

综 述

鱼类低温适应机制及抗寒育种

THE MECHANISMS OF COLD ACCLIMATIZATION AND COLD-TOLERANCE BREEDING IN FISH

邹曙明 楼允东

(上海水产大学渔业学院, 200090)

ZOU Shu-Ming, LOU Yun-Dong

(Fisheries College, SFU 200090)

沈俊宝 孙孝文

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

SHEN Jun-Bao, SUN Xiao-Wen

(Heilongjiang Fishery Research Institute, CAFS, Harbin 150070)

关键词 鱼类, 低温适应机制, 抗寒育种

KEYWORDS fish, mechanism of cold acclimatization, cold-tolerance breeding

中图分类号 Q953.3

鲮(*Cirrhinus molitorella*)、罗非鱼(*Tilapias*)及其它一些喜温性优良养殖鱼类不耐低温问题一直是国内外遗传学和分子生物学研究的重点。鲮在10~7.0℃就开始死亡,以至只能在广东和广西养殖;而罗非鱼在我国广大地区不能自然越冬,每年需花费大量的资金和人力来解决越冬问题。因此,广泛深入研究鱼类的抗寒机理,克隆出与鱼类抗寒性状相连锁的结构基因及调节基因,利用现代分子生物学手段与传统的杂交育种相结合,获得上述鱼类的抗寒品系,将是水产养殖业的一次重大突破,并会给养殖业带来巨大的经济效益。本文从极区及北方海域鱼类抗冻蛋白及其基因分子生物学、低温对鱼类中枢神经系统及新陈代谢的影响、细胞膜的结构、组成与鱼类抗寒的关系等方面阐述并分析了鱼类抗低温的可能适应机制。表明鱼类为了耐受低温从神经系统AChE活力的变化到同工酶的多型性、从抗冻蛋白类的适时转录和翻译到代谢途径的转换等都发生着深刻的变化,指出极区及北方海域鱼类的抗冻与淡水鱼类的抗

寒从本质上都是对低温环境适应的结果。

1 极区及北方海域鱼类抗冻蛋白及其基因

极区及北方海域海水真骨鱼类能产生抗冻蛋白(Antifreeze protein),以免水温在摄氏零度之下鱼体内结冰。Scholander等[1957]发现北极鱼的血清冰点为 -1.4°C ,从而推测鱼血清中可能存在一种能降低血清冰点的物质。DaVries[1971]和Yang等[1988]从南极鱼属(*Notothenia*)血液中发现一种能使血清冰点降低的糖蛋白。海水真骨鱼类产生抗冻物质的量相当大,冬季血清浓度达 10mg/mL [Scott 1988]。目前,对抗冻蛋白的结构、功能、特性等都有了较深入的了解[Davies和Hew 1990, Goldstein等 1990, Hew等 1988]。现在已知有两类抗冻蛋白质:抗冻糖蛋白(Antifreeze glycoprotein, AFGP)及抗冻蛋白(Antifreeze protein, AFP)。

1.1 抗冻糖蛋白(AFGP)

分子量相对较高, $2.5\sim 33\text{Kda}$,它们由三肽重复组成 $(\text{Ala-Ala-Thr})_n$,由N-乙酰半乳糖胺和半乳糖通过羟基原子与Thr残基相连[Hisao 1990]。抗冻糖蛋白是一类高效的抗冻糖蛋白,它们降低溶液冰点的效率比相同克分子浓度的氯化钠要高出200到500倍,为肌红蛋白的200到300倍[Scott等 1986]。因此,生活在极区及北方海域的鱼类能顺利越冬而不被冻死。例如,南极鱼科(*Notothenidae*)的鱼类和纽芬兰地区的大西洋鳕(*Gadus morhua*)的血液中都有高浓度的抗冻糖蛋白存在。

1.2 抗冻蛋白(AFP)

1.2.1 抗冻蛋白 I (AFP I)

AFP I是在美洲黄盖鲈(*Pseudopleuronectes americanus*)和床杜父鱼(*Myoxocephalus scorpius*)冬季血清中分离并鉴定的,分子量为 $3.3\sim 4.5\text{KDa}$,富含Ala,它随着季节含量发生变化,冬季可达 10mg/mL [Hew等 1984]。AFP I是一条11个氨基酸串联重复三次的 α -螺旋 $(\text{Thr})(\text{Ala})_2\text{Asp/Asn}(\text{Ala})_7$ [Hew等 1985]。美洲黄盖鲈AFP基因长1Kb,从核苷酸第50至第295位,编码一种82个残基的前抗冻蛋白原。间插序列600bp,将靠近编码“蛋白原”部分的DNA和编码信号肽的DNA间的接头基因间断,该基因上游31bp是“TATA”盒信号TATAAA,再上游51bp是启动转录序列CAAT[Chan 1993]。美洲黄盖鲈3个染色体区段是非重叠的,每个区段含有2个相距 $3\sim 7\text{Kb}$ 的AFP基因[Davies和Hew 1984]。这6个非等位基因仅为这个大的基因家族全体的 $10\%\sim 20\%$ 。美洲黄盖鲈基因组含有 $30\sim 40$ 个AFP基因,这些成簇的AFP基因元件本身是相互紧密连锁的,全部AFP基因以整体位于一个单座位上。

1.2.2 抗冻蛋白 II (AFP II)

AFP II分子量为 14KDa ,是富含Cys的大分子蛋白质,它首先在美洲绒杜父鱼的冬季血清中被发现,也随着季节而变化,它的基因有40多个拷贝[Hew等 1986]。

1.2.3 抗冻蛋白 III (AFP III)

AFP III分子量为 $6\sim 7\text{KDa}$,它与AFP I和AFP II在氨基酸组成上有巨大的差别,不富含Ala也不富含Cys,首先是从美洲大绵鲈(*Macrozoarces americanus*)冬季血清中分离发现的,美洲大绵鲈AFP在过离子交换树脂柱和高效液相色谱分析时出现多个峰,表明AFP III由多

个亚基组成。美洲大绵鳊基因组有150个长0.7kb的AFP基因,其中大多数紧密连锁但间隔不规则[Scott等1985,Scott1988],而同种的抗冻水平较低的生活在相对温度较高海域的新布鲁斯威克(New Brunswick)种群只含有纽芬兰地区的20%的AFP基因[Hew等1988]。纽芬兰美洲大绵鳊与新布鲁斯威克种群在AFP III基因剂量上的差异,导致了在分泌上的差别,从而与在冰下的海水中的生活能力相关。

大多数海洋硬骨鱼的血清冰点为 -0.5°C 到 -0.8°C 。但是,极区及北方海域海水温度却可以低至 -1.4°C 到 -2°C ,如果没有上述的适应机制,生活在那里是不可能的。然而,生活在淡水中的鱼类,即使在水面冰封以后,冰下水温依然保持在 0°C 至 4°C 。因此生活在淡水中的鱼类不必产生抗冻蛋白或抗冻糖肽来降低冰点。事实上至今也未发现有产生抗冻蛋白的淡水种类。费云标等[1992]发现淡水的瓦氏雅罗鱼基因内含有与美洲黄盖鲈同源的AFP基因,但没有发现抗冻蛋白的产生。淡水瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)属于北方平原复合体,很可能是起源于北极海域,在向北方淡水转移过程中,由于环境温度的压力,使得该鱼抗冻基因严重退化而不能表达。但由于DNA分子的保守性使得抗冻蛋白基因仍存留在该鱼的基因组内。因此,深入该基因的研究为进一步阐明鱼类起源、进化及分类有重要意义。

2 鱼类细胞膜的脂组成、结构与淡水鱼类抗寒的关系

细胞膜主要由脂类、蛋白质和一些碳水化合物组成。因此,膜的结构、功能和性质也决定于这些组份的种类、结构及相互间的作用。细胞膜的流动性主要取决于膜的脂类分子,同时也受膜蛋白和离子浓度等因素的影响。构成膜的脂类主要是磷脂和糖脂,以及少量的硫脂和中性脂如胆固醇等。根据Lyons等[1970]“膜脂相变”学说,低温伤害首先是改变了细胞膜的膜相,膜脂从液晶相变为凝胶相,膜脂的脂肪酸链由无序排列到有序排列,膜上出现孔道或裂缝,使膜的透性增大,膜内可溶性物质如电解质等大量向膜外渗漏,破坏了细胞内外的离子平衡,同时膜结合酶的活化能增高,酶促反应速度失去平衡,代谢紊乱,有害物质(如自由基等)积累。当冷害达到膜脂发生降解时,则导致细胞死亡。Lyons等[1970]指出,在低温下生物膜能否保持适当的膜流动性与农作物耐寒性之间可能有一定的相关性;耐寒的植物中含不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比率较高,而不耐寒的植物中的比率则较低。最近几年,对低温调节代谢基因表达的研究更是在分子水平上证明了膜脂不饱和脂肪酸在植物进入抗寒状态中的重要性。耐寒的蓝藻从 36°C 转到 22°C 继续培养时,一种催化油酸到亚油酸反应($18:1^{\Delta 9} \rightarrow 18:2^{\Delta 9,12}$)的酶基因*desA*表达增强[Los1993]。在高等植物中已发现了低温专一诱导表达的 $\omega-3$ 脂肪酸去饱和酶基因*fad8*[Gibson1994]。在鱼类研究方面,Farkas的实验证实,鱼的脂肪酸代谢对体温降低的适应很敏感,这种脂质代谢变化的结果使得磷脂中链不饱和脂肪酸(特别是DHA)的积累,由于长链不饱和脂肪酸主要影响膜的流动性,可以认为这种反映是膜流动性对于温度适应的表现,Watanate等确定鲤的必需脂肪酸为 $18:2\omega 6$ 和 $18:3\omega 3$ (童圣英1995)。邓会山和桂远明[1995]比较了草鱼、鲢、建鲤及尼罗罗非鱼在不同温度时红细胞的流动性,发现各种鱼的红细胞膜流动性均随温度的下降而降低;在低温时黑龙江野鲤的红细胞膜流动性显著地高于建鲤。

(1)童圣英. 1995. 几种养殖鱼类越冬生理生化指标的变化 V——脂肪酸组成. 北方越冬鱼类死亡原因及提高成活率的研究, 109~124.

童圣英(1995)报导了几种鱼类在越冬期间不饱和脂肪酸含量上升。沈俊宝和刘明华[1988]用抗寒性强的黑龙江野鲤与荷包红鲤杂交选育出荷包红鲤抗寒品系,并发现抗寒子代的膜不饱和性和性介于两亲本之间,证实抗寒力是物质性的、可遗传的;随后梁利群等[1996]发现了三条与抗寒性状紧密连锁的 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)扩增带,说明在黑龙江野鲤基因组内可能存在与细胞膜不饱和性相关的基因。

3 低温对淡水鱼类中枢神经系统及新陈代谢的影响

3.1 低温对鱼类中枢神经系统的影响

温度对生物体的作用可能首先影响中枢神经系统。许多研究表明,温度的变化将影响 AchE 的活性。喜冷性南极鱼(*Trematous orchgrevinki*)的脑 AchE 与底物的亲和力在低温区内(0℃左右)最大,当温度高于0℃以上时,脑 AchE 活力下降,7℃时 AchE 则失活而导致死亡。热带鱼的脑 AchE 比“喜冷”鱼的脑 AchE 对热具有较大的稳定性和对冷的不稳定性。王祖熊等[1984]报道7℃以下鲮的脑 AchE 抑制到大约为55%时,鱼就接近死亡。桂远明(1995)发现在越冬期间鱼脑 AchE 活性也随水温下降而降低,脑 AchE 抑制到大约46%以上时也出现休克现象。Baldwin 和 Hochachka[1970]在研究虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的脑 AchE 对温度的适应性时注意到其 AchE 可能有两种存在形式,长期生活在17℃水温中,出现这种酶的“温暖”变异体,而生活于2℃水温中则出现这种酶的“寒冷”变异体,在较适温度(12℃)水中生活,可能两种形式同时存在,这说明:虹鳟的脑 AchE 变异体的 K_m 值是由环境温度决定的。广温性鱼类鲮(*Mugil cephalus*)中,AchE 也是以改变其 K_m 值来适应温度的变化,这类酶蛋白分子的构型在不同温度条件下是可变的,对温度的适应也就较广。由于遗传性能不同,鱼脑 AchE 的 K_m 值的适应温度范围也不相同,这就导致不同种类鱼 AchE 活性受温度影响的程度各不相同,有的随温度变化其活性变化甚微,有的变化则较大。

3.2 低温对鱼类新陈代谢的影响

根据“代谢反应一般为酶促反应”的原理,鱼类对环境温度的适应与其机体内酶系统的功能活动有关。Brown[1960]在研究葡萄糖代谢时发现,鲤同时开放两条代谢途径,他认为适应性可能包含着葡萄糖降解途径的转换。在温度下降至鱼冷休克期间 LDH 同工酶活性升高,特别是肝 LDH 同工酶活性都升高(桂远明 1995)。近几年来在鱼类适应环境温度过程中同工酶表达方式的研究已有不少报道,都证明存在着由温度所诱导的特殊同工酶产生。同时研究结果还表明,鱼类种群中蛋白质多态性的表达可能是鱼类低温适应的遗传基础。

综上所述,极地及北方海域真骨鱼类能产生抗冻蛋白用于降低血清冰点,而生活在北方淡水里的鱼类由于冰下水温一般不低于0℃而未发现有产生诱导抗冻蛋白的现象。极地及北方海域真骨鱼类与北方抗寒鱼类一样鳃膜和红细胞膜的不饱和脂肪酸的比例高于喜温性鱼类,不饱和脂肪酸的比例高,致使膜流动性增强而加大了鳃膜及红细胞膜对氧的透性;其次细胞膜的

(2)桂远明, 1995. 几种养殖鱼类越冬生理生化指标的变化 I ——脑 AchE、LDH 同工酶、EST 同工酶. 北方越冬鱼类死亡原因及提高成活率的研究, 83~92.

流动性加大增强了有机体对冻伤的抵抗能力。鱼类对低温环境的适应性反应是复杂的。从神经系统脑 AchE 活力的变化到同工酶的多型性,从抗冻蛋白类的适时转录和翻译到代谢途径的转换等都发生着深刻的变化,正如 Moon[1975]指出,在面对温度条件变动的情况下,变温动物机体内维持酶的异质性,例如在鲑鳟鱼类那样是增加可塑性和低温适应能力的保证。Place 和 Powers[1979]以及 Beneden 等[1981]对大西洋北美洲沿岸的底鳉(*Fundulus heteroclitus*)种群的8种多态性酶类基因频率的空间变异性研究结果,说明了这8种酶基因频率的纬度变异性是显著的,并支持这类遗传变异性是由温度选择所决定的学说。由极北方迁移到黑龙江的乌苏里白鲑(*Coregonus ussuriensis*)和江鳕(*Lota lota*)冬季摄食最盛,夏季无论白鲑和江鳕都几乎完全停食;而在北极水域夏季温度也很低,生活在北极水域的白鲑类则与黑龙江所在的种类不同,夏季虽然营养也降低,但仍然摄食相当强烈[高 岫 1960年中译本]。北极水域和黑龙江的白鲑类夏季在营养上的这种差异,可能是由于白鲑类为了进行强烈的新陈代谢,要求水中氧气高度地饱和。而且只有在低温下才能保证强烈的摄食和吸收。这也从一方面反映了鱼类对环境的适应。

4 抗寒育种研究

4.1 通过杂交与选育提高鱼类的低温适应能力

杂交和选育是提高鱼类低温适应能力的有效途径。Кирпичников[1944, 1949]认为黑龙江野鲤(*C. carpio haenaloferus*)在其越冬能力方面在不同种的野鲤和家鲤各品种中占第一位。因此,可以通过与黑龙江野鲤杂交来提高一些不耐寒品种的越冬能力。沈俊宝和刘明华[1988]用抗寒的黑龙江野鲤与荷包红鲤进行种内不同种群之间的杂交和回交,得到了一个生长快,且抗寒的杂交组合,并选育出能稳定遗传的抗寒新品系;表明在获得了野鲤的许多性状后抗寒新品系从神经系统脑 AchE 活力的变化到同工酶的多型性及细胞膜的流动性等方面都使得杂交后代更能适应北方高寒气候。王祖熊和黄文郁[1985]以及吴力钊和王祖熊[1993]用瓦氏雅罗鱼、草鱼等抗寒及广温性鱼类精子混合授精,尽管该方法未能从根本上解决鲢的不耐寒问题,但是得到的混精鲢耐寒能力比对照组的确有明显的提高。总的来讲,用杂交选育的方法提高鲤、鲢耐低温能力已取得一定的进展,尤其鲤获得了抗寒品系。但大多数的喜温性鱼类(如鲢)种群生态范围狭小且属内往往只有一个种,而用远缘杂交又往往会造成杂交子代胚胎发育不正常,特别是两亲本之间的远缘关系超过亚科间距离的种类,绝大部分胚胎都在出膜前后出现畸形而夭亡[楼允东和李元善 1989]。

4.2 抗寒相关基因导入提高鱼类抗寒能力

基因导入的方法突破了传统杂交选育方法所遇到的各种杂交不亲合性障碍,在提高动植物抗寒能力方面有着巨大的应用前景。最近几年来,先后将抗冻蛋白基因导入郁金香、烟草、玉米[Georges 等 1990]、果蝇、瓜蛙卵,并且都在受体细胞、胚胎、甚至个体中得以表达;Huang [1987]用一种药物筛选性载体 PRSVgpt,采用磷酸钙沉淀法、DEAE 葡聚糖法和电击法等技术,将克隆的美洲黄盖鲈 AFP 基因导入虹鳟及鲑鱼的细胞系中,他们观察到了细胞中 AFP DNA 的存在,并根据 AFP mRNA 合成检测到了该基因的表达。Fletcher 等[1988]将美洲黄

盖鳕 AFP 基因的亚克隆 2A-7 线性 DNA 在受精后三小时内通过受精孔注射入鲑鱼卵中,八个月后,12克重的幼鱼个体用 Southern 印迹杂交分析,结果 6.6% 的幼鱼 DNA 能与美洲黄盖鳕 AFP 基因探针杂交。Hew 等[1990]、Hew 和 Yan[1992]等人也曾将 AFP 基因导入大西洋鲑中。转基因的方法预示着解决鱼类抗寒问题的美好前景,但仍有许多问题亟待解决。首先,虽然近年来这些学者已有初步证据表明美洲黄盖鳕 AFP 基因可在大肠杆菌[蒋耀青和陈雄风 1990]和转基因鱼中表达,但是其表达水平还很低,尚未达到功能性抗冻所需要的浓度。所以仍需要完善转基因系统,建立大量处理受精卵,控制定点整合及高效表达等一系列模型。其次,要克隆与抗寒性状相关的各种结构及调节基因,为转基因提供物质保障。目前,用于转基因的 DNA 几乎都是美洲黄盖鳕 AFP 基因,然而从最近的研究表明,抗寒因子是多基因控制的数量遗传,这种单一美洲黄盖鳕 AFP 基因的导入即使能大量表达也不大可能改变鱼类的不耐寒问题;因为即使在冰下,水温也不可能低于零度,所以淡水鱼类不必象极区及北方海域海水真骨鱼类那样分泌一定量的抗冻蛋白来降低血清的冰点。显然,寻找出更多的抗寒相关因子及其基因(如一些能增强膜流动性、增强神经系统抗低温能力及一些低温特异性代谢酶类)对通过基因转移技术定向改变鱼类不耐寒问题将起决定性作用。

参 考 文 献

- 王祖熊,张锦霞,黄文郁. 1984. 鲑鱼遗传改良的研究 I. 杂交育种和遗传下性状分析. 水生生物学集刊, 8(2):195~204.
- 王祖熊,黄文郁. 1985. 鲑鱼混精授精的育种试验. 水产学报, 9(2):203~206.
- 邓会山,桂远明. 1993. 鱼血红细胞膜流动性的研究. 大连水产学院学报, 8(1):9~13.
- 沈俊宝,刘明华. 1988. 荷包红鲤抗寒品系的筛选和培育. 淡水渔业, 3:14~17.
- 关力钊,王祖熊. 1993. 鲑鱼和二代混精鲑鱼低温耐受能力的差异. 水生生物学报, 17(3):205~210.
- 费云标,黄涛,于建康等. 1992. 淡水瓦氏雅罗鱼基因文库的构建和抗冻蛋白基因同源序列的筛选. 生物工程学报, 8(2):192~196.
- 高岫(译). 1960. 黑龙江流域鱼类. 北京:科学出版社. 429~431.
- 梁利群,孙孝文,沈俊宝. 1996. 鱼类抗寒性状的 RAPD 分析. 农业基础与高科技研究进展, (1):48~50.
- 蒋耀青,陈雄风. 1990. 鱼类抗冻蛋白的研究:黄盖鳕抗冻蛋白基因 cDNA 的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 遗传学报, 17:202~210.
- 楼允东,李元善. 1989. 鱼类育种学. 上海:百家出版社. 43~69.
- Baldwin J, Hochachka P W. 1970. Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatization-acetylcholinesterase from trout brain. Bioch J, 116:883~887.
- Beneden R, Cashion R E, Powers D A. 1981. Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* (L). II. Inheritance of isocitrate dehydrogenase (Idh-A and Idh-B), 6 phosphogluconate dehydrogenase (6 Pgdh-A) and serum esterase (Est-S) polymorphisms. Biochem Genet, 19(7/8):701~714.
- Brown W D. 1960. Glucose metabolism in carp. J Cellular Comp Physiol, 55:81~85.
- Chan S L. 1993. Control of antifreeze protein gene expression in winter flounder. In: Hochachka P W, Mommsen T P (eds.). Molecular Biology Frontiers: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 2, Amsterdam: Elsevier Press, 293~295.
- Davies P L, Hew C L. 1984. Antifreeze protein genes of the winter flounder. J Biol Chem, 259(14):9241~9247.
- Davies P L, Hew C L. 1990. Biochemistry of fish antifreeze proteins. Invited review. FASEB J, (4):2460~2468.
- DaVries A L. 1971. Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fishes. Science, 172:1152~1155.
- Fletcher G L, Shears M A, King M J. 1988. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can J Fish Aquat Sci, 45:352~357.
- Georges F, Mohammed S, Adrian J C. 1990. Design and cloning of a synthetic gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells. Gene, 91:159~165.

- Gibson S. 1994. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a Chloroplast ω -3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 106: 1615~1621.
- Goldstein J, Pollitt N S, Inouy M, et al. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 283~287.
- Hew C L, Slaughter D, Joshi S B. 1984. Antifreeze polypeptides from Newfoundland ocean pout (*Macrozoarces americanus*) presence of multiple and compositionally diverse components. *J Comp Physiol Biochem Sys Environ Physiol*, 155:81~88.
- Hew C L, Joshi S, Wang N C. 1985. Structures of shorthorn sculpin antifreeze polypeptides. *Eur J Bio Chem*, 151:167~172.
- Hew C L, Wang N C, Yan S X. 1986. Biosynthesis of antifreeze polypeptides in the winter flounder; characterization and seasonal occurrence of precursor polypeptides. *Eur J Bio Chem*, 263:12049~12055.
- Hew C L, Wang N C, Joshi S. 1988. Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in the ocean pout, *Macrozoarces americanus*. *J Biol Chem*, 263(24):12049~12055.
- Hew C L, Yan D S C. 1992. Protein interaction with ice. Invited review. *Eur J Biochem*, 203:33~42.
- Hew C L, Davies P L, Fletcher G L. 1990. Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Mol Mar Biol Biotech*, 1: 309~317.
- Hisao K C. 1990. An antifreeze glycopeptide gene from the antarctic cod *Notothenia coriiceps* neglect encodes a polyprotein of high peptide copy number. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:9265~9269.
- Huang R C. 1987. Winter flounder antifreeze protein genes; Demonstration of a cold-inducible promoter and gene transfer to other species. *Fed Proc*, 46:2238.
- Lyons J M, Granham D, Raison J K. 1970. Low temperature stress in corp plants; The role of the membrane (Eds Lyons J M, et al.). *New York: Academic Press*, 33~56.
- Los D. 1993. The temperature (dependent expression of the desaturase gene *des A* in *Synechocystis* PCC 6803. *FWBS*, 31 (1):57~60.
- Moon T W. 1975. Temperature adaptation; Isozymic function and the maintenance of heterogeneity. In: Markert C L (eds). *Isozyme H. Physiol Funct.* Academic Press. New York. 207~220.
- Place A R, Powers D A. 1979. Genetic variation and relative catalytic efficiencies; Lactate dehydrogenase B allozymes of *Fundulus heteroclitus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(5):2354~2358.
- Scholander P F, Van Dam L, Kanwisher J W, et al. 1957. Supercooling and osmoregulation in arctic fish. *J Cell Comp Physiol*, 49:5~24.
- Scott G K, Hew C L, Davies P L. 1985. Antifreeze protein genes are tandemly linked and clustered in the genome of the winter flounder. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:2613~2617.
- Scott G K, Fletcher G L, Davies P L. 1986. Fish antifreeze protein; Recent gene evolution. *Can J Fish Aquat Sci*, 43:1028~1034.
- Scott G K. 1988. **Wolfish antifreeze** protein genes are primarily organized as tandem repeats that each contain two genes in inverted orientation. *Mol Cell Biol*, 8(9):3670~3675.
- Yang D S C, Sax M, Chakrabarty A, et al. 1988. Crystal structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implications. *Nature*, 333(19):232~237.
- Кирпичников В С. 1944. Зимостойкость амурского о саана в условиях центральной полосы европейской части СССР. *Д АН СССР*, 43: 1
- Кирпичников В С. 1949. Амурский саанна севере СССР. *Рыбн. хоз-во*, 8~9.