

半饥饿对转基因鲤生长和性腺发育的影响*

刘春雷^{1,2}, 徐丽华^{1,2}, 梁利群^{1**}, 刘金亮^{1,2}, 常玉梅¹

1. 中国水产科学院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090

摘要: 为研究转大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)生长激素基因鲤(转基因鲤)在不同食物含量条件下的生长竞争(主要是生长、生殖), 设定正常投饲组和半饥饿试验组, 每组的饲养池大小相同、混养的转基因鲤和对照鲤初始总体质量相等。连续3个月定期采样后, 从形态学和组织学研究转基因鲤和对照鲤(*Cyprinus carpio*)的生长状况、饲料占有情况和性腺发育状况。结果表明: 正常投饲组的转基因鲤和对照鲤体质量相对增长率分别为127.9%和70.6%, 而半饥饿试验组的转基因鲤、对照鲤的体质量相对增长率分别是72.3%和52.2%, 表明无论在饱食还是在半饥饿情况下, 转基因鲤均显示出快速生长的优势; 两组试验鱼的性腺发育进程无明显差异($P>0.05$), 但在部分月份转基因鲤和对照雌、雄鲤的相对性腺质量差异显著($P<0.05$), 无论在饱食还是在半饥饿情况下, 转基因鲤的性腺发育情况略好于对照鲤。

关键词: 转基因鲤; 半饥饿; 大麻哈鱼生长激素基因; 生长; 性腺发育

中图分类号: S965.116 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2011)

DOI: CNKI:22-1100/S.20110330.0840.001

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.s.20110330.0840.001.html>

Effects of Semi-Starvation on the Growth and Gonad Development of Transgenic Carps

LIU Chun-lei^{1,2}, XU Li-hua^{1,2}, LIANG Li-qun¹, LIU Jin-liang^{1,2}, CHANG Yu-mei¹

1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China

Abstract: In order to study the growth competition and gonad development of transgenic carps of transferred salmon growth hormone gene (thereafter referred to transgenic carp) and wild carps in semi-starvation condition, the experimental fish were divided into groups A and B with the same total weight, in which contained transgenic carps and wild carps with equal gross weight. Group A was fed with enough food and group B was fed with half of the former. Sampled in consecutive three months, the growth performance and gonad development were compared between transgenic carps and its counterpart in two groups. As a result, the relative growth rates of body weight were 127.9% and 70.6% individually in two carps from group A, the same values in two carps of group B were 72.3% and 52.2%, respectively, demonstrating that the transgenic carps had the advantage of fast growth. In addition, there was no difference during the gonad development in two groups ($P>0.05$), however, the value of relative gonad weight of transgenic carp was remarkably higher than that of the control in certain month ($P<0.05$). Overall, the gonad of transgenic carp developed better than the control no matter where group A or group B came from.

Key words: transgenic carps; semi-starvation; growth hormone gene of salmon; growth; gonad development

构建及培育转生长激素(Growth hormone)基因鱼是缩短养殖鱼类生长周期、提高生长速度的主要途径之一。自首例转基因鱼问世以来, 关于导入外源生长激素基因影响动物的生长发育、免疫力及抗病力等方面的研究受到高度关注。据报道, 导入生长激素基因能有效地促进大西洋鲑鱼(*Salmon salar*)和罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的生长^[1-3],

能显著提高食物转化率、合成能力、代谢强度, 加快平均蛋白合成等^[4]; 转生长激素基因鲤

(*Cyprinus carpio*) (以下简称转基因鲤)不但生长速度加快^[5-6], 而且对不良环境因子的耐受性^[7]与对照鲤无明显差异。目前, 关于转基因鱼的制备技术已成熟, 但是关于转基因鱼商业化生产, 各国政府都采取了谨慎的态度, 各国科学家在转基因鱼的食用

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2007AA10Z186)

作者简介: 刘春雷, 男, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类基因工程育种。

收稿日期: 2010-07-26

网络出版时间: 2011-3-30 8:46

** 通讯作者

及生态安全方面正在进行全面细致的研究工作,力求使其负面影响降到最低。在我国,转基因鲤的食用安全研究主要是通过饲喂哺乳动物小鼠

(*Rattus norvegicus*)进行,与对照组相比,饲喂转基因鲤的小鼠在血液学指标、组织病理学检查及表型特征等方面均无异常^[8]。为研究转基因鲤的生长特性,本试验将2组转基因鲤和对照鲤以“等总质量”的方式分别混养在2个池塘,即食物充足池塘和半饥饿池塘,通过比较研究同池的转基因鲤和对照鲤的生长状况及性腺发育状况,评价转基因鲤对同种野生鲤的影响程度,为有关转基因鱼生态安全评价标准的制定提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼来源

试验鲤均来自黑龙江水产研究所松浦试验站,为转大麻哈鱼生长激素基因鲤^[9]F₃(以下简称转基因鲤),对照鲤是由1对普通鲤繁殖的F₁。2组试验鱼均于2008年6月经人工繁殖获得,转基因鲤饲养在667 m²的池塘中预饲养,对照鲤饲养在2 000 m²的池塘中预饲养,放养密度均为12尾/m²。

第二年春出池发现,A池中的转基因鲤和对照鲤的初始平均体质量分别为74.19 g和135.97 g;B池中的转基因鲤和对照鲤的初始平均体质量为73.61 g和130.17 g。转基因鲤体质量小于对照鲤,因此在进行转基因鲤和对照鲤同池混养试验时,采用2种鲤总体质量相同的方法,消除前期饲养池塘大小不同造成的个体间体质量上的背景偏差。

1.2 同塘混养及样品采集

2009年4月将2组总体质量相等(38 kg)的转基因鲤和对照鲤(转基因鲤剪去一小部分左胸鳍,对照鲤未剪),同时放入黑龙江水产研究所松浦试验站的2个大小相同的池塘中进行养殖,面积为2 000 m²,分别称为A池和B池。试验期间,A池进行正常饲喂,即每天投喂3次,早中晚各1次,投喂饲料为人工颗粒饲料(长春通威饲料有限公司),每天早上观察A池无抢食现象时结束投喂,记录投喂饲料总量,中午、晚上以此量投喂。B池进行半饥饿饲喂,即投喂次数和时间与A池相同,每次饲料投喂量是A池的一半。饲养3个月后采集样品,分别在7、8、9月中旬对各池中的转基因鲤和正常鲤进行随机抽样。

1.3 性状测量

对随机采集的样本,进行体质量(精确到

0.01 g)和体长(精确到0.1 cm)测量;然后沿着泄殖孔向头部方向切开5~8 cm的刀口,取出内脏,称量空壳质量;测量肠长及肠内食物长度;最后将鱼体腹部两侧的性腺全部取出,称量性腺质量(精确到0.01 g)。

1.4 性腺组织切片

取部分抽样样本的性腺约1 cm³放入Bouin's固定液固定,然后依次进行酒精梯度脱水、二甲苯透明处理、60℃石蜡包埋、常规石蜡切片(切片厚度5~7 μm)、苏木精—伊红染色后封片保存^[10-12]。组织切片在ZEISS (PRIMO STAR)显微镜下观察,Moticam 2306数码成像系统拍照,性腺分期采用娄允东等方法^[13]。

1.5 数据处理及统计方法

转基因鲤和对照鲤个体间的初始体质量有所差异,本研究采用相对增长率^[14]反映鱼类生长速度。

$$\Delta W = (W_2 - W_1) / W_1 \quad (1)$$

式中: ΔW 为体质量增长率, W_2 为9月中旬平均体质量, W_1 为7月中旬的平均体质量。

性体指数反映性腺成熟程度,是反映鱼类性腺发育的重要指标。比较转基因鲤和对照鲤的性体指数,采用独立性 T 检验检测其显著性差异。相对性腺质量为性腺中的一种校正结果,更好的反应了性腺重^[15]。

$$GSI = GW / EW \quad (2)$$

式中: GSI 为性体指数, GW 为性腺重, EW 为空壳重。

2 试验结果

2.1 半饥饿对转基因鲤体质量及增长率的影响

根据相对体质量增长率公式,分别计算了A、B池塘中转基因鲤和对照鲤的体质量增长率(表1)。由表1可知,7月中旬到9月中旬从A池塘(正常饲喂)中共抽取转基因鲤86尾,其体质量增长率为127.9%,共抽取对照鲤79尾,其体质量增长率为70.6%;7月中旬到9月中旬从B池塘(半饥饿)中共抽样转基因鲤81尾,其体质量增长率为72.3%,共抽取对照鲤78尾,其体质量增长率为52.2%。A池塘中转基因鲤体质量增长率是对照鲤的1.81倍,B池塘转基因鲤的体质量增长率是对照鲤的1.39倍。通过比较A、B池塘中转基因鲤的体质量相对增长率可以看出,无论在正常饲喂条件下还是半饥饿条件下转基因鲤体质量增长率都大于对照鲤。

表1 转基因鲤和对照鲤的相对体质量增长率
Table 1. Body weight rate for transgenic carp and control

池塘 Pond	月份 Month	组别 Group	尾数 Number	体长/cm Body length	体质量/g Body weight	体质量增长率/% Weight growth-rate from Jul. to Sep.
A	7	转基因鲤	28	19.56±1.19	283.00±48.86	127.9
	8	转基因鲤	28	22.22±1.14	436.18±54.39	
	9	转基因鲤	30	25.37±1.89	581.47±95.8	
	7	对照鲤	27	23.55±1.95	414.64±67.91	70.6
	8	对照鲤	24	25.42±2.75	523.45±134.00	
	9	对照鲤	28	27.93±3.33	725.94±138.33	
B	7	转基因鲤	28	16.98±1.61	181.40±41.40	72.3
	8	转基因鲤	27	19.24±1.35	240.22±43.69	
	9	转基因鲤	26	22.63±1.16	286.58±51.65	
	7	对照鲤	23	18.80±2.48	202.10±68.30	52.2
	8	对照鲤	26	24.20±1.43	373.07±64.89	
	9	对照鲤	29	22.31±2.09	327.63±72.91	

2.2 半饥饿对转基因鲤性腺发育的影响

在A池塘中，各月份的转基因鲤和对照鲤的性腺发育进程除I期外基本同步，差异不显著 ($P>0.05$)；在B池中，7月份转基因鲤的雄鱼性腺发育进程比对照鲤快，此时已有多尾雄鱼性腺发育到III期，该月雄鱼在性腺发育进程上差异不显著

($P>0.05$)；8月份雌性转基因鲤性腺发育略快于对照鲤，最快的已发育到III期，该月雄鱼在性腺发育进程上无显著差异 ($P>0.05$) (表2)。

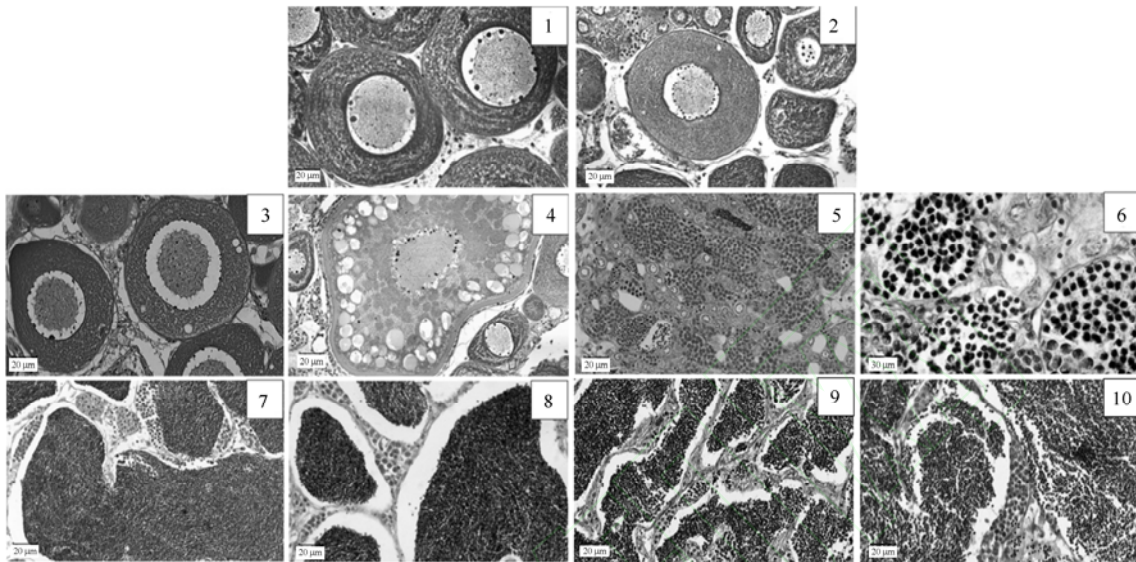
由性腺组织切片观察可知，B池转基因鲤和对照鲤在试验期间各期的组织结构无明显差异(图1)。

表2 转基因鲤和对照鲤的性腺发育时期和性成熟系数
Table 2. The stages of gonad development and GSI of transgenic carp and control carp

池塘 Pond	月份 Month	组别 Group	性别 Sex	尾数 Number	性腺发育情况*				显著性检验P Significance testing	GSI	显著性检验P Significance testing
					The situation of gonad development (n:%)						
					I	II	III	IV			
A池	7	转基因鲤	♀	10	—	6:60	4:40	—	0.408	0.387	0.053
		对照鲤	♀	12	4:33.3	5:41.7	3:25	—			
	转基因鲤	♂	10	—	6:60	4:40	—	0.481	0.741	0.273	
	对照鲤	♂	7	1:14.3	5:71.4	1:14.3	—				0.596
	8	转基因鲤	♀	10	—	5:50.0	5:50.0	—	0.095	0.796	
		对照鲤	♀	11	1:9.1	6:54.5	4:36.4	—			1.000
	转基因鲤	♂	8	—	1:12.5	6:75.0	1:12.5	0.150	0.49	0.136	
	对照鲤	♂	9	—	—	7:77.8	2:22.2				0.129
	9	转基因鲤	♀	14	—	3:21.4	11:78.6	—	0.924	0.96	
		对照鲤	♀	10	—	4:40.0	6:60.0	—			0.054
	7	转基因鲤	♂	6	—	—	4:66.7	2:33.3	0.054	2.25	
		对照鲤	♂	9	—	—	3:33.3	6:66.7			
B池	7	转基因鲤	♀	9	—	9:100	—	—	0.150	0.49	0.136
		对照鲤	♀	11	2:18.2	9:81.8	—	—			
	转基因鲤	♂	11	1:9.1	4:36.4	6:54.5	—	0.129	1.47	0.571	
	对照鲤	♂	9	4:44.4	5:55.6	—	—				0.129
	8	转基因鲤	♀	13	—	12:92.3	1:7.7	—	0.924	0.96	
		对照鲤	♀	13	1:7.7	12:92.3	—	—			0.054
转基因鲤	♂	7	—	1:14.3	3:42.9	3:42.9	0.054	2.25	0.852		

	对照鲤	♂	7	—	—	6:85.7	1:14.3		2.43	
9	转基因鲤	♀	12	—	7:58.3	5:41.6	—	0.819	1.41	0.139
	对照鲤	♀	9	—	5:55.6	4:44.4	—		0.85	
	转基因鲤	♂	7	—	—	5:71.4	2:28.6	0.193	4.87	0.585
	对照鲤	♂	11	—	—	5:45.5	6:54.5		3.97	

* 表中数据为尾数:所占样本百分数(%)



1.转基因鲤雌性II期The second period ovary of transgenic carp; 2.对照鲤雌性II期The second period ovary of control carp; 3.转基因鲤雌性III期The third period ovary of transgenic carp; 4.对照鲤雌性III期The third period ovary of control carp; 5.转基因鲤雄性II期The second period spermary of transgenic carp; 6.对照鲤雄性II期切片The second period spermary of control carp; 7.转基因鲤雄性III期The third period spermary of transgenic carp; 8.对照鲤雄性III期The third period spermary of control carp; 9.转基因鲤雄性IV期The fourth period spermary of transgenic carp; 10.对照鲤雄性IV期The fourth period spermary of transgenic carp

图1 B池转基因鲤和对照鲤雌雄性腺切片比较

Fig. 1. The comparison of the paraffin section of ovary and spermary between transgenic carp and control carp

3 讨论

3.1 半饥饿对转基因鲤体质量及增长率的影响

在自然界中,由于季节更替、环境变化或食物分布不均等原因,鱼类经常受到饲养密度过大、投喂不及时、投饲不均或投喂技术等因素的影响而出现饥饿现象^[16]。闫学春等^[17]对转大麻哈鱼生长激素基因鲤和野生鲤的肌肉成分进行比较,结果表明转大麻哈鱼生长激素基因鲤除其生长激素表达量升高外,其余主要营养成分的百分含量与野生鲤无显著差异,而大麻哈鱼生长激素基因在鲤体内主要作用是刺激骨骼的生长和蛋白的形成,从而促进鲤个体生长加快。本试验用的转基因鲤与闫学春等研究的转基因鲤为转同种外源生长激素基因鲤,导入外源基因的方法也相同,因此推测本试验试验鱼的主要营养成分与对照鲤也应该无显著差异。有研究表明大部分鱼类在饥饿期间首先消耗脂肪和糖原作为能量的补充,对蛋白质利用较少^[18],即饥饿时鱼类摄取的能量主要转化为脂类和糖类等高热量的物

质。本试验结果表明,转基因鲤无论在食物充足的池塘还是在半饥饿池塘,其体质量增长率均大于对照鲤,因此推测生长激素基因促进鱼类的生长,而且即使在半饥饿条件下转基因鲤蛋白质的合成速率仍大于脂类糖类的消耗速率,摄入的能量除用于基本代谢外还有部分能量参与骨骼和蛋白质的形成。另外,有研究表明饥饿的鱼类通过增加巡游速度,以增加同食饵对象的相遇频率或搜索水体的容量,从而提高获得摄食的机会以利于存活^[19],而且有研究表明转基因鱼的抢食能力和食欲明显大于对照鱼^[20],而由半饥饿喂养试验结果推测,转基因鲤可能通过提高饵料转化率及优化代谢途径等方式,使得机体的同化作用大于异化作用,从而使得转基因鲤的体质量大于普通鲤,但是外源生长激素基因的具体调节机理有待研究。

3.2 半饥饿对转基因鲤性腺发育的影响

本研究以池塘作为一个封闭的水体环境,将转基因鲤和同种普通鲤进行混养,比较转基因鲤和普通鲤性腺发育方面的异同,观察不同采样时间转基因

I 期为鲤鱼性腺发育的增殖期和生长期，此时期鱼体需要摄取较多的食物，来为生殖细胞的发育提供能量^[13]。由于大麻哈鱼生长激素基因在鲤体内主要功能是促进鲤骨骼的生长和蛋白质的合成，摄取的能量应该大部分用于生长，性腺发育所需的能量可能会减少，性腺发育状况应滞后于对照鲤。但是由表2可知，7月A、B池中转基因鲤和对照鲤的性腺均有处于第I期的；8月和9月A、B池中转基因鲤和对照鲤性腺都发育到成熟期，对7、8、9月转基因鲤和对照鲤性腺发育进程进行显著性检验，结果显示各月份两者性腺发育状况差异均不显著，说明转基因鲤的性腺发育和对照鲤一样，没有明显的“提前”或“滞后”现象；同时各月性成熟指数结果显示转基因鲤的性腺成熟指数与对照鲤的无显著差异，说明转基因鲤体质量的快速增长并没有对转基因鲤的性腺发育产生显著影响。性腺的发育与鱼体的营养结构有关，已有研究表明转生长激素基因鲤的肌肉及血液成分与普通鲤无显著性差异，所以性腺发育状况应该也无显著差异。由此结果推测生长激素基因只是促进鲤鱼体质量的增加，并不影响其性腺发育。

参考文献：

- [1] 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[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(25): 9303-9308
- [2] Oakes J D, Higgs D A, Eales J G, et al. Influence of ration level on the growth performance and body composition of non-transgenic and growth-hormone-transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Aquaculture, 2007, 265: 309-324.
- [3] Rahman M A, Maclean N. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene[J]. Aquaculture, 1999, 173: 333-346.
- [4] Martínez R, Juncal J, Zaldivar C, et al. Growth efficiency in transgenic tilapia (*Oreochromis* sp.) carrying a single copy of an homologous cDNA growth hormone[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 267(1): 466-472.
- [5] 孙效文, 梁利群, 闫学春, 等. 转生长激素基因鲤的快速生长效应及传代. 水产学报, 2002, 26(5): 391-395.
- [6] Wang Y, Hu W, Wu G, et al. Genetic analysis of 'all-fish' growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus Carpio* L.) and its F1 generation[J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(14): 1174-1177.
- [7] 梁利群, 孙效文, 曹顶臣, 等. 转基因鲤对几种环境因子耐受能力的研究[J]. 应用生态学报, 2002, 12, 13(12): 1719-1720.
- [8] 梁利群, 王静, 曹顶臣, 等. 转大麻哈鱼生长激素基因鲤食用安全毒性分析[J]. 食品科学, 2010, (05): 261-265
- [9] 闫学春, 孙效文, 梁利群, 等. 转基因超级鲤及子代的生长研究[J]. 水产学杂志, 2004, 5, 17(1): 9-13.
- [10] 何德奎, 陈毅峰, 蔡斌. 纳木措裸鲤性腺发育的组织学研究[J]. 水生生物学报, 2001, 1, 25(1): 1-8.
- [11] 尹洪滨, 贾中贺, 姚道霞, 等. 黄颡鱼性腺分化的组织学观察[J]. 动物学杂志, 2008, 43(6): 103-108.
- [12] 马学坤, 柳学周, 温海深, 等. 半滑舌鲷性腺分化的组织学观察[J]. 海洋水产研究, 2006, 4, 27(2): 55-61
- [13] 姜允东, 郑德崇, 黄文浩, 等. 组织胚胎学[M]. 北京: 农业出版社, 1981: 152-231.
- [14] 闫学春, 孙效文, 梁利群, 等. 转生长激素基因鲤鱼与正常鲤鱼经济性状的比较[J]. 东北林业大学学报, 2002, 11, 30(6): 54-56.
- [15] 何德奎, 陈毅峰, 陈自明, 等. 色林措裸鲤性腺发育的组织学研究[J]. 水产学报, 2001, 4, 25(2): 97-103.
- [16] 刘波, 何庆国, 唐永凯, 等. 饥饿胁迫对吉富罗非鱼生长及生理生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2009, 3, 16(2): 230-237.
- [17] 闫学春, 梁利群, 曹顶臣, 等. 转基因鲤与普通鲤的肌肉营养成分比较[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(4): 528-532.
- [18] 谢小军, 邓利, 张波. 饥饿对鱼类生理生态学影响的研究进展[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 181-189.
- [19] 钱周兴, 徐永清, 方一峰. 饥饿对鱼类的影响[J]. 生物学通报, 2006, 41(6): 9-11.
- [20] Devlin R H, D'Andrade M Uh M, Biagi C A. Population effects of growth hormone transgenic coho salmon depend on food availability and genotype by environment interactions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 9303-9308