

文章编号:1000-0615(2007)06-0825-16

· 综述 ·

水产生物技术研究回顾、最新进展及前景展望

陈松林

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

关键词:水产生物技术; 回顾; 现状; 最新进展; 展望

中图分类号:Q 81; S 917

文献标识码:A

Review, recent progress and prospects of aquaculture biotechnology researches

CHEN Song-lin

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: First of all, the development of aquaculture biotechnology in the world was briefly reviewed, mainly including gene cloning, gene transfer, chromosome manipulation, polyploid induction, gynogenesis and sex control in fish. Secondly, the development and achievement of aquaculture biotechnology recently in China were presented, including the screening and cloning of functional genes in aquaculture animals, the screening and application of molecular marker, breeding by gene engineering and cell engineering, culture of fish embryo stem cell and the establishment of cell library, products of gene engineering for fishery, vaccine development, the cryopreservation of fish sperm and embryo, and so on. Thirdly, the problem and deficiency of the development and research in aquaculture biotechnology in China were pointed out by comparing with the development abroad. Finally, the trend of aquaculture biotechnology was prospected, moreover, the trend and key points of research in 5 to 10 years in China were suggested.

Key words: aquaculture biotechnology; review; status; recent progress; prospect

1 简要回顾

水产生物技术是20世纪80年代开始发展起来的、以水产生物为主要研究对象,以水产业应用为目的,以基因工程、细胞工程、发酵工程、酶工程等现代生物技术为主体的综合性技术体系。水产生物技术是生物技术的重要组成部分,也是当今世界发展最快的高新技术领域之一。由于生物技术在水产养殖、良种培育、性别控制、生殖调控与苗

种生产、病害防治、种质资源保存与濒危物种保护以及水环境监测与污染治理等方面具有重要的理论及应用价值,水产生物技术自诞生之日起,就受到各国政府和科学家的高度重视。水产生物技术从80年代的起步期到目前的飞速发展期,可以大致划分为3个阶段:

1.1 从20世纪80年代初到90年代初,水产生物技术处于发展的早期

目的基因克隆与表达 在这个阶段,水产

收稿日期:2007-01-05

资助项目:国家“九七三”计划(2004CB117403);山东省“泰山学者”建设工程专项经费资助;青岛市科技将才计划项目资助

作者简介:陈松林(1960-),男,湖北武汉人,研究员,博士生导师,中国水产科学研究院水产生物技术领域首席科学家,主要从事水产生物技术研究。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

养殖生物基因克隆的工作主要集中在鱼类上,研究的基因主要包括多肽激素和抗冻蛋白。其中,加拿大、美国和英国科学家分别克隆了美洲黄盖鲈 (*Limandn americanus*)、美洲大绵鳠 (*Macrozoarces americanus*) 及大西洋鳕 (*Gadus morrhua*) 等鱼类抗冻蛋白基因或 cDNA。在下丘脑激素中,主要分离与克隆了大西洋鲑 (*Salmo salar* Linnaeus) 促性腺激素释放激素 (GnRH) 的 cDNA。在垂体激素中,研究最多的为鱼类生长激素 (GH) 基因 (或 cDNA)。从虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 和罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 等鱼类基因组文库中克隆了 GH 基因;从虹鳟、大马哈鱼 (*Oncorhynchus keta*)、大西洋鲑、大鳞大马哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*)、银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*)、真鲷 (*Pagrus major*)、金鲷 (*Chrysophrys auratus*)、鲈 (*Pleuronectes platessa*)、金枪鱼 (*Thunnus thunnus*)、罗非鱼、鲤、鲢、鳙 (*Aristichthys nobilis*)、草鱼和鳊 (*Anguilla japonica*) 等 16 种鱼类 cDNA 文库中克隆了 GH cDNA。除 GH 外,还克隆了大鳞大马哈鱼、虹鳟和罗非鱼等鱼类的催乳素 (PRL) cDNA 和大马哈鱼及鲤、鲢等鱼类的促性腺激素 (GTH) 的 cDNA。同时,还从大西洋鳕、鲈鱼和大马哈鱼脑垂体中分离到一种新的激素 (somatolactin),暂时取名为生长-催乳素,并对这种激素的基因克隆进行了研究。此外,科学家们还对某些鱼类的胰岛素原基因、卵黄蛋白基因、类胰岛素生长因子 (IGF-I) 基因、金属硫蛋白基因及肌动蛋白基因等进行了克隆和序列分析。

在这个阶段,国际上还采用基因工程技术进行了鱼类生长激素的研制和生产。日本、美国、加拿大、以色列和比利时等国相继将大马哈鱼、虹鳟、罗非鱼、真鲷、金枪鱼、鳊和鲤的生长激素 cDNA 重组到大肠杆菌中,并成功表达生产了这些鱼类的生长激素。这些重组鱼类 GH 产品对不同幼鱼的生长发育具有明显的促进作用,其生长率一般比对照组高 50% ~ 300%,饵料系数也明显降低。鱼类重组 GH 的大量问世将为提高养殖鱼类生长速率、缩短养殖周期开辟了一条有效途径,在水产养殖中具有很大应用潜力和推广价值。

鱼类基因转移 Palmiter 等^[1]将生长激素基因转移到小鼠受精卵中,成功地研制出了快速生长的转基因“超级鼠”。这一开创性成果诱发了鱼类基因转移的研究。我国是世界上最早开展鱼类基因转移研究的国家之一。Zhu 等^[2]率先将人 GH 基因转入泥鳅和金鱼受精卵中,成功地获得转基因鱼。随后世界各国几十个实验室在短短几年中,在 10 多种鱼类上开展了基因转移的研究工作。早期的研究主要以哺乳类生长激素基因为主,随后才逐渐使用鱼类自身的生长激素基因。在这几年,科学家使用多种人工构建的外源基因和启动子在鲤、鲫、金鱼、泥鳅、虹鳟、大马哈鱼、鲢、青鳉、斑马鱼、罗非鱼、鳊、真鲷、大西洋鲑、沟鲈等近 20 种鱼类上进行了基因转移研究。从所报道的鱼类基因转移的研究结果看,只有加拿大的邱才良和 Devlin 实验室获得具有应用潜力、达到商业化水平的转基因鱼。尽管这一成果目前尚未在水产养殖中大规模推广应用,但却标志着鱼类基因转移研究进入了一个新的阶段,离转基因育种技术的产业化为期不远。

鱼类基因转移研究的另一个重点就是抗冻蛋白基因的转移。加拿大的邱才良等率先开展了将具有抗冻能力的鲈的抗冻蛋白基因分离出来后转移到大西洋鲑体内的研究工作。目前已经获得了能表达外源抗冻蛋白基因的大西洋鲑,并且发现外源基因能通过性细胞遗传给后代,抗冻蛋白的血清水平约为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。目前的主要问题是抗冻蛋白的表达水平还太低,不足以起到抗冻保护的作用。

染色体操作和多倍体诱导 鱼类多倍体诱导研究的主要目的是获得三倍体不育系。因为三倍体鱼类具有控制过度繁殖、抑制性腺发育、促进生长以及提高鱼肉品质等优点,因而受到普遍的重视。自 20 世纪 50 年代末国外首次诱导刺鱼三倍体成功以来,迄今已先后获得了鲟鱼、草鱼、斑点叉尾鲟、罗非鱼、鲢、鲤、虹鳟,银大马哈鱼、大鳞大马哈鱼、大西洋鲑、香鱼、刺鱼、鲢和鲤等近 20 种鱼类的三倍体,以及鲟鱼、斑点叉尾鲟、虹鳟、罗非鱼和鲫等多种鱼类的四倍体。其中只有少数几种鱼类的多倍体进行了商品化生产,达到了产业化水平。法国学者 Chourrou^[3]在虹鳟上的研究最为突出,他们首先诱导产生四倍体虹鳟,并让其繁殖产生了四倍体第二代,随后,用四倍体与二倍

体交配产生了大量的三倍体。这些三倍体后代表现出明显的生长优势,颇受鱼类养殖者的欢迎。另外,在英国和日本,三倍体虹鳟也进入了商业化养殖中。除虹鳟外,日本还开展了诱导三倍体香鱼和三倍体牙鲆的研究与开发,发现三倍体香鱼的生长速率和抗寒能力都明显优于二倍体香鱼。三倍体香鱼已从实验室走向商品化,1992年一次就向日本某河道中放流三倍体香鱼一万余尾。三倍体牙鲆不能性成熟,生长比二倍体快1.4倍,很受消费者和养殖家的欢迎,具有很大的商业价值和开发潜力。

雌核发育和性别控制 在这个时期,雌核发育和性别控制的主要研究对象还是养殖鱼类。这是因为许多鱼类在生长速率上雌雄个体之间存在着明显差别,例如,鲤、鲫、草鱼及某些鲑科鱼类的雌性个体比雄性个体生长快,而罗非鱼的雄性又比雌性生长快,因此,通过某种处理,使得后代全部为单一性别的群体(即性别控制)的研究,对于开展鱼类单性养殖、提高某些养殖鱼类的产量具有重要意义和应用潜力。

鱼类单性苗种的生产主要有两条途径:(1)用类固醇性激素处理胚胎或鱼苗直接雄性化或雌性化。这一方面的研究在日本、中国、台湾、菲律宾、美国、英国和以色列等国家和地区得以广泛开展。据不完全统计,已在鲤、金鱼、罗非鱼、青鳉、斑马鱼、虹鳟、大鳞大马哈鱼、大西洋鲑和银大马哈鱼等多种鱼类上成功地进行了遗传型雌性(雄性)向表型雄性(雌性)转化的研究工作。其中以我国杨永铨等人的工作较为突出。他们生产的罗非鱼全雄鱼具有“杂种”和“全雄”双重优势,生长速率比罗非鱼两性群体快38.5%,群体产量提高43%,在罗非鱼养殖中具有非常重要的推广应用价值和经济效益。(2)雌核发育结合性逆转生产遗传上雌性(XX)而生理上雄性的个体,这样的个体既可产生全雌单性精子(X精子),用这样的精子与正常卵子受精,即可产生全雌后代。应用这项原理,我国学者吴清江等建立了鲤鱼人工雌核发育系,并以雌核发育子一代兴国红鲤为母本,已雄性化的雌核发育镜鲤为父本交配产生了全雌杂交鲤。全雌鲤的养殖产量明显高于普通鲤,很受水产养殖者欢迎,在水产业中大规模推广应用后产生了可观的经济效益和社会效益。与此相类似,加拿大科学家成功生产出了全雌大鳞大马哈

鱼和大西洋鲑,这两种鱼的雌性个体均比雄性个体成熟晚一年,因而雌鱼生长更快,单养雌鱼的产量明显高于雌、雄混养的产量。迄今,加拿大渔业和海洋部已生产出售了数百万尾全雌大鳞大马哈鱼苗,极大地推进了加拿大大马哈鱼养殖业的发展,产生了很大的经济效益和社会效益。最近,加拿大科学家又借助于基因工程技术从大鳞大马哈鱼Y染色体克隆出一个雄性特异的DNA探针,用此探针能很容易鉴别出遗传性别。这一技术的开发成功为大马哈鱼单性苗种的生产提供了一条行之有效的检测手段,在鱼类性别控制和单性苗种生产上具有重要意义和应用潜力。

1.2 从20世纪90年代初到20世纪90年代中后期,水产生物技术研究处于平稳发展期

这个阶段一方面继续进行基因克隆、表达载体的构建和基因转移,主要是克隆鱼类自身的目的基因(如生长激素基因等),同时,还在寻求新的发展方向:

基因转移 鱼类基因转移研究继续快速发展,在这个阶段主要是构建鱼类自身的转基因元件,包括目标基因和启动子。用于转移的目标基因从“非鱼”基因转变为“全鱼”基因。如朱作言等^[4]克隆了鲤和草鱼生长激素基因和肌动蛋白基因;Du等^[5]构建了一个“全鱼”生长激素基因表达载体,用于鱼类基因转移研究;同时筛选高效的鱼类生长激素基因启动子也是转基因研究的重点之一。其中较为突出的就是加拿大学者筛选到一个高效的启动子——美洲黄盖鲈抗冻蛋白(AFP)基因启动子^[6]。在这个时期,鱼类生长激素基因转移的结果最为显著。加拿大获得的转生长激素基因大麻哈鱼的生长速度比对照快3~5倍,其中有些个体的生长速度甚至快10~30倍^[7-8]。转生长激素基因鲤鱼最大个体为对照组的2倍,个别情况甚至为对照的7.7倍^[9]。这些研究为转基因鱼的产业化应用奠定了重要基础。

分子标记的开发与遗传连锁图谱构建 1974年,Grodzicker等创立了RFLP(restrictive fragment length polymorphism, RFLP)技术,这是最早的DNA分子标记,1980年Bostein首先提出了利用RFLP作为标记构建遗传图谱。RFLP作为第1代DNA分子标记开创了直接应用DNA多态性发展遗传标记的新阶段。随后相继开发了RAPD、SSR和AFLP等不同的分子标记技术。由

于分子标记在水产生物遗传育种、遗传多样性分析和种质鉴定等方面具有重要应用价值,因而在1990年代初期很快进入水产养殖领域,并形成研究热潮。在90年代应用分子标记研究的水产养殖动物有百种之多,这个阶段的分子标记以微卫星和RAPD为主。研究的种类主要包括虹鳟^[10]、大西洋鲑^[11]、大菱鲆^[12-15]、牙鲆^[16]、鲈鱼^[17-18]、鳊鱼(*Muraescsox cinercus*)、中华鲟^[19]等。随着分子标记数量的增多,一些学者开始建立鱼类遗传连锁图谱。第1个鱼类遗传连锁图谱是Postlethwait等^[20]在模式鱼类斑马鱼上建立的。随后,Kocher等^[21]发表了罗非鱼的第一个遗传连锁图,其中包括112个AFLP标记和一些微卫星标记;Young等^[22]利用雄核发育的双单倍体虹鳟构建了一个初步的连锁图。由于分子标记数量的限制,这些图谱中各标记间的距离还比较大,还达不到进行QTL定位的要求。

胚胎干细胞(ES)培养 1981年,Evans和Kaufman等率先在小鼠上建立胚胎干细胞系。由于胚胎干细胞在动物遗传学、发育生物学和基因功能分析等方面具有重大意义和应用价值,因此,胚胎干细胞培养研究很快在人和大鼠、鸡、兔、猪等各种家养动物上开展起来。而有关鱼类胚胎干细胞培养最早的尝试是美国Collodi等^[23]在斑马鱼上进行的,尽管他们当时没有建立成胚胎干细胞系,但开辟了鱼类胚胎干细胞研究的领域。随后,日本的Wakamatsu等^[24]在青鳉上开展了ES细胞分离与培养的研究,他们初步建立了ES细胞系,同时德国的Hong和Schatl^[25]也建立了青鳉胚胎干细胞系,并通过ES细胞移植获得了青鳉嵌合体^[26]。随后,胚胎干细胞培养逐步向养殖鱼类上发展。

染色体操作和性别控制 在这个阶段,鱼类染色体操作和性别控制的研究进行得不是很多,但也有一些鱼类雌核发育的研究仍在进行。如美国Goudie等^[27]通过人工诱导获得了雌核发育和多倍体沟鲶;日本开展了泥鳅雌核发育的研究^[28];泰国开展了*Puntius gonionotus* Bleeker雌核发育的研究^[29],同时,雌核发育和性别控制研究在海水养殖虾、贝类上蓬勃开展起来。相建海等^[30]年以确凿的细胞学证据证明了对虾人工雌核发育的可行性,随后,戴继勋等^[31]用⁶⁰Co γ 射线照射中国对虾的精子诱导雌核发育,实验表明

用⁶⁰Co γ 射线照射精子受精后,随着辐射剂量的增加,胚胎的存活率显著下降,而到了更高剂量时,胚胎的存活率反而增加,存活率出现了“U”形曲线,表现有所谓Hertwig效应。蔡难儿等^[32]用紫外线照射精子、受精、温度或细胞松弛素B处理卵子方法,诱导出了中国对虾雌核发育个体,最高诱导率达37.22%。包振民等^[33]用细胞松弛素B处理中国对虾的受精卵,获得了三倍体对虾幼体,诱导率达62.5%。孙振兴和李诺^[34]在皱纹盘鲍上也进行了三倍体诱导研究。

1.3 从20世纪90年代后期到2006年年底,随着人类基因组计划的完成,水产生物技术的发展迎来了前所未有的历史机遇,进入快速发展时期

在这个阶段,水产生物技术更受各国政府的重视,成为世界各国研究开发的重点,成为水产科技竞争的焦点。这个阶段水产生物技术的特点就是水产生物功能基因组的兴起和发展。例如,美国自1997年就开始投巨资开展水产生物基因组的研究,其重点是5种养殖动物(斑点叉尾鲟、大麻哈鱼、罗非鱼、对虾及牡蛎)的基因组作图和全序列分析(即结构基因组计划)的研究计划,目前取得重大进展。目前,美国、欧洲和日本相继成立了海洋生物技术学会,并联合起来召开国际海洋生物技术大会,在2003年以前,海洋生物技术大会是每隔3年召开一次,但从2003年开始,鉴于水产生物技术发展的速度之快,从业人数越来越多,因此特地将会议改为2年召开一次;2003年在日本召开了第6届国际海洋生物技术大会(IMBC);2005年在加拿大召开了第7届国际海洋生物技术大会(IMBC),2007年将在以色列召开第8次国际海洋生物技术大会;可见,水产生物技术已成为国际上非常活跃的研究领域。

功能基因组研究 功能基因组研究是进入21世纪来水产生物技术发展的一个重要特点。美国科学家以斑点叉尾鲟等为材料,开展了功能基因组的系统研究,建立了斑点叉尾鲟多种组织(包括头肾、脾脏、肝脏、皮肤、脑、胃及肠)的cDNA文库,分别测定了数十万个EST序列,对这些组织的基因表达谱进行了分析,并筛选到一批与发育、生殖及免疫相关的功能基因^[35]。日本科学家则以牙鲆为模式鱼类,进行了重要性状相关功能基因筛选的研究;测定了数以万计的EST序列,筛选到一大批免疫相关功能基因^[36-38]。美

国科学家还开展了凡纳滨对虾的功能基因组研究,建立了相关组织的 cDNA 文库,测定了数千个 EST 序列,还应用获得的 EST 制备了 cDNA 文库微阵列,用于筛选病毒应答基因^[39]。其他国家,如英国、法国、加拿大、挪威、新加坡、泰国等许多国家科学家也都对自己国家特有的种类进行了功能基因筛选的研究。

国内在几种重要海水养殖动物功能基因筛选方面也开展了卓有成效的工作。如 Xiang 等^[40]构建了中国对虾和栉孔扇贝的 cDNA 文库,测定了上万个 EST 序列,获得一大批功能已知或未知的基因序列;陈松林^[41]和 Chen 等^[42-43]在海水养殖鱼类功能基因组研究上开展了大量工作,构建了真鲷、大菱鲆和牙鲆 cDNA 文库,测定了 6 000 多个 EST 序列,筛选和克隆到功能基因 400 多个,其中与免疫/抗病相关功能基因 100 多个,主要包括抗菌肽、天然抗性相关巨嗜蛋白和 MHC 等,与生长和代谢相关功能基因 20 多个,其他相关基因 300 多个,全部被美国 GenBank 数据库收录;其他学者在石斑鱼和银鲫等鱼类上也筛选到一些生长发育和免疫相关功能基因^[44-45];此外也开展了鱼、虾重要性状相关功能基因筛选与克隆的研究。

结构基因组和遗传图谱研究 美国于 1997 年启动了大马哈鱼、斑点叉尾鲟、罗非鱼、对虾及牡蛎的基因组计划。他们首先开展了遗传连锁图谱构建的研究工作。Liu 等^[46]构建了斑点叉尾鲟连锁图谱,正在进行 BAC 文库构建和基因组序列测定的工作。微卫星和 AFLP 等分子标记技术日益成熟,在一些重要水产养殖生物开发了大量的微卫星和 AFLP 等分子标记,通过这些分子标记,国际上已构建了虹鳟、罗非鱼、沟鲈、牙鲆、斑节对虾、牡蛎等水产养殖动物的遗传连锁图谱;国内,迄今尚未启动水产养殖生物基因组测序的研究,目前主要是筛选分子标记和建立遗传连锁图谱。已经在草鱼、鲤鱼、鲢、鳙、银鲫等淡水鱼类和真鲷、大菱鲆等海水鱼类上分离了大量的微卫星标记,并筛选到与鲤鱼抗寒相关分子标记和与牙鲆抗病相关的 AFLP 标记,并且构建了鲤鱼和栉孔扇贝的遗传连锁图谱^[47]。

养殖鱼类胚胎干细胞和基因打靶研究 进入 21 世纪后,胚胎干细胞培养和基因打靶研究逐步在养殖鱼类上开展起来。目前国外已在金头鲷

和大菱鲆上开展了胚胎干细胞培养的研究,并初步建立了金头鲷的 ES 细胞系;国内,目前只有 Chen 等^[48-50]建立了花鲈和真鲷胚胎干细胞系,并通过细胞移植证明了胚胎干细胞的多能性,同时分离了鲈肌肉生长抑制基因,构建了基因打靶载体,并建立了鱼类细胞基因打靶的正负选择策略和技术条件。为鱼类基因打靶技术的建立奠定了重要基础。另外,有关学者还建立了花鲈、真鲷、牙鲆、大菱鲆、漠斑牙鲆等主要海水养殖鱼类细胞系 10 多个,建立了包括 20 多个海、淡水鱼类细胞系在内的细胞库 1 座^[51-52]。

性别决定机制和性别控制研究 鱼类作为较低等脊椎动物,性别决定机制和性腺分化极其复杂,鱼类的生理性别除了受遗传因素影响外,还受到外部环境因子(诸如:温度、光照和食物等)的影响,是二者相互作用的结果。这就给鱼类性别决定研究带来了一定难度,但是,随着分子生物学技术的迅猛发展,近几年来有关鱼类性别决定机理及性别相关基因的研究已经取得了相当大的进展。Matsuda 等^[53]筛选到青鳉雄性决定基因 *DMY*,这是在鱼类中发现的第一个性别决定基因。随后,Nanda 等^[54]也从青鳉中克隆到了 *DMY* 基因,命名为 *DMRTLY*。但 Kondo 等^[55]以青鳉的 *DMY* 和 *DMRT1* 基因为探针,通过 DNA 印迹法在西里伯斯青鳉(*O. celebensis*)、曼谷青鳉(*O. mekongensis*)、虹鳉(*Poecilia reticulata*)、罗非鱼、斑马鱼中都没有找到雄性特异的片段。Volf 等^[56]针对这种情况进一步通过种系发生(phylogenetic)分析表明,青鳉的 *DMY* 是进化上出现比较晚的一个 Y 染色体特异基因,它是由脊椎动物中参与睾丸发育的基因 *DMRT1* 复制而来,而且这个事件发生在青鳉与其他鳉科鱼类分开之后,所以,其他鱼中不存在 *DMY* 基因。

随着分子标记技术的发展,近几年国际上筛选鱼类性别相关分子标记的研究也取得较大进展。Kovacs 等^[57]用 RAPD 扫描非洲鲶鱼(*Clarias gariepinus*)雌雄基因池,找到两个雄性性别相关的 RAPD 标记;Rechael 等^[58]又在虹鳉中筛选到 2 个雄性性别连锁的微卫星标记。Waldbieser 等^[59]从斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)的基因序列和基因组 DNA 文库的随机克隆里鉴定出一些微卫星位点(其中 7 个位点和性别决定位点紧密连锁),并且参照两个家系绘制了沟鲈基因组的

遗传连锁图谱。Lee等^[60]找到10个与表型性别连锁的微卫星标记。这些标记可以直接用于不同Y染色体等位基因功能的研究和具有1个或者几个Y染色体拷贝的亲鱼的鉴定。Ezaz等^[61]用AFLP技术扫描尼罗罗非鱼基因组,找到3个Y染色体连锁(OniY425、OniY382、OniY227)和1个X染色体连锁(OniX420)的AFLP标记,其中OniX420和OniY425证明为等位基因。然而这些标记却不能鉴别没有亲缘关系的个体的性别,表明这些标记和性别决定位点之间发生了重组。国内有关鱼类性别相关基因或分子标记的研究工作开展不少,但成功地筛选到性别特异基因或标记的则很少。Chen等^[62]采用AFLP分子标记技术成功地筛选到半滑舌鳎雌性特异AFLP分子标记,并建立了遗传性别鉴定的分子生物学技术。

随着海水鱼类养殖业的迅速发展,海水鱼类优良品种培育成为重点研究内容,由于某些鱼类雌雄个体生长差异明显,因而借助生物技术手段培育单性苗种对于提高水产养殖产量和经济效益就显得非常重要。国际上近几年在大西洋庸鲽^[63]、牙鲆^[64]和大菱鲆^[65]等鲆鲽鱼类上开展起来;国内,近几年,除了在鲤科鱼类多倍体育种上首次研制出雌雄两性能育的异源四倍体鲫鲤外^[66],还开展了牙鲆和栉孔扇贝等海水鱼、贝类雌核发育的研究。

2 国内水产生物技术研究最新进展(2005-2006年)

2.1 水产动物功能基因的筛选与克隆

国内许多科研和教学单位都开展了水产养殖动物基因筛选与克隆的研究,这方面的研究也成为近几年国内水产生物技术领域的研究热点,取得了非常明显的进展。据不完全统计,2005-2006年度,我国学者在国内刊物上发表有关基因克隆、序列分析以及表达分析方面的论文达80篇以上,在国际SCI刊物上发表的基因克隆方面的论文也达80篇以上。这些文章所涉及的基因大致可分为免疫/抗病相关基因、生长、生殖与发育相关基因、性别控制相关基因、溶菌酶和激酶等酶类基因等几大类。研究的对象很多,主要包括牙鲆、大菱鲆、石斑鱼、大黄鱼、鲈、真鲷、罗非鱼、银鲫、鳊、鲢、黄鳝、草鱼、鲤、鲟鱼等海、淡水养殖鱼类,中国对虾、斑节对虾、螯虾、中华鳖、扇贝、中华

绒螯蟹、罗氏沼虾和日本沼虾等无脊椎动物,另外还有一些文章涉及到斑马鱼和文昌鱼等模式动物。其中具有代表性的研究包括在银鲫和石斑鱼上筛选到一批发育、生殖及免疫相关功能基因,在国内外刊物上共发表基因方面的论文20多篇^[43,67-77];通过EST大量测序,筛选到中国对虾和栉孔扇贝生长、生殖和免疫相关功能基因,并在国内外发表论文20多篇^[67,72,76,78-87];建立了真鲷、大菱鲆和牙鲆cDNA文库6个,测定了EST序列6000多个,筛选和克隆到功能基因400多个,其中与免疫/抗病相关功能基因40多个,主要包括抗菌肽、天然抗性相关巨嗜蛋白和MHC等,与生长和代谢相关功能基因20多个,其他相关基因300多个,在国内外发表研究基因方面的研究论文20多篇^[43,72,88-95];对石斑鱼等鱼类的生长激素和类胰岛素生长因子I型受体等激素或神经递质等相关功能基因以及免疫相关功能基因等进行了克隆和分析,在国内外杂志上发表了一些论文^[67,96-99];对日本对虾和斑节对虾抗病毒相关功能基因进行研究,发表文章数篇^[100-101];对草鱼免疫相关基因进行研究,发表了一些文章^[102-104];克隆了与淡水鱼类生长和病害等相关功能基因10多个;克隆了鲈鱼白细胞介素等免疫相关功能基因数个。

2.2 分子标记的筛选与应用

近两年来国内对水产动物分子标记的开发非常重视。国内一些单位已经建立了多种不同水产养殖动物的微卫星、AFLP和ISSR等分子标记技术。2005-2006年来,在淡水动物方面,主要筛选开发了草鱼、鲢、鲤、鳙、哲罗鱼、鳊、中华鲟、铜鱼、圆口铜鱼、稀有鮡鲫等水产动物的微卫星标记^[78,105-111,116-118];在海水动物方面,主要筛选开发了大菱鲆、红鳍东方鲀、虾夷扇贝、牙鲆、紫红笛鲷、中国对虾、真鲷、大黄鱼、皱纹盘鲍、黄鳍鲷等水产养殖动物的微卫星标记^[68,79,112-115,119-125];此外,还建立了牙鲆AFLP和ISSR分析技术,初步筛选到牙鲆抗病相关的AFLP标记^[120]。综上所述,近两年国内已筛选开发了20多种重要水产养殖动物微卫星标记,但绝大部分都是来源于基因组中的微卫星标记,只有部分来自表达序列标签的微卫星,即EST-SSR(I型标记)算得上是功能性分子标记^[68,112,126],因此这些微卫星标记还有待用于分子标记辅助选育种实践中去。在筛选与

感兴趣的目标性状连锁的功能性分子标记方面,梁利群等^[127]筛选出并定位了鲤鱼抗寒相关分子标记。Zhang 等^[72]克隆了部分海水鱼类的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)基因并进行了深入研究,发现 MHC 的某些等位基因/基因型与牙鲆对鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)的抗性/感性相关,因此这些 MHC 的等位基因/基因型可以作为抗病基因标记来定向选育牙鲆抗病品系。为了有效的开展分子标记辅助选育种,构建遗传连锁图谱及定位数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)是必要的。目前国内学者已经构建了鲤、中国(明)对虾、栉孔扇贝等水产经济动物的遗传连锁图谱^[47,67,128-129],这为将来的 QTL 定位及分子育种打下了良好基础。

2.3 基因工程和细胞工程育种

重点放在外源基因的转移方法和转基因水产生物的安全性评价上。Wu 等^[130]构建了斑马鱼双色荧光基因载体,以用于基因敲除和基因插入研究;Wang 等^[131]进行了外源生长激素基因对转基因鲤免疫功能影响的研究;陈开健等^[132]采用显微注射法将人 α 干扰素(HuIFN α)重组基因转入草鱼 I~II 细胞期的受精卵。

在细胞工程育种方面,近两年国内的研究又逐渐多了起来,主要开展了雌核发育的研究,研究的对象涉及到鱼、虾和贝类,采用的方法大多采用异源精子诱导法,其中较有代表性的工作包括:凌去非等^[133]进行了丁鲷卵子雌核发育的研究;张桂蓉等^[134]采用 RAPD 技术分析了人工雌核发育鲢近交 F₁ 遗传距离、遗传相似度及群体遗传多样性;王伟等^[135]表明异质雌核发育牙鲆的遗传多态性和平均杂合度明显低于自然和养殖群体;董迎辉等^[136]开展了栉孔扇贝雌核发育的研究;王晓清等^[137]开展了大黄鱼雌核发育的研究;李雅娟等^[138]采用紫外线照射法灭活精子获得四倍体人工雌核发育诱导太平洋牡蛎;朱晓琛等^[139]采用微卫星标记对牙鲆减数雌核发育二倍体家系和卵裂雌核发育二倍体家系的纯合性进行检验,发现牙鲆卵裂雌核发育二倍体一代即可形成纯合子,而减数雌核发育二倍体由于具有较高的重组率,使其与母本的遗传同质性较高;相关学者则开展了栉江珧、栉孔扇贝和牙鲆雌核发育的研究^[140-143]。杨景峰等^[144]开展了斑马鱼雄核发育

诱导条件的研究。Xiang 等^[145]等通过热休克方法成功得到了中国对虾的三倍体,并在实验室培养条件下研究了二倍体和三倍体在体重、体长上的差别和关系,对甲壳类三倍体的研究很有帮助。Sun 等^[146]通过紫外线照射方法,灭活镜鲤精子,然后用其诱导日本鲫鱼的卵进行了雌核发育。

2.4 水产养殖动物胚胎干细胞的培养和细胞库的建立

近几年在海水鱼类胚胎干细胞培养和海水鱼类细胞库建立方面还是取得明显进展。例如,Chen 等^[50]、叶寒青等^[147]以及沙珍霞等^[148]在鲈鱼和真鲷胚胎干细胞系的基础上,将绿色荧光蛋白基因(GFP)转移到花鲈胚胎干细胞中,建立了表达 GFP 的花鲈胚胎干细胞株,同时还建立了胚胎干细胞移植技术,获得了 GFP 标记的胚胎干细胞移植的鲈鱼和斑马鱼胚胎和鱼苗。另外,还构建了鲈鱼生长抑素基因的同源重组载体,并建立了鱼类细胞基因打靶的正负选择策略和技术条件,在国际上也占有一席之地;同时,还建立了花鲈、真鲷、牙鲆、大菱鲆、漠斑牙鲆和星鲈等主要海水养殖鱼类细胞系十多个;一些学者在对虾和扇贝细胞培养方面做了一些工作,初步建立了原代细胞分离与培养技术,且可以在体外传代培养几次。张晓军等^[149]对 EGFP 基因在中国明对虾原代培养细胞中的导入和表达进行了研究。罗鹏等^[150]等对凡纳滨对虾血淋巴、类淋巴细胞进行了培养,发现 pH 在 7.0~7.2 时血淋巴和类淋巴细胞生长最好,且类淋巴细胞迁出迅速。Chen 等^[151]找到了适合低血清培养大马哈鱼胚胎细胞的葡萄糖和谷氨酸盐的浓度,并根据细胞生长和新陈代谢特点建立了培养技术。相关学者还建立了鲤尾鳍和吻端上皮细胞系,同时还进行了鲤体细胞核移植的初步研究^[152-153]。王宏伟等^[154]开展了日本对虾肝胰腺细胞和血细胞原代培养的研究。

2.5 渔用基因工程产品和疫苗的研制

王蕴等^[155]采用 RT-PCR 方法从鲤脑垂体获得了两种 GtH β 亚基的 cDNA 克隆到 pET-32(a) 中,转化 BL21(DE3),以 IPTG 诱导融合蛋白的高效表达,Western-blot 及 ELISA 分析,结果显示获得的多抗能特异识别各自的天然蛋白。戴汉川等^[156]采用 RT-PCR 技术从鲤肠系膜脂肪组织中扩增出鲤肥胖基因的 cDNA 编码序列,构建了原核表达载体 pET-28a-li,利用 IPTG 在大肠杆菌

中进行了诱导表达,并对表达产物进行了初步纯化和生物活性检测,表达产物经过纯化和复性能够明显抑制小鼠的摄食和生长。Chen等^[43,157]克隆了真鲷抗菌肽 hepcidin 基因,并在酵母中进行了表达,获得了重组抗菌肽,并检测到抗菌活性。Xu等^[158]在家蚕中表达了 WSSV 病毒的 VP28 和 VP19 蛋白,并通过口服处理作用于小龙虾,表明对提高小龙虾抗 WSSV 的能力有一定作用。Du等^[80]在大肠杆菌中表达 WSSV28 蛋白,并提高了小龙虾对 WSSV 病毒的抵抗力。

2.6 鱼类低温生物工程研究

近几年来,我国在海水鱼类精子和胚胎冷冻保存方面取得重大进展,在精子冷冻保存方面,共建立了近 20 种海水鱼类精子冷冻保存技术和海水鱼类精子库,达到产业化应用水平,采用微卫星技术揭示冷冻精子受精后代遗传结构没有变化^[119,159],并应用冷冻精子进行了杂交育种实验^[160-162]。特别是在海水鱼类胚胎冷冻保存方面取得突破性进展,研究了抗冻剂对牙鲆胚胎的毒性作用,建立了海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存技术,多次成功地在液氮中获得冷冻复活的牙鲆胚胎,并孵化出鱼苗^[162-167],该领域的研究目前处于国际领先水平。

3 展望和预测

生物技术的迅速发展为鱼类分子育种提供了有效的技术手段,而海洋生物基因资源的开发又为海水养殖生物优良品种培育提供了丰富的基因资源。世界发达国家不仅正在开展一场海洋生物基因资源的争夺战,而且也在研究如何利用开发出的基因资源培育养殖鱼类新品种上展开竞争。从国内的研究进展来看,笔者认为我国在鱼类基因转移技术上具有很好的工作基础,可望在未来几年内,在抗病基因转移研究方面取得较大进展。今后,应重点加强重要海水养殖鱼类抗病相关功能基因筛选、基因标记辅助育种以及分子标记辅助育种技术的研究,可以相信,在未来 4~6 年内,我国的海水养殖鱼类抗病分子育种研究很有希望跻身国际先进行列,开创出我国海水养殖鱼类抗病品种培育的新局面,并推动我国海水养殖业的可持续发展。

水产生物技术一方面为我们提供了在分子水平、细胞水平或个体水平对水产养殖生物进行定

向设计、构建具有人们需要的具有特定优良性状的新物种或新品种的可能性;另一方面,应用该项技术,可以生产出防病、治病用或水产养殖用抗肿瘤药物、抗病疫苗或重组抗菌肽、多肽激素等生物活性物质。因此,这项技术已成为当今国际上水产和海洋领域中的前沿热点学科,也是 21 世纪水产科学的重点发展方向之一。世界各国在水产生物技术领域的激烈竞争,以及各国政府对水产生物技术的大力支持,为水产生物技术的快速发展提供了良好的机遇,根据国际上的发展现状和趋势,笔者认为今后 5~10 年国际上水产生物技术研究将在如下几方面取得突破或重大进展,或达到产业化应用水平,这些也是我国今后应该进行重点研究的方向和内容。

3.1 重要水产养殖生物功能基因组学研究

未来几年,国际上将完成 2~3 种养殖鱼类、2~3 种重要养殖虾、贝类基因组全序列测定的工作,构建出水产养殖生物基因组框架图;将在重要海、淡水养殖动物上获得一批与抗病、抗逆、生长、生殖及性别等重要性状相关的功能基因,阐明其中一些重要基因的功能及其表达调控机制,阐明重要经济性状的遗传基础;将为良种培育、病害防治、生殖调控、苗种培育及水产养殖等提供一批具有重要应用价值的基因资源。

3.2 重要水产养殖动物分子育种技术

将在重要海淡水养殖动物上筛选到一大批与抗病、抗逆、生长、生殖、性别及品质等重要性状相关的基因标记和分子标记,构建出遗传连锁图谱,并将某些重要经济性状相关 QTL 定位在连锁图谱上,建立水产养殖动物分子标记辅助育种的技术路线,并在良种培育中进行推广应用。

3.3 水产养殖生物遗传多样性评价及种质鉴定用分子标记的筛选

将通过微卫星、AFLP 和 SNP 等分子标记技术,对重要海淡水养殖生物遗传多样性进行评价和鉴定,将在部分种类上筛选出不同种类、不同品系、不同地理群体以及同种鱼类的良种与普通种种质特异的分子标记,建立用于种质鉴定的分子标记技术和标准。

3.4 基因工程育种技术

将在 1~2 种重要海、淡水养殖鱼类上突破鱼类外源基因定点整合技术,建立鱼类细胞介导的基因转移或基因定点敲除新技术,通过引入外源

有用基因或定点敲除鱼体内致病或生长抑制基因,为基因工程育种开辟新的技术途径。

在鱼类基因转移育种方面,在分离生长、生殖、抗病和观赏性相关的基因的基础上,筛选鱼体有关组织特异的启动子,构建适合在鱼体特定组织表达的“全鱼”转基因载体,阐明转基因的整合与表达调控规律,建立实用的组织特异性表达的转基因技术,为培育能稳定遗传的转基因养殖鱼或观赏鱼提供技术储备;将在抗病基因转移上取得突破性进展,将有可能获得抗病力提高的转基因养殖鱼类。

3.5 细胞工程育种技术

性别控制将是海水鱼类细胞工程育种的重要方向,将在雌雄生长差异明显的海淡水养殖鱼类性别相关功能基因和分子标记筛选方面取得突破,将建立重要养殖鱼类遗传性别鉴定的分子生物学技术;海水养殖鱼类雌核发育诱导和性别控制技术将获得快速发展,达到产业化应用水平。

3.6 基因工程抗病药物和疫苗的研制

功能基因组学将为水产养殖生物病害防治开辟新的途径,抗病相关功能基因的获得将为无公害生物鱼药或饲料添加剂的研制提供基因资源,通过基因工程手段将大量生产重组鱼、虾、贝类抗菌肽等抗病产品,将在重要水产养殖动物病害防治中得到实际应用。

3.7 水产养殖动物低温生物工程技术

重点开展鱼、虾、贝类胚胎超低温冷冻保存技术的研究,建立可重复的、实用化的水产养殖动物胚胎冷冻保存技术方法,为珍稀濒危鱼类种质资源保存提供技术手段。

4 结语

综上所述,人类基因组测序项目的完成极大地促进了水产生物技术的发展,以功能基因组为核心的新一代水产生物技术已经形成并逐渐成为国际上的前沿热点研究领域。近几年国际上水产生物技术研究发展迅速,抢夺水产生物基因资源大战的序幕已经拉开;生物技术在水产养殖、水产种质保存和遗传多样性保护、良种培育、病害防治、环境保护和修复以及水产品加工等方面已展现出巨大的应用潜力和广阔的应用前景。我国近几年在水产生物技术的许多方面都开展了大量工作,并在功能基因组、分子标记、基因工程和细胞

工程以及低温生物工程等方面取得重要进展,在某些方向上达到或接近国际先进水平,但总体上与国际先进水平相比,还有相当大的差距。我国应该加强水产生物技术研究顶层设计,加大对水产生物技术与产业化应用的投入,构建我国水产生物技术学术研究与交流的体系和平台,瞄准国际上的研究前沿、针对我国水产养殖业中存在的重大问题、开展自主创新性研究,实现我国水产生物技术研究跨越式发展,为我国水产养殖业的可持续健康发展提供技术支撑。

参考文献:

- [1] Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, *et al.* Dramatic growth of mice that developed from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes[J]. *Nature*, 1982, 300: 611-615.
- [2] Zhu Z, Li G, He L, *et al.* Novel gene transfer into fertilized eggs of gold fish[J]. *Z Angew Ichthy*, 1985, 1: 31-34.
- [3] Chourrout D. Techniques of chromosome manipulation in rainbow trout: A new evaluation with caryology[J]. *Theor Appl Genet*, 1986, 72: 627-632.
- [4] 朱作言,何玲. 鲤鱼和草鱼基因文库构建及其生长激素基因和肌动蛋白基因筛选[J]. *水生生物学报*, 1990, 14: 176-178.
- [5] Du S J, Gong Z, Hew C L, *et al.* Development of an all-fish gene cassette for gene transfer in aquaculture[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1992, 1: 290-300.
- [6] Gong Z Y, Vielkind J R, Hew C L. Functional analysis of promoter regions from fish antifreeze protein genes in transgenic Japanese medaka embryos[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1991, 1: 64-72.
- [7] Du S J, Gong Z Y, Fletcher G L, *et al.* Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all-fish” chimeric growth hormone gene construct[J]. *Bio/Technology*, 1992, 10: 176-181.
- [8] Devlin R H, Yesaki T Y, Biagi C A, *et al.* Extraordinary salmon growth[J]. *Nature*, 1994, 371: 209-210.
- [9] Zhu Z Y. Generation of fast growing transgenic fish: methods and mechanisms[M]//Hew C L, Fletcher G L (Eds.). *Transgenic fish. World*

- Scientific Publishing, Singapore, 1992; 92 - 119.
- [10] Estoup A, Rousset F, Michalakis Y, *et al.* Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*) [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 339 - 353.
- [11] O'Reilly P T, Herbinger C, Wright J M. Analysis of parentage determination in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites [J]. *Animal Genetics*, 1998, 29: 363 - 370.
- [12] Coughlan J, McCarthy E, McGregor D. Four polymorphic microsatellites in turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Animal Genetics*, 1996, 27 (6): 441 - 447.
- [13] Harald H, Svein L, Mona M, *et al.* A Bkm-related DNA sequence gives individual DNA fingerprints in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1994, 107B (1): 69 - 73.
- [14] Estoup A, Gharbi K, SanCristobal M. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1998, 55 (3): 715 - 725.
- [15] Coughlan J P, Imsland A K, Galvin P T. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study [J]. *J Fish Biol*, 1998, 52 (5): 916 - 922.
- [16] Sekino M, Takagi, N, Hara M, *et al.* Analysis of microsatellite DNA polymorphisms in rockfish *Sebastes thompsoni* and application to population genetic studies [J]. *Mar Biotechnol*, 2001, 3: 45 - 52.
- [17] Bielawski J P, Pumo D E. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic coast strip bass [J]. *Heredity*, 1996, 78: 32 - 40.
- [18] Garcia de Leon F J, Chikhi L, Bonhomme F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural population of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) [J]. *Mol Ecol*, 1997, 6: 51 - 62.
- [19] 张四明, 吴清江, 张亚平. 中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 及相关种类的 mtDNA 控制区串联重复序列及其进化意义 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16 (4): 458 - 461.
- [20] Postlethwait J H, Johnson S L, Midson C N, *et al.* A genetic linkage map for the zebrafish [J]. *Science*, 1994, 264: 699 - 703.
- [21] Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H, *et al.* A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Genetics*, 1998, 148: 1225 - 1232.
- [22] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids [J]. *Genetics*, 1998, 148: 839 - 850.
- [23] Collodi P, Kamei Y, Sharps A, *et al.* Fish embryo cell cultures for derivation of stem cells and transgenic chimeras [J]. *Mol Mar Biol Biotech*, 1992, 1: 257 - 265.
- [24] Wakamatsu Y, Ozato K, Sasado T. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3: 185 - 191.
- [25] Hong Y, Scharl M. Establishment and growth responses of early medakafish embryonic cells in feeder layer-free cultures [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1996, 5: 93 - 104.
- [26] Hong Y, Winkler C, Scharl M. Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3 679 - 3 684.
- [27] Goudie C A, Simco B A, Davis K B, *et al.* Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation [J]. *Aquaculture*, 1995, 133: 185 - 198.
- [28] Suwa M, Arai K, Suzuki R. Suppression of the first cleavage and cytogenetic studies on the gynogenetic loach [J]. *Fish Sci*, 1994; 60: 673 - 681.
- [29] Pongthana N, Penman D J, Karnasuta J, *et al.* McAndrew. Induced gynogenesis in the silver barb (*Puntius gonionotus* Bleeker) and evidence for female homogamety [J]. *Aquaculture*, 1995, 135: 267 - 276.
- [30] 相建海, 周令华, 刘瑞玉, 等. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 四倍体诱导研究 [J]. *海洋科学*, 1992, 4: 55 - 59.
- [31] 戴继勋, 包振民, 张全启. 中国对虾三倍体的诱发研究 [J]. *遗传*, 1993, 15 (5): 15 - 18.
- [32] 蔡难儿, 林峰, 柯亚夫, 等. 中国对虾人工诱导雌核发育的研究 I —— 四步诱导法 [J]. *海洋科学*, 1995, 3: 35 - 41.
- [33] 包振民, 张全启, 王海, 等. 中国对虾三倍体的诱导研究 II. 细胞松弛素 B 处理 [J]. *海洋学报*, 1993, 15 (3): 101 - 106.

- [34] 孙振兴,李 诺. 皱纹盘鲍三倍体诱导条件及其室内饲养试验[J]. 水产学报,1993,17(3):243-249.
- [35] Karsi A, Cao D, Li P, *et al.* Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of gene expression and microsatellite-containing cDNAs in the skin[J]. *Gene*, 2002, 285(1-2):157-168.
- [36] Nam B H, Yamamoto E, Hiroto I, *et al.* A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with HIRAME rhabdovirus[J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(1):13-24.
- [37] Katagiri T, Hirono I, Aoki T. Molecular analysis of complement component C8beta and C9 cDNAs of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Immunogenetics*, 1999, 50(1-2):43-48.
- [38] Inoue S, Nam B H, Hirono I, *et al.* A survey of expressed genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver and spleen [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1997, 6(4):376-380.
- [39] Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*[J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25(7):565-577.
- [40] Xiang J H, Wang B, Liu B, *et al.* Over 10000 expressed sequence tags from *Penaeus chinensis*[J]. *Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference*, 2002, 16.
- [41] 陈松林. 青鳞 p53 基因克隆结构分析及同源重组载体构建[J]. *动物学报*, 2002, 48(4):519-526.
- [42] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, *et al.* Cloning and characterization of natural resistance associated macrophage protein (Nramp) cDNA from red sea bream (*Pagrus major*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(4):305-313.
- [43] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, *et al.* Cloning, characterization, and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream (*Chrysophrys major*) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(4):1608-1612.
- [44] Zhang Y B, Gui J F. Identification and expression analysis of two IFN-inducible genes in crucian carp (*Carassius auratus* L.) [J]. *Gene*, 2004, 325:43-51.
- [45] Zhang Y B, Li Q, Gui J F. Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon[J]. *Immunogenetics*, 2004, 56(1):68-75.
- [46] Liu Z, Karsi A, Li P, *et al.* An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family[J]. *Genetics*, 2003, 165(2):687-694.
- [47] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping a locus associated with cold tolerance trait [J]. *Aquaculture*, 2004, 238:165-172.
- [48] Chen S L, Ye H Q, Sha Z X. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) blastula embryo [J]. *Aquaculture*, 2003, 218:141-151.
- [49] Chen S L, Ye H Q, Sha Z X. Derivation of a pluripotent embryonic cell line from red sea bream blastulas[J]. *Journal of Fish Biology*, 2003, 63:795-805.
- [50] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q, *et al.* Pluripotency and chimera competence of an embryonic stem cell line from the sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 9:82-91.
- [51] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, *et al.* Development and characterization of a continuous embryonic cell line from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Aquaculture*, 2005, 249:63-68.
- [52] Ye H Q, Chen S L, Sha Z X, *et al.* Development and characterization of five cell lines from heart, liver, spleen and head kidney of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *J Fish Biol*, 2006, 69 (Supplement A):115-126.
- [53] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, *et al.* DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. *Nature*, 2002, 417:59-563.
- [54] Nanda I, Kondo M, Hornung U, *et al.* A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(18):11778-11783.
- [55] Kondo M, Nandam I, Hornung U, *et al.* Absence of the candidate male sex-determining gene dmrt1b (Y) of medaka from other fish species [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(5):416-420.
- [56] Volff J N, Kondo M, Schartl M. Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining

- gene in fish [J]. Trends Genet, 2003, 19(4): 196 - 199.
- [57] Kovacs B, Egedi S, Bartfai R, et al. Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. Genetica, 2000, 110(3): 267 - 276.
- [58] Rachael A. Woram, K G, Takashi S, et al. Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes [J]. Genome Res, 2003, 13: 272 - 280.
- [59] Waldbieser G C, Bosworth B G, Nonneman D J, et al. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Genetics, 2001, 158(2): 727 - 734.
- [60] Lee B Y, Penman D J, Kocher T D. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis [J]. Anim Genet, 2003, 3(5): 379 - 383.
- [61] Ezaz M T, Harvey S C, Boonphakdee C, et al. Isolation and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) [J]. Mar Biotechnol (NY), 2004, 6(5): 435 - 445.
- [62] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9: 273 - 280.
- [63] Tvedt H B, Benfey, T J, Martin-Robichaud, D J, et al. Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. Aquaculture, 2006, 252: 573 - 583.
- [64] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned population in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. Aquaculture, 1999, 173: 235 - 246.
- [65] Piferrer F, Cal R M, Gomez C, et al. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture, 2004, 238: 403 - 419.
- [66] Liu S, Liu Y, Zhou G, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. Aquaculture, 2001, 192(2-4): 171 - 186.
- [67] Li L, Xiang J, Liu X, et al. Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers [J]. Aquaculture, 2005, 245: 63 - 73.
- [68] Wang H, Li F, Xiang J. Polymorphic EST-SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Aquaculture, 2005, 249: 107 - 114.
- [69] Xu H, Gui J, Hong Y. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate [J]. Dev Dyn, 2005, 233(3): 872 - 82.
- [70] Liu J X, Gui J F. Expression pattern and developmental behaviour of cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) during folliculogenesis and oogenesis in fish [J]. Gene, 2005, 356: 181 - 192.
- [71] Zhou L, Wang Y, Yao B, et al. Molecular cloning and expression pattern of 14 kDa apolipoprotein in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (B), 2005, 142(4): 432 - 437.
- [72] Zhang Y X, Chen S L, Liu Y G, et al. Major histocompatibility complex class IIB allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(6): 600 - 610.
- [73] Zhu R, Zhang Y B, Chen Y D, et al. Molecular cloning and stress-induced expression of *paralichthys olivaceus* heme-regulated initiation factor 2alpha kinase [J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(11): 1047 - 1059.
- [74] Ji G D, Zhou L, Wang Y, et al. Identification of a novel C2 domain factor in ovaries of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. Comp Biochem Physiol B (Biochem Mol Biol), 2006, 143(3): 374 - 83.
- [75] Dong C W, Zhang Y B, Zhang Q Y, et al. Differential expression of three *Paralichthys olivaceus* Hsp40 genes in responses to virus infection and heat shock [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2006, 21(2): 146 - 58.
- [76] Wang B, Li F, Dong B, et al. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray [J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(5): 491 - 500.
- [77] Sun B, Chang M, Chen D, et al. Gene structure and transcription of IRF-2 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with the finding of alternative transcripts and microsatellite in the coding region [J]. Immunogenetics, 2006, 58(9): 774 - 784.
- [78] Zhang B, Li Z J, Tong J G, et al. Isolation and

- characterization of 18 polymorphic microsatellite markers in Chinese mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) [J]. Mol Ecol Notes (Published online), 2006.
- [79] Zhang J, Cai Z, Huang H. Isolation and characterization of microsatellite loci from mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus* [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6: 408–411.
- [80] Du H, Xu Z, Wu X, et al. Increased resistance to white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* by injection of envelope protein VP28 expressed using recombinant baculovirus [J]. Aquaculture, 2006, 260: 39–43.
- [81] Yao C L, Wu C G, Xiang J H, et al. Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2005, 19(4): 317–29.
- [82] Liu J X, Gui J F. Expression pattern and developmental behaviour of cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) during folliculogenesis and oogenesis in fish [J]. Gene, 2005, 356: 181–192.
- [83] Liu M, Zhang S, Liu Z, et al. Characterization, organization and expression of Amphilyc, an acidic c-type lysozyme gene in amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtaense* [J]. Gene, 2006, 367: 110–117.
- [84] Song L, Zou H, Chang Y, et al. The cDNA cloning and mRNA expression of a potential selenium-binding protein gene in the scallop *Chlamys farreri* [J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(3): 265–73.
- [85] Song L, Xu W, Li C, et al. Development of expressed sequence tags from the Bay scallop, *Argopecten irradians irradians* [J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(2): 161–169.
- [86] Song L, Wu L, Ni D, et al. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2006, 21(4): 335–345.
- [87] Zhu R, Zhang Y B, Chen Y D, et al. Molecular cloning and stress-induced expression of *paralichthys olivaceus* heme-regulated initiation factor 2 alpha kinase [J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(11): 1047–59.
- [88] Chen S L, Li W, Meng L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2007, 22(3): 172–181.
- [89] Chen S L, Zhang Y X, Xu M Y, et al. Molecular polymorphism and expression analysis of MHC class II B gene from red sea bream (*Chrysophrys major*) [J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(4): 407–418.
- [90] Chen S L, Wang Z J, Xu M Y, et al. Molecular identification and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (Nramp) cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2006, 20(3): 365–73.
- [91] Zhang Y X, Chen S L. Molecular identification, polymorphism, and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and B genes of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Mar Biotechnol (NY), 2006, 8(6): 611–623.
- [92] 徐美瑜, 陈松林, 沙珍霞, 等. 真鲷天然抗性相关巨噬蛋白全长 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. 水产学报, 2005, 29(1): 128–132.
- [93] 王志坚, 陈松林, 季相山. 牙鲆自然杀伤细胞增强因子 (NKEF) 全长 cDNA 的克隆及表达分析 [J]. 高技术通讯, 2005, 15(11): 86–90.
- [94] 张玉喜, 陈松林. 大菱鲆 MHC II B 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析 [J]. 高技术通讯, 2006, 16(8): 859–863.
- [95] 叶寒青, 陈松林. 真鲷肌肉生长抑素 (MSTN) 基因的克隆及表达分析 [J]. 高技术通讯, 2006, 16(7): 718–726.
- [96] Chen Y D, Zhang Y B, Zhu R, et al. Inductive expression and characteristic analysis of *Paralichthys olivaceus* pigment epithelium-derived factor in a virally infected cell line [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335: 799–809.
- [97] Bei J X, Suetake H, Araki K, et al. Two interleukin (IL)-15 homologues in fish from two distinct origins [J]. Mol Immunol, 2006, 43(7): 860–869.
- [98] Kuang Y M, Li W S, Lin H R. Molecular cloning and mRNA profile of insulin-like growth factor type 1 receptor in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005, 37(5): 327–334.
- [99] Yin Z X, Wei H, Chen W J, et al. Cloning, expression and antimicrobial activity of an antimicrobial peptide, epinecidin-1, from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J].

- Aquaculture, 2006, 253: 204-211.
- [100] Luo T, Yang H, Li F, *et al.* Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon* [J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(7): 07-617.
- [101] Pan D, He N, Yang Z, *et al.* Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization [J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29(2): 103-112.
- [102] Lin H F, Shao J Z, Xiang L X, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) NF45 (ILF2) cDNA, a subunit of the nuclear factor of activated T-cells (NF-AT) [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2006, 21(4): 385-392.
- [103] Yang T Y, Hao H F, Jia Z H, *et al.* Characterisation of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) MHC class I domain lineages [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2006, 21(5): 583-591.
- [104] Hao H F, Yang T Y, Yan R Q, *et al.* cDNA cloning and genomic structure of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) beta2-microglobulin gene [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2006, 20(1): 118-123.
- [105] 孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 126-132.
- [106] 孙效文, 鲁翠云, 梁利群. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记 [J]. 水产学报, 2005, 29(4): 482-486.
- [107] 鲁翠云, 孙效文, 曹洁, 等. 磁珠富集法筛选白鲢的微卫星分子标记 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(6): 772-776.
- [108] 鲁翠云, 孙效文, 梁利群. 鳙鱼微卫星分子标记的筛选 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 192-196.
- [109] 常玉梅, 孙效文, 李绍武, 等. 牙鲆 CA/GT 微卫星标记的筛选 [J]. 动物学研究, 2005, 26(6): 652-656.
- [110] 佟广香, 鲁翠云, 匡友谊, 等. 哲罗鱼基因组微卫星富集文库的构建与分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 181-186.
- [111] 曹洁, 常亚青, 丁君, 等. 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 微卫星 DNA 的筛选与引物设计 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(3): 448-449.
- [112] Liu Y G, Zheng M G, Liu L X, *et al.* Five new microsatellite loci for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) from an expressed sequence tag (EST) library and cross-species amplification [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6: 371-373.
- [113] Liu Y G, Liu L X, Lei Z W, *et al.* Identification of polymorphic microsatellite markers from RAPD product in turbot (*Scophthalmus maximus*) and a test of cross-species amplification [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6: 867-869.
- [114] Cui J Z, Shen X Y, Yang G P, *et al.* Characterization of microsatellite DNAs in *Takifugu rubripes* genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus* [J]. Aquaculture, 2005, 250: 129-137.
- [115] Zhan A, Bao Z, Yao B, *et al.* Polymorphic microsatellite markers in the Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6: 127-129.
- [116] Guo W, Wang Z Y, Wang Y L, *et al.* Isolation and characterization of six microsatellite markers in the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* Richardson) [J]. Mol Ecol Notes, 2005, 5: 369-371.
- [117] Zhu B, Liao X, Shao Z, *et al.* Isolation and characterization of microsatellites in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* [J]. Mol Ecol Notes, 2005, 5: 888-892.
- [118] 廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 113-119.
- [119] Liu Y, Chen S, Li B. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2005, 243: 103-111.
- [120] Liu Y G, Chen S L, Li B F, *et al.* Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers [J]. Bioche Systeme Ecol, 2005, 33: 993-1005.
- [121] 刘云国, 陈松林, 李八方, 等. 牙鲆选择性养殖群体遗传结构的微卫星分析 [J]. 高技术通讯, 2006, 16(1): 94-99.
- [122] 孟宪红, 孔杰, 刘萍, 等. 中国对虾微卫星引物筛选及反应条件优化 [J]. 海洋水产研究, 2006, 27(1): 35-39.
- [123] 孔杰, 高焕. 中国明对虾基因组串联重复序列分析 [J]. 科学通报, 2005, 50(13): 1340-1347.
- [124] 高焕, 孔杰. 中国明对虾基因组小卫星重复序列分析 [J]. 动物学报, 2005, 51(1): 101-107.

- [125] Xia J H, Xia K F, Jiang S G. Characterization of 11 polymorphic microsatellite loci in the yellowfin seabream *Acanthopagrus latus* [J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6: 484 - 486.
- [126] Chen S L, Liu Y G, Xu M Y, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from an EST-library of red sea bream (*Chrysophrys major*) and cross-species amplification [J]. *Mol Ecol Notes*, 2005, 5: 215 - 217.
- [127] 梁利群, 高俊生, 李绍戊, 等. 与鲤鱼抗寒性状相关的 RAPD 分子标记的筛选及其克隆 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13(3): 360 - 364.
- [128] 王伟继, 孔杰, 董世瑞, 等. 中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建 [J]. *动物学报*, 2006, 52(3): 75 - 584.
- [129] 孙昭宁, 刘萍, 李健, 等. RAPD 和 SSR 两种标记构建的中国对虾遗传连锁图谱 [J]. *动物学研究*, 2006, 27(3): 317 - 324.
- [130] Wu Y, Zhang G, Xiong Q, *et al.* Integration of double-fluorescence expression vectors into zebrafish genome for the selection of site-directed knockout/knockin [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2006, 8(3): 304 - 311.
- [131] Wang W B, Wang Y P, Hu W, *et al.* Effects of the "all-fish" growth hormone transgene expression on non-specific immune functions of common carp, *Cyprinus carpio* L [J]. *Aquaculture*, 259(1): 81 - 87.
- [132] 陈开健, 张怀云, 肖调义, 等. 重组 Hu-IFN- α 基因在草鱼中的整合和表达 [J]. *淡水渔业*, 2005, 35(5): 3 - 7.
- [133] 凌去非, 李思发, 张海军, 等. 丁雌核发育鱼的异源精子诱导及其与亲本的 RAPD 比较分析 [J]. *水产学报*, 2005(1): 121 - 124.
- [134] 张桂蓉, 严安生, 邹桂伟, 等. 两个人工雌核发育系鲢近交 F₁ 遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *水产学报*, 2005(2): 12 - 18.
- [135] 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 人工诱导牙鲆异质雌核发育群体的微卫星标记分析 [J]. *高技术通讯*, 2005(7): 110 - 113.
- [136] 董迎辉, 杨爱国, 刘志鸿. 栉孔扇贝正常发育和人工雌核发育二倍体早期胚胎核行为的细胞学观察 [J]. *水产学报*, 2006(1): 31 - 37.
- [137] 王晓清, 王志勇, 柳小春. 大黄鱼人工诱导雌核发育后代的微卫星标记分析 [J]. *遗传*, 2006(7): 67 - 73.
- [138] 李雅娟, 李霞, 毛连菊, 等. 人工雌核发育诱导太平洋牡蛎四倍体的研究 [J]. *东北农业大学学报*, 2006, 37(3): 362 - 366.
- [139] 朱晓琛, 刘海金, 孙效文. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性 [J]. *动物学研究*, 2006(1): 65 - 69.
- [140] 杨青, 李琪, 于瑞海, 等. 人工诱导栉江珧雌核发育的初步研究 [J]. *中国水产科学*, 2006(2): 1546 - 1551.
- [141] 潘英, 李琪, 于瑞海, 等. 栉孔扇贝第 1 卵裂抑制型雌核发育二倍体的研究 [J]. *海洋学报*, 2005(6): 156 - 163.
- [142] 袁媛, 李琪, 于瑞海. 栉孔扇贝雄核发育二倍体的人工诱导 [J]. *中国水产科学*, 2006(4): 77 - 82.
- [143] 戈文龙, 张全启, 齐洁, 等. 异源精子诱导牙鲆雌核发育二倍体 [J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2005(6): 133 - 138.
- [144] 杨景峰, 杨智慧, 刘伟成, 等. 斑马鱼雌核紫外线辐射灭活及延迟受精的研究 [J]. *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 2005(1): 78 - 82.
- [145] Xiang J H, Li F H, Zhang C S, *et al.* Evaluation of induced triploid shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* cultured under laboratory conditions [J]. *Aquaculture*, 2006, 259: 108 - 115.
- [146] Sun Y D, Zhang C, Liu S J, *et al.* Induction of gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius cuvieri*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33: 405 - 412.
- [147] 叶寒青, 陈松林, 刘洋, 等. 表达绿色荧光蛋白基因的花鲈胚胎干细胞株的建立及其体外分化 [J]. *高技术通讯*, 2006(1): 65 - 70.
- [148] 沙珍霞, 刘洋, 陈松林, 等. 花鲈胚胎干细胞移植及嵌合体的构建 [J]. *高技术通讯*, 2006(2): 80 - 84.
- [149] 张晓军, 余黎明, 李富花, 等. EGFP 基因在中国明对虾原代培养细胞中的导入和表达 [J]. *中国生物工程杂志*, 2006(2): 43 - 48.
- [150] 罗鹏, 邱德全. 凡纳滨对虾血淋巴、类淋巴细胞培养 [J]. *海洋通报*, 2005, 24(1): 27 - 30.
- [151] Chen J X, Sun X M, Zhang L, *et al.* Mass cultivation of marine fish Chinook salmon embryo cells in bioreactor with low-serum medium [J]. *Aquaculture*, 2005, 249: 35 - 45.
- [152] 孟凡华, 尹洪滨, 孙中武, 等. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 体细胞系的建立及其生物学特性分析 [J]. *实验生物学报*, 2005(1): 82 - 86.
- [153] 尹洪滨, 孟凡华, 孙中武, 等. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 体细胞核移植的初步研究 [J]. *分子科学学报*, 2006, 22(2): 127 - 131.

- [154] 王宏伟,孟翠丽,刘晋,等.不同pH值条件下日本对虾肝胰腺及血的细胞培养[J].动物学杂志,2005(1):91-94.
- [155] 王蕴,胡炜,汤斌,等.鲤鱼促性腺激素基因的克隆、原核表达及多克隆抗体制备[J].高技术通讯,2006,16:633-637.
- [156] 戴汉川,龙良启,丁光.鲤鱼肥胖基因的分子克隆及在大肠杆菌中的表达[J].动物学报,2005,51:1-6.
- [157] Chen S L, Sui S F, Xu M Y, et al. Molecular identification and recombination expression of red sea bream (*Chrysophrys major*) hepcidin [C]//Xue G X, Zhu Z Y. Proc. 13th International congress on genes, genefamilies and isozymes. Medimond S. r. l., Italy. 2005, 133-142.
- [158] Xu Z, Du H, Xu Y. Crayfish *Procambarus clarkii* protected against white spot syndrome virus by oral administration of viral proteins expressed in silkworms[J]. Aquaculture, 2006, 260:179-183.
- [159] 陈松林,刘云国,季相山.精子冷冻保存对大菱鲂后代遗传结构影响的微卫星分析[J].高技术通讯,2005,15(6):87-91.
- [160] 季相山,陈松林,赵燕,等.石鲮、牙鲆精子冷冻保存研究及其在人工杂交中的应用[J].海洋水产研究,2005,26(1):13-16.
- [161] 赵燕,季相山,陈松林.大菱鲂精子低温短期保存[J].海洋水产研究,2006,27(4):48-52.
- [162] 田永胜,陈松林,刘本伟,等.大西洋牙鲆冷冻精子×褐牙鲆卵杂交胚胎的发育及胚后发育[J].水产学报,2006,30(4):433-443.
- [163] Chen S L, Tian Y S. Cryopreservation of flounder embryos by vitrification[J]. Theriogenology, 2005, 63(4):1207-1219.
- [164] Zhang Y Z, Zhang S C, Liu X Z, et al. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos [J]. Theriogenology, 2005, 63(3):763-773.
- [165] 田永胜,陈松林,严安生.牙鲆胚胎玻璃化冷冻技术研究[J].高技术通讯,2005,15(3):105-110.
- [166] 田永胜,陈松林,于过才,等.大菱鲂胚胎的玻璃化冷冻保存[J].水产学报,2005,29(2):275-280.
- [167] 赵燕,陈松林,孔晓喻,等.几种因素对牙鲆胚胎玻璃化冷冻保存的影响[J].动物学报,2005,51(2):320-326.