

海水养殖鱼类抗病分子育种研究进展及前景展望*

陈松林
(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 研究员、博士生导师 山东青岛 266071)

[摘要] 病害是限制水产养殖业可持续发展的关键因素。而我国目前尚缺乏优良的抗病养殖鱼类品种。鱼类功能基因组和分子标记技术的发展为筛选鱼类抗病相关功能基因和分子标记提供了机遇。基因转移、分子标记和基因标记等分子育种技术是培育抗病优良鱼类新品种的很有潜力的技术手段, 已成为国际上的发展趋势, 也是我国今后应大力发展的研究领域。本文结合笔者实验室的工作, 对某些海水养殖鱼类抗病相关功能基因及抗病分子育种研究的最新进展作一综述介绍。

[关键词] 海水鱼类 抗病基因 基因转移 基因标记 分子标记 分子育种 抗病品种

[中图分类号] Q2 Q3 S9 P7 [文献标识码] A [文章编号] 1000-7857(2004)09-0010-04

PROGRESS IN MOLECULAR BREEDING FOR
DISEASE-RESISTANT MARINE FISHES AND ITS PROSPECTS

CHEN Song-lin

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

Abstract: Disease is key factor restricting sustainable development of fisheries. No fish species with enhanced disease-resistance are available in China. The development of fish functional genomics and molecular marker techniques provides chance for screening functional genes or molecular markers related to disease-resistance. Molecular breeding techniques such as transgenesis, gene marker-assisted selection breeding and molecular marker-assisted selection breeding are potential approaches to developing new strains with enhanced disease-resistance in aquaculture, which should be strengthened in China. The aim of this paper is to provide a survey on the progress in the field of fish disease resistance-related functional genes and molecular breeding.

Key Words: marine fish, disease resistance -related genes, transgenesis, gene marker, molecular marker, molecular breeding, disease-resistant stock

CLC Number: Q2 Q3 S9 P7 Document Code: A Article ID: 1000-7857(2004)09-0010-04

1 前言

近 20 年来, 我国的海水养殖业有了突飞猛进的发展,

* 本文为作者在第 225 次香山科学会议“海洋生物基因资源的研究与利用”上所作专题报告的部分内容。本项研究得到国家“863”高技术研究发展计划(2002AA626010)和国家自然科学基金(30170740)的支持。

养殖规模越来越大、种类越来越多、产量逐年增加。海水养殖产量从 1987 年的 193 万吨增加到 2001 年的 1 132 万吨, 占海洋渔业产量的比重从过去的 10% 左右上升到 44%, 约占全球海水养殖总产量的 1/3 以上, 我国已成为世界海水养殖大国。海水养殖鱼类, 特别是真鲷、牙鲆、大菱鲆和大黄鱼等名贵鱼类已成为我国重要的海水养殖对象。目前, 我国海洋渔业总产值达 1 500 亿元, 约占全国整个海洋产业的

encoding gene from the hyperthermophilic archaebacterium Thermococcus hydrothermalis and biochemical characterisation of the recombinant enzyme [J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 186(1): 67~71

[6] Takai K et al. The gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from an extremely thermophilic bacterium, Rhodothermus obaensis: cloning, sequencing and overexpression in Escherichia coli [J]. Microbiology, 1998, 144 (5): 1 423~1 434.

[7] Bertus van den Burg. Extremophiles as a source for novel enzymes [J]. Current Opinion in Microbiology [J]. 2003, 6(3): 213~218

[8] 马延和. 嗜碱微生物[J]. 微生物学通报, 1999, 26(4): 309

[9] Lu J et al. Oceanobacillus iheyensis gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 205(2): 291~297

[10] Ryu K et al. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile [J]. Enzyme Microb Technol, 1994, 16(4): 266~275

[11] Gonzalez JM et al. Pyrococcus horikoshii sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough [J]. Extremophiles [J], 1998, (2): 123~130

[12] Schiraldi C et al. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles [J]. Trends Biotechnol, 2002, 20 (12): 515~521

[13] 曾艳等. 嗜碱菌 (Bacillus sp.) ZBAW6 的木聚糖酶的分离纯化及其性质 [J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 75~79

(责任编辑 胡春华)

50%。但是,应当清楚地认识到,在我国海水养殖业高速发展的同时,仍然存在不少问题和困难。尤其是基础研究薄弱、病害频发、缺少抗病优良品种等问题日趋严重,它们已成为制约海水鱼类养殖业可持续发展的关键因素。生物技术的迅速发展为培育抗病力强、生长快和品质优的养殖鱼类新品种提供了新的技术手段。尤其近几年来,水产养殖生物功能基因组和分子标记技术的迅速发展,为鱼类品种培育提供了大量可用的基因资源和分子技术。以基因转移、分子标记和基因标记为主的分子育种技术,由于具有快速、高效、定向等特点,因而受到各国政府和科学家的广泛关注和高度重视,并在海水养殖鱼类品种培育上展现出良好的发展前景和巨大的应用潜力。

2 海水鱼类养殖业中存在的主要问题

2.1 鱼类免疫和抗病机理等基础研究薄弱 养殖鱼类生长的快慢、品质的好坏及抗御疾病的能力等与其自身相关的功能基因或基因组的调控和表达有关。迄今对养殖鱼类免疫和抗病的分子机理了解甚少,对这些性状相关功能基因的结构和功能开展的研究很少,特别是对鱼类天然抗病力的遗传基础、抗病相关分子标记等研究则更少,从而严重限制了鱼类分子育种技术的建立及其在抗病新品种培育中的应用。

2.2 养殖病害频发,缺乏优良抗病品种 随着海水养殖业的迅速发展,海水养殖病害发生日益严重,每年因病害造成的直接经济损失高达上百亿元。据国家有关部门统计,2003 年仅养殖鱼类病害造成的直接经济损失就高达 85 亿元。由于缺少人工培育的优良抗病品种,目前养殖的海水鱼类基本上为未经选育的野生种类,而人工培育的品种极少。一些重要养殖品种品质差、抗病力差、对环境适应力低,一经患病,就会引起大面积减产。因此,病害和优良品种已成为制约我国海水鱼类养殖业健康可持续发展的瓶颈;通过生物技术途径培育抗病、优质养殖品种,提高养殖鱼类的天然抗病力是水产养殖业中急待解决的重要问题之一。

2.3 传统抗生素类药物满足不了无公害渔业发展的需要 饲养在高密度状况下的海水养殖鱼类,对病原菌的感染非常敏感,往往容易患上各种疾病。当前防治鱼病的主要方法是使用抗菌素或化学药物。抗菌素具有污染环境、影响消费者健康及使病原菌产生抗药性等缺点,特别是对多种药物产生了抵抗力的病原菌的出现,已对水产养殖业构成越来越大的威胁。因此,抗菌素的使用既不能有效防治流行病的发生,也不能满足人们日益增长的对无药物残留的鱼产品的需求。探索能有效防治鱼类病害且无公害的绿色基因工程药物已成为海洋渔业资源可持续利用的发展趋势之一。

2.4 传统转基因技术适应不了基因工程育种的需要 基因转移是培育高产、抗病和优良养殖鱼类品种的有效手段。自朱作言^[27]率先研制出第一例转基因鱼以来,全世界数十个实验室大规模的鱼类基因转移研究,取得了很大进展,建立了显微注射、电穿孔等多种基因转移方法,获得了快速生长的转基因鲤和大马哈鱼。但上述方法只能将外源基因随机整合到受体鱼基因组中;而外源基因拷贝数及整合位点难以控制、转基因鱼形成嵌合体、外源基因难以稳定表达和遗传给后代等问题则严重影响了这一基因工程育种技术

的有效应用,已成为制约转基因鱼研究进一步发展和推广应用的瓶颈。探索外源基因定点整合、稳定表达和遗传的基因转移技术已显得非常迫切和必要,成为鱼类转基因育种研究中急待解决的重大课题。胚胎干细胞介导的基因打靶技术则能够将外源基因定点引入转基因鱼的特定部位,从而成为解决外源基因不能定点整合和稳定遗传的很有潜力的技术途径。

3 鱼类抗病分子育种研究进展

3.1 抗病相关功能基因筛选及基因标记辅助育种 与海水鱼类抗病性状相关的功能基因,目前开展研究的较多。下面主要介绍与鱼类天然抗病能力密切相关的几种抗病相关功能基因,主要包括抗菌肽、主要组织相容性复合体(MHC)和天然抗性相关巨噬蛋白(Nramp)。

3.1.1 抗菌肽 鱼类是特异性免疫和非特异性免疫并存的脊椎动物。但与哺乳类相比,鱼类的特异免疫系统尚不够发达,特异性免疫机制还不完善。因此,在鱼类对外界刺激及病原生物侵袭的防御反应中,非特异性免疫起着重要作用。现已知参与鱼类非特异性免疫反应的因子主要包括巨噬细胞、粒细胞和细胞毒性细胞等一些具有吞噬作用的细胞,以及介导一系列免疫或应激反应的蛋白分子,如补体、细胞因子、趋化因子及溶菌酶和抗菌肽等。由于非特异性免疫在鱼类等水生动物的防御反应中所起的重要作用及其在水产动物防病治病中的巨大应用潜力,近年来有关鱼类非特异性免疫相关功能基因的克隆及免疫调节机理的研究已引起科技界的高度关注,并成为当今世界鱼类分子免疫学和抗病机理研究的热点课题。在非特异性免疫防病相关因子中,抗菌肽是一个重要组成部分。抗菌肽是一类可以抵抗多种病原菌感染的非特异性免疫因子。过去几年,抗菌肽在植物和小鼠上应用较多,并得到成功。研究表明,抗菌肽基因转移明显提高了植物和小鼠的抗病能力;相类似,抗菌肽在鱼、虾抵抗病原感染过程中也起着重要作用。美国 and 法国科学家在虹鳟、泥鳅抗菌肽分离纯化上做了一些研究。而有关鱼类抗菌肽基因克隆的研究,目前只在白鲈、美洲鲈、虹鳟等几种鱼类上有过一些报道。

国内,陈松林等^[9]构建了真鲷脾脏 cDNA 文库,测定了 2 000 多个 EST 序列,获得了 1 133 个基因,其中与 GENBANK 中已知基因同源的有 150 个,从中筛选到一批免疫和抗病相关功能基因,特别是筛选到真鲷抗菌肽基因,构建了真鲷抗菌肽基因表达载体,并在酵母中表达了真鲷抗菌肽,表明真鲷重组抗菌肽对大肠杆菌具有剂量依存的抑菌活性。抗菌肽基因的获得为培育转抗菌肽基因鱼奠定了重要基础。

3.1.2 主要组织相容性复合体 主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)是指染色体上由一系列紧密连锁的基因位点所组成的具有高度多态性的复合遗传系统或区域。MHC 基因编码细胞表面糖蛋白,能结合和呈递内源抗原和外源抗原给 T 细胞。一般来说,鱼类的 MHC I 类分子结构和哺乳动物相似,是由 α 链和 $\beta 2$ -微球蛋白非共价连接形成的异二聚体。鱼类的 MHC I 类分子主要在有核细胞表达而且主要结合内源多肽给细胞毒性(CD8+)T 细胞;MHC II 类分子是由 α 链和 β 链组成的异二聚体。其分子结构形式与哺乳动物的 MHC II 类分子相似。

鱼类的 MHC II 类分子主要在免疫系统的细胞表达,如 B 细胞、巨噬细胞和其它抗原呈递细胞,主要结合外源多肽呈递给辅助(CD4+)T 细胞。MHC 基因产物诱导和调节机体的免疫应答,激发机体特异性的免疫反应,因此在免疫学上具有极其重要的意义,它是目前已知多态性最丰富的基因之一。

有关动物抗病力相关基因,迄今的许多研究认为,主要组织相容性复合物(MHC)是一个疾病抗性相关的重要候选基因。MHC I 和 MHC II 基因都有多态性,这些多态性与机体的抗病力相关。研究表明:鸡 MHC 基因的多态性影响了鸡对 Marek's 病毒的敏感性,鸡对 Marek's 病的抗性与 MHC 位点多态性相关;人类对 HIV 病的抵抗力与 MHC I 多态性密切相关;虹鳟的 MHC 基因的差异导致它们在 IPNV 病毒抗性和敏感性上的差异;大西洋鲑的 MHC 基因位点与对细菌性疾病的抵抗力之间存在相关性^[16]。因此,鱼类 MHC 基因的克隆及其与鱼类抗病力的关系的研究对于阐明鱼类抗病力的分子遗传基础具有重要意义,目前它已成为鱼类抗病免疫遗传学和抗病分子育种研究的前沿、热点课题之一。有关鱼类 MHC 基因的克隆和结构分析目前国内外报道较少。

在国内,Xia 等^[25]研究了虹鳟不同品系 MHC I 型基因的多态性;黄海水产研究所采用 EST 技术从真鲷脾脏 cDNA 文库中筛选到 MHC II 型 α 和 β 基因^[9],研究了病原菌感染后真鲷不同组织中 MHC II 基因表达的变化,克隆了牙鲆 MHC II 型基因,比较了牙鲆抗病个体和不抗病个体 MHC II 型基因的分子多态性,初步筛选出与牙鲆抗病相关的基因型(陈松林等,待发表),从而为我国海水养殖鱼类基因标记辅助育种研究奠定了良好基础。

3.1.3 天然抗性相关巨噬蛋白 天然抗性相关巨噬蛋白(Natural resistance associated macrophage protein, Nramp)是生物体内的一种抑制胞内寄生菌侵染的免疫蛋白,能够促进溶酶体与吞噬小体的融合,起到降解吞噬细胞吞入的病原菌的作用,该蛋白的结构特征及作用功能成为一个新的研究热点。鉴于天然抗性相关巨噬蛋白在提高生物天然抗病力和防治疾病上的重要应用价值,过去几年,在哺乳类中研究较多。研究表明,在鼠科动物中,天然抗性相关巨噬蛋白能够促进巨噬细胞内包含 *Salmonella* 液泡(SVC)的成熟和酸化,并调节其与溶酶体的融合,促进杀菌作用。

小鼠天然抗性相关巨噬蛋白基因组全序列已经被克隆出来,它包括 15 个外显子,长约 11.5kb。在小鼠中已证实天然抗性相关巨噬蛋白对 *Salmonella typhimurium*, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* 和 *Leishmania donovani* 等病菌都有很好的抑制作用。在鸟类,发现天然抗性相关巨噬蛋白基因的 11 种突变型中有 10 种可以在 *Salmonella* 抗病个体和 *Salmonella* 敏感家系中检测到,1 种只能在 *Salmonella* 敏感家系中检测到^[14]。在对冈比亚感染肺结核群体研究中发现 4 种 NRAMP1(5'(CA)_n, INT4, D543N, 3'UTR)多态性标记与肺结核病菌感染显著相关^[21]。上述研究说明了天然抗性相关巨噬蛋白在哺乳类巨噬细胞的免疫反应中起着重要作用。最早于 1999 年在鲤鱼中克隆出 NRAMP 基因,目前关于真鲷、虹鳟、沟鲈、鲟鱼、条纹狼鲈等鱼类的 NRAMP 基因克隆都有报道。对鱼类天然抗性相关巨噬蛋白的研究仅限于基因克隆、序列分析和不同组织中的表达差异^[11-12]。在国内,Chen et al. (2004b) 分离克隆了真鲷 Nramp 基因并发

现鳗弧菌感染能够提高真鲷肝脏和脾脏中的 Nramp 表达水平^[10]。

3.2 转基因育种 鱼类基因转移研究自朱作言等首次在金鱼上获得成功以来,全世界 20 多个国家的几十个实验室相继开展了鱼类基因转移的研究。早期的研究主要集中在生长激素基因上,已成功获得快速生长的转基因鲤、大马哈鱼、罗非鱼和泥鳅等。转生长激素基因鱼所表现的快速生长效应是非常引人注目的。例如,转生长激素基因的大西洋鲑和银大马哈鱼生长非常迅速,即使是 G₀ 代鱼也比对照组生长快 10 倍;转生长激素基因罗非鱼的生长是对照组的 2~3 倍^[20];汪亚平等^[4]将构建的“全鱼”生长激素基因导入到黄河鲤中,转基因鱼最大个体的体重是对照组体重的 3.3 倍,得到的转基因 F1 代能够继续保持快速生长的特性。抗病基因转移是培育抗病鱼类新品种的很有潜力的技术手段。近几年随着鱼类功能基因组研究的发展,一些抗病相关功能基因(如抗菌肽基因、干扰素基因等)相继被分离和克隆,为鱼类抗病基因转移提供了基因资源。尽管鱼类抗病基因转移研究起步较晚,但近几年来也取得了一定进展。例如,Hew 等利用溶菌酶基因与美洲大鲈的 AFP 基因启动子,进行了向大西洋鲑受精卵转移的实验;Dunham 等把从家蚕中分离到的抗菌肽基因利用电穿孔的方法导入斑点叉尾鲷受精卵中,提高了转基因鱼的抗菌活性,并且外源基因也没有产生其它的影响^[13];Sarmasik 等则将抗菌肽基因导入青鳉中,结果也显示出转基因个体具有比对照组更高的抗菌活性^[22]。

3.3 遗传连锁图谱构建及分子标记辅助育种 鉴于遗传连锁图谱在基因克隆、基因定位和分子标记辅助选育等方面的重要意义和应用价值,国际上对水生动物遗传连锁图谱构建给予了高度重视^[2],目前已在多种鱼类上构建了遗传连锁图谱。美国于 1997 年启动了大马哈鱼、沟鲈、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。继 Postlethwait 等率先建立斑马鱼遗传连锁图谱以来^[19],Young 等用加倍的单倍体构建了虹鳟遗传连锁图谱^[26],Kocher 等构建了罗非鱼遗传连锁图谱^[15],Liu 等构建了沟鲈遗传连锁图谱^[17]。国内,黑龙江水产研究所应用微卫星标记构建了鲤鱼遗传连锁图谱,并初步筛选到一个抗寒相关标记^[23]。但有关抗病分子标记筛选及其在海水鱼类抗病品种培育中的应用方面,目前国内外均少有报道。

3.4 胚胎干细胞系建立与基因定点突变育种 胚胎干细胞和基因打靶技术是分析基因功能、制作定点突变转基因(knock-in)或缺基因(knock-out)动物的有效手段。这项技术已在小鼠上建立并得到广泛应用。通过这套技术,已经对上千个小鼠基因进行了功能分析。同样,这项技术在鱼类基因功能分析和抗病品种培育上具有重要意义和应用价值^[1]。鉴于胚胎干细胞和基因打靶技术是分析鱼类基因功能、制作定点突变转基因或缺基因鱼类的有效手段,美、日、德等国正在以小型模式鱼类斑马鱼和青鳉为材料,试图建立鱼类基因打靶技术。例如,美国用培养的斑马鱼囊胚细胞移植获得了生殖系嵌合体^[18];日本用培养的青鳉胚胎细胞核移植获得了成活的二倍体苗^[24];中国与德国科学家合作建立了鱼类细胞基因打靶的正-负选择程序^[5],克隆了青鳉 p53 基因组基因并构建了其同源重组载体^[3,8];国内黄海水产研究所建立了鲈鱼和真鲷 ES 样细胞系^[6,7]。鉴于传统转基因技术不能将外源基因定点引入转基因生物的特定位置,探索胚胎

干细胞介导的基因定点转移技术已成为鱼类基因转移研究的发展趋势之一。

4 前景展望

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鱼类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,而且在研究如何利用已开发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上取得较大进展。近几年来,我国在水产养殖动物抗病相关功能基因筛选与克隆、分子标记技术以及胚胎干细胞培养等方面也有良好的开端,例如,已经分离、克隆了我国海水鱼类的抗菌肽基因、天然抗性相关巨嗜蛋白基因以及MHC基因等一批抗病相关功能基因,建立了花鲈等海水养殖鱼类的ES样细胞系。上述成果为我国开展海水鱼类抗病分子育种的研究奠定了良好基础。如果政府和有关部门能够增加经费投入,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,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于国际先进行列,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。

参考文献与注释(References)

- [1]陈松林. 鱼类胚胎干细胞研究进展[J]. 中国水产科学, 2001, 7(4): 95~99
- [2]陈松林. 水产养殖生物基因组研究现状及发展趋势[A]. 见: 世界水产养殖科学技术发展趋势-2002 世界水产养殖大会总结[C]. 青岛: 海洋出版社, 2003. 79~88
- [3]陈松林, Hong Y, Scharlt M. 青鳉 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
- [4]汪亚平, 胡炜, 吴刚, 孙永华, 陈尚萍, 张甫英, 朱作言. 转“全鱼”生长激素基因鲤鱼及其 F1 代遗传分析 [J]. 科学通报, 2001, 46: 226~229
- [5]Chen S L, Hong Y, Scharlt M. Development of a positive-negative selection procedure for gene targeting in fish cell [J]. Aquaculture, 2002, 214: 67~79
- [6]Chen S L, Sha Z X, Ye H Q. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch blastula embryo[J]. Aquaculture, 2003, 218: 141~151
- [7]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, 2003b, 63: 795~805
- [8]S L Chen, Y Hong, M Scharlt. Lack of ultraviolet-light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53 [J]. Gene, 2001, 264: 197~203
- [9]Chen S L, Xu M Y, Hu S N, Li L. Analysis of immune-relevant genes expressed in red sea bream (*Chrysophrys major*) spleen[J]. Aquaculture, 2004a (In press)
- [10]Chen S L, Xu M Y, Ji X S, Yu G C. Cloning and characterization of natural resistance associated macrophage protein (Nramp) cDNA from red sea bream (*Pagrus major*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004b (In press)
- [11]Chen H, Geoffery C W, Charles D R. Isolation and characterization of channel catfish natural resistance associated macrophage protein gene [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2002, 26: 517~531
- [12]Dorschner M O, Philips R B. Comparative analysis of two Nramp loci from rainbow trout[J]. DNA and Cell Biology, 1999, 18: 573~583
- [13]Dunham R A, Warr G W, A Nichols. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish possessing cecropin genes [J]. Marine Biotechnology, 2003, (3): 330~338
- [14]Hu J, Bumstead N, Barrow P. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC [J]. Genome Research, 1997, (7): 693~704
- [15]Kocher T D, Lee W J, Sobolewska H. A genetic linkage map of a cichlid fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Genetics, 1998, 148: 1 225~1 232
- [16]Langefors A, Lohm J, Grahn M. Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to aeromonas salmonicida in Atlantic salmon[J]. Proc. R. Soc. Lond., 2001, 267: 479~485
- [17]Liu Z J, Karsi A, Li P, Cao D, Dunham R. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family[J]. Genetics, 2003, 165: 687~694
- [18]Ma C, Fan L, Ganassin R, Bols N, Collodi P. Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures [J]. PNAS, 2001, 98: 2 461~2 466
- [19]Postlethwait J H, Johnson S L, Midson C N. A genetic linkage map for the zebrafish[J]. Science, 1994, 264: 699~703
- [20]Rahman M A, Mak R. Expression of a novel growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia[J]. Transgenic Research, 1998, (7): 357~369
- [21]Richard B, Cyril R. Variations in the nramp1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans[J]. The New England Journal of Medicine, 1998, 338: 640
- [22]Sarmasik A, Warr G, Chen T. Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens [J]. Marine Biotechnology, 2003, 5: 300~308
- [23]Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp and mapping a locus associated with cold tolerance trait [J]. Aquaculture, 2004 (In press)
- [24]Wakamatsu Y. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*)[J]. PNAS, 2001, 98(3): 1 071~1 076
- [25]Xia C, Kiryu I, Dijkstra J M, Azuma T, Nakanishi T, Ototake M. Differences in MHC class I between strains of rainbow trout[J]. Fish Shellfish Immunology, 2002, (12): 287~301
- [26]Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, Keim P, gaard G H. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids[J]. Genetics, 1998, 148: 839~850
- [27]Zhu Z, Li G, He L. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus*)[J]. Applied Ichthyology, 1985, (1): 31~34

(责任编辑 肖庆山)