

# 转青鱼生长激素基因日本白鲫原代的研制

冯浩, 傅永明, 吴慧, 刘筠, 刘少军\*

(湖南师范大学生命科学学院, 中国湖南长沙410081)

**摘要:** 构建由青鱼  $\beta$ -actin 基因启动子和青鱼生长激素(GH)基因精确拼接的“全鱼”基因 *pbcAbcGHc*, 并采用显微注射法将 *pbcAbcGHc* 导入日本白鲫的受精卵中. 对照养殖结果显示 150 日龄  $P_0$  代转基因日本白鲫的平均体重是对照组 1.37 倍, 平均体长是对照组 1.07 倍. 选择 30 尾  $P_0$  代转基因日本白鲫, PCR 方法检测出外源青鱼 GH 基因在  $P_0$  代转基因日本白鲫尾鳍基因组 DNA 中的整合率为 90%; 在一尾生长速度显著的转青鱼 GH 基因日本白鲫  $P_0$  的肌肉、肝脏两种组织中可检测到外源青鱼 GH 基因的转录.  $P_0$  代转青鱼 GH 基因日本白鲫  $P_0$  的成功获得为建立转青鱼 GH 基因日本白鲫纯系奠定了基础.

**关键词:** 转基因; 日本白鲫; 生长激素

中图分类号: S961.6

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)02-0158-07

## The Development of $P_0$ of Black Carp GH gene Transgenic Japanese Crucian Carp

FENG Hao, FU Yong-ming, WU Hui, LIU Yun, LIU Shao-jun\*

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

**Abstract:** The “all fish” transgene (*pbcAbcGHc*) containing the promoter of the  $\beta$ -actin gene and cDNA of growth hormone (GH) gene of black carp was microinjected into fertilized eggs of Japanese crucian carp (JCC). The contrast cultivation results showed that the mean body weight of the  $P_0$  of transgenic JCC of 150 days was 1.37 times of the control group. The average body length of the  $P_0$  of transgenic JCC of 150 days was 1.07 times of the control group. 30 transgenic JCC of 150 days were chosen for tail fin genomic DNA isolation and subsequently PCR detection. The ratio of the exogenous transplant gene integrating in the genome of the JCC tail fin is 90%. The transcription of exogenous black carp GH gene could be detected in the total RNA of the muscle and liver from one JCC with outstanding growth rate. The  $P_0$  of transgenic Japanese crucian carp with higher growth rate had been successfully developed, which made the solid foundation for the establishment of the pure line of the transgenic JCC.

**Key words:** transgenic; Japanese crucian carp; growth hormone

(Life Science Research, 2011, 15(2): 158~164)

20 世纪 80 年代, 多倍体育种技术是鱼类人工繁殖技术中的主攻方向. 国内外很多实验室采用细胞松弛素 B、热休克或静水压处理等方法获得了四倍体鱼类, 许多研究者试图通过可育的四倍体(♂)与正常的二倍体(♀)交配产生三倍体后代用于生产<sup>[1]</sup>. 但通过理化方法诱导难以获得能

够稳定遗传的四倍体种群. 湖南师范大学生命科学学院鱼类发育生物学研究室与湖南省湘阴县东湖渔场合作, 在二倍体红鲫(2N=100, ♀)和二倍体湘江野鲤(2N=100, ♂)远源杂交子一代(F<sub>1</sub>)中发现部分可育后代. F<sub>1</sub> 自交获得二倍体后代 F<sub>2</sub>. 在 F<sub>2</sub> 中有部分雌、雄个体能产生二倍体卵子和二

收稿日期: 2010-12-08; 修回日期: 2011-03-28

基金项目: 国家公益性行业(农业)课题(200903046-08); 国家自然科学基金资助项目(30500294); 湖南师范大学青年优秀人才培养计划资助项目(ET31004)

作者简介: 冯浩(1971-), 男, 湖南桃源人, 湖南师范大学副教授、博士; 傅永明为本文同等贡献作者; \* 通讯作者: 刘少军(1962-), 男, 湖南长沙人, 湖南师范大学教授、博士, 主要从事多倍体鱼类育种研究, Tel: 0731-88873010, E-mail: [lsj@hunnu.edu.cn](mailto:lsj@hunnu.edu.cn).

倍体精子,这两种二倍体配子受精能形成四倍体个体  $F_3$ ,将  $F_3$  中两性可育的雌雄四倍体 ( $4N=200$ ) 自交产生  $F_4$  四倍体群体,该群体已连续传代形成了一个染色体数目为  $4N=200$  的群体 ( $F_3-F_{18}$ )——即异源四倍体鲫鲤;采用该异源四倍体鲫鲤精子与二倍体日本白鲫卵子受精得到三倍体湘云鲫 ( $3N=150$ )<sup>[2,3]</sup>.湘云鲫具有生长速度快、完全不育、肉质好等特点,已在全国多个省区大规模推广养殖<sup>[4]</sup>.由于湘云鲫是一种完全不育的三倍体鱼,它的繁殖全依赖于亲本鱼,因此本工作组期望通过改良日本白鲫并将之同异源四倍体鲫鲤杂交获得生长速度等经济性状更好的三倍体湘云鲫品系.如果通过采用传统的鱼类杂交选育种、倍性育种、性控技术育种以及细胞工程育种技术来提高养殖鱼类产量难以克服育种周期长和优良性状遗传不稳定等问题<sup>[5]</sup>,因此鱼类育种学家们希望找到能定向培育具有特定优良性状,且该优良性状能够稳定遗传的鱼类新品系的方法和技术.自20世纪70年代以来,基因克隆和重组技术的诞生和飞速发展,为定向改变动物性状提供了理论和技术基础.1982年,美国科学家 Palmiter 等成功研制出转基因“超级鼠”<sup>[6]</sup>,以及1985年世界首例转基因鱼在我国研制成功<sup>[7]</sup>,标志着动物转基因技术从理论阶段向实践阶段转变.近年来,鱼类基因转移研究得到普遍开展,诸如汪亚平等研制出具有显著快速生长效应的转“草鱼”生长激素基因鲤鱼<sup>[8]</sup>.我们构建了含有青鱼  $\beta$ -actin 基因和青鱼 GH 基因精确拼接的“全鱼”基因  $pb-cAbcGHc$ ,并通过显微注射将“全鱼”基因  $pb-cAbcGHc$  导入日本白鲫受精卵,获得了具有一定生长优势的  $P_0$  代转青鱼 GH 基因日本白鲫.与此同时本工作组也成功研制出  $P_0$  代转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤.  $P_0$  代转青鱼 GH 基因日本白鲫的培育成功,为转青鱼 GH 基因日本白鲫纯系建立奠定了基础,同时对将来研制完全不育的转基因三倍体湘云鲫具有重要意义.

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料及试剂

本研究所用青鱼、雌核发育草鱼和日本白鲫均来自湖南师范大学四倍体鱼保护基地.高保真 EX Taq DNA 多聚酶购自 Takara 公司;pUCM-T 载体 T/A、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒购自上海生工;各种限制性

内切酶来自 New England Biolab 公司;Total RNA 提取及 cDNA 合成试剂盒来自 Promega 公司. DNA 测序由上海生工完成.

### 1.2 “全鱼”基因载体构建

“全鱼”基因  $pb-cAbcGHc$  所有构件均来自于我国鲤科养殖鱼类基因元件,启动子部分来源于青鱼  $\beta$ -actin 基因 5' 启动调控区,目的基因生长激素基因来源于青鱼生长激素基因编码区 cDNA,“全鱼”基因 3' 端结尾区来自本研究室雌核发育草鱼生长激素基因组基因 DNA 3' 端非翻译区.完整的“全鱼”基因  $pb-cAbcGHc$  见图 1,详细构建过程见转青鱼 GH 基因异源四倍体鲫鲤文章(待发表).

### 1.3 显微注射及对照养殖

大量制备和纯化“全鱼”基因  $pb-cAbcGHc$  质粒 DNA, EcoR I 和 Xho I 双酶切该质粒,胶回收纯化目的转植基因片段(2.9 kb)溶于 ST 溶液中,调整浓度为 100 mg/L.显微注射实验选在日本白鲫繁殖的旺盛季节 4 月进行,地点为湖南师范大学国家四倍体鱼种质保护基地,室温下(18~21 °C 最合适)采用人工授精方法得到受精卵,用 0.25% 的胰蛋白酶脱膜,然后将裸卵移至加有 Holtfreter 溶液的平皿中,在第 1 次卵裂前将约 1~2 nL 的转植基因 DNA 溶液显微注射到受精卵的动物极.转基因日本白鲫以及对照组鱼饲养地点为湖南师范大学四倍体鱼保护基地,鱼苗在面积 26 m<sup>2</sup>、水深 1.6 m 的室外水泥池中喂养至夏花阶段,夏花时转到面积 120 m<sup>2</sup>、水深 1.6 m 的室外大水泥池饲养,调整密度为每平方米 4 尾,成鱼阶段每日 2~3 次投喂蛋白含量为 25% 的鱼用配合饲料,其它管理按常规方法.

### 1.4 转基因鱼的检测

#### 1.4.1 体重及体长检测

150 日龄时,取  $P_0$  代转基因日本白鲫及对照养殖的日本白鲫,逐一测量体重和体长.其中转基因日本白鲫检测了 121 尾,普通日本白鲫检测了 70 尾.

#### 1.4.2 转植基因整合情况的检测

选择 30 尾 150 日龄  $P_0$  代转基因日本白鲫及对照鱼,提取尾鳍基因组 DNA,采用引物  $P_1$  及  $P_2$  进行 PCR 扩增来检测外源转植青鱼 GH 基因在转基因日本白鲫  $P_0$  尾鳍中的整合.随机回收纯化上述 PCR 扩增目的片段测序并分析比较测序结果.引物  $P_1$  (TGCGGTGATGAATGTCG) 和  $P_2$

(AACACGGATGACTGCGT), 两引物之间间隔 411 bp(见图 1).

#### 1.4.3 转植基因转录的检测

选择体重最大的 150 日龄 P<sub>0</sub> 代转基因日本白鲫和体重最大的对照鱼, 提取尾鳍、肌肉、肝脏、肾脏、脾脏、肠、心脏、性腺 8 种组织总 RNA, 采用引物 P<sub>a</sub> 及 P<sub>b</sub> 进行 RT-PCR 来检测外源转植青鱼 GH 基因的转录. 引物 P<sub>a</sub>(ATGGCTAGAGCR-TTACTGCTGTT) 位于 *pbcaBcGHc* 中青鱼 GH 基因编码区 5' 端, P<sub>b</sub> (TTACAGGTTGCAGTTGGA-

ATCC) 位于青鱼 GH 基因编码区 3' 端(见图 1). 分别回收纯化上述 RT-PCR 扩增目的片段测序并分析比较测序结果.

## 2 结果与分析

### 2.1 转“全鱼”基因日本白鲫的形态学检测

分别随机选取 121 尾 150 日龄 P<sub>0</sub> 代转基因日本白鲫和 70 尾对照鱼, 逐一测量体重和体长, 检测结果显示 P<sub>0</sub> 代转青鱼 GH 基因日本白鲫 P<sub>0</sub> 较对照组表现出一定的生长优势(见表 1, 图 2).

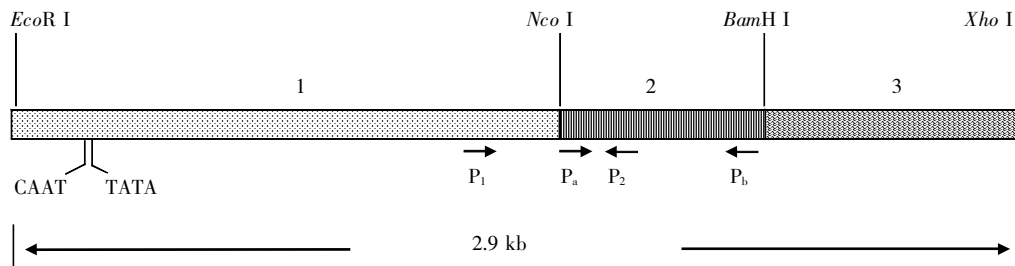


图 1 “全鱼”基因 *pbcaBcGHc* 示意图

1: 青鱼  $\beta$ -actin 基因启动调控区; 2: 青鱼 GH 基因开放阅读框; 3: 雌核发育草鱼 GH 基因 3'端 UTR 序列; P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> 和 P<sub>a</sub>/P<sub>b</sub> 分别为转植基因 PCR 或 RT-PCR 检测引物.

Fig.1 Diagram of “all fish” transgene - *pbcaBcGHc*

1: Flanking sequence of black carp  $\beta$ -actin gene; 2: ORF of black carp GH gene; 3: 3'UTR of GH gene for gynogenesis grass carp; P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> and P<sub>a</sub>/P<sub>b</sub> represent the PCR primers for detecting transgene's integration and transcription separately.

表 1 150 日龄 P<sub>0</sub> 代转基因日本白鲫和对照鱼的体重及体长

Table 1 The weight and body length of P<sub>0</sub> of transgenic Japanese crucian carp fish of 150 days and the controls

	Weight/g			Body length/cm		
	Max	Min	Average	Max	Min	Average
Transgenic Japanese Crucian Carp	225	80	152.4 ± 20.1	21.5	15.5	18.5 ± 1.4
Japanese Crucian Carp	190	30	111.1 ± 20.4	20	12.5	17.2 ± 1.3
	<i>P</i> < 0.01			<i>P</i> < 0.01		
Results	Obvious difference			Obvious difference		

注: 150 日龄 P<sub>0</sub> 代转基因日本白鲫检测了 121 尾, 对照检测了 70 尾.

Notes: 121 of the P<sub>0</sub> of transgenic Japanese crucian carp of 150 days and 70 of the control were measured.

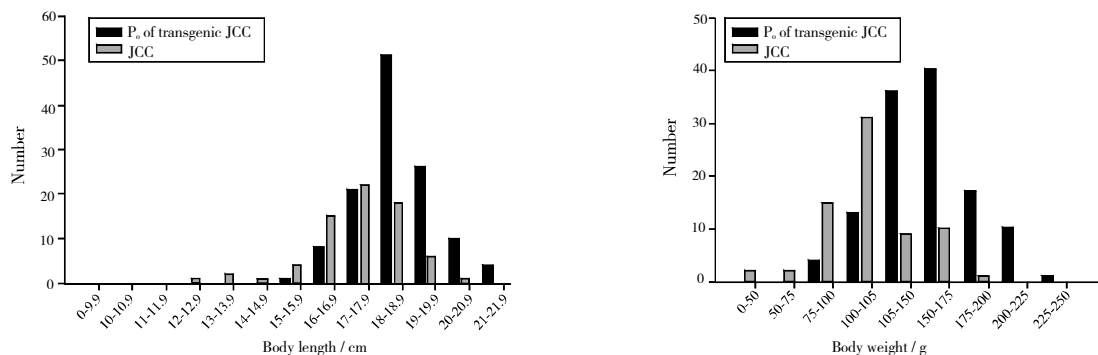


图 2 150 日龄 P<sub>0</sub> 代转基因日本白鲫与对照鱼体长及体重分布图

黑色柱代表 P<sub>0</sub> 代转基因日本白鲫, 灰色柱代表对照日本白鲫.

Fig.2 The body length (left) and body weight(right) of the P<sub>0</sub> of transgenic Japanese crucian carp of 150 days and the controls

The black bars stand for the transgenic fish and the gray bars for the control.

其中, P<sub>0</sub>代转基因日本白鲫的平均体重与平均体长分别为对照组的 1.37 倍和 1.07 倍; P<sub>0</sub>代转基因日本白鲫最大个体的体重与体长分别是最大对照鱼的 1.18 和 1.075 倍. P<sub>0</sub>代转基因日本白鲫中

出现生长速度显著增大的个体, 其背部肌肉明显增厚, 在头部后方形成明显的隆起形状, 有的转基因鱼出现发育畸形, 可能是外源转植基因的“毒性整合”所致<sup>[9]</sup>(图 3).



图 3 150 日龄 P<sub>0</sub> 代转基因日本白鲫  
(A)上方为对照鱼, 下方为转基因鱼; (B)为转基因鱼畸形个体.

Fig.3 The P<sub>0</sub> of transgenic Japanese crucian carp of 150 days

(A) The upper is the control and the lower is the transgenic Japanese crucian carp; (B) Transgenic abnormality.

### 2.2 外源转植基因整合情况的检测

选取 30 尾 P<sub>0</sub>代转基因日本白鲫, 提取尾鳍 DNA, 采用 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 引物进行 PCR 扩增, 有 27 条鱼能够扩增出 411 bp 左右的特异性条带, 阳性率为 90 % (见图 4); 对照组日本白鲫均没有扩增出该特异性条带.

选择 150 日龄 P<sub>0</sub>代转基因日本白鲫以及相应的对照鱼中体重最大的个体各一条 (转基因日本白鲫与对照体重分别为 225 g 和 190 g, 均为雌性鱼), 取尾鳍、肌肉、肝脏、肾脏、脾脏、肠、心脏、性腺 8 种组织提取总 RNA, 采用 P<sub>a</sub> 和 P<sub>b</sub> 引物进行 RT-PCR 来检测外源转植基因在受体鱼各种组织中的转录情况. 转基因日本白鲫 P<sub>0</sub>的肌肉、肝脏两种组织的 RNA 可以扩增出 630 bp 左右的特

### 2.3 外源转植基因转录水平的检测

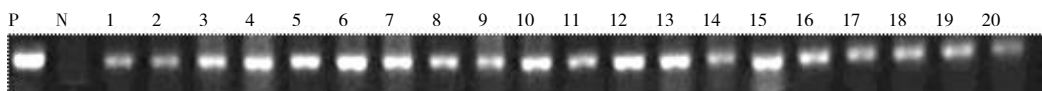


图 4 P<sub>0</sub>代转基因日本白鲫尾鳍 DNA 扩增结果

P: 阳性对照 (*pbcAbcGHc*); N: 阴性对照 (日本白鲫); 1~20: P<sub>0</sub>代转基因日本白鲫.

Fig.4 PCR results of DNA of caudal fin of P<sub>0</sub> of the transgenic Japanese crucian carp

P: Positive control (*pbcAbcGHc*); N: Negative control (Japanese crucian carp); 1~20: List of P<sub>0</sub> of transgenic Japanese crucian carp.

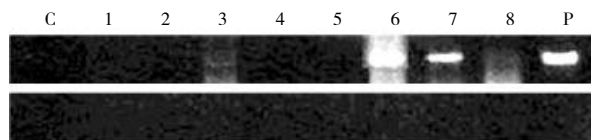


图 5 P<sub>0</sub>代转基因日本白鲫 RT-PCR 结果

上图为 RT-PCR 结果, 下图为 NO-RT 对照.

1: 尾鳍; 2: 卵巢; 3: 心脏; 4: 肠; 5: 肾脏; 6: 肝脏; 7: 肌肉; 8: 脾脏 P: 阳性对照 (*pbcAbcGHc*); C: 阴性对照 (日本白鲫).

Fig.5 RT-PCR of P<sub>0</sub> of transgenic Japanese crucian carp

The upper is RT-PCR data and the lower is NO-RT control.

1: Fin; 2: Ovary; 3: Heart; 4: Intestine; 5: Kidney; 6: Liver; 7: Muscle; 8: Spleen; P: Positive control (*pbcAbcGHc*); C: Negative control (Japanese crucian carp).

异性条带(见图5),而对照鱼普通日本白鲫的上述8种组织RNA都没有扩增出该特异性条带(图片未展示).

在转基因日本白鲫  $P_0$  基因组 DNA (引物  $P_1$  和  $P_2$ ) PCR 扩增产物中随机抽选4个条带和转基因日本白鲫 RT-PCR (引物  $P_a$  和  $P_b$ ) 所扩增出的所有条带(肌肉、肝脏两个 RT-PCR 扩增片段)测序. 测序结果表明: 转基因日本白鲫  $P_0$  基因组 DNA (引物  $P_1$  和  $P_2$ ) PCR 扩增出的产物条带 DNA 序列同外源转植基因 *pbcAbcGHc* 的序列同源性都达到98%以上, 在4个测序结果中都可以找到 *Nco* I 酶切位点; 转基因日本白鲫  $P_0$  肌肉、肝脏 RT-PCR (引物  $P_a$  和  $P_b$ ) 所扩增出的条带同青鱼生长激素基因编码区 cDNA 同源性都在98%以上.

### 3 讨论

近年来,随着世界人口的剧增,人们对鱼类等水产品的消耗也大幅上升. 按联合国粮农组织的报告介绍,由于过量捕捞,如今海洋中60%~70%的鱼类受到威胁,估计在2015~2025年间,全球将有50%的食用鱼来自人工养殖<sup>[10]</sup>,因此有必要选育出适于养殖的优良品种进行人工繁殖以满足人们的需求. 通过传统的遗传改良方法如种内遗传选育,人们选育出了诸如大西洋鲑<sup>[11]</sup>、罗普莎鲤<sup>[12]</sup>和斑点叉尾鲷等优良品种<sup>[13]</sup>. 湖南师范大学生命科学学院及其协作单位通过10多年的研究,成功研制出世界上首个雌雄可育的异源四倍体鲤(4N=200)群体<sup>[2, 3]</sup>,该四倍体鱼群体已连续繁育了16代( $F_3$ - $F_{16}$ ). 用该四倍体鱼群体为父本,二倍体日本白鲫为母本,通过倍间交配方法获得了快速生长的三倍体鱼湘云鲫(3N=150). 三倍体湘云鲫的性腺具有3种类型:精巢型、卵巢型、脂肪型,它们都不能产生正常配子,10多年的养殖实验也证明三倍体湘云鲫是不育的<sup>[14]</sup>. 由于湘云鲫的母本是日本白鲫,日本白鲫的改良对于三倍体湘云鲫体型、肉质、生长速度等方面的进一步改善具有深远的意义.

日本白鲫(*Carassius auratus cuvieri*)隶属于鲤亚科(Cyprinae)、鲫属(*Carassius*),原产于日本琵琶湖,1976年从日本引进我国饲养,是一种能在不良环境条件下生长和繁殖的大型鲫鱼. 日本白鲫生长快,饲养管理好,1周年可性成熟;日本白鲫还具有卵量大,一年可产多次卵的特点. 在我国的淡水养殖中,采用主养日本白鲫,搭养草鱼、

鳊鱼、鲢鱼、鳙鱼效果较好<sup>[15]</sup>.

青鱼是我国“四大家鱼”之一,生长速度快、个体大、肉味鲜美,但是关于青鱼的分子生物学研究还很少. 本工作组已经成功地克隆和表达了青鱼 *GH* 基因、制备了抗青鱼 *GH* 血清、成功地克隆了青鱼  $\beta$ -actin 基因启动子调控区域基因. 显微注射实验表明带有  $\beta$ -actin 基因启动子的绿色荧光蛋白在泥鳅胚胎的各个发育时期和各中器官中均有强烈表达,证明了该启动子的广泛表达性和强启动性<sup>[16-18]</sup>. 在此基础上我们构建了含有青鱼  $\beta$ -actin 基因和青鱼 *GH* 基因精确拼接的“全鱼”基因 *pbcAbcGHc*, 并将“全鱼”基因 *pbcAbcGHc* 用显微注射的方法分别导入日本白鲫和异源四倍体鲤的受精卵中(待发表),结果证明青鱼自身的  $\beta$ -actin 基因启动子同自身的 *GH* 基因相结合的全鱼基因在受体鱼中有着强烈的表达和明显的生物学效应.

通过对150日龄  $P_0$  代转“全鱼”基因 *pbcAbcGH* 日本白鲫及对照组的体重和体长的检测,结果显示  $P_0$  代转基因日本白鲫较对照组而言,表现出一定的生长优势. 这一结果与转草鱼生长激素基因异源四倍体不同<sup>[19]</sup>,这可能与日本白鲫的生长速度和遗传背景有关. Robert H. Devlin 等报道了转三文鱼生长激素基因 (*OnMTGH1*) 鲑鱼的促生长效应与受体鱼的品种有关<sup>[20]</sup>. 因此我们可以得出结论: 青鱼 *GH* 基因在日本白鲫中得到了有效的表达. 另外选取30尾150日龄转 *GH* 基因日本白鲫  $P_0$  尾鳍 PCR 检测 *pbcAbcGH* 基因的整合情况,结果显示有27尾检测到 *pbcAbcGH* 基因的整合; 在一尾150日龄生长速度显著的  $P_0$  代转 *GH* 基因日本白鲫的肌肉、肝脏两种组织中可检测到外源青鱼 *GH* 基因的转录,其他组织并未检测到转植基因的转录,以上结果表明我们所获得的转 *GH* 基因日本白鲫是携带外源基因的嵌合体,即不同组织或器官之间,同一器官的不同细胞之间所整合的外源基因的数量和质量是不均一的<sup>[10]</sup>. 由于原代鱼是嵌合体,转植基因在其后代个体之间的整合情况是不一致的,这就造成了后代个体之间表型的差异,因此我们需要通过三杂交或者雌核发育的方法来获得转 *GH* 基因日本白鲫纯系<sup>[21, 22]</sup>. 本研究室已经在鱼类雌核发育研究方面做了许多工作,诸如孙远东等培养出的雌核发育日本白鲫<sup>[23]</sup>,这为我们将来的工作打下了坚实的基础.

转基因鱼的生态安全风险问题是其走向市场的瓶颈,转基因鱼一旦逃逸到天然水体中:一则外源转植基因的表达可能让转基因鱼获得较强的生存力和竞争力,从而形成优势种群并挤占天然水体中其它野生鱼类的生态位,最终改变鱼类群落结构和影响物种多样性,二则转基因鱼可能与自然生态系统中的近源物种杂交,导致外源转植基因漂移而造成野生基因库污染,最终影响遗传多样性<sup>[24]</sup>.解决这一问题的方法是研制不育的转基因鱼或雌核发育转基因鱼<sup>[25]</sup>.本研究室于凡等通过转草鱼生长激素基因黄河鲤(♂)与异源四倍体鲫鱼(♀)交配获得转基因三倍体鲤鱼,转基因三倍体鲤鱼具有生长快速的特性,并且在同龄的鲤鱼繁殖季节(24月龄),转基因三倍体鲤鱼同普通三倍体鲤鱼一样不能产生成熟配子,因此是完全不育的<sup>[26]</sup>.

本研究以及本工作组同时进行的转青鱼GH基因异源四倍体鲫鱼原代的研究(待发表)为我们将来研制表达外源转植青鱼GH基因优良性状的两种转基因鱼纯系做了铺垫.本工作组计划在得到转青鱼GH基因异源四倍体鲫鱼纯系和转青鱼GH基因日本白鲫纯系的基础上,采取种间杂交的形式即转青鱼GH基因异源四倍体鲫鱼(♂)与转青鱼GH基因日本白鲫(♀)杂交得到完全不育的转基因三倍体鲫鱼.由于这两种转基因亲本均含有外源转植青鱼GH基因,我们期望该转基因三倍体鲫鱼在多种性状上明显优于三倍体湘云鲫.

### 参考文献(References):

- [1] 叶玉清,吴清江.人工四倍体鲫鱼的产生[J].自然科学进展(YE Yu-qing, WU Qing-jiang. The development of tetraploid fish through artificial method[J]. Progress in Natural Science), 1999, 9(7): 658-661.
- [2] LIU S J, LIU Y, ZHOU G J, *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.
- [3] 冯浩,刘少军,张轩杰,等.红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)F2和F3的染色体研究[J].中国水产科学(FENG Hao, LIU Shao-jun, ZHANG Xuan-jie, *et al.* Chromosome study on F2 and F3 hybrids of *Carassius auratus red var.* (♀) × *Cyprinus carpio* (♂)[J]. Journal of Fishery Sciences of China), 2001, 8(2): 1-4.
- [4] 刘少军.优质高产养殖鱼类—工程鲫[J].内陆水产(LIU Shao-jun. Xiangyun Crucian Carp-characterized with higher yield and better quality[J]. Inland Fisheries), 1993, 1(1): 17.
- [5] 崔宗斌,朱作言.鱼类基因转移育种的几个问题[J].生物技术通报(CUI Zong-bin, ZHU Zuo-yan. Several interesting questions about breeding transgenic fish[J]. Biotechnology Bulletin), 1998, 5(5): 1-10.
- [6] PALMITER R D, BRINSTER R L, HAMMER E R, *et al.* Dramatic growth of mice flat develop from eggs microinjected with metallothioneio growth hormone fusion genes[J]. Nature, 1982, 16(300): 611-615.
- [7] ZHU Z, LI G, HE L, *et al.* Novel gene transfer into fertilized eggs of goldfish(*Carassius auratus*)[J]. Journal of Applied Ichthyology, 1985, 1(1): 31-34.
- [8] 汪亚平,胡炜,吴刚,等.转“全鱼”生长激素基因鲤鱼及其F1遗传分析[J].科学通报(WANG Ya-Ping, HU Wei, WU Gang, *et al.* Genetic analysis of “all-fish”growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio*.) and its F<sub>1</sub> generation[J]. Chinese Science Bulletin), 2001, 46(14): 1174-1177.
- [9] 朱作言.转基因鱼模型的建立[J].中国科学(ZHU Zuo-yan. The model of transgenic fish[J]. Science China), 1989, B(2): 147-155.
- [10] 黄桂菊,喻达辉.水产动物转基因研究进展[J].动物医学进展(HUANG Gui-ju, YU Da-hui. Progress on transgenic aquatic animals[J]. Progress in Veterinary Medicine), 2005, 26(8): 6-9.
- [11] GJEDREM T. Selective breeding to improve aquaculture production[J]. World Aquaculture, 1997, 28(3): 33-45.
- [12] KIRPICHNIKOV V S, ILYASOV J I, SHART L A, *et al.* Selection of krasnodar common carp(*Cyprinus carpio* L.) for resistance to dropsy: principal results and prospects[J]. Aquaculture, 1993, 111(1-4): 7-20.
- [13] DUNHAM R A, BRUMMETT R E. Response of two generations of selection to increased body weight in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, compared to hybridization with blue catfish, *I. furcatus*, males[J]. Journal of Applied Aquaculture, 1999, 9(3): 37-45.
- [14] 刘少军,胡芳,周工健,等.三倍体湘云鲫繁殖季节的性腺结构观察[J].水生生物学报(LIU Shao-jun, HU Fang, ZHOU Gong-jian, *et al.* Gonadal structure of triploid crucian carp produced by crossing allotetraploid hybrids of *Carassius auratus red var.* (♀) × *Cyprinus carpio* (♂) with Japanese crucian carp (*Carassius auratuscavieri* T. ets)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica), 2000, 24(4): 301-306.
- [15] 陈素芝,页卫.我国引进鲤科和脂鲤科鱼类的研究[J].淡水渔业(陈素芝,页卫. The introduced Carps and Characins in China[J]. Freshwater Fisheries), 1994, 24(3): 4.
- [16] FENG Hao, CHEN Jia, LUO Jian, *et al.* Cloning of black carp  $\beta$ -actin gene and primarily detecting the function of its promoter region[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(2): 133-140.
- [17] 冯浩,成嘉,刘妍,等.青鱼生长激素的重组表达及其多克隆抗体的制备[J].遗传(FENG Hao, CHENG Jia, LIU Yan, *et al.* *In vitro* expression and antibody preparation of black carp (*Mylopharyngodon piceus*)GH[J]. Hereditas (Beijing)), 2005, 27(5): 729-734.
- [18] 冯浩,曾志强,成嘉,等.青鱼生长激素cDNA的克隆与序列分析[J].激光生物学报(FENG Hao, ZENG Zhi-qiang, CHENG Jia, *et al.* Molecular cloning and sequencing of growth hormone gene for black carp[J]. Acta Laser Biology Sinica), 2002, 11(6): 407-411.
- [19] 曾志强,胡炜,汪亚平,等.四倍体鱼的种质改良研究[J].高技术通讯(ZENG Zhi-qiang, HU Wei, WANG Ya-ping, *et al.* The genetic improvement of tetraploid fish by pCAGcGHc-transgenicism[J]. High Technology Letters), 2000, 7(7): 12-15.
- [20] DEVLIN R H, BIAGI C A, YESAKI T Y, *et al.* Growth of do-

- mesticated transgenic fish(A growth-hormone transgene boosts the size of wild but not domesticated trout)[J]. *Nature*, 2001, 409(15): 781-782.
- [21] 冯浩, 曾志强, 刘少军, 等. 转基因异源四倍体鲫鱼 F1 的研究[J]. *遗传学报*(FENG Hao, ZENG Zhi-qiang, LIU Shao-jun, *et al.* Studies of F1 of transgenic allotraploid hybrids of *Carassius auratus red* var. (♀) × *Cyprinus carpio* (♂) [J]. *Acta Genetica Sinica*), 2002, 29(5): 434-437.
- [22] 龙华, 黄燕. 转基因鱼品系的纯化[J]. *生物学通报*(LONG Hua, HUANG Yan. Development of pure line of transgenic fish[J]. *Bulletin of Biology*), 2006, 41(1): 49.
- [23] SUN Yuan-dong, ZHANG Chun, LIU Shao-jun, *et al.* Induction of gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius Cu-vieri*)[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(5): 405-412.
- [24] HU Wei, WANG Ya-ping, ZHU Zuo-yan. Progress in the evaluation of transgenic fish for possible ecological risk and its containment strategies [J]. *Science China C: Life Science*, 2007, 50(5): 573-579.
- [25] MUIR W M, HOWARD R D. Assessment of possible ecological risks and hazards of transgenic fish with implications for other sexually reproducing organisms[J]. *Transgenic Research*, 2002, 11(2): 101-114.
- [26] 于凡, 肖俊, 刘少军, 等. 转生长激素基因三倍体鲤鱼的快速生长与不育特性[J]. *科学通报*(YU Fan, XIAO Jun, Liu Shao-jun, *et al.* The fast growth and sterility of the growth hormone gene transgenic triploid carps [J]. *Chinese Science Bulletin*), 2010, 55(20): 1987-1992.

(上接第 141 页)

- [10] 中国科学院华南植物园, 澳门民政总署园林绿化部. 澳门植物名录[M]. 广州: 广东世界图书出版公司(South China Botanical Garden, Ministry of Municipal Affairs Bureau of Macao Landscaping. Macao Plants List [M]. Guangzhou: Guangdong World Books Publication Company), 2004. 13-23.
- [11] 徐成东. 哀牢山蕨类植物 [M]. 成都: 西南交通大学出版社(XU Cheng-dong. Pteridophytes in Ailaoshan [M]. Chengdu: Southwest Traffic University Press), 2007.
- [12] 赵运林. 湘黔桂交界地区植物区系研究 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社(ZHAO Yun-lin. Flora Research in the Area Marching with Hunan, Guizhou and Guangxi[M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press), 1995.
- [13] 赵运林, 潘晓玲. 湘黔桂交界地区植物名录 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社(ZHAO Yun-lin, PAN Xiao-ling. Plants List of the Area Marching with Hunan, Guizhou and Guangxi [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press), 1996.
- [14] 蒋木青. 黄山蕨类植物的生态及地理分布 [C] //张宪春, 邢公侠. 纪念秦仁昌论文集. 北京: 中国林业出版社(JIANG Mu-qing. Ecological and geographical distribution of Pteridophytes in Huangshan, Anhui [C] //ZHANG Xian-chun, XING Gong-xia. Memorial Proceedings of Ching. Beijing: China Forestry Press), 1999. 189-198.
- [15] 叶华谷, 陈邦余. 乐昌植物志(上册)[M]. 北京: 世界图书出版公司(YE Hua-gu, CHEN Bang-yu. Flora of Lechang, Guangdong [M]. Beijing: World Publishing Company), 2005.
- [16] 周兰平, 何祖霞, 陈辉敏, 等. 江西省齐云山自然保护区的蕨类植物区系[J]. 华南农业大学学报(ZHOU Lan-ping, HE Zu-xia, CHEN Hui-min, *et al.* The fern flora of Qiyunshan Nature Reserve, Jiangxi, China [J]. *Journal of South China Agricultural University*), 2010, 31(2): 88-94.
- [17] 张懿铨. 植物区系地理研究中的重要参数——相似性系数[J]. *地理研究*(ZHANG Yi-li. Coefficient of similarity ——an important parameter in Floristic geography [J]. *Geographical Research*), 1998, 17(4): 429-434.
- [18] 孔宪需. 四川蕨类植物地理特点兼论“耳蕨-鳞毛蕨植物区系”[J]. *云南植物研究*(KONG Xian-xu. The phytogeographical features of pteridophytes of Sichuan, China with some remarks on the “Polysticho-Dryopteris Flora” [J]. *Acta Botanica Yunnanica*), 1984, 6(1): 27-38.
- [19] 武素功. 中国-日本蕨类植物区系的地理亲缘 [J]. *云南植物研究*(WU Su-gong. The phytogeographical affinities of pteridophytes between China and Japan [J]. *Acta Botanica Yunnanica*), 1987, 9(2): 167-179.

## · 简 讯 ·

本刊现存少量近三年的《生命科学研究》合订本, 2008 年合订本定价 70 元, 2009、2010 年合订本定价 130 元(免收邮费)。如读者需要购买, 可在汇款后, 将收件人、邮寄地址、邮编、本数等信息发至本刊邮箱 [lfe@hunnu.edu.cn](mailto:lfe@hunnu.edu.cn), 本刊随后将安排具体寄书事宜。

《生命科学研究》编辑部