

鲢的远缘杂交子代和人工三倍体的同工酶表达

朱蓝菲 桂建芳 梁绍昌 蒋一珪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分析了鲢♀×鳙♂、鲢♀×团头鲂♂的二倍体和异源三倍体杂种, 以及同源三倍体鲢及其亲本种的 8 种蛋白质和同工酶的表型。二倍体杂交子代的基因表达是多样的, 这些多样的表达可能与双亲的这些蛋白质和同工酶的表型差异有关。如与二倍体杂交子代相比, 鲢×鳙异源三倍体的肌肉蛋白和血清蛋白有较一致的表型。此外在两种异源三倍体中 EST 和 MDH 同工酶的表型接近母本。这些结果表明异源三倍体由于增加了一套母本染色体组, 基因的表达较接近母本或趋向一致。同源三倍体鲢与二倍体鲢的肌肉蛋白、血清蛋白、G3PDH、MDH 和 LDH 同工酶表型没有区别。

关键词 鲢, 远缘杂交, 异源三倍体, 同源三倍体, 同工酶和蛋白质

鲢是我国主要淡水养殖鱼类, 为了改良它的品质提高其经济价值, 曾设想通过远缘杂交导入异源基因组, 并通过染色体倍性操作获得异源多倍体, 以求达到改良鲢的品质和提高杂交子代的成活率和生长率的目的。本文所研究的问题就是这一设想的部分工作。在远缘杂交工作中用生化指标可检出雌核发育和雄核发育的个体, 并杂交子代的性状进行遗传分析^[1]。随着人工诱导多倍体成功之后, 对多倍体的生化鉴定及同工酶基因剂量与成活率之间的关系等进行了研究^{[2-6], [1]}。我们分析比较了鲢的二组远缘杂交子代及人工异源和同源三倍体的蛋白质和同工酶的表型, 观察了染色体组的变化对生化性状的影响。

材料与方法

鲢、鳙和团头鲂均取自本所关桥试验站, 亲鱼经人工催产后干法授精获得鲢♀×鳙♂(简称鲢鳙)、鲢♀×团头鲂♂(简称鲢团)的杂交子代。鲢的同源三倍体和两个异源三倍体(三倍体鲢鳙、鲢团)均由静水压休克诱导而成。实验中所用的同源和异源三倍体均经过染色体计数而确认。

电泳分析材料制备如下: 采血后离心 10 分钟(1000rpm), 收取血清在-20℃保存备

1) 吴清江、傅洪拓、叶玉珍 1988/1989。酶的基因剂量效应及其对鱼类远缘杂交的影响。中国科学院水生所淡水生态与生物技术国家重点实验室(年报)139—149 页。

1991 年 5 月 22 日收到。

用。取背部白肌和肝脏,剪碎后分别放入匀浆器中,肌肉按组织块的重量加5倍蒸馏水,肝脏加2倍蒸馏水反复进行匀浆,并在冰箱中放置2h后离心20min(4℃,20000g)。肝的上清液吸出后再重复离心1次。上清液置-20℃保存备用。组织中的蛋白和同工酶均用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳进行分离^[7]。

结 果

(一) 鲢鳙杂交子代及其三倍体的蛋白质和同工酶的表型分析

1. 肌肉蛋白(MP)

鲢、鳙在MP1—8这几部分均有区别(图版I:2)。多数杂交子代(2n)的肌肉蛋白表型在这几部分可看到来自双亲区带的总和。少数杂交子代在MP2、MP4、MP5和MP7部分只显示来自父本基因的表达,因而在杂交子代中具有不同的表型。三倍体的表型与多数杂交子代的表型一致。

2. 血清蛋白(SP)

鲢与鳙的血清蛋白(图版I:1)在SP1—3和SP5这几部分都有区别。在SP2部分可清楚地看到双亲基因在杂交子代中的不同表达:多数子代的表型为双亲区带的总合,少数子代只有来自父本基因的表达或双亲基因的部分表达,因此表型有明显的差异。这些似乎只有来自父本基因表达的少数杂交子代,经肌肉蛋白电泳分析表明这些鱼确是杂种,而不是雄核发育的个体。三倍体的表型为来自双亲基因的表达,表型较一致。

3. 四唑氧化酶(TO)同工酶

鲢与鳙肌肉的TO同工酶都具三条带的表型,是由两个基因编码的二聚体酶。鳙的三条带比鲢泳动的快(图版I:4)。杂交子代和三倍体都具8条带,其中有来自双亲的酶带,也有新的酶带。

4. 甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH)同工酶

肌肉中的G3PDH同工酶是由两个基因编码的二聚体酶。鲢具3条带的表型。鳙有两种不同的表型:一种与鲢相同,另一种是在泳动稍慢的位置多了两条带,形成具5条带的表型(图版I:5),表明是在鳙的G3PDH的A座位上出现了等位基因所致,这一多态现象与吴力钊用淀粉凝胶电泳所测的结果是一致的^[8]。杂交子代和三倍体也同样出现这两种表型(杂交子代中5条酶带的图谱略),在显色强度上杂交子代与三倍体之间没有明显的差异。

5. 异柠檬酸脱氢酶(IDHP)同工酶

肝脏中细胞质型IDHP同工酶是由两个基因编码的二聚体酶。鲢有两种表型,分别具3条带和5条带(图版I:3)。这5条带的表型也表明在A座位上出现了等位基因。鳙的肝脏中只检测到一种表型,与鲢的三条带的表型相同。杂交子代中检测到与鲢相同的两种表型(3条带的图谱略),三倍体只检测到5条带的一种表型,与二倍体相比在显色强度上没有明显的差异。

6. 酯酶(EST)同工酶

鲢与鳙肝脏EST同工酶都为多态酶。杂交子代的表型中来自鳙(父本)的基因表达较

强,而三倍体这种表达较弱或只部分表达,使其表型偏于母本(图谱略)。

7. 苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶

肌肉中 MDH 同工酶可分两类:细胞质型(s-MDH)和线粒体型(m-MDH),并分别由两个基因 A、B 和 C、D 编码的二聚体酶。鲢的表型中 A_2 及 D_2 带不显色,所以呈 4 条带,其中 AB 带显色也很淡(图版 I : 3)。鳙则具 5 条带的表型(只有 D_2 带不显色)。杂交子代也具 5 条带的表型,其中 A_2 带显色比鳙的淡,AB 带比鲢深,所以酶活性介于两亲本之间。三倍体具 4 条带的表型,与母本的同工酶表达相近。

8. 乳酸脱氢酶(LDH)同工酶

LDH 同工酶是由两个基因编码的四聚体酶。鲢与鳙肌肉中的 LDH 同工酶相同(图版 I : 6)。杂交子代和三倍体都与鲢、鳙的表型相同。

(二) 鲢团杂交子代及其三倍体的蛋白质和同工酶的表型分析

1. 肌肉蛋白(MP)

鲢与团头鲂在 MP2、MP3 和 MP5-8 部分有明显的差异(图版 I : 1)。杂交子代的 MP5 和 MP8 部分出现了一些在两亲本中没有的新的蛋白区带,其它部分为来自双亲基因的表达。三倍体与杂交子代相比没有明显的差异。

2. 血清蛋白(SP)

鲢、团头鲂的 SP 表型可明显地区分。杂交子代的表型中有些区带为来自双亲基因的表达,有些为来自父本的基因表达,此外还有一些新的区带出现。三倍体与杂交子代相比没有明显差异(图谱略)。

3. LDH 同工酶

由于 LDH 同工酶的组织特异性分布, A_4 和 A_3B 酶带的活性在肌肉中特别高。如显色时间延长至 5 条带都可显出时,在同一板上泳动的杂交子代的酶带已连成一片,为了能显示杂交子代的电泳酶带,在图版 I : 2 中鲢的表型只显出 3 条带,团头鲂只显 4 条带。团头鲂酶带的间隔大于鲢,二者易区分。杂交子代出现 14 条带,三倍体杂交子代只有 10 条带,有 4 条带的活性受到抑制。

4. EST 同工酶

团头鲂肝脏 EST 同工酶也为多态酶。杂交子代的表型为来自双亲的基因表达。三倍体的表型则偏于母本的基因表达(图谱略)。

5. MDH 同工酶

团头鲂肌肉的 MDH 同工酶具 5 条带的表型(D_2 带无活性)。杂交子代也具 5 条酶带的表型,与父本基因表达相近。三倍体显 4 条酶带而与母本相近(图版 I : 4)。

(三) 三倍体鲢的蛋白质和同工酶的表型分析

检测了三倍体鲢的肌肉蛋白(图版 I : 2)、血清蛋白(图谱略)、G3PDH 同工酶(图版 I : 5)、MDH 同工酶(图版 I : 3)和 LDH 同工酶(图版 I : 6),并与二倍体鲢相比,表明三倍体与二倍体鲢在这 5 个指标中均没有明显的差异。

讨 论

远缘杂交子代基因的表达已有报道^[9-12]。观察到杂交子代中存在着父母本基因的同

步表达、非同步表达和只有单方亲本的基因表达，并以基因的协同表达的假设来解释这些现象。也有的认为是基因组之间不协调所造成。本文所检测的8种蛋白质和同工酶的表型中观察到双亲种间这些指标的异同（包括区带的数目、迁移率和活性强弱），可能与其杂交子代基因的表达有关。当种间蛋白质和同工酶的表型有明显差异的情况下，其杂交子代基因的表达常出现下列几种情况：（1）具有来自双亲区带的总和——来自双亲基因的同步表达，常为单聚体的酶或蛋白。（2）表型中出现了在双亲中没有的新区带——也是来自双亲基因的同步表达，常为多聚体的酶或蛋白，当两亲本种的亚基亲和性较大时可形成一些新的杂聚体。（3）某些座位上出现单方亲本基因的表达——双亲基因组之间的不协调而出现的不平衡表达。当种间同工酶的迁移率相同而活性有区别时，其杂交子代的同工酶活性常介于两亲本种之间。当种间同工酶的迁移率和活性都相同时，其杂交子代基因的表达则与亲本种一致。因此就一个杂交组合来说，它的亲代有各种各样的蛋白质和同工酶，其中有的相同而有的不同，因此在杂交子代中基因表达也是复杂而多样的。曾有利用杂交子代具有来自双亲谱带这一规律来鉴定杂交种的报道，但是根据本文结果，在鲢鳙杂交子代中有少数个体的血清蛋白或肌肉蛋白的表型似乎只有父本基因的表达，根据其它指标判断这些少数个体并不是雄核发育的个体而确实是个杂种。因此用生化方法来检测远缘杂交子代时，应采用多项指标比较可靠。

两组不同的异源三倍体蛋白质和同工酶表达与二倍体杂交子代相比有如下几种情况：（1）有较一致的表型（三倍体鲢鳙的肌肉蛋白和血清蛋白）。（2）酶的区带（EST同工酶）和酶活性（MDH同工酶）有减少父本基因的影响而偏母本的表达。（3）部分LDH同工酶受抑制（三倍体鲢团）。这些不同的表达表明异源三倍体中由于增加了一套母本染色体组，基因的表达比二倍体杂交子代更接近母本或趋向一致。除此之外，也有些酶表现出不受染色体倍性的影响，与二倍体的表达相同，表明生物体内对这些酶可能有精密的调控系统，使这些酶的表达趋向恒定。

在观察多倍体的同工酶表达时，曾有人发现在杂合体表型上，双亲的同工酶染色强度的预期比率能确定染色体倍性^[2-4,10]。二倍体和三倍体中双亲的单体酶染色强度比值分别为1:1和2:1，二聚体酶三条区带的染色强度比值则分别为1:2:1和4:4:1，并利用这种同工酶定量表达的规律，成功地鉴定出多倍体鱼。本文所测试的同工酶中没观察到这些定量上的差异，可能还需寻找合适的多态同工酶，以便作为鉴定多倍体的生化检测指标。

参 考 文 献

- [1] Stanley J G, Biggers C J, Schultz D E. Isozymes in androgenetic and gynogenetic white amur, gynogenetic carp, and carp-amur hybrids. *J. Hered.*, 1976, **63**(3): 129-134.
- [2] Allen S K Jr, Gagnon P S, Hidu H. Induced triploidy in the soft-shell clam. *J. Hered.*, 1982, **73**: 421-428.
- [3] Crozier W W, Moffett I J J. Application of an electrophoretically detectable genetic marker to ploidy testing in brown trout (*Salmo trutta L.*) triploidised by heat shock. *Aquaculture*, 1989, **80**: 231-239.
- [4] Danzmann R G, Bogart J P. Gene dosage effects on MDH isozyme expression in diploid, triploid, and tetraploid treefrogs of the genus *Hyla*. *J. Hered.*, 1982, **73**: 277-280.
- [5] Magee S M, Philipp D P. Biochemical genetic analyses of the Graas carp female \times bighead carp male F_1 hybrid

- and the parental species. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1982, **111**, 593-602.
- [6] Seeb J E, Thorgaard G H, Utter F M. Survival and allozyme expression in diploid and triploid hybrids between chum, chinook and coho salmon. *Aquaculture*, 1988, **72**, 31-48.
- [7] 朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法. 水生生物学报, 1992, **16**(2), 183-185.
- [8] 吴力钊, 王祖熊. 长江鲢、鳙、草鱼同工酶基因座位的多态性及种群遗传结构. 李思发等编: 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究, 上海: 科学技术出版社. 1991, p71-82.
- [9] Beck M L, Biggers C J, Barker C J. Chromosomal and electrophoretic analyses of hybrids between grass carp and bighead carp (Pisces: Cyprinidae). *Copeia*, 1984, (2), 337-342.
- [10] Danzmann R G, Down N E. Isozyme expression in F_1 hybrids between carp and goldfish. *Biochem. Genet.*, 1982, **20**, 1-15.
- [11] Scholl A, Anders F. Tissue-specific preferential expression of the *Xiphophorus xiphidium* allele for 6-Phosphogluconate dehydrogenase in interspecific hybrids of platyfish (Poeciliidae, Teleostei). In: J. H. Schroder (Editor), *Genetics and Mutagenesis of Fish*. Springer-Verlag, New York, 1973. pp. 301-313.
- [12] Whitt G S, Philipp D P, Childers W F. Aberrant gene expression during the development of hybrid sunfishes (Perciformes, Teleostei). *Differentiation*, 1977, **9**(1), 97-109.

ISOZYME EXPRESSION OF DISTANT HYBRIDIZATION OFFSPRING AND ARTIFICIAL TRIPLOID IN SILVER CARP (*HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX*)

Zhu Lanfei, Gui Jianfang, Liang Shaochang and Jiang Yigui

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

Abstract

The protein and isozyme phenotypes of diploid and allotriploid hybrids of female silver carp \times male bighead carp and female silver carp \times male blunt snout bream, autotriploid silver carp and their parental species were analysed by gradient gel electrophoresis on polyacrylamide. The gene expression of diploid F_1 hybrids was variable, and the variable expressions might be related to the phenotypic difference in proteins and isozymes in both parental species. In comparison with diploid F_1 hybrids, the phenotypes of muscle proteins and serum proteins were basically identical in the allotriploids of silver carp and bighead carp. In addition, the phenotypes of EST and MDH in both allotriploids were close to those of maternal silver carp. These results suggested that the gene expression of allotriploid should be close to the maternal species and have a stable and identical tendency due to the increase of one maternal genome. The phenotypes of muscle proteins, serum proteins, G3PDH, MDH and LDH isozymes were not different between autotriploid and diploid silver carp.

Key words Silver carp, Distant hybridization, Allotriploid, Autotriploid, Isozyme and protein