

雌核发育系红鲤 8305 的产生 及其生物学特性*

吴清江 叶玉珍 陈荣德 童金苟

(中国科学院水生生物研究所, 武汉, 430072)

提要 于1981年,以经过 γ 射线或紫外线处理的近类精子作为激活源,成功地诱发兴国红鲤(*Cyprinus carpio*)卵子的雌核发育。经两代连续雌核发育的部分后代个体进行人工转性,使之成为“生理雄性”,并以“生理雄性”个体与其同胞姐妹交配所产后代为遗传特性纯一的个体——红鲤8305。检查了LDH, EST, MDH, SOD, IDH及运铁蛋白(transferrin)的座位,发现同一个系的不同个体之间等位基因没有差别,而且各座位的等位基因都是纯合的。血清学试验表明,控制红鲤8305雌核发育系的红细胞表面抗原的基因纯合度相当高,同系个体之间的鳞片移植成活率可达87%以上,说明控制MHC基因的纯合度很高。

目前,国际上常用的纯系实验鱼主要是鲮形目的孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)和剑尾鱼(*Xiphophorus*),而这两类鱼的繁殖方式都是卵胎生。而中国的淡水鱼类80%属鲤科,均为卵生,因此,要满足我国鱼类生理、营养、病理、药理等实验的要求,必须从鲤科鱼类的有代表性种中培育一个纯系。为达到这一目的,自70年代末我们就着手对鲤的鳞被和体色的遗传进行了研究^[1],并完成了鱼类人工雌核发育作为建立近交系新途径的研究^[2];在80年代初对鱼类品系的鉴定技术作了初步研究^[3],同时培育了一个兴国红鲤的纯系——红鲤8305。本文为这方面工作的报告。

一、雌核二倍体纯系的产生

1978年,作者首先在国内突破了鱼类人工雌核发育,并诱发了人工雌核二倍体。1980年,完成了鲤人工雌核发育、染色体的人工和自然加倍、性别人工控制等一系列关键技术的研究,并首先提出了一个通过雌核发育结合性别人工控制快速建立鱼类纯系的完整技术途径。

1. 雌核单倍体的产生

母本为红鲤(*Cyprinus carpio*),以经 $1.3 \times 10^{-2} \text{J}$ γ 射线照射或经2支30W、波长为2350Å的灭菌灯、距离17cm照射30min的鲫(*Carassius auratus*)或团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)精子作为激活源,经射线处理过的精子的遗传物质遭受破坏,但精虫不失活。用这种遗传失活的精子激活红鲤的成熟卵子,其激活比例与正常受精的受

* 本研究系由国家攻关项目(75-06-02-07)及国家自然科学基金(852160生85-343)资助。
收稿日期: 1989年10月10日。

精率没有显著差别,激活的胚胎在胚前期形态正常;但精核不与卵核融合,检查激活卵的囊胚细胞,几乎全部为单倍体。这种单倍体胚胎,在原肠期以后某些酶的合成出现障碍,在孵化前即开始出现形态异常,皆为围心腔扩大、水肿、尾柄向上弯曲等单倍体综合症状;至孵化期,这类单倍体胚胎大量死亡。凭肉眼,在胚胎的眼色素期就很容易辨认出这些单倍体胚胎为母体遗传,雌核发育的幼鱼形态也表现了母本红鲤的遗传特征;在激活卵的胚胎中,只有 0.15% 左右的个体能顺利通过孵化期而继续发育,这些个体都为自然加倍的正常雌核二倍体。

2. 雌核单倍体的人工加倍和自然加倍

提高雌核二倍体的产量可借助于染色体人工加倍的方法,我们采用两种人工加倍的方法均获得成功。在卵子激活 3—5min 时,以 1℃ 的极端温度进行冷休克 30min,抑制第二极体的排出,从而雌核二倍体胚胎的比例可提高至 17.4%;当激活卵发育至二胞期时,以 25×10^{-6} 或 100×10^{-6} g 的秋水仙碱水溶液浸泡 30min,破坏纺锤丝的形成,从而雌核二倍体胚胎比例可达 31.6%。温度休克可能在抑制第二极体排出时造成染色体的断裂或丢失,从而形成非整倍体,最终性细胞分化发生障碍致使败育。大批卵子于二胞期进行秋水碱溶液处理在实验操作上是有一定困难的,因为同一批受精卵即使在环境条件完全相同的情况下发育速度也是很不一致的。因此,我们经常采用自然加倍的方法,尽管雌核二倍体的产量极低,但不发生不育现象,况且产量低还可以大批量激活卵子来弥补。几年来,我们用紫外线处理近类精子诱发若干组雌核发育红鲤,全部具有正常的雌核二倍体染色体。这些个体生长正常,而且发育至性成熟,有的个体已用于进行第二代雌核发育。

3. 雌核发育个体性别的人工控制

雌核发育二倍体鲤全部个体均为雌性。因此,虽然由同一个雌核发育一代母体所产生的所有雌核发育二代个体的基因都是纯合的,但由于缺少雄性个体就不可能依靠它们来繁殖后代而建立纯系;为此,应把部分雌核发育二代的个体转变为“生理雄性”。为得到这种生理雄性的个体,在夏花出塘后(大约孵化后 20d),对雌核发育的红鲤开始喂以雄性激素混合饵料,剂量为每公斤商品饵料含 30mg 甲基睾丸酮。三个月后改为普通饵料,即可把性原细胞转变为精原细胞,翌年轻压腹部可流出精液。

4. 纯系建立

如果雌核发育一代的母本的某些基因座位是杂合的,同胞姐妹个体之间的等位基因是不同的,即使杂合型个体所占比例很低。因此要获得一个等位基因完全纯合的后代,必须进行两代连续的雌核发育。这样,同一个雌核发育二代的不同个体的遗传基因都是源于同一个卵细胞,只有这样的群体才可能建立一个纯系。鲤雌核发育后代都为雌性,要建立一个纯系还必须把部分雌核发育后代的个体转化为生理雄性个体,并以这种生理雄性个体与同胞姐妹交配,所产后代就可形成一个纯系。应用这一技术我们已获得了一个红鲤 8305 纯系。

二、品系鉴定

鱼类品系鉴定技术是个全新的课题。首先,在鱼类养殖对象中可称为品种的极少,因此就不可能发展起完善的品系鉴定技术手段。但是,这一技术在我们应用雌核单倍体建

立纯系工作中是不可缺少的; 同时, 它在品种的提纯及鉴定方面也具有重要的实际意义。解决这一问题必须考虑的是同一个品系的所有个体是否具有纯合基因以及个体之间的等位基因是否相同。我们企图从分析某些控制功能蛋白、同工酶的基因座位及免疫反应来解决这一问题。

1. 运铁蛋白

鲤的运铁蛋白受一个座位 7 个等位基因控制。我们分析了不同品种鲤的 30 个样品, 检出了 6 个等位基因, 其相对迁移率分别为 $A = 68.3\%$, $B = 56.7\%$, $C = 52.3\%$, $D = 50\%$, $E = 47.0\%$, $F = 44.0\%$ 。红鲤 8305 的全部个体都为 E 的纯合型(图版 I:1)。

2. 同工酶

红鲤 8305 的 LDH, EST, MDH, SOD, IDH 的座位数见表 1。应当指出, EST 的座位 G 是多型的, 但红鲤 8305 的 G 座位只有纯合的等位基因 G_2 (图版 I:2, 3) 鲤的 LDH 的 B 基因也是多型的, 但红鲤 8305 的不同个体中并未发现 B 基因有多型性; 鲤的 s-MDH, s-IDH 和 SOD 都是多型的, 但在红鲤 8305 中我们从未发现这几种同工酶有杂合带¹⁾。

表 1 红鲤 8305 几种同工酶的座位数

Tab. 1 Number of isozyme loci in Red Carp 8305

酶	座位缩写
乳酸脱氢酶	Ldh-A, Ldh-B, Ldh-C
酯酶	Est-A, Est-B, Est-C, Est-D, Est-E, Est-F, Est-G, Est-H, Est-I
s-苹果酸脱氢酶	s-Mdh-A, s-Mdh-B
m-苹果酸脱氢酶	m-Mdh-A, m-Mdh-B
s-异柠檬酸脱氢酶	m-Idh-A, m-Idh-B
m-异柠檬酸脱氢酶	m-Idh-C
超氧化物歧化酶	Sod-A, Sod-B, Sod-C

3. 血清学及免疫学反应

(1) 血清学反应 以红鲤 8305 的红血球作为抗原分别制取家兔的抗血清。这种抗血清与各品种鲤随机抽样的个体的红血球的交叉凝集反应(表 2)表明, 各品种对这种抗血清的凝集效价不同, 但同系不同个体的凝集效价基本在同一水平, 而且每测验的 5 个个体都有一个原来是原来作为制取抗血清的红血球供体, 抗血清与其红血球的凝集反应滴度

表 2 鲤各品种间红血球和抗血清的交叉凝集反应(单位: 滴度)

Tab. 2 The results of cross agglutination among various varieties of Carp (unit: titer)

抗血清	红鲤8305 红血球	红镜鲤 红血球	红鲤 红血球	镜鲤 红血球
红鲤8305	1521, 2028	1141, 1521	782	320, 640
红镜鲤	640, 853	2028	305	640, 746

1) Fu Hongtuo and Wu Chingjiang, 1989. The Isozyme Expression of Diploid and Triploid Hybrid between Red Carp (*Cyprinus carpio*) and Red Goldfish (*Carassius auratus*). Proceeding of Symposium on New Trend in Ichthyogenetics (Munich).

达 2 000 左右,其它个体的反应值与此值十分相近,说明控制红血球表面抗原的基因有相当水平的纯合。从表 2 还可看出,红鲤 8305 的反应值与普通红鲤及散鳞镜鲤的有显著的差别,这一点从吸收试验的结果也可得到进一步证明(表 3)。以上结果说明,以鲤红血球作为抗原不仅可清楚地把不同品种的鲤区别开来,而且还可作为品系鉴定的技术手段。

表 3 抗红鲤 8305 红血球抗原抗血清的吸收试验(单位:滴度)

Tab. 3 The results of absorption test of antiserum of red blood cell of Red Carp 8305 (unit: titer)

红血球	未经吸收 抗血清	经红鲤 8413 吸收抗血清	经镜鲤吸 收抗血清	经鲢吸收 抗血清
红鲤8305	2 560	320	640	1 280

(2) 组织移植 鲤的鳞片生长在鳞囊中,鳞片表面覆盖以表皮,鳞囊分布有微血管。由于编码主要组织相容性复合体(MHC)基因有高度的遗传多态性,因此在同种不同个体之间的鳞片移植总是不能成功。水温在 20℃ 以上,一般移植的第二天就可以观察到排斥反应,先是充血、发炎,以后移植的鳞片表面由一层白色腐生物覆盖,最终移植的鳞片被排斥而脱落,或是虽未脱落但鳞片的反光层脱落,覆盖于鳞片上的表皮色素细胞死亡消失,整个移植的鳞片成为透明的似玻璃纸的薄片。整个排斥过程最快为 5d,最慢两周完成。对 120 个红鲤 8305 的不同个体进行了鳞片移植试验,结果有 87% 的移植鳞片都能正常生长。这说明控制红鲤 8305 品系各个体 MHC 的基因的纯合度是很高的。

参 考 文 献

- [1] 吴清江、柯鸿文、陈荣德,1980。鲤鱼的遗传分离规律及选种分析。遗传 2(2): 15—16。
- [2] 吴清江、陈荣德、叶玉珍等,1981。鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究。遗传学报 8(1): 50—55。
- [3] 董金苟、陈荣德、吴清江,1987。鲤鱼不同品种(系)红血球抗原特异性的初步研究。水生生物学报 11(2): 112—116。

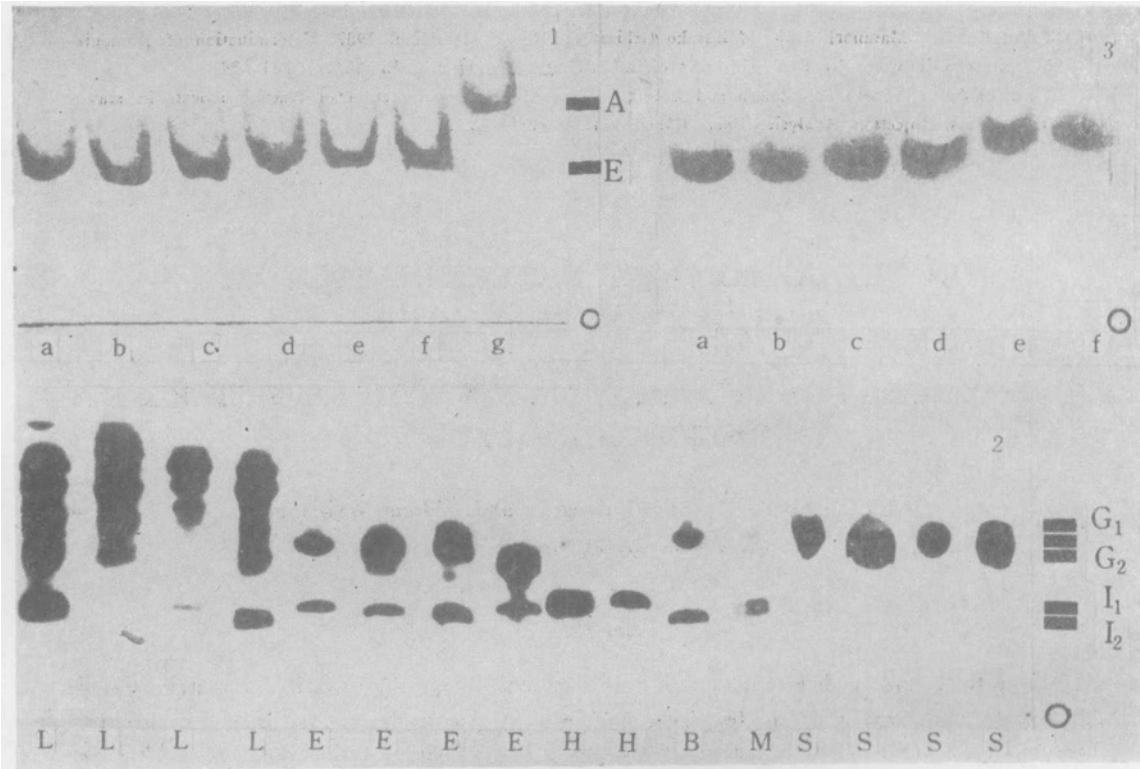
THE PRODUCTION OF PURE LINE RED CARP 8305 AND ITS BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Wu Qingjiang, Ye Yuzhen, Chen Rongde and Tong Jingou

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan, 430072*)

ABSTRACT

Induction of gynogenesis of the Xingguo Red Carp (*Cyprinus carpio* var.) has been carried out since 1988. By means of γ -rays (dosage of 1.3×10^{-2} J) or ultraviolet (2 350 Å, 30W \times 2, 30 min), the sperms of related species (*Carassius auratus* or *Megalobrama amblycephala*) were irradiated and used as an activation agent, the matured eggs of Xingguo Red Carp were successfully induced to gynogenesis. All of the gynogenetic embryos are maternal hereditary without any paternal characteristics. There is only one genome ($N=50$) in almost all of the gynogenetic embryonic cell. However, there is no significant difference between frequencies of the activation by irradiation and fertilization with a normal sperms. Majority of the gynogenetic embryo had a haploid syndrome of edema, enlarged cardiocoelom and bent caudal part. As a result of natural diploidization a minority of gynogenetic embryo (0.15—0.20%) was normal gynogenetic diploid. With normal viability naturally diploidized gynogenetic diploid individuals grew normally and developed into maturation. After two successive gynogenesis, in the second generation of gynogenesis all individuals came of a same egg. After being treated with androgen, part of individuals of second gynogenetic generation was artificially reversed into "physiological male". Mating "physiological male" with its sisters the pure line—Red Carp 8305 was established. Loci of some isozymes and transferrin were examined. The results showed that in the same locus there was no different allele between different individuals of Red Carp 8305 and no heterozygotes had been found. However, there are 7 alleles of transferrin and the G-locus and I-locus of Esterase, B-locus of Lactate Dehydrogenase, s-Malate Dehydrogenase, s-Isocitrate Dehydrogenase, Superoxide Dismutase are found to be polymorphic in the common carp populations. Using red blood cell of the Red Carp 8305 as an antigen from rabbit the special antiserum was made. The results of tests of cross hemagglutination between the special antiserum and the red blood cell of Red Carp 8305 and those of other carp varieties showed that the reaction values were different between these varieties, but the values of different individuals of the Red Carp 8305 are of the same level, the titre is about 2 000. The serological assay showed that genes controlling the red blood cell allotypic antigens were homogenous to a great extent in Red Carp 8305. The survival rate of scale transplantation between different individuals of Red Carp 8305 was over 87%. It appears that genes controlling MHC are homogenic.



红鲤 8305 的运铁蛋白和酯酶同工酶图谱

Patterns of transferrin and esterase of Red Carp 8305

1. 鲤的运铁蛋白谱带: a-f. 红鲤 8305E 等位基因纯合带, g. 其它鲤个体的 A 等位基因纯合带; 2. 酯酶同工酶在鲤各组织中的表达: L. 肝, E. 眼, H. 心, B. 脑, M. 肌肉, S. 血清; 3. 红鲤 8305 血清酯酶同工酶谱: a-d. 红鲤 8305 只有 G₂ 纯合带, e-f. 红镜鲤 G₁ 纯合带。