

## APLIKASI TRANSFER GEN DALAM AKUAKULTUR

### Application of Gene Transfer in Aquaculture

Alimuddin<sup>1)</sup>, G. Yoshizaki<sup>1)</sup>, O. Carman<sup>2)</sup> dan K. Sumantadinata<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory of Aquaculture, Departement of Aquatic Bioscience, Tokyo University of Fisheries,  
4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

<sup>2)</sup>Laboratory of Fish Breeding and Genetic, Departement of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine Sciences,  
Bogor Agricultural University, Bogor 16680, Indonesia

#### ABSTRACT

Recently, global food security has become a hot issue by the public in national as well as out of the country. Aquacultural output will need to be increased several fold in order to meet the rising demands for fish in coming years as the increasing of mankind population. The intensity and capacity of production is expected to increase using biotechnology approach. One of the advances biotechnologies that expected to be a powerful approach for aquaculture development is transgenic technique. This technique has been applied to several commercially valuable species. This review describes various techniques of gene transfer, persistence and expression of transferred gene, application and future aspect of gene transfer research in aquaculture.

Key words: Gene transfer, gene expression, biotechnology, aquaculture

#### ABSTRAK

Saat ini, keamanan pangan telah menjadi isu hangat di masyarakat baik di dalam maupun di luar negeri. Produksi akuakultur diharapkan dapat ditingkatkan beberapa kali lipat untuk memenuhi kebutuhan pangan berupa ikan dimasa-masa mendatang akibat peningkatan populasi manusia. Intensitas dan kapasitas produksi diharapkan meningkat dengan menggunakan pendekatan bioteknologi. Salah satu teknik modern yang diduga akan menjadi sarana yang berguna dalam pengembangan akuakultur adalah teknologi transfer gen. Teknik ini telah diaplikasikan pada spesies-spesies yang memiliki nilai ekonomis. Ulasan ini menggambarkan variasi metode transfer gen, persistensi dan ekspresi dari gen yang ditransfer, aplikasi dan prospeknya ke depan dari penelitian transfer gen dalam akuakultur.

Kata kunci : transfer gen, ekspresi gen, bioteknologi, akuakultur

#### PENDAHULUAN

Keamanan pangan telah menjadi isu utama saat ini baik di dalam maupun di luar negeri. Dengan perkiraan jumlah populasi dunia mencapai 11 milyar pada tahun 2050, sektor pertanian (termasuk perikanan) ditantang untuk bisa melipatgandakan produksi pangan di tahun 2025 dan tiga kali lipat di tahun 2050, dengan kondisi lahan dan air per kapita berkurang dan tantangan kondisi lingkungan meningkat. Peningkatan produksi perikanan, dalam hal ini seafood, diperlukan sekitar 7 kali lipat di tahun 2020 (Hew & Fletcher 1997). Produksi pertanian yang berbasis lahan, dalam arti luasan dan output per hektar, telah mencapai titik maksimum dengan melakukan pemupukan dan selektif breeding. Hal tersebut diperburuk oleh bertambah jeleknya kualitas tanah, air dan udara, yang disebabkan oleh perubahan iklim global, penggundulan lahan, polusi, dan industrialisasi (Hew & Fletcher 2001).

Perkembangan ilmu biologi molekuler akhir-akhir ini telah memungkinkan dengan mudah membuat klon suatu gen yang diinginkan. Pada tahun 1980, Gordon *et al.* (1980) melaporkan keberhasilan memindahkan gen ke tikus dengan cara menyuntikkannya ke dalam pronukleus telur yang sudah dibuahi. Tikus tersebut selanjutnya dinamakan 'tikus transgenik'. Dengan

menggunakan teknik ini, suatu gen yang mengkodekan karakter tertentu yang diinginkan dapat diintroduksi ke suatu individu. Sekali gen asing terintegrasi ke dalam genom resipien, gen tersebut akan diwariskan ke keturunannya melalui germ line. Sebagai contoh, tingkat pertumbuhan dapat dipercepat dengan mengintroduksi gen yang mengkodekan hormon pertumbuhan yang mensintesa peptida hormon pertumbuhan dalam jumlah yang besar, dan daya tahan terhadap suhu dingin dapat diperoleh dengan memasukkan gen yang mengkodekan protein antibeku (*antifreeze protein*) dari ikan yang hidup di temperatur sub-zero.

Di bidang akuakultur, domestikasi strain yang mempunyai karakter yang baik seperti yang dimiliki oleh hewan, misalnya Holstein cow, Yorkshire pig, and white leghorn chicken, masih sangat sedikit dikarenakan histori dari akuakultur tidak setua dengan peternakan dan teknik selektif breeding membutuhkan waktu yang lama (beberapa generasi) untuk memperoleh strain seperti demikian (Yoshizaki 2002). Oleh karena itu, biologi molekuler mungkin merupakan suatu metode yang cepat dan efektif untuk diaplikasikan dalam pembenihan. Selanjutnya, teknik ini diperkirakan menjadi alat yang berguna untuk akuakultur secara umum. Ulasan ini menggambarkan beberapa teknik transfer gen yang umum dilakukan, persistensi dan

ekspresi dari gen yang ditransfer, aplikasi dan prospek ke depan dalam bidang akuakultur.

## TEKNIK TRANSFER GEN

### 1. Mikroinjeksi

Teknik mikroinjeksi yang dikembangkan dari teknik produksi tikus transgenik merupakan teknik yang umum digunakan dalam introduksi gen pada ikan. Gen yang akan diintroduksi disuntikkan ke sel menggunakan gelas pipet yang sangat kecil (diameter ujung jarum sekitar 0,05–0,15 mm). Pekerjaan ini dilakukan di bawah mikroskop dengan bantuan sebuah mikromanipulator pengatur gerak jarum suntik dan volume larutan DNA yang akan disuntikkan. Namun demikian, terdapat dua masalah dalam pengaplikasian teknik ini pada ikan (Yoshizaki 1998). Masalah pertama adalah inti telur ikan yang telah dibuahi relatif sulit diidentifikasi di mikroskop karena ukurannya kecil dan volume sitoplasma besar (Hackett 1993). Korion telur sangat keras dan sulit ditembus oleh mikropipet merupakan masalah kedua yang dihadapi pada ikan.

Untuk mengatasi masalah tersebut di atas, beberapa cara telah dikembangkan untuk beberapa spesies berbeda. Beberapa peneliti menyuntikkan gen ke inti telur medaka yang belum matang. Telur yang belum matang tersebut diinkubasi secara *in vitro*. Pada fase ini inti telur (disebut sebagai *germinal vesicle*) sudah kelihatan dan akan matang secara spontan dengan cara *in vitro*. Sebagai tambahan, telur medaka sangat keras setelah dibuahi sehingga penyuntikan pada saat tersebut dengan korion yang lembut akan lebih mudah. Akan tetapi, induksi pematangan telur secara *in vitro* memerlukan prosedur yang rumit dan membutuhkan waktu relatif lama pada spesies tertentu. Oleh karena itu, kelompok peneliti lain membuat ikan transgenik dengan cara menyuntikkan gen dengan jumlah copy yang banyak ke sitoplasma telur yang telah dibuahi sebagai alternatif penyuntikan ke inti telur.

Beberapa metode telah dilaporkan untuk mengatasi kesulitan di atas untuk menembus korion yang keras. Korion telur ikan rainbow trout yang keras setelah dibuahi ditusuk dengan jarum metal dan gen disuntikkan melalui lubang yang terbentuk dengan menggunakan gelas mikropipet (Chourrout *et al.* 1986). Pada ikan cyprinids, korion dibuang dengan bantuan proteinase dan selanjutnya telur tersebut dapat disuntik dengan mudah (Ueno *et al.* 1994). Cara lainnya adalah gen disuntikkan melalui mikrofil (Brem *et al.* 1988).

Meskipun waktu yang tersedia cukup singkat, penyuntikan dapat dilakukan sesaat setelah pembuahan dan sebelum korion mengeras. Sementara kami menemukan bahwa dengan melakukan treatment menggunakan glutathione 1 mM masalah telur rainbow trout yang keras dapat diatasi (Yokshizaki *et al.* 1991a, 1991b). Dengan demikian kami bisa menyimpulkan

bahwa diperlukan seleksi metode yang cocok untuk setiap spesies ikan.

Secara umum, jumlah copy gen yang disuntikkan ke dalam sitoplasma adalah  $10^6$  sampai  $10^8$  dan 5.000 sampai 10.000 kopi untuk penyuntikan ke dalam inti telur. Gen ini dilarutkan dalam beberapa pikoliter sampai nanoliter saline atau buffer Tris-EDTA. Mikroinjeksi harus dilakukan pada fase I sel untuk mendistribusikan gen ke setiap sel yang membelah. Jika penyuntikan dilakukan ke dalam salah satu blastomer setelah pembelahan sel, gen hanya bisa terdistribusikan dari sel yang disuntik tadi. Tingkat kelangsungan hidup dan persentase ikan yang membawa gen yang telah disuntikkan bervariasi bergantung kepada keterampilan dan spesies ikan. Bila telur rainbow trout yang telah ditreatment dengan glutathione disuntik dengan DNA konsentrasi  $10^7$  (dilarutkan dalam 2 nL buffer Tris-EDTA), tingkat penetasan secara umum sama dengan control (tidak disuntik), dan sekitar 50% dari total juvenil membawa gen yang ditransfer dalam genomnya (Yoshizaki *et al.* 1992).

### 2. Elektrofesis

Metode lain yang juga populer digunakan dalam pembuatan ikan transgenik adalah elektrofesis. Prinsip metode ini adalah membuat *reparable-holes* pada membran sel dengan bantuan aliran listrik yang bergetar (*electric pulse*). Sel disuspensikan dalam larutan DNA, dan larutan ini dapat masuk ke sel melalui lubang yang telah terbentuk. Pada awalnya, metoda ini dikembangkan untuk kultur sel; namun demikian teknik ini dapat juga diaplikasikan untuk telur dan sperma ikan. Teknik elektrofesis telah digunakan dalam beberapa spesies ekonomis penting seperti channel catfish, carp (Powers *et al.* 1992), dan salmon (Sin *et al.* 1993; Symonds *et al.* 1994). Powers *et al.* (1992) memproduksi ikan transgenik channel catfish dan carp dengan melakukan elektrofesis menggunakan telur yang telah dibuahi. Dalam beberapa kasus, tingkat kelangsungan hidup dan transformasi yang diperoleh dengan elektrofesis tidak setinggi dengan level yang diperoleh dengan teknik mikroinjeksi. Baru-baru ini, laboratorium kami telah mengembangkan teknik elektrofesis ini untuk memperoleh hasil yang lebih baik dengan menggunakan sperma yang telah direhidrasi (Kang *et al.* 1999). Pertama-tama sperma ikan mas dihidrasi dalam larutan hiperosmotik dan dilanjutkan dengan rehidrasi dengan larutan hiposmotik yang mengandung DNA untuk mengembalikan tekanan osmotik cairan seminal ke kondisi awal. Elektrofesis dilakukan pada saat proses rehidrasi. Tingkat keberhasilan transfer yang dianalisis menggunakan ikan umur 30 hari adalah sekitar 66%, sedangkan teknik elektro-fesis yang biasa pada kondisi isotonic hanya 20%. Hasil ini menunjukkan bahwa elektrofesis selama rehidrasi dapat meningkatkan penyerapan DNA

yang juga berarti meningkatkan frekuensi transfer gen. Meskipun teknik ini belum sempurna, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa cara ini cukup efektif. Penelitian lebih lanjut masih dibutuhkan untuk mendapatkan tingkat keberhasilan yang lebih baik dengan metode ini.

### 3. Metode Alternatif

Kedua metode transfer gen yang dipaparkan di atas telah digunakan secara rutin pada ikan. Akan tetapi akan menghadapi masalah bila menggunakan ikan yang perkembangan embrionya terjadi di dalam tubuh induknya seperti pada gapi, platy dan swordtail. Juga, umumnya spesies krustasea yang penting untuk akuakultur seperti udang dan lobster tidak melepaskan telurnya yang baru terbuahi. Akibatnya, transfer gen tidak bisa dilakukan dengan cara mikroinjeksi atau elektroforesis. Alternatif metode transfer gen untuk spesies seperti itu telah dikembangkan oleh Burns *et al.* (1993) dengan menggunakan bantuan sebuah vektor yang dikenal sebagai *replication-defective pantropic retroviral*. Vektor ini telah menunjukkan hasil yang efektif dalam menginfeksi sel lines ikan, kadal air, kodok (*Xenopus*) dan nyamuk (Burns *et al.* 1993, 1994; Matsubara *et al.* 1996), dan telur ikan yang baru dibuahi seperti medaka, zebra dan kerang, *Mulina lateralis* (Burns *et al.* 1993; Lin *et al.* 1994; Lu *et al.* 1996, 1997), dan sukses menghasilkan transgen. Baru-baru ini juga Sarmasik *et al.* (2001) telah berhasil memproduksi ikan transgenik dengan menyuntukan vektor tersebut ke daerah sekitar gonad ikan gapi (*Poecilia lucidai*) dan crayfish (*Procambarus clarkii*). Lu *et al.* (2002) juga berhasil membuat ikan silver sea bream transgenik dengan menyuntikkan cDNA (hormone pertumbuhan ikan rainbow trout dengan promoter ikan mas  $\beta$ -actin) yang dicampurkan dengan liposom ke gonad ikan, dan cara ini disebut sebagai "testis-mediated gene transfer". Hasil yang diperoleh dengan cara ini relatif sama dengan hasil yang diperoleh dengan cara elektroforesis (Lu *et al.* 2002).

Metode alternatif lainnya adalah transfer gen dengan bantuan sel, atau dikenal dengan "cell mediated gene transfer". Teknik ini merupakan pengembangan dari metode mikroinjeksi, dengan pertimbangan bahwa untuk menghasilkan ikan transgenik membutuhkan banyak waktu, biaya, fasilitas dan tenaga. Dengan mengisolasi sel yang membawa gen yang mengkodekan protein aktif, sel tersebut dapat disimpan dalam jangka waktu yang cukup lama, dan pada saat dibutuhkan dapat ditransplantasikan ke ikan resipien. Teknik ini telah berhasil diaplikasikan ke ikan rainbow trout dengan menggunakan sel bakal gonad (PGC, *primordial germ cell*) yang membawa gen GFP (*green fluorescent protein*). Dengan menyuntikkannya ke embrio ikan rainbow trout, PGC tersebut berkembang seperti halnya PGC normal lainnya. Namun demikian

penerapan teknik ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut untuk bisa diaplikasikan pada spesies ikan lain.

### PERSISTENSI DAN EKSPRESI GEN

Gen yang ditransfer akan direplikasi tanpa mengalami integrasi ke dalam genom resipien pada awal perkembangan embrio (review oleh Iyengar *et al.* 1996). Setelah mengalami beberapa pembelahan sel, beberapa gen asing tersebut terintegrasi secara acak di genom resipien di salah satu blastomer yang diikuti dengan pembentukan *concatemer* (cluster dari fragmen DNA yang terjalin satu sama lain). Terkadang pula gen asing terintegrasi ke dalam blastomer yang berbeda pada fase perkembangan yang berbeda (Yoshizaki *et al.* 1991b). Gen asing yang terintegrasi akan stabil di sel resipien, sementara dalam bentuk ekstrakromosomal akan terdegradasi oleh endogenous nuclease.

Gen yang telah terintegrasi akan ditransmisikan ke keturunannya melalui germ line (Hackett 1993). Bila gen terintegrasi ke dalam genom sebelum pembelahan sel pertama, gen akan didistribusikan ke setiap sel dan 50% dari germ sel akan memiliki gen asing tersebut setelah meiosis. Namun demikian, integrasi biasanya terjadi setelah sel membelah beberapa kali. Oleh karena itu, akan terdapat dua macam sel, yaitu memiliki gen yang ditransfer dan yang tidak membawa, yang dikenal dengan istilah mosaik. Keadaan mosaik ini menyebabkan persentase keturunan yang membawa gen asing tersebut akan sangat bervariasi. Laporan-laporan sebelumnya menunjukkan bahwa integrasi gen asing yang stabil akan diwariskan ke anaknya mengikuti hukum Mendel (Shears *et al.* 1991; Tewari *et al.* 1992). Keturunan pertama F1 membawa gen asing di setiap selnya dalam kondisi heterosigot. Sekitar 25% dari F2 yang diperoleh dengan menyilangkan antar keturunan F1 diperkirakan telah homisigot, 50% menjadi heterosigot, dan sisanya adalah non-transgenik. Untuk tujuan akuakultur, sekali kita memperoleh induk yang homisigot, keturunan yang semuanya transgen dengan mudah dapat diperoleh dengan pembuahan buatan.

Introduksi gen pengkode karakter yang diharapkan ke ikan harus bisa ditranskripsi dan ditranslasi secara akurat dalam ikan resipien. Namun demikian, pengontrolan ekspresi gen pada ikan masih belum banyak diketahui sebagai akibat dari belum banyaknya gen ikan yang diklon dibandingkan dengan vertebrata tingkat tinggi. Oleh karena itu, umumnya peneliti menggunakan promoter/enhanser yang diperoleh dari vertebrata lainnya atau dari virus yang menginfeksi. Rous sarcoma virus merupakan salah satu retrovirus yang menginfeksi ayam, menunjukkan aktivitas promoter/enhanser yang sangat kuat dalam sel mamalian. Promoter/enhanser ini juga aktif di transgenik ikan koki (Yoon *et al.* 1990), Walleye

(Gross *et al.* 1992), northern pike (Moav *et al.* 1992), carp (Zhang *et al.* 1990), dan rainbow trout (Yoshizaki *et al.* 1992). Meskipun promoter/enhanser metallothionein dari tikus juga telah digunakan secara luas dalam penelitian ikan transgenik, umumnya penelitian yang menggunakan elemen ini tidak melaporkan ekspresi gennya. Hasil yang negatif ini mungkin disebabkan oleh sifat sikwens promoter/enhanser yang spesifik-spesies. Moav *et al.* (1992) melaporkan promoter/enhanser  $\beta$ -actin ikan mas menunjukkan aktivitas yang kuat di ikan mas.  $\beta$ -actin merupakan protein yang melimpah di hampir semua semua tipe sel, menunjukkan bahwa promoter/enhanser ini adalah sangat aktif dan serbaguna. Pada embrio ikan zebra, ekspresi yang kuat telah diketahui dengan menggunakan promoter/enhanser  $\beta$ -actin homolog (Higashijima *et al.* 1997). Baru-baru ini, promoter/enhanser  $\beta$ -actin dari medaka juga menunjukkan aktivitas yang sangat tinggi di embrio medaka (Hamada *et al.* 1998). Promoter/enhanser gen antibeku ikan ocean pout, winter flounder, wolfish dan sea raven juga telah dikarakterisasi (Gong & Hew 1993). Promoter/enhanser antibeku ikan winter flounder adalah sangat aktif di hati salmon Atlantik, dimana hati merupakan tempat protein antibeku disintesis (Hew *et al.* 1995).

Ekspressi dari gen asing dimulai setelah fase mid-blastula dan levelnya meningkat selama embryogenesis, dan selanjutnya menurun setelah menetas (Gong & Hew 1993; Liu *et al.* 1990). Kejadian ini disebut sebagai ekspresi sementara (transient expression), yang mungkin disebabkan oleh replikasi ekstrakromosomal DNA asing. Level ekspresi selanjutnya akan menurun yang diikuti dengan degradasi dari ekstrakromosomal DNA. Akibatnya, level ekspresi gen yang terintegrasi ke kromosom resipien tidak setinggi dengan ekspresi sementara. Meskipun hanya beberapa laporan yang menunjukkan integrasi gen dalam genom ikan resipien, teknik ini sangat diperlukan dalam akuakultur.

Di beberapa laporan, ekspresi gen dianalisis dengan mengukur level mRNA dan protein. Messenger RNA dari gen asing dapat dideteksi menggunakan probe (fragment DNA yang diberi label radioaktif, biasanya berupa  $^{32}\text{P}$ ), dan protein dengan cara immunodeteksi dengan menggunakan antibodi. Akan tetapi kedua metode ini membutuhkan banyak waktu dan relatif kompleks. Oleh karena itu, untuk mengembangkan promoter/enhanser yang baik diperlukan suatu metode yang sederhana dan cepat untuk menefeksi ekspresi gen yang dikendalikannya. Hydo-Taguchi *et al.* (1997) mengintroduksi gen yang mengkodekan tyrosinase, yang bisa mengkonversi tyrosin menjadi melanin, ke ikan medaka albino dan sukses menghasilkan ikan dengan spot hitam. Takayama *et al.* (1989) juga telah berhasil memindahkan gen *melamin-concertrating hormone* dari salmon ke rainbow trout dan menghasilkan spot putih yang

terbentuk sebagai hasil dari melanofor yang terkonsentrasi. Sebagai tambahan dalam studi semacam ini, gen mengkodekan protein berwarna hijau (GFP, *green flourescent protein*) yang diisolasi dari ubur-ubur juga telah digunakan secara luas dalam penelitian transgenik. Gen semacam ini disebut sebagai gen 'reporter' yang bisa dimanfaatkan dalam pengembangan sistem promoter/enhanser atau teknik transfer gen yang baru. Di dalam review ini diungkapkan beberapa hasil studi ekspresi gen khususnya pada ikan; namun tingkat ekspresinya tidak sebesar yang sering didapatkan pada tikus transgenik dan kadang-kadang levelnya tidak cukup tinggi untuk mengubah fenotipe ikan resipien. Oleh karena itu, pengembangan sistem promoter/enhanser yang cocok yang diperoleh dari ikan atau virus ikan merupakan hal yang penting untuk dilakukan.

## APLIKASI TRANSFER GEN DALAM AKUAKULTUR

Dalam akuakultur, karakter-karakter genetik seperti peningkat laju pertumbuhan, ketahanan terhadap suhu dingin dan penyakit, dan daya tahan terhadap kadar oksigen terlarut rendah dapat diintroduksi ke ikan bernilai ekonomis penting. Demikian juga telah dimungkinkan membuat ikan dengan warna berbeda seperti yang dilaporkan oleh Gong's grup (Melamed *et al.* 2001) pada ikan zebra dengan menggunakan gen GFP (*green fluoroscent protein*), YFP (*yellow fluoroscent protein*), dan RFP (*red fluoroscent protein*) yang dapat terlihat pada kondisi cahaya biasa. Namun demikian pada bagian ini hanya akan dipaparkan tentang peningkatan pertumbuhan, daya tahan terhadap suhu dingin dan resistensi terhadap penyakit.

### 1. Peningkatan Pertumbuhan

Biaya produksi dalam akuakultur secara kasar bida dikatakan setengahnya berhubungan dengan pakan. Oleh karena itu perhatian utama dalam akuakultur adalah tingkat pertumbuhan dan efisiensi konvensi pakan. Hasil yang pertama kali diperoleh oleh Palmiter *et al.* (1982) yang mampu membuat "tikus super", sekitar 2 kali lebih besar dari tikus biasa/normal telah mendorong untuk menghasilkan ikan yang juga mengkodekan hormon pertumbuhan.

Percobaan menggunakan teknik ini pada ikan telah banyak dilakukan (lihat Tabel 1 ada Hew & Fletcher 2001 + Hinitis dan Moav 1999). Namun demikian, peningkatan laju pertumbuhan yang sangat dramatis hanya ditunjukkan pada ikan salmonid. Hew's grup menggunakan konstruksi gen "all-fish" yang mengandung promoter dari ocean pout protein antibeku (AFP, antifreeze protein) digabungkan dengan Chinook salmon GH cDNA (complementary DNA), dan disuntikkan ke embrio salmon. Promoter ini digunakan karena telah menunjukkan pola ekspresi di tissue yang

Tabel 1. Peningkatan pertumbuhan ikan transgenic spesies ekonomis penting menggunakan gen GH

Spesies ikan	Promoter	Sumber FGen GH	Peningkatan Pertumbuhan (kali)
Ikan mas	MMT	GH manusia	1.1
	RSV	Rainbow trout GH cDNA	1.2-1.4
	$\beta$ -actin ikan mas	GH cDNA ikan mas	2.9-3.7
Crusian carp	MMT	GH manusia	1.7
Lele	RSV	Coho GH cDNA	1.2
Loach	MMT	GH manusia	2
	op-AFP	GH cDNA Chinook	2.5
Tilapia	CMV	GH cDNA tilapia	1.81
	op-AFP	GH cDNA Chinook	2
Pike	RSV	bGH cDNA	0-1.12
Atlantic salmon	op-AFP	GH cDNA salmon	3-10
		GH minigene	3-10
Pacific salmon	op-AFP	GH cDNA salmon	3-10
	Sockeye MT	Gen GH salmon	6-11

(Sumber : Hew dan Fletcher, 2001 ; Hinits dan Moav, 1999)

sesuai (umumnya di hati), dan juga tidak mengandung variasi musim dalam aktivitasnya. Lebih lanjut, faktor transkripsi yang diperlukan untuk beraktivitas kelihatannya terdapat dibanyak jenis ikan (contohnya medaka, Gong *et al.* 1991; salmon, Shears *et al.* 1991; Devlin *et al.* 1995; goldfish, Wang *et al.* 1995; loach, Tsai *et al.* 1995), sementara faktanya bahwa gen ini tidak terdapat secara normal diteleost lain, yang berarti bahwa transgen lebih mudah untuk dideteksi dengan PCR.

Pemanfaatan teknik ini dalam peningkatan laju pertumbuhan menunjukkan bahwa kecepatan tumbuh pada salmon dewasa dapat mencapai 3-5 kali lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol-non transgenik. Bahkan di beberapa individu, khususnya dalam bulan-bulan awal pertumbuhannya, dapat mencapai 10-30 kali dibandingkan kontrol (Du *et al.* 1992; Devlin *et al.* 1994). Studi pada ikan lain dengan promoter dari ikan atau non-ikan juga dapat meningkatkan pertumbuhan meskipun tidak sedramatis seperti pada salmonid. Beberapa dari studi menunjukkan peningkatan level GH di plasma sementara GH native di pituitari menunjukkan down-regulated sebagai hasil feedback negative, pituitary lebih kecil dan level mRNA yang lebih rendah (Mori & Devlin, 1999). Ikan-ikan tersebut secara umum dalam keadaan sehat-sehat, dan telah dihasilkan generasi kedua dan ketiga (Saunders *et al.* 1998). Keuntungan secara ekonomi dari rekayasa seperti ini sangat menjanjikan, dan dibandingkan dengan pemijahan selektif, waktu yang dibutuhkan untuk mencapai hasil yang sama adalah sangat signifikan.

## 2. Peningkatan Daya Tahan terhadap Suhu Dingin

Temperatur air yang dingin umumnya menyebabkan ikan stress, tetapi beberapa spesies ikan dapat hidup pada temperatur air 0 sampai  $-1^{\circ}\text{C}$ . Yang jelas kondisi seperti ini merupakan masalah utama akuakultur di daerah temperate dimana pada musim dingin semua stok ikan dapat musnah. Namun demikian, beberapa jenis ikan laut memiliki kadar serum anti beku tinggi (10-25mg/ml) atau glycoproteins (AFGP) yang efektif menurunkan suhu beku dengan cara mencegah pembentukan kristal-es. Struktur protein ini bervariasi, satu jenis berupa AGFP dan 4 lainnya berupa AFP (Fletcher *et al.* 2001). Umumnya protein ini diekspresikan di liver, beberapa diantaranya (negatively) dikontrol oleh hormone pertumbuhan dan dipengaruhi oleh musim. Pada beberapa jenis ikan, ekspresi terdapat juga di kulit, insang dan jaringan periphera (sekeliling tubuh) lainnya. Isolasi, karakterisasi dan regulasi protein antibeku ini, khususnya winter flounder *Pleuronectes americanus*, merupakan subjek utama dalam penelitian Fletcher's grup sampai saat ini, dan telah diuji potensi penggunaan protein ini temperature beku pada spesies ikan lain, terutama salmonid.

Gen yang mengkodekan AFP liver dari winter flounder telah berhasil diintruduksi ke genom ikan salmon Atlantik, terintegrasi ke germ line, dan pada generasi ketiga diekspresikan spesifik di hati. Level AFP serum pada semua keturunan ketiga mirip dengan



level precursor proAFP (mencapai 200-400µg/ml) AFP yang mendekati dan menunjukkan pola kristal es heksagonal, menunjukkan adanya aktivitas antibeku. Namun demikian, sejumlah Ala, Pro-spesifik endopeptidase yang dibutuhkan untuk menghasilkan protein mature, tidak dimiliki oleh salmon Atlantik, sehingga aktivitas antibeku pada transgenic ini belum optimal, mungkin hanya mencapai 70% dari potensi yang ada. Oleh karena itu, level proAFP dalam serum di bawah level yang dimiliki oleh winter flounder, sehingga diperlukan teknik lain untuk meningkatkan jumlah copy untuk meningkatkan ekspresi gen ini ke level yang memberikan toleransi ke suhu beku pada ikan (Hew *et al.* 1999).

Introduksi AFP ke ikan koki juga meningkatkan toleransinya terhadap suhu dingin, ke temperature dimana ikan control mati (12 jam pada suhu 0°C; Wang *et al.* 1995). Hal yang sama, injeksi atau pemberian secara oral ke juvenil ikan bandeng atau tilapia meningkatkan ketahannya terhadap penurunan suhu sampai 26 sampai 30°C hanya 3.4% ikan tilapia hasil treatment yang mati, sedangkan ikan control mencapai 60%, sementara ikan bandeng 22.2% mati setelah disuntik dengan level yang lebih rendah (100µg/g BW), dibanding dengan 70% yang mati pada ikan control (Wu *et al.* 1998). Pengembangan ikan yang membawa gen ini akan menguntungkan bagi akuakultur di Negara-negara dimana suhu pada musim dingin sering merupakan batas limit fisiologi ikan.

Demikian juga pada vertebrata lainnya, kelompok protein ini telah digunakan untuk memproteksi membrane dari suhu dingin dan kerusakan akibat pembekuan, yang mungkin dengan cara mengubah struktur membrane (Rubinsky *et al.* 1992a,b). Pada kondisi ini, sepertinya membrane diberi stabilitas yang lebih besar. Kemampuan protein ikan ini telah ditunjukkan dalam preservasi embrio sapi pada suhu rendah (4°C), sementara itu juga cryopreservasi AFP telah menunjukkan kemampuan memproteksi telur babi oolemma dari kerusakan akibat suhu dingin (Arav *et al.* 1997) penggunaan AFP dalam cryopreservasi telur dan embrio ikan masih belum dikembangkan.

### 3. Peningkatan Daya Tahan Ikan terhadap Pathogen

Pendekatan untuk menghindari kerusakan akibat virus dan bakteri pathogen pada ikan budidaya, saat ini dialihkan ke penggunaan vaksin DNA dan agen antimicrobial. Vaksin DNA dilakukan dengan menginjeksikan DNA yang mengkodekan antigen (biasanya membrane luar dari bakteri atau protein kapsid dari virus) sehingga protein diekspresikan *in vivo* dan merangsang produksi antibody. Pendekatan ini telah berhasil digunakan pada sejumlah ikan percobaan. Sebagai contoh, penyuntikan pada salmon Atlantik dengan plasmid mengkodekan glycoprotein infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) dengan pengontrol

Cytomegalovirus promoter (pCMV): uji challenge (tantang) dengan virus setelah 8 minggu menunjukkan proteksi yang signifikan. Pada ikan yang sama 12 minggu kemudian masih resisten dan menunjukkan adanya pembedaan antibody penetral virus setelah immunisasi, dan titernya meningkat setelah uji tantang (Traxler *et al.* 1999). Penelitian yang lebih baru menunjukkan bahwa single dosis dari beberapa nanogram DNA cukup untuk membangkitkan respon yang demikian (Corbeil *et al.* 2000). Proteksi yang sama telah ditunjukkan pada ikan rainbow trout setelah vaksinasi melawan virus haemorrhagic septicaemia virus (HSV) menggunakan sikkens yang mengkodekan glycoprotein yang dikendalikan oleh pCMV (Lorenzen *et al.* 1999). Namun teknik ini masih susah diaplikasikan pada jumlah ikan yang banyak.

Pada konteks immunitas, teknologi antisense atau "gene knock-down" dapat diaplikasikan dan hasil yang telah dilaporkan menggunakan antisense oligonukleotida dengan tujuan memblokir ekspresi gen dari Rous sarcoma virus. Pada percobaan ini, sikkens antisense yang merupakan bagian dari virus 35S RNA diintroduksi ke kultur jaringan fibroblast embrio ayam, menyebabkan terhambatnya produksi virus (Zamecnik and Stephensen, 1978). Demikian pula, baru-baru ini, pendekatan aplikasi teknologi antisense pada ikan telah dilakukan oleh Boonanuntanasarn *et al.* (2002) menggunakan antisense morpholino phosphorodiamidate oligonukleotides dengan promoter  $\beta$ -actin medaka pada ikan rainbow trout dan berhasil memblokir ekspresi gen GFP. Namun demikian aplikasi teknologi ini dalam akuakultur masih menghadapi masalah yang berhubungan dengan spesifikasi immunity pada pathogen tertentu sesuai dengan antisense yang dibuat.

Sebuah alternatif lain adalah respons immune dengan system non-spesifik melalui penggunaan protein antimicrobial, beberapa jenis ditemukan di eukariot. Review terbaru tentang hal ini menggambarkan dua grup berdasarkan struktur kimianya (Andreu & Rivas 1999). Akan tetapi, umumnya masih belum diketahui, kecuali lysosyme yang telah menunjukkan efek antibakterial yang tidak spesifik (Austin and Allen-Austin 1985). Dengan metode transgenic yang membawa gen lysozyme yang dikontrol oleh ocean pout AFP promoter, konsentrasinya mirip dengan level yang membuat ikan salmonid resisten, sehingga diperkirakan ikan transgenic yang membawa gen ini akan sangat meningkatkan kemampuan melawan berbagai jenis mikroba. Hasil terbaru yang diperoleh oleh Sarmasik *et al.* (2002) dengan mentransfer gen cecropin pada ikan medaka dengan promoter CMV meningkatkan daya tahan ikan medaka terhadap *Pseudomonas fluorescens* dan *Vibrio anguillarum*. Dengan menggunakan 60% dosis letal, persentase keturunan F2 ikan transgenic medaka yang mati akibat pathogen *P. fluorescens* hanya sampai 10% dan sekitar 10-30% pada uji tantang

dengan *Vibrio anguillarum* dibandingkan dengan kematian pada ikan kontrol yang mencapai 40%.

Immunostimulans yang memfasilitasi fungsi fagositasi dari sel dan meningkatkan aktivitas antimikrobanya dapat juga digunakan untuk meningkatkan daya tahan terhadap penyakit, meskipun stimulasi alamiah dari mekanisme pertahanan yang tidak spesifik diduga hanya bersifat temporal. Sejumlah immunostimulans yang diketahui efektif pada ikan, seperti glucan, chitin, and levamisole meningkatkan aktivitas fagositasi, sementara glucan ragi dan vitamin C juga membantu aktivitas ini secara komplemen. Sebagai tambahan, levamisole dan hormone pertumbuhan juga mengaktifkan sel NK. Sebuah review yang bagus yang berhubungan immunostimulan dapat dibaca dalam Sakai (1999).

Kemampuan bahan-bahan tersebut untuk meningkatkan daya tahan terhadap stress lingkungan dan spectrum aktivitas yang lebar sangat memungkinkan untuk diterapkan dalam akuakultur, khususnya bila dibandingkan dengan penggunaan vaksin. Namun demikian, meskipun immunostimulans dapat diberikan dengan cara injeksi, dosis yang tepat sangat diperlukan, overdosis sering menyebabkan imunosupresi. Dan juga waktu pemberian treatment sangat penting daripada penyuntikan itu sendiri (cara melalui pakan lebih baik) karena dapat menyebabkan ikan stress dan juga kurang praktis untuk ikan kecil. Oleh karena itu, terbuka jalan untuk mengembangkan gen yang dapat diatur dengan mudah, bisa mengaktifkan immunostimulans pada saat ikan diberi stress lingkungan (sebagai contoh menggunakan promoter yang diaktifkan dengan pemberian cortisol dosis tinggi), atau mendorong reaksi immune terhadap penyakit virus (contohnya penggunaan interferon-responsive promoters).

### PROSPEK

Beberapa kemajuan yang diperoleh dari penelitian menggunakan ikan model atau spesies ekonomis penting membuka jalan lebar aplikasi teknologi transfer gen ini dalam akuakultur. Beberapa hal seperti daya tahan terhadap penyakit, terhadap stress lingkungan dan perbaikan kualitas daging merupakan issue yang masih perlu untuk dipelajari lebih lanjut (Yoshizaki 2002). Selanjutnya, masih terbuka kemungkinan untuk mengintroduksi fungsi non-piscian, seperti anti-kanker, anti tekanan darah tinggi, ke ikan dengan transfer gen yang mengkodekan protein yang dapat menekan kanker atau tekanan darah tinggi. Dan juga ikan transgenic dapat diusulkan sebagai vaksin yang dapat dimakan untuk manusia. Metode ini mungkin akan lebih murah dan memiliki potensi lebih mudah dimakan. Dengan kata lain, ikan transgenic dapat berfungsi sebagai "edible pharmaceuticals". Percobaan yang mirip seperti ini sedang dilakukan pada tumbuhan (Fishcer *et al.*

1999); tetapi, ikan memiliki satu keuntungan karena dapat dimakan mentah tanpa dimasak, sehingga protein yang dihasilkan oleh gen asing tetap aktif. Laboratorium kami telah berhasil memproduksi protein GFP dalam jumlah besar di daging ikan (Yoshizaki *et al.* 2002) dengan promoter dari ikan medaka,  $\beta$ -actin promoter (Hamada *et al.* 1998). Hasil ini menunjukkan kemungkinan besar untuk menghasilkan sejumlah protein yang bersifat obat yang bisa dimakan dari ikan dengan mengintroduksi gen yang tepat sebagai pengganti gen GFP.

Khusus untuk masalah yang sering dihadapi oleh petani ikan dikeramba apung, kematian massal akibat kekuarangan oksigen, mungkin bisa diatasi dengan pemeliharaan ikan yang membawa gen yang mengontrol produksi  $\alpha$ -globin dalam jumlah besar (overekspresi) sehingga bisa bertahap meskipun kadar oksigen sangat rendah atau bahkan nol. Penelitian tentang hal ini telah dilakukan dengan menggunakan ikan rainbow trout sebagai model dengan menggunakan gen  $\alpha$ -globin ikan mas (Yoshizaki *et al.* 1991a,b). Hemoglobin ikan mas bisa menyuplai oksigen ke jaringan pada kondisi oksigen rendah, sedangkan ikan rainbow hanya bisa pada kadar oksigen tinggi.

Untuk mengaplikasikan teknologi ini dalam akuakultur, masih dibutuhkan banyak informasi tentang molekuler dan biologi sel pada ikan, khususnya studi tentang mekanisme ekspresi gen yang dibutuhkan untuk mengontrol ekspresi gen asing secara tepat. Selain itu, diperlukan studi dengan tujuan mengontrol karakter fenotipe yang diinginkan untuk memproduksi daging yang berkualitas tinggi. Kemajuan ilmu seperti ini juga harus digabungkan dengan aspek eko-biologi dari ikan transgenik bila terlepas ke populasi alami. Untuk mencegah resiko kemungkinan terjadi perkawinan ikan ini dengan populasi alami, penggunaan ikan transgenik yang steril dan pemeliharaan dalam sistem tertutup bisa dipertimbangkan penerapannya.

### REFERENSI

- Andreu, D. & L. Rivas. 1999. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 47: 415-433.
- Arav, A., B. Rubinsky, G. Fletcher & E. Seren. 1993. Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Mol. Reprod. Dev.*, 36: 488-493.
- Austin, B. & D. Allen-Austin. 1985. Bacterial pathogens of fish. *J. Appl. Bacteriol.*, 58: 483-506.
- Baguisi, A., A. Arav, T.F. Crosby, J.F. Roche & M.P. Boland. 1997. Hypothermic storage of sheep embryos with antifreeze protein: development in vitro and in vivo. *Theriogenology*, 48: 1017-1024.

- Boonanuntanasarn, S., G. Yoshizaki, Y. Takeuchi, T. Morita & T. Takeuchi. 2002. Gene knock-down in rainbow trout embryo using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides. *Marine Biotechnology*, 4: 256-266.
- Brem, G., B. Brenig, G. Horstgen-Schwark & E.L. Winnacker. 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 68: 209-219.
- Burns, J.C., T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano & J.K. Yee. 1993. Vesicular stomatitis virus G. Glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8033-8037.
- Burns, J.C., T. Matsubara, G. Lozinski, J.K. Yee, T. Friedmann, C.H. Washabaugh & P. Tsonis. 1994. Pantropic retroviral vector-mediated gene transfer, integration, and expression in cultured newt limb cells. *Dev. Biol.*, 165: 285-289.
- Chourrout, D., R. Guyomard & L.M. Houdebine. 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairneri* Rich) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, 51: 143-150.
- Corbeil, S., S.E. LaPetra, E.D. Anderson & G. Kurath. 2000. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine*, 8: 2817-2824.
- Devlin, R.H., T.Y. Yesaki, C.A. Biagi, E.M. Donaldson, P. Swanson & W.K. Chan. 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371: 209-210.
- Devlin, R.H., T.Y. Yesaki, E.M. Donaldson & C.L. Hew. 1995. Transmission and phenotype effects of an antifreeze/GH gene construct in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 137: 161-169.
- Du, S.J., Z. Gong, G.L. Fletcher, M.A. Shears, M.J. King, D.R. Idler & C.L. Hew. 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Bio/Technology*, 10: 176-180.
- Fisher, R., J. Drossard, U. Commandeur, S. Schillberg & N. Emans. 1999. Towards molecular farming in the future : moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30: 101-108.
- Fletcher, G.L., C.L. Hew & P.L. Davies. 2001. Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annu. Rev. Physiol.*, 63: 359-390.
- Gong, Z. & C.L. Hew. 1993. Promoter analysis of fish antifreeze protein genes, p: 307-324. In: P.W. Hochachka & T.P. Mommsen, "Molecular Biology Frontier" (Eds.). Elsevier, New York.
- Gong, Z., J.R. Vielkind & C.L. Hew. 1991. Functional analysis of promoter regions from fish antifreeze genes in transgenic Japanese medaka embryos. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 64-72.
- Gordon, J.W., G.A. Scangos, D.J. Plotkin, J.A. Barbosa & F.H. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7380-7384.
- Gross, M.L., J.F. Schneider, N. Moav, C. Alvarez, S. Myster, Z. Liu, E.M. Hallerman, P.B. Hacket, K.S. Guise, A.J. Faras & A.R. Kapuscinski. 1992. Molecular analysis and growth evaluation of Northern pike (*Esox lucius*) microinjection with growth hormone genes. *Aquaculture*, 103: 253-273.
- Hacket, P.B. 1993. The molecular biology of transgenic fish, p: 207-240. In: P.W. Hochachka & T.P. Mommsen, *Molecular Biology Frontiers*" (Eds.). Elsevier, New York.
- Hamada, K., K. Tamaki, T. Sasado, Y. Watai, S. Kami, Y. Wakamatsu & K. Ozato. 1998. Usefulness of the medaka  $\beta$ -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7: 173-180.
- Hew, C.L., G.L. Fletcher & P.L. Davies. 1995. Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *J. Fish Biol.*, 47: 1-9.
- Hew, C.L., R. Poon, F. Xiong, S. Gauthier, M. Shears, M. King, P. Davies & G. Fletcher. 1999. Liver-specific and seasonal expression of transgenic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic Res.*, 8: 405-415.
- Hew, C.L. & G.L. Fletcher. 2001. The role of aquatic biotechnology in aquaculture. *Aquaculture*, 197: 194-204.
- Higashijima, S., H. Okamoto, N. Ueno, Y. Kurihara, A. Schartl & G. Eguchi. 1997. High frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.*, 192: 289-299.



- Hinitz, Y. & B. Moav. 1999. Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 173: 285-296.
- Hyodo-Taguchi, Y., C. Winkler, Y. Kurihara, A. Scharl & M. Scharl. 1997. Phenotypic rescue of the albino mutation in the medaka fish (*Oryzias latipes*) by a mouse tyrosinase transgene. *Mech. Dev.*, 68: 27-35.
- Iyengar, A., F. Muller & MacLean. 1996. Regulation and expression of transgenes in fish: a review. *Transgenic Res.*, 5: 147-166.
- Kang, J.H., G. Yoshizaki, O. Homma, C.A. Strunsmann & F. Takashima. 1999. Effect of an osmotic differentiation on the efficiency of gene transfer by electroporation of fish spermatozoa. *Aquaculture*, 173: 297-307.
- Lin, S., N. Gaiano, P. Culp, J.C. Burns, T. Friedmann, J.K. Yee & N. Hopkins. 1994. Integration and germline transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science*, 265: 666-668.
- Liu, Z., B. Moav, A.J. Faras, K.S. Guise, A.R. Kapuscinski & P.B. Hacket. 1990. Development of expression vectors for transgenic fish. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 3432-3440.
- Lorenzen, N., N.J. Olsen & C. Koch. 1999. Immunity to HVS virus in rainbow trout. *Aquaculture*, 172: 41-61.
- Lu, J.-Kan, Bo-Hua, F., W. Jen-Leh & T.T. Chen. 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.*, 4: 328-337.
- Lu, J.-K., T.T. Chen, S.K. Allen, T. Matsubara & J.C. Burns. 1996. Production of transgenic dwarf surfclams, *Mulina lateralis*, with pantropic retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 3482-3486.
- Lu, J.-K., J.C. Burns & T.T. Chen. 1997. Pantropic retroviral vectors integration, expression, and germline transmission in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 6: 289-295.
- Matsubara, T., R.W. Beeman, H. Shike, N.J. Besansky, O. Mukabayire, S. Higgs, A.A. James & J.C. Burns. 1996. Pantropic retroviral vectors integrate and express in cells of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94: 6181-6189.
- Melamed, P., Z. Gong, G. Fletcher & C.L. Hew. 2002. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204: 255-269.
- Moav, B., Z. Liu, Y. Groll & P.B. Hacket. 1992. Selection of promoters for transgenic fish. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 338-345.
- Mori, T. & R.H. Devlin. 1999. Transgene and host GH gene expression in pituitary and non-pituitary tissue of normal and GH transgenic salmon. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 149: 129-139.
- Palmiter, R.D., R.L. Brinster, R.E. Hammer, M.E. Trumbauer & M.G. Rosenfeld. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 30: 611-615.
- Powers, D.A., L. Hereford, T. Cole, T.T. Chen, C.M. Lin, K. Night, K. Creech & R. Dunham. 1992. Electroporation: a method for transferring genes into the gametes of zebrafish. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 301-308.
- Rubinsky, B., M. Mattioli, A. Arav, B. Barboni, and G.L. Fletcher. 1992a. Inhibition of  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  currents by antifreeze proteins. *Am. J. Physiol.*, 262: 542-545.
- Rubinsky, B., A. Arav & A.L. DeVries. 1992b. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes. *Cryobiology*, 29: 69-79.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulans. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Sarmasik, A., J. In-Kwon, C.Z. Chun, J.K. Lu & T.T. Chen. 2001. Transgenic live-bearing fish and crustaceans produced by transforming immature gonad with replication-defective pantropic retroviral vector. *Mar. Biotechnol.*, 3: 470-477.
- Sarmasik, A., G. Warr & T.T. Chen. 2002. Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol.*, 4: 310-322.
- Sauders, R.L., G.L. Fletcher & C.L. Hew. 1998. Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Aquaculture*, 168: 177-193.
- Shears, M.A., G.L. Fletcher, C.L. Hew, S. Gauthier & P.L. Davies. 1991. Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 58-63.

- Sin, F.Y.T., A.L. Bartley, S.P. Walker, I.L. Sin, J.E. Symonds, L. Hewke & C.L. Hopkins. 1993. Gene transfer in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytschai*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-LacZ DNA. *Aquaculture*, 117: 57-69.
- Symonds, J.E., S.P. Walker & F.Y.T. Sin. 1994. Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA: evidence of enhanced sperm/DNA association. *Aquaculture*, 119:313-327.
- Takayama, Y., C. Wada, H. Kawauchi & M. Ono. 1989. Structures of two genes coding for melanin-concentrating hormone of chum salmon. *Gene*, 80: 65-73.
- Tewari, R., C. Michard-Vanhee, E. Perrot & D. Chourout. 1992. Mendelian transmission, structure and expression of transgenes following their injection into the cytoplasm of trout eggs. *Transgenic Res.*, 1: 250-260.
- Traxler, G.S., E. Anderson, S.E. LaPetra, J. Richard, B. Shewmaker & G. Kurath. 1999. Naked DNA vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* against IHNV. *Dis. Aquat. Org.*, 38: 183-190.
- Tsai, H.J., F.S. Tseng & I.C. Liao. 1995. Transgenic loach: electroporation of sperm to introduce foreign DNA. *Can. J. Aquat. Sci.*, 52: 776-787.
- Ueno, K., S. Hamaguchi, K. Ozato, J.H. Kang & K. Inoue. 1994. Foreign gene transfer into nigróbuno (*Carassius auratus grandoculis*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3: 235-242.
- Wang, R., P. Zhang, Z. Gong & C.L. Hew. 1995. Expression of antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 4: 20-26.
- Wu, S.-M., P.-P. Hwang, C.L. Hew & J.-L., Wu. 1998. Effects of antifreeze protein on cold tolerance in juvenile tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) and milkfish (*Chanos chanos* Forskaal). *Zool. Sci.*, 37: 39-44.
- Yoon, S.J., E.M. Hallerman, M.L. Gross, Z. Liu, J.F. Schneider, A.J. Faras, P.B. Hacket, A.R. Kapuscinski & K.S. Guise. 1990. Transfer of the gene for neomycin resistance into goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 85: 21-33.
- Yoshizaki, G., S. Kobayashi, T. Oshiro & F. Takashima. 1992. Introduction and expression of CAT gene in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 1659-1665.
- Yoshizaki, G. 1998. Gene Transfer in Fish: Applications to Aquaculture. Symposium on Molecular Bioengineering of Food Animals 23-24 Oct. 1998. Research for the Future Program Genetic Engineering of Animal Protein Resources.
- Yoshizaki, G. 2002. Gene transfer in salmonidae: applications to aquaculture. *Suisanzoshoku*, 49 (2): 137-142.
- Yoshizaki, G., T. Oshiro & F. Takashima. 1991a. Introduction of carp  $\alpha$ -globin gen in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 819-824.
- Yoshizaki, G., T. Oshiro, F. Takashima, I. Hirono & T. Aoki. 1991b. Germ-line transmission of carp  $\alpha$ -globin gene introduced in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 2203-2209.
- Zamecnik, P.C. & M.L. Stephensen, 1978. Inhibition of *Rous sarcoma* virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75: 280-284.
- Zhang, P., M. Hayar, C. Joyee, L.I. Gonzalez-Villasenor, C.M. Lin, R.A. Dunham, T.T. Chen & D.A. Powers. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Mol. Rep. Dev.*, 25: 3-13.