝脏中的 *SOD*、*CAT* 和 *HSP70* mRNA 表达水平

Table 6 *SOD*, *CAT* and *HSP70* mRNA expression levels in the liver of zebrafish in different groups

组别 Group	性别 Sex	<i>SOD</i>			<i>CAT</i>			<i>HSP70</i>		
		28 d	56 d	98 d	28 d	56 d	98 d	28 d	56 d	98 d
GMM	♀	2.40±0.64	4.09±1.44	1.19±0.18	5.14±1.67	3.49±1.02	0.17±0.04	3.88±0.82	0.90±0.25	0.97±0.16
	♂	2.67±1.03	4.51±3.57	4.89±1.89	5.38±1.48	4.26±2.00	1.34±0.76	1.19±0.31*	1.38±0.90	4.02±1.41
	平均 Average	2.54±0.59	4.3±1.87	3.04±1.02	5.26±1.09A	3.87±1.09	0.75±0.39B	2.54±0.54	1.14±0.45	2.4±0.75
Non-GMM	♀	3.94±0.84	5.11±1.78	0.97±0.62	5.66±1.48	2.83±0.74	0.26±0.16	4.42±1.1	1.10±0.35	0.35±0.08
	♂	0.74±0.25* *	5.11±3.50	1.36±0.54	1.92±0.80*	5.83±2.03	0.81±0.37	0.74±0.22*	2.05±0.85	2.81±1.00*
	平均 Average	2.25±0.57	5.11±1.9	1.17±0.4	3.79±0.93AB	4.33±1.11	0.54±0.21B	2.47±0.69	1.58±0.46	1.58±0.57
GMS	♀	1.93±0.53	2.27±0.76	0.25±0.06	2.49±1.08	3.54±1.06	0.11±0.02	2.00±0.68	1.22±0.48	0.55±0.12
	♂	1.70±1.02	2.48±1.04	1.40±0.56	1.81±1.08	1.69±0.84	1.13±0.52	0.61±0.29	2.04±0.87	2.15±0.64*
	平均 Average	1.81±0.56	2.38±0.63	0.82±0.31	2.15±0.75a	2.62±0.69	0.62±0.28b	1.31±0.40	1.63±0.49a	1.35±0.37
Non-GMS	♀	0.95±0.35	0.58±0.22	0.49±0.15	0.59±0.32	0.97±0.56	0.50±0.17	1.27±0.65	0.21±0.04	0.56±0.16
	♂	0.47±0.17	0.86±0.32	1.38±0.57	0.18±0.08	0.94±0.37	0.93±0.50	0.61±0.26	0.47±0.19	2.76±0.75*
	平均 Average	0.71±0.2	0.72±0.19	0.93±0.31	0.39±0.17b	0.96±0.33	0.72±0.26b	0.94±0.35	0.34±0.1b	1.66±0.46
CF	♀	1.40±0.29	2.38±1.52	1.31±0.28	1.33±0.44	1.57±0.62	2.12±0.75	1.27±0.28	1.90±0.69	1.07±0.13
	♂	1.37±0.34	2.54±1.28	1.53±0.54	1.68±0.49	3.31±1.25	2.57±1.30	1.38±0.29	1.45±0.47	1.39±0.37
	平均 Average	1.39±0.21	2.46±0.97	1.42±0.3	1.66±0.32Bab	2.44±0.71	2.34±0.73Aa	1.32±0.20	1.67±0.41a	1.23±0.19

注：* 和 ** 分别表示同组雌鱼与雄鱼间在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平上差异显著；不同大写字母表示转基因玉米组、非转基因玉米组和商业饲料组之间在 $P<0.05$ 水平上差异显著；不同小写字母表示转基因大豆组、非转基因大豆组和商业饲料组之间在 $P<0.05$ 水平上差异显著。

Note: * and ** represent significant difference between female and male zebrafish at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively; different capital letters represent significant difference between GMM, Non-GMM and CF at $P<0.05$; different lowercase letters represent significant difference between GMS, Non-GMS and CF at $P<0.05$.

表 7 不同组别斑马鱼肠道中的 *SOD*、*CAT* 和 *HSP70* mRNA 表达水平

Table 7 *SOD*, *CAT* and *HSP70* mRNA expression levels in the intestinal tract of zebrafish in different groups

组别 Group	性别 Sex	<i>SOD</i>			<i>CAT</i>			<i>HSP70</i>		
		28 d	56 d	98 d	28 d	56 d	98 d	28 d	56 d	98 d
GMM	♀	0.55±0.10	1.58±0.28	1.31±0.16	0.37±0.10	2.55±0.91	0.36±0.10	1.07±0.26	0.33±0.05	0.58±0.21
	♂	0.73±0.09	0.51±0.13**	1.36±0.15	0.25±0.04	0.88±0.13	1.22±0.23**	1.47±0.61	0.41±0.08	0.88±0.31
	平均 Average	0.64±0.07B	1.05±0.20	1.34±0.11AB	0.31±0.06B	1.72±0.49	0.79±0.16	1.27±0.33	0.37±0.05B	0.73±0.19
Non-GMM	♀	0.33±0.06	1.64±0.27	2.02±0.28	0.23±0.06	0.86±0.21	0.58±0.17	1.04±0.27	0.29±0.05	0.83±0.16
	♂	0.50±0.09	1.04±0.32	1.47±0.11	0.26±0.06	1.33±0.28	1.81±0.40*	1.15±0.32	0.87±0.19**	3.85±1.87
	平均 Average	0.42±0.06B	1.34±0.22	1.75±0.16A	0.24±0.04B	1.09±0.18	1.19±0.26	1.09±0.20	0.58±0.12B	2.34±0.98

续表7

组别 Group	性别 Sex	SOD			CAT			HSP70		
		28 d	56 d	98 d	28 d	56 d	98 d	28 d	56 d	98 d
GMS	♀	0.31±0.04	0.75±0.15	1.36±0.34	0.48±0.08	0.31±0.03	1.33±0.41	0.59±0.13	0.48±0.18	1.79±0.42
	♂	0.46±0.06*	0.74±0.20	0.87±0.11	0.35±0.06	0.49±0.16	0.62±0.34	0.83±0.29	2.52±0.37**	1.44±0.22
	平均 Average	0.38±0.04b	0.74±0.12	1.11±0.18	0.42±0.05b	0.4±0.08b	0.98±0.27	0.71±0.15	1.50±0.32	1.61±0.24
	♀	0.53±0.08	0.94±0.08	1.02±0.17	0.63±0.14	0.64±0.16	1.14±0.28	0.97±0.34	0.34±0.08	1.28±0.25
Non-GMS	♂	0.69±0.12	0.61±0.10*	1.20±0.28	0.58±0.17	0.45±0.17	1.55±0.58	0.94±0.22	1.09±0.21**	3.69±0.59**
	平均 Average	0.61±0.07b	0.77±0.07	1.11±0.16	0.6±0.11b	0.55±0.12b	1.35±0.32	0.95±0.20	0.72±0.14	2.48±0.43
	♀	0.95±0.15	1.24±0.30	1.06±0.12	1.21±0.28	1.54±0.73	0.86±0.10	1.27±0.35	1.77±0.70	1.94±0.90
	♂	1.13±0.20	1.21±0.25	1.12±0.20	1.19±0.24	1.61±0.55	1.38±0.50	1.22±0.28	1.42±0.41	2.51±1.54
CF	平均 Average	1.04±0.12Aa	1.22±0.19	1.09±0.11B	1.2±0.18Aa	1.57±0.44a	1.12±0.26	1.24±0.22	1.6±0.40A	2.23±0.87

表 8 不同组别斑马鱼性腺组织中的 SOD、CAT 和 HSP70 mRNA 表达水平
Table 8 SOD, CAT and HSP70 mRNA expression levels in the gonad tissues of zebrafish in different groups

组别 Group	性别 Sex	SOD			CAT			HSP70		
		28 d	56 d	98 d	28 d	56 d	98 d	28 d	56 d	98 d
GMM	♀	0.97±0.64	2.44±0.21	1.14±0.08	0.05±0.01	0.69±0.06	0.45±0.05	0.49±0.22	1.33±0.23	0.87±0.16
	♂	0.43±0.12	2.59±0.32	1.65±0.33	0.28±0.07*	0.65±0.08	0.26±0.06*	0.79±0.28	0.53±0.13	0.65±0.18
	平均 Average	0.70±0.32	2.51±0.19A	1.40±0.18	0.17±0.04B	0.67±0.05B	0.36±0.04B	0.64±0.18	1.04±0.21	0.76±0.12AB
	♀	1.16±0.47	1.71±0.34	1.04±0.13	0.42±0.30	0.56±0.18	0.80±0.09	1.21±0.37	1.21±0.34	0.67±0.11
Non-GMM	♂	0.36±0.09	1.85±0.34	1.20±0.13	0.18±0.08	0.94±0.19	0.47±0.10*	0.68±0.19	0.36±0.07*	0.37±0.05*
	平均 Average	0.80±0.26	1.84±0.24AB	1.12±0.09	0.31±0.16B	0.77±0.14AB	0.63±0.08A	0.96±0.22	0.76±0.19	0.52±0.07B
	♀	0.54±0.05	1.71±0.30	0.83±0.08	0.16±0.03	0.97±0.22	0.63±0.12	0.62±0.05	1.09±0.26	0.91±0.23
	♂	0.38±0.12	1.43±0.21	1.36±0.27	0.17±0.07	0.68±0.07	0.01±0.00**	0.46±0.17	0.42±0.11*	1.31±0.60
GMS	平均 Average	0.46±0.06b	1.57±0.18a	1.10±0.15	0.16±0.03b	0.83±0.12ab	0.32±0.09b	0.55±0.08b	0.76±0.16	1.11±0.31
	♀	0.73±0.10	0.89±0.06	0.81±0.06	0.36±0.04	0.76±0.10	0.73±0.09	0.62±0.10	0.73±0.09	1.13±0.10
	♂	0.46±0.09	1.07±0.09	1.54±0.37	0.11±0.01***	0.65±0.11	0.03±0.01***	0.31±0.02*	0.76±0.07	1.45±0.34
	平均 Average	0.6±0.07b	0.98±0.06b	1.18±0.20	0.24±0.04b	0.71±0.07b	0.38±0.1b	0.47±0.06b	0.74±0.05	1.29±0.18
CF	♀	1.08±0.16	1.01±0.05	1.10±0.16	1.24±0.28	1.06±0.12	1.05±0.11	1.18±0.20	1.06±0.12	1.16±0.22
	♂	0.94±0.28	1.03±0.09	1.09±0.16	1.32±0.51	1.08±0.14	0.48±0.10	1.16±0.25	1.06±0.13	1.44±0.43
	平均 Average	1.01±0.16a	1.02±0.05Bb	1.09±0.11	1.28±0.28Aa	1.07±0.09Aa	0.77±0.1Aa	1.17±0.16a	1.06±0.09	1.30±0.24A

发现转基因与非转基因大豆组大西洋鲑脏器组织中的 *SOD*、*CAT* 和 *HSP70* mRNA 表达量没有显著差异,但与鱼粉饲料组相比,2 组大西洋鲑肠道中的 *HSP70* mRNA 表达水平均表现出上调趋势,推测可能与大豆中的抗营养因子(如大豆凝集素)有关。已有文献报道大豆凝集素能够与大西洋鲑小肠上皮细胞特异性结合,影响肠道的结构和功能^[28-29]。本研究中,性别与试验时间的交互作用对斑马鱼脏器组织中的 mRNA 表达量有显著影响,在不同取样时间和不同检测指标上雌鱼与雄鱼的差异表现不同。Sissener 等^[20]对喂食转基因大豆饲料的雌性和雄性斑马鱼检测发现,转基因大豆组雌鱼肝脏中 *SOD* 的 mRNA 转录水平显著低于非转基因大豆组,而雄鱼在 2 组间没有显著差异。已有研究显示,转基因大豆与非转基因大豆中大豆异黄酮等植物雌激素的含量可能存在差异^[30],雌鱼和雄鱼对植物雌激素的敏感程度也有所差别^[31],植物雌激素能够诱导雄鱼肝脏中卵黄蛋白原的合成、影响鱼的性腺发育和繁殖^[32]。

斑马鱼脏器组织中的抗氧化酶活性与其 mRNA 表达量之间没有明显的相关性,可能主要与基因表达过程中转录和翻译调控有关。值得注意的是,玉米组雌鱼和雄鱼肠道中 *SOD* 酶活与其 98 d 时的 mRNA 表达量显著相关,非转基因玉米组的 *SOD* 酶活及其 mRNA 表达量均显著高于商业饲料组,可能是饲料组成和营养成分上的差异导致。肠道是营养物质消化吸收的主要器官,也是生物体免疫防御的重要屏障,肠道中抗氧化酶活性的变化可以指示胁迫条件下机体的氧化应激反应。本研究中,非转基因玉米饲料的 FB1、DON 和 AFB1 含量均略高于转基因玉米饲料,已有文献报道高剂量的霉菌毒素暴露可以诱导鱼脏器组织中 *SOD* 基因转录水平上调^[33-34],DON 和 AFB1 在鱼体中的靶标器官分别是肠道和肝脏^[35],因此,推测非转基因玉米组斑马鱼肠道中的 *SOD* 酶活和 mRNA 表达量显著偏高,可能也与饲料中霉菌毒素含量相对偏高有关。

综上所述,摄食含有抗虫转基因玉米和耐除草剂转基因大豆饲料的斑马鱼,在生长表现、组织病理和繁殖性能上与非转基因对照组相比均无显著差异。转基因大豆组斑马鱼肝脏中的 *SOD* 酶活显著高于非转基因大豆组和商业饲料组,且雄鱼显著高于雌鱼($P<0.05$)。斑马鱼脏器组织中敏感蛋白 mRNA 的表达水平,没有随时间呈现明显的规律性变化,喂养时间与组别和性别之间存在显著的交互作

用。总体上看,转 *Cry1Ic* 基因抗虫玉米和转 *CP4-EPSPS* 基因耐除草剂大豆对斑马鱼没有明显的生态毒性效应。但是,试验饲料组斑马鱼的生长表现、肝脏中 *SOD* 酶活以及 mRNA 表达量与商业饲料组相比有显著差异,可能与饲料的适口性和营养成分上的差异有关。

通讯作者简介:刘燕(1977—),女,硕士,研究员,主要研究方向为转基因生物安全、生物多样性保护。

参考文献 (References):

- [1] 国际农业生物技术应用服务组织. 2019 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(1): 114-119 International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. The global status of commercialized biotech/GM crops in 2019 [J]. China Biotechnology, 2021, 41(1): 114-119 (in Chinese)
- [2] Strain K E, Whiting S A, Lydy M J. Laboratory and field validation of a Cry1Ab protein quantitation method for water [J]. Talanta, 2014, 128: 109-116
- [3] Whiting S A, Strain K E, Campbell L A, et al. A multi-year field study to evaluate the environmental fate and agronomic effects of insecticide mixtures [J]. Science of the Total Environment, 2014, 497-498: 534-542
- [4] Pott A, Otto M, Schulz R. Impact of genetically modified organisms on aquatic environments: Review of available data for the risk assessment [J]. Science of the Total Environment, 2018, 635: 687-698
- [5] Douville M, Gagné F, André C, et al. Occurrence of the transgenic corn *cry1Ab* gene in freshwater mussels (*Elliptio complanata*) near corn fields: Evidence of exposure by bacterial ingestion [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(1): 17-25
- [6] 陈秀萍, 王加美, 朱昊俊, 等. 转 *Bt* 基因作物对水生生态系统的影响研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(4): 569-574
Chen X P, Wang J M, Zhu H J, et al. Progress in effects of transgenic *Bt* crops on the aquatic ecosystem [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(4): 569-574 (in Chinese)
- [7] Harris J H. The use of fish in ecological assessments [J]. Austral Ecology, 1995, 20(1): 65-80
- [8] 董姗姗, 章嫡妮, 张振华, 等. 转基因作物对鱼类的生态毒理效应研究综述[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(5): 26-34
Dong S S, Zhang D N, Zhang Z H, et al. Overview of ecotoxicological effects of genetically modified crops on

- fish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(5): 26-34 (in Chinese)
- [9] Sissener N H, Sanden M, Krogdahl Å, et al. Genetically modified plants as fish feed ingredients [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2011, 68(3): 563-574
- [10] Hemre G I, Sagstad A, Bakke-Mckellep A M, et al. Nutritional, physiological, and histological responses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed diets with genetically modified maize [J]. Aquaculture Nutrition, 2007, 13(3): 186-199
- [11] Gu J N, Bakke A M, Valen E C, et al. Bt-maize (MON₈₁₀) and non-GM soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) juveniles—Impact on survival, growth performance, development, digestive function, and transcriptional expression of intestinal immune and stress responses [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99932
- [12] Schlegel A, Stainier D Y R. Lessons from “lower” organisms: What worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism [J]. PLoS Genetics, 2007, 3(11): e199
- [13] Seth A, Stemple D L, Barroso I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease [J]. Disease Models & Mechanisms, 2013, 6(5): 1080-1088
- [14] Gabriëls I, Vergauwen L, de Boevre M, et al. Optimizing the use of zebrafish feeding trials for the safety evaluation of genetically modified crops [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(6): 1472
- [15] Rayan A M, Nigussie F, Abbott L C. Safety evaluation of stacked genetically modified corn event (MON89034 × MON88017) using zebrafish as an animal model [J]. Food and Nutrition Sciences, 2015, 6(14): 1285-1295
- [16] National Research Council. Nutrient requirement of fish [R]. Washington DC: National Academy Press, 1993
- [17] 董姗姗, 章嫡妮, 张振华, 等. 转 *mCryIAc* 基因玉米 BT799 对斑马鱼的生态毒理学效应[J]. 应用生态学报, 2019, 30(8): 2845-2853
- Dong S S, Zhang D N, Zhang Z H, et al. Ecotoxicological effects of transgenic *mCryIAc* maize (BT799) on zebrafish [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2019, 30(8): 2845-2853 (in Chinese)
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料卫生标准: GB 13078—2017[S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2017
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. Hygienical standard for feeds: GB 13078—2017 [S]. Beijing: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China, 2017 (in Chinese)
- [19] Sanden M, Krogdahl A, Bakke-Mckellep A M, et al. Growth performance and organ development in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parr fed genetically modified (GM) soybean and maize [J]. Aquaculture Nutrition, 2006, 12(1): 1-14
- [20] Sissener N H, Johannessen L E, Hevrøy E M, et al. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for investigating the safety of GM feed ingredients (soya and maize); performance, stress response and uptake of dietary DNA sequences [J]. The British Journal of Nutrition, 2010, 103(1): 3-15
- [21] Nordgarden U, Oppedal F, Taranger G L, et al. Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) I—Growth and feed conversion ratio [J]. Aquaculture Nutrition, 2003, 9(5): 287-293
- [22] Sissener N H, Sanden M, Bakke A M, et al. A long term trial with Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed genetically modified soy; focusing general health and performance before, during and after the parr-smolt transformation [J]. Aquaculture, 2009, 294(1-2): 108-117
- [23] Sagstad A, Sanden M, Krogdahl, et al. Organs development, gene expression and health of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed genetically modified soybeans compared to the near-isogenic non-modified parental line [J]. Aquaculture Nutrition, 2008, 14(6): 556-572
- [24] Sissener N H, Bakke A M, Gu J, et al. An assessment of organ and intestinal histomorphology and cellular stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed genetically modified Roundup Ready[®] soy [J]. Aquaculture, 2009, 298(1-2): 101-110
- [25] Sanden M, Ornsrud R, Sissener N H, et al. Cross-generational feeding of *Bt* (*Bacillus thuringiensis*)-maize to zebrafish (*Danio rerio*) showed no adverse effects on the parental or offspring generations [J]. The British Journal of Nutrition, 2013, 110(12): 2222-2233
- [26] Goolish E M, Okutake K, Lesure S. Growth and survivorship of larval zebrafish *Danio rerio* on processed diets [J]. North American Journal of Aquaculture, 1999, 61(3): 189-198
- [27] Sanden M, Jørgensen S, Hemre G I, et al. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for investigating dietary toxic effects of deoxynivalenol contamination in aquaculture feeds [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(12): 4441-4448

- [28] Iwashita Y, Yamamoto T, Furuita H, et al. Influence of certain soybean antinutritional factors supplemented to a casein-based semipurified diet on intestinal and liver morphology in fingerling rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Fisheries Science, 2008, 74(5): 1075-1082
- [29] Nordrum S, Bakke-Mckellep A M, Krogdahl Å, et al. Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 125(3): 317-335
- [30] Duke S O, Rimando A M, Pace P F, et al. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(1): 340-344
- [31] 王德鑫. 黄豆苷元对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长的影响及其机制研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 5-7
- Wang D X. The research of effects and mechanisms of dietary daidzein on the growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014: 5-7 (in Chinese)
- [32] Bennetau-Pelissero C, Breton B B, Bennetau B, et al. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2001, 121(2): 173-187
- [33] Pietsch C, Katzenback B A, Garcia-Garcia E, et al. Acute and subchronic effects on immune responses of carp (*Cyprinus carpio* L.) after exposure to deoxynivalenol (DON) in feed [J]. Mycotoxin Research, 2015, 31(3): 151-164
- [34] Ryerse I A, Hooft J M, Bureau D P, et al. Diets containing corn naturally contaminated with deoxynivalenol reduces the susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to experimental *Flavobacterium psychrophilum* infection [J]. Aquaculture Research, 2016, 47(3): 787-796
- [35] Anater A, Manyes L, Meca G, et al. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review [J]. Aquaculture, 2016, 451: 1-10 ◆