

WSTĘPNE BADANIA NAD GRUPAMI KRWI U KARPIA (*CYPRINUS CARPIO*)

Ewa Słota, Jan Rapacz, Jerzy Stefan

Instytut Zootechniki, Zakład Immunogenetyki

Kierownik: prof. dr Jan Rapacz

WSTĘP

Badania nad grupami krwi u ryb zostały rozpoczęte w latach pięćdziesiątych, chociaż prace wstępne notuje się ok. 1941 r. (4). W początkowym okresie największe znaczenie dla rozwoju dalszych badań miały prace Ridgwaya i Klontza (1). Uczni ci otrzymali na drodze immunizacji większą liczbę surowic testowych, przy użyciu których wykryli układ grupowy, analogiczny do układu B u bydła.

Grupy krwi jako cechy, które nie zmieniają się z wiekiem ani pod wpływem przypadkowych zmian warunków zewnętrznych i dziedziczą się w prosty sposób wg praw Mendla, mogą stanowić przydatny materiał do charakterystyki genetycznej ryb.

Dzięki badaniom cech antygenowych krwi można wykazać istnienie odrębnych populacji w obrębie tego samego gatunku. Sprague i Vrooman (3) testując grupy krwi sardynek z Pacyfiku stwierdzili, że ich antygeny erythrocytarne są produktem genów i wyodrębnili dwa układy grupowe krwi B i C, dziedziczące się niezależnie i posiadające po kilka antygenów w każdym układzie. Na podstawie częstotliwości genów stwierdzili obecność przynajmniej dwóch odrębnych populacji na obszarach objętych badaniami.

Przydatność cech antygenowych do rozróżniania poszczególnych ras wykazano już niejednokrotnie u bydła i innych zwierząt, co może sugerować ich zastosowanie u ryb.

Również tak skomplikowane zagadnienie, jak wędrówki ryb, dokładniej można by poznać, używając cech antygenowych krwi do oznaczenia poszczególnych osobników.

MATERIAŁ

Do badań użyto karpia gatunku *Cyprinus carpio*, odmiany wyselekcjonowanej w Zatorze — Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki.

Do izoimmunizacji użyto ryb o wadze powyżej 2 kg w celu uzyskania większej ilości surowicy. Część ryb umieszczano w stawie przesadkowym, część w akwariach. W r. 1965 immunizowano w stawach 19 szt. karpia, zaś w r. 1966 — 8 szt. Ponadto w tym samym roku immunizowano 14 karpia, które przetrzymywano w akwariach. W r. 1967 przeprowadzono immunizację 3 szt. karpia w akwarium i 12 szt. w stawie.

METODA

IMMUNIZACJE

Ryby przeznaczone do izoimmunizacji zostały oznakowane przy pomocy lapisu. Krew od ryb — dawców pobierano do płynu konserwującego, sporządzonego wg własnej modyfikacji metody podanej przez Sprague'a i Vroomana (3). Skład płynu: 8 g cytrynianu sodu, 20,5 g glukozy i 6,5 g chlorku sodu rozpuszczone w 1000 ml wody destylowanej. Ryby były szczepione od 4 do 6 razy dootrzewnowo. Celem stwierdzenia powstawania przeciwciał dla wprowadzonych antygenów badano ich obecność w surowicy biorcy po drugim i następnych szczepieniach. Ryby, których surowice nie wykazywały obecności aglutynin, lub u których miano aglutynin było niskie reimmunizowano po upływie 3 miesięcy.

TEST AGLUTYNACYJNY

Krew na surowicę pobierano z żyły zstępującej do płynu konserwującego, aby uzyskać większe ilości surowicy z plazmy, z której uwalniano włóknik przez ogrzewanie do 56°C i zamrażanie. Surowice przechowywano w temp. -20°C.

Miano przeciwciał po szczepieniach sprawdzano testem aglutynacyjnym (6). Do próbki zawierającej dwie krople odpowiednio rozcieńczonej surowicy odpornościowej dodawano jedną kroplę 2,5% zawiesiny oczyszczonych przez trzykrotne płukanie płynem fizjologicznym krwinek karpia. Probówki wytrząsano i umieszczano w temp. +4°C.

Wyniki testu odczytywano po 2 i 6 godz. i określano je pięciostopniową skalą: ± bardzo mała, ledwo widoczna ilość krwinek zlepionych, + ok. 1/4 krwinek zaglutynowanych, ++ ok. 1/2 krwinek zaglutynowanych, +++ ok. 3/4 krwinek zaglutynowanych oraz ++++ wszystkie krwinki bardzo silnie zaglutynowane.

ABSORPCJE

Surowice izoodpornościowe były poddawane absorpcji, w celu otrzymania surowic monowalentnych lub też sprawdzenia, czy powstała surowica jest monowalentna.

Absorpcję wykonano w następujący sposób: surowicę odpornościową mieszano z oczyszczonymi przez trzykrotne płukanie płynem fizjologicz-

nym krwinkami karpia w stosunku 1/2 lub 2/3 i pozostawiano na 15—20 min., wstrząsając co 5 min. Po absorpcji surowicę sprawdzano testem aglutynacyjnym.

WYNIKI

Na ogólną liczbę 37 ryb szczepionych w stawach — 14 biorców wytworzyło surowice izoodpornościowe o mianie oryginalnym, 1/2 lub 1/4, 12 surowic reagowało słabo (+ lub ±), natomiast 11 ryb nie wytworzyło izoaglutynin.

Brak przeciwciał w niektórych surowicach mógł być spowodowany tym, że w początkowej fazie pracy ryby do szczepień dobierano losowo, na skutek czego pewna liczba dawców i biorców nie różniła się składem antygenowym krwi. W innych przypadkach przyczyną mogła być zbyt niska temp. wody i związany z tym brak zdolności biorców do produkcji przeciwciał.

Tabela 1

Wyniki reakcji surowic izoodpornościowych, w których stwierdzono izoaglutyniny

Lp.	Symbol surowicy izoodpornościowej	Reakcje po szczepieniach				
		II	III	IV	V	VI
1	$A_{(F)}$	org. ±	org.	org.	org.	
2	$F_{(HLB)}$	org.	org.	1/2	org. ±	
3	$B_{(G)}$	—	org. ±	org.	org.	
4	$HLB_{(K)}$	—	org.	org.	org.	
5	$V_{(F)}$	—	org.	org.	—	
6	$II_{(III)}$	—	org. ±	org.	—	
7	$Z IV_{(PPB)}$	—	org.	1/2	org.	
8	$W_{(PPB)}$	—	org.	org.		
9	$Q_{(B)}$	—	—	org.	—	
10	$7_{(F)}$	—	—	org. ±	org.	
11	$E_{(A)}$	—	—	org.	org.	
12	$2_{(1)}$	—	—	—	org.	
13	$7_{(6)}$	—	—	—	—	org.
14	$A_{(E)}$	—	—	—	—	org.

W tab. 1 przedstawiono 14 szczepień, w wyniku których otrzymano surowice odpornościowe. W rubryce drugiej podano symbol biorcy, a poniżej w nawiasie symbol dawcy. W następnych rubrykach podano miana surowic po poszczególnych szczepieniach.

Pierwsze przeciwciała w surowicach izoodpornościowych stwierdzono już po drugim szczepieniu u dwóch karp: A immunizowanego krwią karpia F i F immunizowanego krwią HLB , jakkolwiek surowica karpia A reagowała słabiej. Surowicę A otrzymano w wystarczającej ilości, ale

nie używano jej do dalszych badań ze względu na obecność w niej kilku typów przeciwciał, bardzo trudnych do rozdzielenia na drodze absorpcji, natomiast surowica *F* była używana do dalszych prac.

Największa liczba ryb — 6 szt. reagowała po trzeciej immunizacji. Z grupy tej do dalszych prac użyto surowic *B* i *V*. Pozostałe surowice były wykorzystywane tylko do wykrywania różnic antygenowych przy ustalaniu następnych szczepień, ponieważ zostały otrzymane w niezbyt wielkich ilościach.

Po czwartym szczepieniu zareagowały 3 karpie, a do dalszych prac użyto surowic 7 i *E*.

Po piątym szczepieniu zareagowała ryba 2, jednak brak krwinek dawcy do dalszych szczepień wyeliminował tę surowicę z następnych badań.

Po szóstym szczepieniu natomiast stwierdzono aglutyniny w surowicach karpia 7 szczepionego krwią karpia 6 i *A* szczepionego krwią karpia *E*. Wyniki testu wykazały, że surowica 7 po szczepieniach krwią dawcy 6 zawierała ten sam typ przeciwciał co surowica 7 po szczepieniach krwią dawcy *F*. Przyczyną późniejszej reakcji była niższa temp. wody w czasie tej serii szczepień. Tylko surowica 7 była używana do dalszych prac.

Na rybach, które przeżyły po 3 miesiącach wykonywano reimmunizację.

W 6 surowicach z 22 otrzymanych drogą reimmunizacji wykazano obecność przeciwciał o mianie oryginalnym do 1/10. Pozostałe surowice nie dały żadnych reakcji.

Reimmunizacje, w wyniku których otrzymano surowice odpornościowe reagujące przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Wyniki reakcji surowic odpornościowych uzyskanych drogą reimmunizacji

Lp.	Symbol surowicy izoodpornościowej	Reakcje po szczepieniach				Uwagi
		II	III	IV	V	
1	$A_{(F)}$	org.±	org.	org.	org.±	
2	$A_{(F)}$	—	org.	org.±		przy IV szczepieniu nastąpił spadek temperatury wody
3	$A_{(F)}$	org.	1/4	1/10	1/4	wysoka temperatura wody
4	$A_{(F)}$	org.±	org.±			niska temperatura wody
5	$F_{(HLB)}$	org.	1/2	org.		przy IV szczepieniu nastąpił spadek temperatury wody
6	$F_{(HLB)}$	org.±	1/2	1/4	1/4	wysoka temperatura wody
7	$F_{(HLB)}$	—	org.	org.	—	niska temperatura wody

Wpływ temp. wody na produkcję przeciwciał był tu istotny. Przy pierwszej serii reimmunizacji karpia *A* temp. wody wynosiła ok. 18—20°C. Pierwsze reakcje w surowicy pojawiły się już po drugim szczepieniu. W czasie drugiej serii reimmunizacji temperatura wody spadła przy czwartym szczepieniu, co pociągnęło za sobą spadek miana przeciwciał w tej surowicy. Najwyższe miano (1/10) zanotowano w czasie trzeciej serii, która była wykonana w okresie, kiedy temperatura wody wynosiła 22—25°C. Następna, czwarta seria wykonana przy temperaturze wody ok. 15°C dała w rezultacie surowicę reagującą bardzo słabo. Analogicznie przedstawia się miano surowicy *F*.

Przeprowadzono również szczepienia ryb w akwariach. Stwierdzono, że ryby te nie produkowały przeciwciał nawet w stosunkowo wysokich temperaturach (powyżej 20°C) mimo różnic antygenowych między dawcą a biorcą wykrytych otrzymanymi surowicami.

Otrzymanymi pięcioma surowicami izoodpornościowymi przebadano 233 szt. karpia z ZD Zator i stwierdzono u nich obecność różnic antygenowych krwi.

Tabela 3

Dziedziczenie grup krwi u karpia (badania wstępne)

Potomstwo	Genotypy rodziców					
	7/-	V/-	E/-	F/-	B/B	F/F
	7/-	V/-	-/-	-/-	B/B lub B/-	-/-
Ogólna liczba	30	30	85	55	59	30
Osobniki pozytywne	27	22	45	28	59	30
Osobniki negatywne	3	8	40	27	—	—

Tabela 3 przedstawia dziedziczenie niektórych cech antygenowych krwi u karpia. Należy podkreślić, że są to badania wstępne. Przedstawione w górnych rzędach genotypy rodziców (np. 7/-, F/-, V/-, B/B, E/-, -/-) ustalono na podstawie segregacji cech w potomstwie. I tak na przebadaną liczbę 30 szt. potomstwa po rodzicach o genotypie V/- i V/- stwierdzono, że 22 osobniki mają cechę V, a 8 nie ma tej cechy. Podobnie w przypadku genotypów 7/- i 7/- na przebadanych 30 szt., 27 osobników ma cechę 7, a 3 nie mają tej cechy. W badaniach nad grupami krwi stwierdzono, że obecność jakiejś cechy zawsze dominuje nad jej brakiem. Przy cesze V otrzymano segregację zgodną z liczbą spodzie-

waną. Jeżeli chodzi o cechę 7 segregacja pozornie odbiega od spodziewanej liczby, jakkolwiek przyczyną tego może być mała liczebność badanych osobników potomnych (30 szt.).

W przypadku genotypów rodziców $E/-$ i $-/-$ na badanych 85 szt. potomstwa 45 miało cechę antygenową E , a 40 szt. było pozbawionych tej cechy. Podobnie przy genotypie rodziców $F/-$ i $-/-$ na badanych 55 szt., 28 szt. potomstwa miało cechę F , a 27 jej nie miało. I tu liczba obserwowanych jest zgodna z liczbą spodziewanych. Przy łączeniu heterozygoty z cechą dominującą z homozygotą recesywną 50% osobników potomnych powinno posiadać daną cechę, a 50% będzie także recesywnymi homozygotami.

W przypadku genotypów rodziców B/B i B/B lub $B/-$ oraz F/F i $-/-$ wszystkie osobniki potomne mają cechy B i F , co jeszcze raz dowodzi, że przy grupach krwi obecność danej cechy zawsze dominuje nad jej brakiem.

W materiale nie napotkano na pary, gdzie obydwaj osobniki byłyby recesywnymi homozygotami.

DYSKUSJA

Jak już wspomniano praca została wykonana na karpkach z ZD Zator. Obserwacje i dane niepublikowane zebrane przez Rychlickiego przynoszą informacje dotyczące powstania tej właśnie odmiany. Prace selekcyjne w Zatorze rozpoczęto pod koniec XIX w. Selekcja prowadzona przez Namskiego polegała na doborze osobników o określonym ułuszczeniu począwszy od pierwszego roku życia. Praca ta doprowadziła do wytworzenia miejscowej odmiany. Metoda selekcji jest stosowana w dalszym ciągu aż do ostatnich czasów (7). Jednak nie uzyskano tą drogą czystej linii genetycznej, szczególnie wyraża się to w ułuszczeniu, które ulega rozszczepieniu i ciągle jeszcze pojawiają się nieliczne karpki drobnołuskie.

Pomimo, że wyniki przedstawionych doświadczeń są wstępными, jednak dostarczają informacji z zakresu genetyki karpia. W trakcie badań uzyskano drogą izoimmunizacji i reimmunizacji 14 surowic odpornościowych o mianie oryginalnym do 1/10. Przy pomocy uzyskanych surowic wykazano różnice antygenowe krwi u karpia. Pięć surowic izoodpornościowych użyto do dalszych prac nad dziedziczeniem wykrywanych przez nie cech antygenowych krwi. Na podstawie segregacji cech u potomstwa po rodzicach o znanym składzie antygenowym krwi stwierdzono, że grupy krwi u ryb dziedziczą się wg praw Mendla i że obecność danej cechy antygenowej zawsze dominuje nad jej brakiem. Do tej pory nie stwierdzono innych jakościowych znaczników genetycznych u ryb, co by podkreślało wartość grup krwi jeszcze bardziej.

Prócz wspomnianej już przydatności grup krwi do badań populacyj-

nych i charakterystyki ras, dzięki tym znacznikom można będzie lepiej poznać pewne zagadnienia dotyczące tarła. Liczbowy stosunek samców do samic u karpia i kilku innych gatunków ryb jest zwykle 2:1, jednak dokładnie nie wiadomo, czy ikra zostaje zapłodniona przez jednego, czy też przez oba samce. Wydaje się, że najłatwiej można by to stwierdzić, używając takich znaczników genetycznych, jakimi są grupy krwi.

Ridgway, Utter i Warren wykazali, że przy użyciu badań nad grupami krwi możliwe jest wykrycie inbredu o niebezpiecznych dla hodowli rozmiarach. Stwierdzili oni, że narybek podejrzany o inbred wykazywał albo bardzo wysoką, albo bardzo niską częstotliwość reakcji z poszczególnymi reagentami oraz jednakową siłę reakcji, co wskazuje na jednolitość genetyczną badanej grupy i sugeruje występowanie w niej większej liczby homozygot. Pewien stopień inbredu można zauważyć również u karpia zatorskiego. W czasie testowania narybku surowicą oznaczoną wstępnie symbolem *B* na badanych 155 szt. — 143 miało cechę *B*, a tylko 12 jej nie miało. Również jednakowa siła reakcji tej surowicy sugeruje duży stopień pokrewieństwa u karpia w Zatorze, co może wynikać z długotrwałej selekcji.

STRESZCZENIE

Praca przedstawia wyniki badań nad grupami krwi u karpia, przeprowadzonych w Zatorze.

W wyniku pierwszych prac nad immunogenetyką karpia w Polsce otrzymano 14 surowic izoodpornościowych, z tego 5 użyto do badań genetycznych. W trakcie badań stwierdzono, że surowice izoodpornościowe dla grup krwi można otrzymać na drodze izoimmunizacji ryb przetrzymywanych w stawach przy temperaturze wyższej niż 15°C.

Materiał użyty do badań genetycznych pochodził od trzech par i obejmował 150 osobników. Przy użyciu izoodpornościowych surowic stwierdzono, że segregacja badanych pięciu grup krwi w potomstwie, pochodzącym od trzech par rodziców nie odbiega od praw Mendla.

Na podstawie częstotliwości występowania grup krwi wstępne wyniki badań wykazują, że badany narybek jest w dość dużym stopniu zimbredowany.

LITERATURA

1. Ridgway J. R., Klontz G.: *Fischeries*, 324, 1—9, 1960.
2. Ridgway G. J.: *Xth Eur. Conf. on Animal Blood and Bioch. Pol. Inst. Nat. Rech. Agron.* 361—365, Paris 1966.
3. Sprague L. M., Vrooman A. M.: *Annals of the New York Acad. of Scien.* vol. 97, 3, 1962, 131—138.
4. Taliew D. N.: *Trudy Zoolog. Instit. Akad. Nauk SSSR* vol. 4, 66—91, 1941.
5. Utter F. N., Ridgway G. J., Warren J. W.: *Fish and Game* 52 (3), 180—184, 1966.
6. Wiener A. S., Wexler I. B.: *Bacterial Rev.* 16, 2, 69—87, 1952.
7. Żarnecki S., Karbowski W., Rychlicki Z.: *Rocz. Nauk. rol.*, t. 70 B-2, 207—220, 1955.

Эва Слота, Ян Рапач, Ежы Стефан

ВСТУПИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГРУПП КРОВИ У КАРПА
(*CYPRINUS CARPIO*)

Резюме

Работа представляет результаты исследований групп крови у карпа, проведенных в опытном хозяйстве Затор.

В результате первых работ над иммуногенетикой карпа в Польше получено 14 изоустойчивых сывороток, из них 5 использовано для генетических исследований. Во время исследований установлено, что изоустойчивые сыворотки для групп крови можно получить путем изоиммунизации рыб, содержащихся в прудах при температуре выше 15°.

Материал, использованный для генетических исследований, происходил от трех пар и охватывал 150 особей. При использовании изоустойчивых сывороток установлено, что сегрегация 5 исследуемых групп крови в потомстве, происходящем от трех пар родителей, не отклоняется от законов Менделя.

На основе частоты выступления групп крови предварительные результаты исследований указывают на то, что исследуемая заторская молодежь показывает довольно большую степень инбреда.

Ewa Słota, Jan Rapacz, Jerzy Stefan

PRELIMINARY STUDIES ON THE BLOOD GROUPS IN CARP
(*CYPRINUS CARPIO*)

Summary

This work presents preliminary data on blood group study of fish (carp) carried out on the experimental station Zator. This is the first report on immunogenetics study of carp in Poland. As a result of isoimmunization it was possible, to produce 14 agglutinins, from which five reagents were selected for genetic study. During the course of experiment it became evident that isoimmunization could result in production of agglutinins only, when the temperature of water in a pond raised above 15°C.

Material for genetic study composed of 150 individuals was descended from three pairs of fish. The progeny test showed, that segregation of five antigens agreed closely with those expected suggests that blood group antigens in carp are inherited according Mendelian laws.