



鱼类基因组操作与定向育种

叶鼎, 朱作言, 孙永华*

中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: yhsun@ihb.ac.cn

收稿日期: 2014-09-15; 接受日期: 2014-10-29

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB126306, 2012CB944504)、国家自然科学基金(批准号: 31222052)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(批准号: KSCX2-EW-N-004-4)和淡水生态与生物技术国家重点实验室自主研究项目(批准号: 2011FBZ23)资助

摘要 水产养殖已成为全球范围内发展最快的农业产业之一, 可持续发展水产养殖的关键在于培育具有优良性状的养殖品种. 基因组操作技术为快速、定向的鱼类遗传育种提供了一条重要的可行性途径. 本文回顾了基于经典基因组操作技术的鱼类育种方法学历史, 如多倍体育种及细胞核移植等. 然后重点介绍并展望了基于转基因技术及新近发展的基因组编辑技术的鱼类定向育种方法. 后两种技术的发展和运用将会为未来的鱼类种业带来更加高效和更具预见性的育种新方法.

关键词

鱼类定向育种
多倍体育种
细胞核移植
转基因鱼
基因组编辑

鱼类蛋白是人类最为重要的蛋白质来源之一. 由于过度捕捞导致渔业资源衰竭, 水产养殖已成为全球范围内最受关注和发展最快的农业产业之一^[1]. 可持续发展水产养殖的关键在于培育具有优良性状的养殖品种. 现阶段, 鱼类养殖面临着近亲繁殖所带来的种质退化、鱼病频发、产量和品质下降等问题^[2]. 因此, 筛选和培育高产、抗病、优质的养殖品种是可持续发展渔业的重中之重.

在过去几十年间, 种内杂交^[3]和种间杂交^[4]等传统育种方法给人们提供了大量的优质鱼类产品. 然而, 杂交育种通常需要多代的循环选育才能造就具有某一优良性状且不表现出负面效应的新品种. 另外, 利用这些方法, 也无法窥见这些优良性状背后的遗传机制, 使得选育品种的目标性状往往具有不可预见性. 因此, 亟需开发高效并可预测的育种方法来培育高产优质的鱼类新品种. 本文首先回顾基于经典基因组操作技术的鱼类育种方法学历史, 如多倍

体育种^[5]及细胞核移植^[6]等. 然后, 重点介绍基于转基因技术及新近发展的基因组编辑技术的鱼类定向育种方法. 后两种技术的发展将会给未来的鱼类种业带来更加高效和更具预见性的育种新方法, 而基于经典和新兴基因组操作技术相结合的综合育种技术将极有可能成为未来鱼类育种的主导技术.

1 多倍体育种

多倍体育种通常通过倍性操作来实现. 倍性操作是一种通过人工干预致使染色体加倍的方法, 它可以说是基因组操作中最为经典的方法^[5]. 在一些鱼类物种中, 雌、雄性或不育个体往往表现出不同的生长速率, 因此如何高效获得单性群体或不育群体往往是鱼类育种学家追求的目标. 在所有有关鱼类性别控制或育性控制的方法中, 倍性操作是使用最早也是目前为止最为有效的方法之一. 此外, 这一方法

引用格式: 叶鼎, 朱作言, 孙永华. 鱼类基因组操作与定向育种. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 1253–1261

英文版见: Ye D, Zhu Z Y, Sun Y H. Fish genome manipulation and directional breeding. Sci China Life Sci, 2015, 58, in press

也被广泛用于纯系的快速获得,加之与其他育种方法相结合,将会大大缩减育种周期。

鱼类多倍体育种源于对雌核发育的研究。在鱼类中,第二次减数分裂在排卵或受精后很短的时间内完成。研究者发现,这一过程能够被冷休克所抑制,从而使卵细胞的染色体加倍^[7,8]。后续的实践表明,热休克和静水压相结合的方法亦可获得类似的效果,且更为简洁高效^[9,10]。通常而言,鱼类人工雌核发育的实现是首先利用灭活的精子与正常成熟的卵子受精,然后通过冷热激或静水压处理该受精卵发育而来^[11,12]。反之,人工雄核发育是利用灭活的卵子与正常成熟的精子受精,然后通过冷热激或静水压处理该受精卵发育而来。雌核发育和雄核发育已在各种经济鱼类中得到广泛运用,并获得双单倍体(double haploid)^[10]。

双单倍体的获得能够被用来维持单一性别群体。在XX-XY性别决定机制的物种中,雌核发育将会获得全雌后代;而在雄核发育的后代中,将会得到XX和YY 2种基因型。在ZW-ZZ性别决定机制的物种中,情况则相反。由于辐射、温度、压力等处理对胚胎造成损伤从而导致胚胎具有较高的死亡率,因此直接利用雌核发育或者雄核发育技术仅能生产少量的单性后代,并不适宜于大规模的应用^[10]。然而,值得强调的是,多倍体育种常常会和一些经典的育种方法——如性逆转法相结合从而实现控制性别的目的。全雄黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)研制则充分利用了这一策略^[13]。首先,通过激素诱导性逆转的方法获得生理雌性的XY型黄颡鱼,再通过雌核发育获得YY型超雄鱼。当该超雄鱼和普通的XX型雌鱼交配即可得到全雄后代。另外,利用激素诱导YY型超雄鱼可获得生理雌性的YY型雌鱼,利用它们与正常YY超雄鱼的交配可以维持一个有相当规模的超雄亲本。

与很多家养动物一样,不育的鱼类品系往往比可育品系具有更快的生长速度。因此,三倍体不育鱼的育种在不同鱼类物种中获得广泛的研究和应用。早期研究者们利用冷或热刺激正常的受精卵来获得三倍体不育鱼。然而,这种方法成功率较低并常常伴随着较高的死亡率。相比之下,利用四倍体鱼和二倍体鱼杂交来获得三倍体鱼则是一个更为高效的办法^[14]。因为大多数的鱼都是二倍体,所以如何获得具有繁殖能力的四倍体群体是该策略中最为关键的一步。

一个最为成功的案例是利用红鲫(*Carassius auratus*)和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)杂交直到F₃代,通过筛选获得两性可育的异源四倍体鲫鲤^[15,16]。同一课题组也报道了利用红鲫和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)杂交成功获得了两性可育的异源四倍体鲫鲂^[17,18]。虽然多倍体育种在鱼类育种历史上存在已久,并且利用此方法已经获得了多个优良品种,但是利用这种方法建立四倍体品系并不具有普遍意义。这主要是因为只能在为数不多的鱼类物种中才能通过杂交手段获得两性可育的四倍体群体。此外,三倍体不育系的最主要优良性状表现为快速生长,因而这一方法并不适用于培育具有其他目标性状的品系。当然,这一方法也不适用于一些雌、雄性或不育个体在生长上没有显著差别的鱼类品种。

2 细胞核移植

细胞核移植被认为是最为彻底的一种基因组操作。这一技术将一整套细胞核基因组移植到另一个去核的卵细胞中,从而构建一个重构卵。如果移植的细胞核和卵细胞来源于同一物种,这种细胞核移植被称作“同种核移植”。同种核移植已被广泛用于研究细胞核的可塑性、细胞核的再程序化以及利用体细胞核获得再程序化的干细胞等相关研究^[19]。虽然自20世纪50年代以来,细胞核移植(动物克隆)技术已在多个物种中获得了较为广泛的研究,利用这一技术也成功地获得了干细胞来源的克隆动物^[6],但是直到首例体细胞克隆哺乳动物“多莉”羊的诞生才掀起了另一波研究的热潮^[20]。在鱼类中,细胞核移植技术最早由童第周等人^[21]在金鱼(*Carassius auratus*)和鲫(*Rhodeus sinensis*)中建立。其实,早在1985年,陈宏溪等人^[22,23]报道了第一例来自于短期培养体细胞的克隆鱼,但是这一研究因为最初以中文发表而并不为国际学术界所知。2002年, Lee等人^[24]报道了利用长期培养的斑马鱼(*Danio rerio*)细胞获得克隆斑马鱼,从而点亮了利用基因操作后的鱼类培养细胞进行个体重建的希望之光。有意思的是,在青鳉鱼(*Oryzias latipes*)中,“半克隆”的技术也能获得成功——研究者利用单倍体胚胎干细胞进行细胞核移植,从而获得了单倍体克隆鱼^[25]。然而,不得不指出,体细胞克隆的成功率非常低,而且克隆子代往往出现各种发育缺陷。因而,必须解决以上问题,才能有效

地将克隆技术应用于鱼类遗传育种。

如果用于克隆的卵细胞和供体细胞来源于 2 个不同的物种, 则被称作“异种核移植”。由于异种核移植可以将来源于不同物种的细胞核和卵细胞质因子进行组合, 因此认为对鱼类育种具有较大的价值^[26]。异种核移植最早在两栖类的 2 个属——*Rana* 或 *Xenopus* 内的不同物种间进行^[27,28]。在这些实验中, 研究者无一例外地无法获得成功的克隆子代。可能原因是供体细胞核的不完全再程序化或用于克隆的物种间的核质不相容性。在哺乳动物的近缘物种间, 已有若干的濒危动物获得成功克隆^[29]。这些实验同时显示, 克隆动物在各个方面与细胞核供体完全一致, 显示细胞核基因组对性状的决定性作用。然而, 在具有不同表型的鱼类不同物种间开展的细胞核移植研究给出了非常不一样的结果。

作为脊椎动物中较为低等的类群, 鱼类中的异种细胞核移植似乎可以获得更广泛的成功。为了获得具有优良经济性状的“核质杂交鱼”, 童第周课题组^[26]利用跨属的鲤鱼细胞核和鲫鱼去核卵进行细胞核移植试验并获得成功, 以及将鲫鱼细胞核移入鲤鱼去核卵也能获得成功^[30]。在童第周等人开展的实验中, 以及本课题组近期将转基因鲤鱼细胞核移入金鱼去核卵所获得的属间克隆鱼实验中^[31], 均可以观察到克隆鱼的脊椎骨数目与受体鱼一致, 而不同于供体鱼。这表明, 鱼类卵细胞质不仅能驱动来自于相对远缘物种的供体细胞核的发育, 并且能够在一定程度上影响克隆鱼的发育和性状决定。鱼类的异种核移植甚至在不同科间——如金鱼 (*Carassius auratus*, family Cyprinidae, order Cypriniformes) 和泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*, family Cobitidae, order Cypriniformes) 间, 以及不同目间——如罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*, order Perciformes) 和金鱼间展开^[32,33]。但是, 所有这些科间或目间的细胞核移植均无法获得成功。这不得不重新检视这些已获得成功的鱼类异种克隆, 结果发现, 它们只能在那些原本就能够进行人工杂交的物种间获得成功。同样, 异种克隆的效率依然低下。因此, 很难想象利用异种克隆技术能够将远缘鱼类物种的优良性状导入到经济鱼类品种中, 但其在珍稀或濒危鱼类的保护和育种中有着重要的应用前景。

由于核移植的技术难度较大, 研究者们试图去寻找一种替代方法——细胞融合, 从而可以在一次

实验中获得大量的重构卵。这种方法已经成功的用于获得鲤鱼细胞核与银鲫 (*Carassius auratus*, genus *Carassius*) 卵细胞质的核质杂交鱼^[34]。这种杂交鱼显示出与核供体鲤鱼相似的表型。此外, 另一项有意义的研究利用抗草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 出血病病毒的肝细胞与未受精卵融合来创建品系^[35]。然而, 对该品系的进一步的抗病性分析却未见报道。同核移植相比, 通过细胞融合来获得幼鱼的成功率同样极低, 这在很大程度上限制了该方法在育种研究和品系建立中的应用。

3 转基因育种

随着功能基因组学的飞速发展, 从植物到动物, 从非脊椎动物到脊椎动物, 成千上万种基因的功能获得阐释并表现出物种间的功能保守性。理论上, 通过转基因技术, 可以在最短时间内使得目标鱼类获得某一(些)特定基因所关联的性状, 并且这些性状是稳定和可遗传的。

显微注射是最广为使用的生产转基因鱼的方法^[36]。其他的基因转移方法在鱼类转基因研究中也已被广泛应用, 包括电转法^[37-39]、精子介导法^[40,41]、电脉冲精子介导法^[42,43]、逆转录病毒法^[44-46]和脂质介导法^[47]等。世界上首例转基因鱼在中国诞生——研究者们利用小鼠金属硫蛋白 I 型基因的启动子驱动人生长激素基因对金鱼进行转基因实验^[36]。后来, 生长激素转基因在各种鱼类中被加以广泛研究。例如, 各种生长激素基因被转移到泥鳅^[48]、鲤鱼^[49-53]、大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*)^[54]、鲶鱼 (*Silurus asotus*)^[39]、罗非鱼^[55,56]等经济鱼类中。

除了通过转入生长激素获得更高的生长速率外, 其他的基因也被成功导入到鱼中以期获得抗逆形状。例如, 抗冻蛋白转基因被用来增强鱼类的抗冻能力^[54,57]; 溶菌酶基因被导入到大西洋鲑鱼中以其获得抗病特性^[58,59]; 天蚕 (*Hyalophora cecropia*) 抗菌肽 B 基因转基因鲶鱼表现出一定的抗病特性^[60]; 人乳铁蛋白基因被导入到草鱼用以增强其抗出血病能力^[43]; 透明颤菌血红蛋白基因被用于抗低氧转基因鱼的研究^[61]。

出于对潜在的转基因安全和生物伦理的考虑, 研究者们考虑过表达鱼类自身来源的基因, 而不是外源性的人生长激素基因, 这被称为“全鱼”转基因。

基于该策略, 一种新的“全鱼”生长激素转基因载体被成功设计和应用, 它是由鲤鱼的 β -actin 基因的启动子驱动草鱼生长激素基因表达的^[50,53]; 另外一个例子是用大洋鳕鱼(*Zoarces americanus*)的抗冻蛋白启动子介导大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)生长激素的 cDNA 表达^[54]. 在这 2 例研究中, 转基因鱼均表现出较非转基因鱼显著的生长优势.

除了天然编码基因可用于转基因之外, 在鱼类转基因研究中也提出了更高效的“分子设计”转基因的概念. 在斑马鱼中转入了一种人为改造的激活型的生长激素受体基因, 此基因的表达产物生长激素受体可形成不依赖于生长激素结合的二聚体状态, 从而持续地激活下游的信号通路. 持续激活型生长激素受体转基因鱼表现出较普通生长激素转基因鱼更高的生长速度^[62]. 利用“分子设计”的方法来构建新型高效的目标基因, 将是转基因鱼研究值得重点发展的方向.

“合成生物学”的概念也开始应用于鱼类转基因育种, 其目的是使鱼具有更高的营养价值. 长链多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)对人类健康特别是神经系统的发育和健康具有重要功能^[63], 而其来源极其有限. 研究者将鱼类来源的脂肪酸去饱和酶和延长酶导入斑马鱼受精卵, 用于生产富含 n3 及 n6 长链多不饱和脂肪酸的转基因鱼^[64-66]. 然而, 由于鱼类缺乏将 n6 PUFA 转化为 n3 PUFA 的能力以及从头合成 n6 PUFA 的能力, 这类转基因鱼体内的 n3 和 n6 PUFA 水平依然依赖于饲料中 n3 或者 n6 PUFA 的含量. 本课题组克隆了线虫(*Caenorhabditis elegans*)来源的 Δ 12-去饱和酶基因(*fat1*)和 Δ 15-去饱和酶基因(*fat2*), 并将其进行鱼类密码子优化, 通过以上 2 个基因向鱼类基因组的转移实现了长链多不饱和脂肪酸在鱼类物种中的从头合成. 对于这种转基因鱼, 即便投喂不含 n3 和 n6 PUFA 的饲料, 依然可以在转基因鱼体内检测到高水平的 n6 和 n3 PUFA 含量^[67]. 转基因鱼还可以用于生物反应器的研究. 有研究者利用斑马鱼卵生产如人凝血因子 VII^[68]、黄体素^[69]以及类胰岛素样生长因子^[70]等生物活性物质.

如果希望获得集多种目标性状于一体的转基因鱼, 除了可以结合传统的杂交选育手段外, 也可以利用 2A 短肽技术来实现. 2A 短肽可以用来有效地在同一细胞中表达被 2A 序列分隔的多个基因. 该短肽被证明在包括鱼^[71]、小鼠^[72]、猪^[73]等多个物种中有效.

利用 2A 短肽将可以使转基因鱼同时获得多个有价值的表型, 因而能够大大地缩短多目标性状转基因的育种周期.

经遗传修饰过的动物, 可能存在入侵自然生态的潜在风险, 因此需要开展详尽的生态安全评估研究^[74]. 除了广泛而深入地评价转基因鱼对其他物种的影响外^[75], 一个可行的杜绝潜在生态安全的解决办法是生产不育的转基因鱼^[76,77]. 在以上所有类型转基因鱼中, 有 2 类最接近于上市的品系. 一种是由 AquaBounty 公司生产的转生长激素基因大西洋鲑, 此种转基因鱼已经提交至美国食品和药物管理局等待上市批准(<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/GeneticEngineering/GeneticallyEngineeredAnimals/ucm280853.htm>). 另一种是本课题组获得的三倍体转生长激素基因鲤鱼, 该鲤鱼表型出明显的快速生长优势且完全不育^[76].

4 基因组编辑

近年来, 各种靶向核酸酶介导的基因组编辑技术在斑马鱼等鱼类物种中得到飞速发展, 如锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)^[78]、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)^[79,80]和 CRISPR(clustered regularly interspersed short palindromic repeats)/Cas9^[81-83]技术等. 相对于 ZFNs 和 TALENs 而言, CRISPR/Cas9 系统组分较为简单并可达到相似甚至更高的效率, 因而 CRISPR/Cas9 系统成为发展最快的基因组编辑技术并且广为所用. CRISPR/Cas9 系统利用一个短的通常含有约 20 个碱基靶序列的向导 RNA(gRNA)结合到它的 DNA 互补靶点, 并介导 Cas9 核酸酶到此靶点切断靶序列从而造成双链断裂(double-strand breaks, DSBs). 这些 DSBs 一般通过非同源末端连接方式(nonhomologous end-joining, NHEJ)或者通过同源介导的 DNA 修复机制(homology-directed repair, HDR)进行修复. NHEJ 往往导致突变的产生, 而 HDR 在外源 DNA 修复模板的介导下可以实现精细的基因组编辑^[84]. 目前, 将这一技术成功运用到育种研究的报道仅有少数几例. 凯尔特(Celtic) POLLED 基因位点是无角牛表现出无角性状的等位位点, 研究者们利用 TALEN 介导的精细基因组编辑技术将 POLLED 位点引入到普通有角奶牛基因组中, 意图使普通有角奶牛

获得无角性状^[85]. 在鱼类中, 利用斑马鱼模型开展了针对 GH(growth hormone)信号通路最主要的负调节因子 SOCS(suppressor of cytokine signaling)家族基因 *socs2* 的敲除试验, 结果显示, *socs2* 敲除的斑马鱼表现出 GH 信号通路下游靶基因的激活且在胚胎发育早期表现出一定的快速生长效应^[86].

单链核苷酸被证明是一种有效的介导 HDR 的修复模板, 它通过单链复性(single strand annealing, SSA)的机制来实现 HDR. 通过共注射靶向核酸酶和单链 DNA, 已成功地在斑马鱼和小鼠中导入了单核苷酸的改变^[79,87]. 从科学的角度而言, 这种单核苷酸的改变当然可以等同于在自然界固有存在的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP). 这一方法也能够被用于在特定位点引入诸如 HA(hemagglutinin)标签, *loxP* 位点等短的 DNA 片段^[79,82,88]. 然而, 主要由非特异性 NHEJ 导致的脱靶效应常常发生. 新改进的 Cas9 通过 RuvC 或者 HNH 核酸酶结构域产生点突变, 使其仅能在一条链上产生断裂而不是像普通 Cas9 那样产生双链断裂^[89-91]. 用这种突变的 Cas9 结合一对引导 RNA 能够介导高效的插入或者缺失突变, 与普通 Cas9 相比, 可将非特异性最高降低 1500 倍, 从而大大降低脱靶效应^[92,93].

另外, TALEN 介导的同源重组(homologous recombination, HR)已经在斑马鱼中获得初步的成功^[94]. CRISPR/Cas9 介导的同源重组也在线虫^[95]、果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[96-98]、人类细胞^[99,100]上获得成功. 虽然靶向核酸酶技术已经大大地增加了鱼类胚胎中同源重组的效率, 但是该效率还远达不到满意的程度. 为了提高同源重组的效率, 研究表明, 通过抑制一些参与 NHEJ 基因的功能来抑制其效率, 可以有效的提高同源重组的效率^[101-105]. 很多研

究表明, 同源介导的 DNA 修复常发生在体细胞, 同源重组子代的筛选过程冗长并且耗费人力. 如果生殖细胞特异的同源重组在 F_0 中可以被快速地检测出来, 将大大节省筛选的工作量. 基于 UAS/ Gal4 和 Cre/loxP 系统构建的原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)特异的操作工具将有可能提供上述基于 PGC 检测的快速筛选平台^[106].

基因组编辑技术能够高效地并在相对较短的时间内特异地对多个基因进行精细编辑^[107], 因而它非常有利于对现有的优良品系进行改良. 更重要的是, 利用单链 DNA 退火介导的单碱基替换技术不涉及新 DNA 元件的引入或大片段的缺失, 其最终存在形式可以完全等同于自然界广泛存在的单核苷酸多态性. 因此, 如果将这项技术结合基于 PGC 检测的筛选平台将会使得鱼类和其他动物育种的预见性更强、效率更高.

5 总结

科学技术的发展常常会加速科学研究的进程, 变“不可能”为“可能”. 转基因鱼的商品化虽然遭遇到一定的困难, 但事实表明, 没有一例批准上市的转基因食品出现安全问题. 研究者们需要做的是在转基因食品上市之前做好科学而严谨的评估工作, 而不是盲目地反对转基因食品. 除此之外, 高速发展的基因组编辑技术为鱼类育种研究提供更为宝贵的工具. 把精细基因组编辑技术与传统的鱼类育种技术相结合能够更加高效、更加自如和更具目的地改善某一(或某些)特定性状, 而不去干扰其他任何性状. 由于这一技术不会引入任何的外源基因片段而仅对内源基因组作最为精细的编辑, 这将成为未来鱼类育种技术发展的重要方向.

参考文献

- 1 Cressey D. Aquaculture: future fish. *Nature*, 2009, 458: 398-400
- 2 桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良. *科学通报*, 2012, 57: 1719-1729
- 3 Bakos J, Gorda S. Genetic-improvement of common carp strains using intraspecific hybridization. *Aquaculture*, 1995, 129: 183-186
- 4 Bartley D M, Rana K, Immink A J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev Fish Biol Fisher*, 2000, 10: 325-337
- 5 Wu C J, Ye Y Z, Chen R D. Genome manipulation in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 1986, 54: 57-61
- 6 Zhu Z Y, Sun Y H. Embryonic and genetic manipulation in fish. *Cell Res*, 2000, 10: 17-27
- 7 Sajiro Makino Y O. Formation of the diploid egg nucleus due to suppression of the second maturation division, induced by refrigeration of fertilized eggs of the carp, *Cyprinus carpio*. *Cytologia*, 1943, 13: 55-60

- 8 Nagy A, Rajki K, Horvath L, et al. Investigation on carp, *Cyprinus carpio* L. gynogenesis. J Fish Biol, 1978, 13: 215–224
- 9 Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature, 1981, 291: 293–296
- 10 Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. Aquaculture, 2007, 269: 150–173
- 11 Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Mar Biotechnol, 2009, 11: 243–251
- 12 Chen S L, Ji X S, Shao C W, et al. Induction of mitogynogenetic diploids and identification of ww super-female using sex-specific ssr markers in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Mar Biotechnol, 2012, 14: 120–128
- 13 Wang D, Mao H L, Chen H X, et al. Isolation of Y- and X-linked scar markers in yellow catfish and application in the production of all-male populations. Anim Genet, 2009, 40: 978–981
- 14 Horvath L, Orban L. Genome and gene manipulation in the common carp. Aquaculture, 1995, 129: 157–181
- 15 Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp X common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. Aquaculture, 2001, 192: 171–186
- 16 Guo X H, Liu S J, Liu Y. Evidence for recombination of mitochondrial DNA in triploid crucian carp. Genetics, 2006, 172: 1745–1749
- 17 Liu S J, Qin Q B, Xiao J, et al. The formation of the polyploid hybrids from different subfamily fish crossings and its evolutionary significance. Genetics, 2007, 176: 1023–1034
- 18 Qin Q B, He W G, Liu S J, et al. Analysis of 5s rDNA organization and variation in polyploid hybrids from crosses of different fish subfamilies. J Exp Zool Part B, 2010, 314: 403–411
- 19 Gurdon J B, Wilmut I. Nuclear transfer to eggs and oocytes. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3, doi: 10.1101/cshperspect.a002659
- 20 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997, 385: 810–813
- 21 童第周, 吴尚勳, 叶毓芬, 等. 鱼类细胞核的移植. 科学通报, 1963, 7: 60–61
- 22 陈宏溪, 易咏兰, 陈敏容, 等. 鱼类培养细胞核发育潜能的研究. 水生生物学报, 1986, 10: 1–7
- 23 Chen H, Yi Y, Chen M, et al. Studies on the developmental potentiality of cultured cell nuclei of fish. Int J Biol Sci, 2010, 6: 192–198
- 24 Lee K Y, Huang H, Ju B, et al. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. Nat Biotechnol, 2002, 20: 795–799
- 25 Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. Science, 2009, 326: 430–433
- 26 Tung T C, Tung Y Y F. Nuclear transplantation in teleosts. I. Hybrid fish from the nucleus of carp and the cytoplasm of crucian. Sci Sin B, 1980, 14: 1244–1245
- 27 Moore J A. Serial back-transfers of nuclei in experiments involving two species of frogs. Dev Biol, 1960, 2: 535–550
- 28 Gurdon J B. The transplantation of nuclei between two species of xenopus. Dev Biol, 1962, 5: 68–83
- 29 Sun Y H, Zhu Z Y. Cross-species cloning: influence of cytoplasmic factors on development. J Physiol, 2014, 592: 2375–2379
- 30 Yan S, Lu D, Du M, et al. Hybrid fish from the nucleus of crucian and the cytoplasm of carp. Sci Sin B, 1984, 27: 1029–1034
- 31 Sun Y H, Chen S P, Wang Y P, et al. Cytoplasmic impact on cross-genus cloned fish derived from transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) nuclei and goldfish (*Carassius auratus*) enucleated eggs. Biol Reprod, 2005, 72: 510–515
- 32 Yan S Y, Mao Z R, Yang H Y, et al. Further investigation on nuclear transplantation in different orders of teleost: the combination of the nucleus of tilapia (*Oreochromis nilotica*) and the cytoplasm of loach (*Paramisgurnus dabryanus*). Int J Dev Biol, 1991, 35: 429–435
- 33 Yan S Y, Tu M, Yang H Y, et al. Developmental incompatibility between cell nucleus and cytoplasm as revealed by nuclear transplantation experiments in teleost of different families and orders. Int J Dev Biol, 1990, 34: 255–266
- 34 易咏兰, 刘沛霖, 刘汉勤, 等. 鱼类囊胚细胞和卵的电融合. 水生生物学报, 1988, 12: 189–192
- 35 余来宁, 左文功, 方耀林, 等. 用电融合结合继代移核方法构建草鱼抗病体细胞工程鱼. 水产学报, 1996, 20: 314–318
- 36 Zhu Z Y, Li G H, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L.1758). J Appl Ichthyol, 1985, 1: 31–34
- 37 Inoue K, Yamashita S, Hata J, et al. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. Cell Differ Dev, 1990, 29: 123–128
- 38 Xie Y, Liu D, Zou J, et al. Gene transfer via electroporation in fish. Aquaculture, 1993, 111: 207–213
- 39 Powers D A, Hereford L, Cole T, et al. Electroporation: a method for transferring genes into the gametes of zebrafish (*Brachydanio rerio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), and common carp (*Cyprinus carpio*). Mol Mar Biol Biotechnol, 1992, 1: 301–308
- 40 Khoo H W, Ang L H, Lim H B, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. Aquaculture, 1992, 107: 1–19
- 41 Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V M, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs-genetic-transformation of mice. Cell, 1989, 57: 717–723
- 42 Tsai H J. Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish. Mol Reprod Dev, 2000, 56: 281–284
- 43 Zhong J Y, Wang Y P, Zhu Z Y. Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against gch virus. Aquaculture, 2002, 214: 93–101

- 44 Lin S, Gaiano N, Culp P, et al. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science*, 1994, 265: 666–669
- 45 Lu J K, Burns J C, Chen T T. Pantropic retroviral vector integration, expression, and germline transmission in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1997, 6: 289–295
- 46 Linney E, Hardison N L, Lonze B E, et al. Transgene expression in zebrafish: a comparison of retroviral-vector and DNA-injection approaches. *Dev Biol*, 1999, 213: 207–216
- 47 Lu J K, Fu B H, Wu J L, et al. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar Biotechnol*, 2002, 4: 328–337
- 48 朱作言, 许克圣, 李国华, 等. 人生长激素基因在泥鳅受精卵显微注射转移后的生物学效应. *科学通报*, 1986, 5: 387–389
- 49 Zhang P J, Hayat M, Joyce C, et al. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Mol Reprod Dev*, 1990, 25: 3–13
- 50 Zhu Z, He L, Chen T T. Primary-structural and evolutionary analyses of the growth-hormone gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Eur J Biochem*, 1992, 207: 643–648
- 51 冯浩, 傅永明, 骆剑, 等. 转青鱼生长激素基因异源四倍体鲫鲤. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41: 202–209
- 52 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立. *中国科学 B 辑 (化学 生命科学 地学)*, 1989, 2: 147–155
- 53 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. *科学通报*, 2001, 46: 226–229
- 54 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. *Biotechnology*, 1992, 10: 176–181
- 55 Rahman M A, Mak R, Ayad H, et al. Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Res*, 1998, 7: 357–369
- 56 Martinez R, Estrada M P, Berlanga J, et al. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1996, 5: 62–70
- 57 Wang R, Zhang P, Gong Z, et al. Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995, 4: 20–26
- 58 Fletcher G L, Hobbs R S, Evans R P, et al. Lysozyme transgenic atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Res*, 2011, 42: 427–440
- 59 Hew C L, Fletcher G L, Davies P L. Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *J Fish Bio*, 1995, 47: 1–19
- 60 Dunham R A, Warr G W, Nichols A, et al. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. *Mar Biotechnol*, 2002, 4: 338–344
- 61 Guan B, Ma H, Wang Y, et al. Vitreoscilla hemoglobin (vhb) overexpression increases hypoxia tolerance in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar Biotechnol*, 2011, 13: 336–344
- 62 Ishtiaq Ahmed A S, Xiong F, Pang S C, et al. Activation of GH signaling and GH-independent stimulation of growth in zebrafish by introduction of a constitutively activated GHR construct. *Transgenic Res*, 2011, 20: 557–567
- 63 Marszalek J R, Lodish H F. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 633–657
- 64 Alimuddin, Yoshizaki G, Kiron V, et al. Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon delta6-desaturase-like gene in zebrafish. *Transgenic Res*, 2005, 14: 159–165
- 65 Alimuddin, Yoshizaki G, Kiron V, et al. Expression of masu salmon delta5-desaturase-like gene elevated EPA and DHA biosynthesis in zebrafish. *Mar Biotechnol*, 2007, 9: 92–100
- 66 Alimuddin, Kiron V, Satoh S, et al. Cloning and over-expression of a masu salmon (*Oncorhynchus masou*) fatty acid elongase-like gene in zebrafish. *Aquaculture*, 2008, 282: 13–18
- 67 Pang S C, Wang H P, Li K Y, et al. Double transgenesis of humanized *fat1* and *fat2* genes promotes omega-3 polyunsaturated fatty acids synthesis in a zebrafish model. *Mar Biotechnol*, 2014, 16: 580–593
- 68 Hwang G L, Muller F, Rahman M A, et al. Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Mar Biotechnol*, 2004, 6: 485–492
- 69 Morita T, Yoshizaki G, Kobayashi M, et al. Fish eggs as bioreactors: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transgenic Res*, 2004, 13: 551–557
- 70 Hu S Y, Liao C H, Lin Y P, et al. Zebrafish eggs used as bioreactors for the production of bioactive tilapia insulin-like growth factors. *Transgenic Res*, 2011, 20: 73–83
- 71 Provost E, Rhee J, Leach S D. Viral 2A peptides allow expression of multiple proteins from a single ORF in transgenic zebrafish embryos. *Genesis*, 2007, 45: 625–629
- 72 Trichas G, Begbie J, Srinivas S. Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol*, 2008, 6: 40

- 73 Deng W, Yang D, Zhao B, et al. Use of the 2A peptide for generation of multi-transgenic pigs through a single round of nuclear transfer. *PLoS One*, 2011, 6: e19986
- 74 Devlin R H, Sundstrom L F, Muir W M. Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends Biotechnol*, 2006, 24: 89–97
- 75 Sundstrom L F, Vandersteen W E, Lohmus M, et al. Growth-enhanced coho salmon invading other salmon species populations: effects on early survival and growth. *J Appl Ecol*, 2014, 51: 82–89
- 76 于凡, 肖俊, 梁向阳, 等. 转生长激素基因三倍体鲤鱼的快速生长与不育特性. *科学通报*, 2010, 55: 1987–1992
- 77 胡炜, 汪亚平, 朱作言. 转基因鱼生态风险评价及其对策研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2007, 37: 377–381
- 78 McCammon J M, Amacher S L. Using zinc finger nucleases for efficient and heritable gene disruption in zebrafish. *Methods Mol Biol*, 2010, 649: 281–298
- 79 Bedell V M, Wang Y, Campbell J M, et al. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 2012, 491: 114–118
- 80 Huang P, Xiao A, Zhou M, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 699–700
- 81 Hwang W Y, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 227–229
- 82 Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23: 465–472
- 83 Zhang L L, Zhou Q. CRISPR/Cas technology: a revolutionary approach for genome engineering. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 639–640
- 84 Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278
- 85 Tan W, Carlson D F, Lancto C A, et al. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 16526–16531
- 86 王华林, 朱作言, 孙永华. 斑马鱼 *socs2* 的 TALEN 敲除及其敲除胚胎的生长研究. *水生生物学报*, 2014, 已接受
- 87 Xiao A, Wang Z, Hu Y, et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e141
- 88 Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*, 2013, 140: 4982–4987
- 89 Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 9275–9282
- 90 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E2579–E2586
- 91 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 92 Mali P, Aach J, Stranges P B, et al. Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 833–838
- 93 Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154: 1380–1389
- 94 Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*, 2013, 10: 329–331
- 95 Dickinson D J, Ward J D, Reiner D J, et al. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods*, 2013, 10: 1028–1034
- 96 Bassett A R, Tibbit C, Ponting C P, et al. Mutagenesis and homologous recombination in drosophila cell lines using CRISPR/Cas9. *Biol Open*, 2014, 3: 42–49
- 97 Yu Z, Chen H, Liu J, et al. Various applications of TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to modify the drosophila genome. *Biol Open*, 2014, 3: 271–280
- 98 Bottcher R, Hollmann M, Merk K, et al. Efficient chromosomal gene modification with CRISPR/Cas9 and PCR-based homologous recombination donors in cultured *Drosophila* cells. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: e89
- 99 Rong Z, Zhu S, Xu Y, et al. Homologous recombination in human embryonic stem cells using CRISPR/Cas9 nickase and a long DNA donor template. *Protein Cell*, 2014, 5: 258–260
- 100 Xue H, Wu J, Li S, et al. Genetic modification in human pluripotent stem cells by homologous recombination and CRISPR/Cas9 system. *Methods Mol Biol*, 2014, PMID: 24615461
- 101 Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, et al. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 12248–12253
- 102 Verbeke J, Beopoulos A, Nicaud J M. Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in *Ku70* deficient *yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnol Lett*, 2013, 35: 571–576

- 103 Kretschmar A, Otto C, Holz M, et al. Increased homologous integration frequency in *Yarrowia lipolytica* strains defective in non-homologous end-joining. *Curr Genet*, 2013, 59: 63–72
- 104 Nishizawa-Yokoi A, Nonaka S, Saika H, et al. Suppression of Ku70/80 or lig4 leads to decreased stable transformation and enhanced homologous recombination in rice. *New Phytol*, 2012, 196: 1048–1059
- 105 Wei Z Q, Xiong F, He M D, et al. Suppression of ligase 4 or XRCC6 activities enhances the DNA homologous recombination efficiency in zebrafish primordial germ cells. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, in press
- 106 Xiong F, Wei Z Q, Zhu Z Y, et al. Targeted expression in zebrafish primordial germ cells by Cre/loxP and Gal4/UAS systems. *Mar Biotechnol*, 2013, 15: 526–539
- 107 Wang H, Yang H, Shivalila C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153: 910–918