

生物技术在水产养殖上的应用

APPLICATIONS OF BIOTECHNOLOGY IN AQUACULTURE

吴 融

(浙江省海洋水产研究所温州分所)

Wu Rong

(Wenzhou Branch. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang Province)

生物技术(Biotechnology)既是一门综合性的新工艺,又是一个知识密集的新产业。有人预言,生物技术将成为未来工业结构调整和改革的重要因素之一。

我国是一个十亿人口的大国,农业是国民经济的基础,因此必须加强生物技术在水产应用方面的研究,包括基因重组、细胞融合、固定化酶和固定化细胞等技术,这将大大推动我国整个国民经济的发展。

近年来,生物技术在水产养殖上的应用日益受到重视,并已初见成效。现就鱼类性别的控制、缩短紫菜的生活史、海带配子体无性繁殖系和雌性孢子体、细胞核移植和外源信使 RNA 注射、细胞融合、珍珠贝品质控制的可能性、鮑和鲑鳟的遗传工程,分述如下:

一、鱼类性别的控制

在鱼类方面,有的雄鱼生长较快如罗非鱼;有的雌鱼生长较快如鲤、鲫等,因此近年来对鱼类单性养殖的研究进展甚快。

鱼类的性别决定是有其遗传基础的,有些鱼类的性别是由精子决定的,是为雄性异配型,如莫桑比克罗非鱼、尼罗罗非鱼。

杨永铨等(1979,1980)接合性反转法和交配技术筛选得一种莫桑比克罗非鱼超雄鱼(YY),以此超雄鱼与正常雌鱼(XX)交配,则所产的后代全部为雄鱼(XY)。看来,用这种方法获得超雄鱼还是比较麻烦的,现在还不能用核型分析、酶谱或其他方法来区别真雌鱼和假雌鱼、一般雄鱼和超雄鱼,所以还不能在生产上大量推广。最近,小野里坦(1984)利用雄核发育在马苏大麻哈鱼上获得二倍体鱼,但发生率只有1.5%,认为在性决定为XY型的鱼类上,如果利用雄核发育的话,在理论上可获得部分超雄鱼。

在性决定为ZW型的奥利亚罗非鱼上,则性别的控制较为简单,即先用雌性激素处

理,获得性反转的假雌鱼(ZZ),再以此假雌鱼与正常雄鱼(ZZ)交配,可产生全部为雄鱼(ZZ)的群体。但据 Jenson 和 Shelton (1978)用雌三醇,雌酮和 17β -雌二醇处理奥利亚罗非鱼鱼苗,由于剂量不足和处理时间已在性腺分化期,试验未成。台湾的余廷基等(1984)也曾用雌激素($17-\alpha$ 乙基雌二醇, β -雌二醇,雌酮)来处理,因未能产卵,也未成功,认为投喂时间要延长至 30 天以上。

在获得鲑鳟全雌群体上,已知鲑鳟雄鱼生长一年后即性成熟,停止生长,肉的质量也下降,不久即死亡,而且孵化场生产所需的雄亲鱼数仅为雌亲鱼数的几十份之一。Hunter (1983)在大鳞大麻哈鱼上,把孵化后 4 天和 11 天的鱼苗放在含有甲基睾丸素 400 微克/1 升的水中浸浴 2 小时,再在孵化后 47 天投喂含有甲基睾丸素 3—9 微克/1 克饵料 3—9 天,最后将性反转的假雄鱼(XX)与正常雌鱼(XX)交配,可产生全部为雌鱼的单性群体。

已知鲑鳟的性决定为 XY 型,也可用 γ 或 X 射线处理精子,剂量为 10^8 拉德,使精子在遗传上失活。“受精”后 5 分钟(即处在第一次卵裂中期),用每平方厘米 650 公斤的水静压处理 6 分钟,使染色体加倍,倍化率可达 100%,但异常胚占 40%左右,一般认为这是由于隐性有害基因的纯合得到表现的结果,如果不经加压处理,则出现单倍体综合症,表现为矮小、体弯、心脏不正常、小眼等症状,孵化前全部死亡。为了获得大量全雌群体,把从雌核发育得到的鱼苗(XX),在性腺未分化前用雄性激素作浸浴和投喂处理,获得假雄鱼,再以此假雄鱼与正常雌鱼交配,可产生全部为雌性的群体。

在鱼类中,也有自然发生的多倍体,如分布于我国黑龙江水系的银鲫和产于云南滇池的高背鲫都是三倍体,它们具有个体大,生长快、内质好、适当性强等优良性状,因此,人们就设想,自然界尚如此,那么用人工的方法诱发产生多倍体又何偿不可。

诱发产生多倍体的方法,归纳起来,不外乎杂交的、物理的以及化学的三种(楼允东,1984)。其机理是由于卵子第二次成熟分裂时第二极体的保留或受精卵第一次有丝分裂的抑制(Chourrout, 1984)。

获得鱼类三倍体的主要目的有二。一是利用其不育性使营养物质用于生长,从而提高了产量;二是不育的三倍体还可能比二倍体存活得更久,因此长得更大。已知虹鳟三倍体雌鱼(XXX)是不育的,故有利用三倍体获得巨型鱼的设想。Lincoln(1983)曾以热($27-28^{\circ}\text{C}$)处理虹鳟受精卵 0—45 分钟后的卵 10 或 15 分钟得到三倍体,并认为利用假雄鱼与正常雌鱼交配,并接合热处理产生不育的三倍体全雌虹鳟,在水产养殖上是有意义的。冈田风二(1985)以假雄性虹鳟所产的精子与正常雌性虹鳟所产的卵受精,受精后 15 分钟用水静压(650 公斤/厘米²)处理 6 分钟,诱发得不育的三倍体雌性虹鳟(XXX),诱发率高达 96%。利用三倍体不育的另一目的是控制鱼类的过度繁殖,如美国于 1964 年引进草鱼后,由于不能控制其自然繁殖而成为有害的了。为了培育放流后不能繁殖的草鱼,除用雌核发育产生的全雌纯合系外,也用人工诱导的方法(温度处理)产生不育的三倍体(Cassani 等,1985)。最近,上野絃一(1985,1986)培育出不育的三倍体香鱼($3n=84$)。已知香鱼通常于晚秋产卵后即死亡,如果把受精后 5 分钟的卵浸在 $0-0.2^{\circ}\text{C}$ 的冰水中约 1 小时,可诱发产生不育的三倍体达 93.3%(孵化率在对照组上为 5.5%,在试验组上为 45%),它不但能把营养物质转到生长上,个体比一般二倍体大 3—4 成,成为生长上的

优势,而且越冬后仍能继续生长。

雌核发育是自然中一种较少见的生殖现象,是指卵子需要精子的激活而不需要精子提供遗传物质的一种单性生殖,因此发育的后代完全表现母本的性状,而且全部是雌鱼。

人工诱发的雌核发育,即用经紫外线, X 和 Y 等射线或用化学药品处理后的精子与正常的卵子受精,再在适当时机对这种“受精卵”施以冷、热、高压物理或化学药物处理,使其自身染色体加倍而发育为正常的二倍体。

对鱼类人工雌核发育的研究,是50年代后期从苏联开始的,首先在泥鳅、鲤、鲫上进行试验,后又扩大至草鱼、鲢、鳙、鲟科等鱼类上。我国于70年代开始研究鱼类的人工雌核发育,1975年首先在红鲫上获得成功,后又获得了草鱼、鲢、鳙、银鲫等雌核发育鱼。最近日本“养殖”杂志(1985年12期)上有报导利用雌核发育在保持金鱼、锦鲤优良性状上获得成功。在金鱼上是用经紫外线照射过的泥鳅精子受精,剂量为12,000尔格,受精后在水温零下1.4℃处理20分钟,卵孵化的约有35%,全部为雌鱼。在锦鲤上,用的是镜鲤的精子,紫外线照射也为12,000尔格。受精后在0℃下处理30分钟,最高孵化率为8.8%。

研究鱼类人工雌核发育的目的,主要是:

1. 快速建立纯系 已知许多经济性状是由多基因控制的,如果用传统的近亲交配的方法,至少要经过8—10代的连续选育才能获得纯系,用人工雌核发育的方法,即用失活的精子激活和抑制第二次成熟分裂或第一次卵裂使卵子本身染色体加倍的方法,则在一个世代中就可得到一定程度的纯合体,如果再在第二代继续进行雌核发育就可获得高的纯合系,一切性状就很快得到固定。另外,鱼类纯合系的获得也为杂交育种提供了亲本。

2. 应用于性别控制的假雄鱼制种法上 通过雌核发育生产的鱼苗(XX),在性腺未分化时用雄性激素处理,以此性反转的假雄鱼(XX)与正常雌鱼(XX)交配,可获得大量生产全部为雌鱼的群体,像在鲢、鳙上。

3. 培育具有生长优势的品种,直接投入生产 蒋一珪(1983)用兴国红鲤的精子与东北方正银鲫的卵“受精”所产生的雌核发育后代(异育银鲫),具有明显的生长优势,生长速度比方正银鲫快30%左右,说明异种精子对雌核发育后代的发育也有影响。1985年异育银鲫夏花鱼种繁育量达50—100亿尾之多,养殖面积已达50—100万亩,经济效益显著,这是我国利用雌核发育进入实用阶段的标志。

4. 通过雌核发育,稳定杂种优势 现在,在鱼类上还不能抑制第一次成熟分裂获得雌核发育的二倍体,如果这将来能实现的话,则所得到的后代不出现分离现象,也与母体雌鱼一样是杂合体,这为保持某些鱼类的杂种优势提供了方法。

5. 大幅度提高选择效率 已知任何个体都含有一些有害的隐性基因,但这些基因是以杂合状态存在不表现于外,要在群体中完全除去这些基因是很困难的。通过雌核发育产生的二倍体是纯合体,一切有害的隐性基因都表现于外,因此能容易从群体中除去这些基因,尤其是致死的隐性基因,被自然所淘汰,这也有助于提高选择效率,简化育种过程,缩短育种时间。

此外,人工诱发雌核发育还可为研究鱼类品种变异,检查近亲交配后果提供了一种快速的有效手段;获得遗传上的一致性也可用于准确评价各种环境因子对某些个别性状的影响;与其他育种技术如辐射或化学诱变等结合,其应用范围更加广泛。

总之,目前人们对人工诱发雌核发育中有关破坏精子染色体的射线剂量,提高卵子二倍化的比率和适宜的处理时间,二倍化的原因及雌核发育后代生殖能力等有了一些认识,但还未达到控制自如的水平。国内外许多学者正努力探索如何提高失活精子和二倍化个体的比例,开发有效地鉴别雌核发育鱼的遗传标志和应用于养鱼生产的途径。

这里值得一提的是,已知鱼类的精子也可用冰冻或低温保存,这样可保存少数濒于绝灭物种的精子。复活时,可将解冻后的精子与失活的近缘种的卵子受精,通过雄核发育,在性决定为XY型的鱼类上,按理可获得雌鱼和超雄鱼,这对保存基因资源和濒于绝灭物种是有意义的。

现将正常发生的二倍体、诱发的雌核发育单倍体、雌核发育二倍体、三倍体、四倍体、雄核发育单倍体、雌核发育二倍体的操作过程,图解如下:

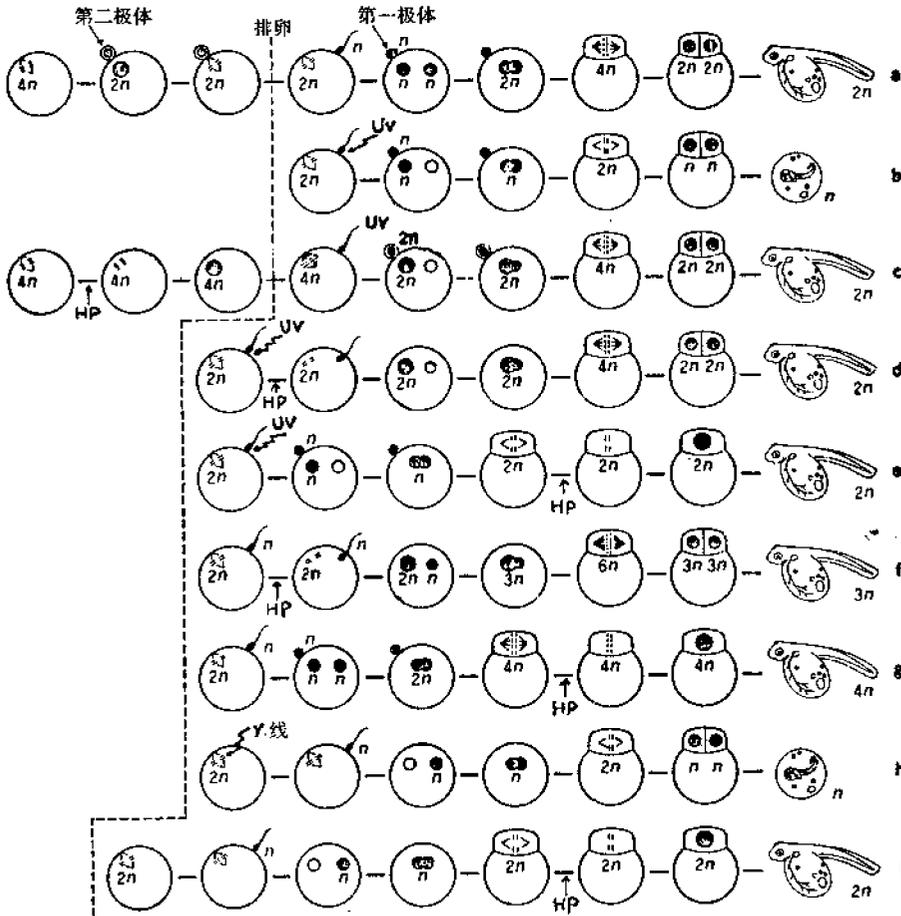


图1 染色体操作(小野里坦,1984)

a、正常发育, b、雌核发育单倍体, c、抑制第一次成熟分裂产生的雌核发育二倍体, d、抑制第二次成熟分裂产生的二倍体, e、抑制第一次卵裂产生的雌核发育二倍体, f、三倍体, g、四倍体, h、雄核发育单倍体, i、雌核发育二倍体。

二、缩短紫菜的生活史

已知紫菜食用的叶状体是单倍体($n = 3$), 夏季潜入贝壳中的丝状体是双倍体($2n =$

6)。岩崎英雄(1972)曾在室内进行紫菜自由丝状体的培养,并获得成功,由生产实践证明,30克的新鲜自由丝状体可采一亩网帘的紫菜苗,大大地节约了人力和物力,并投入生产。赵焕登等(1984)进行条斑紫菜营养细胞的分离培养试验,证明单个营养细胞在适宜条件下也具有发育为小紫菜的全能性。

已知高等植物的细胞壁主要成分为纤维素,但在海藻上则由另一种多糖类构成,因此用纤维素酶和果胶酶分解海藻胞壁是无效的。从摄食海藻的海胆、海螺、鲍等,可以推论这些动物的消化腺一定能分泌一种分解海藻胞壁的酶。据唐延林(1982)的试验,从一种粒棘螺(*Turbo coronatus granulatus* Gmelin)消化腺里提取了一种复合酶,对紫菜细胞壁有较好的分解能力,获得大量单个营养细胞,再经过培养可产生“孢子”,这种孢子也能通过萌发,发育为正常的小紫菜,这为紫菜育苗开辟了一条新的途径。方宗熙等(1986)也利用酶法分离条斑紫菜和坛紫菜,进行采苗试验获得成功。

紫菜酶法采苗的研究成功,是生物技术在水产养殖中的首次应用。它的优点在于:(1)省去了紫菜丝状体培育等养殖环节,可避免若干病害,节省大量人力物力;(2)能有效地控制采苗密度和时间,它摆脱了季节的限制,从而掌握住生产的主动权;(3)为紫菜的遗传育种提供了新的方法;(4)为南方品种在北方养殖提供了可能,也为南方开展条斑紫菜和坛紫菜等多品种养殖提供了方便。

鬼头钧(1983)提出从紫菜所患的一些细菌性疾病,可推断这些细菌本身能分泌一种消化海藻胞壁的酶,如果用遗传工程的方法,将控制产生这种酶的基因转移到大肠杆菌染色体上去的话,则可通过发酵大量生产分解紫菜叶状体胞壁的酶,再将消化后的裸露原生质体撒在网片上,也可发育为完整的叶状体,这样就缩短了紫菜的生活史。

三、海带的配子体无性繁殖系和雌性孢子体

已知海带的孢子体是雌雄同体的,所产生的孢子体约有一半萌发成为雌配子体,另一半萌发成为雄配子体,看来在海带配子体中出现的性别分化与遗传有关。雌雄配子体在连续光照下能继续生长和分裂,得到了雌配子体和雄配子体的无性繁殖系(clone),这样就把短命的配子体转化为长寿的配子体,有利于用海带配子体进行遗传育种的研究。而且还发现在雌配子体中,有一部分细胞通过染色体加倍既由孤雌生殖成为雌性孢子体($2n=44$),成熟时也能放散孢子,但全部萌发生长成为雌性孢子体,这表明海带孢子体的性别是有其遗传基础的。有趣的是海带雄性孢子体多数是畸形的,生长缓慢,个体较小,在数百棵海带中未发现一棵是能育的。据对雄性孢子体进行细胞学上的观察,发现都是单倍体(戴继勋,个人通讯)。

四、细胞核的移植和外源信使 RNA 注射

1984年日本农林水产部召开了会议,提出利用细胞融合和核移植进行新生物资源开发规划的研究,把一些鱼类的细胞核移入除去核的另一种鱼的卵内,以期获得所需的一种新的鱼类作为目标。现在开始着手的是一些有关核的移植技术,包括卵膜除去法,成熟卵保存法,卵核摘出或破坏法。现将利用核移植制作杂种鱼的技术图解如下:

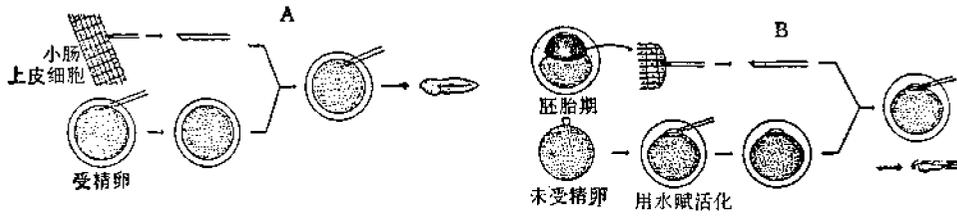


图2 利用移植细胞核法制作杂种鱼之技术示意图

A—组织易核法； B—胞胚易核法

图A是当鱼卵受精完了,即雄性原核和雌性原核刚刚融合,立刻用吸针把那棵细胞核剔除,另外把培养的别种鱼类小肠上皮细胞核取出,移植到去核的受精卵内,当作鱼类的细胞核用。图B为先把未受精鱼卵在水中使之赋活,用吸针将卵中核除去,同时将另一种鱼的受精卵,当发育到囊胚期时,取出核,移进未受精去核的卵内,这两种方法都是利用核移植制作杂种鱼的育种新法。

童弟周等(1973)曾在金鱼、鲫鱼间做过核移植试验,就是把金鱼发育至囊胚期的细胞核(如图B所示)移植到去核的鲫鱼卵内,等发育至囊胚时,再取囊胚期的细胞核移回到去核的金鱼卵内。这样得到的“杂种”鱼兼具有金鱼和鲫鱼的性状,这一研究主要是探讨核和质在动物发育遗传上的作用,尤其是细胞质的作用。中国科学院动物研究所等(1980)做过鲤、鲫间的核移植,就是把鲤鱼受精卵发育至囊胚期的细胞核移植到去核的鲫鱼未受精卵内,用这样方法得到的“鲤鲫核质杂种”既具有鲫鱼的性状,也有鲤鱼的性状,而且是可育的。

童弟周、牛满江(1973,1975)又从鲫和鲤的成熟卵提取信使RNA,注射到金鱼受精卵内,结果部分金鱼的尾鳍由双尾变为单尾,认为外源信使RNA能改变生物的原有性状,而且能遗传。

在核和质的相互关系上,苏联著名的鱼类遗传育种家Kirpichnikov(1981)在其“鱼类育种的遗传学基础”一书中云:“一直到现在为止,还没有在鱼类上发现一个非染色体遗传的例子。唯一的例外是在某些杂交上较为广泛分布的偏母遗传(matrochinal inheritance)或母体性状的优先传递(preferential transmission of maternal traits)。偏母遗传在家养鲤和野生鲤变种上是明显的,也在鲤和鲫间杂交上。偏母遗传是依据以下一个或更多机制:1.母体染色体的大量产物(信使RNA和蛋白质)在成熟卵细胞质和卵黄上的积累,这使母体性状在胚胎发育早时得到表现,这也使雄性亲本基因只能在晚囊胚期,有时甚至更晚发生作用。2.细胞质内具有DNA和控制特定蛋白质合成的结构,线粒体具有这些特点,这种非染色体基因的传递是属于母系的,也就是通过卵细胞而具有稳定的母体遗传。看来,鱼类上大多数偏母遗传的例子是由于母本基因型的后效,母本性状的母体遗传。在相继世代中消失”。

总之,以核移植作为鱼类育种的一种新技术,应该说还处在探索阶段,离开生产上的应用还有一定的距离。

五、细胞融合

细胞融合又称体细胞杂交,为缩短动植物育种年限,克服远缘杂交不亲和性,扩大遗传重组,增加变异,创造新品种开辟一条新的途径。

在动物细胞上,日本是最早进行鱼类和鼠间的细胞融合试验,但也发现有鱼类染色体受到排斥的现象。据报导,实验时所用的鼠细胞是不能合成一种酶的一个株,而鱼类的染色体则具有合成这种酶的能力,融合后的细胞并没有排除这一条染色体,因此杂种细胞仍能合成这种酶的能力。小岛吉雄(1983)认为进行与鱼类育种有关的细胞杂交的研究,首先要开展鱼类细胞培养的基础研究。

有兴趣的是最近发表于台湾中国水产(1986)上的“农业生产结构之调整与有关科技之改进”一文中,有提出利用细胞融合瘤技术产生单克隆抗体,作为动物疾病检验试剂的开发,对早期防止养殖鱼贝类的病毒性疾病、赤鳍病及红斑病的流行具有重要意义。

近十多年来,对高等植物细胞融合的研究有了很大的进展。要在海藻上进行细胞融合,同样要首先获得原生质体。据 Cheney(1986)所收集的资料,知到目前为止,用多细胞海藻获得原生质体的共有 15 个物种,包括绿藻 3 个属 7 个种,褐藻 4 个属 7 个种,红藻中只有紫菜、江蓠 2 个属 4 个种。

夏镇澳等(1979)用绿藻石莼、红藻多管藻、仙菜、坛紫菜作原生质体分离的初步试验,获得了石莼的原生质体,在多管藻上获得一些带壁的细胞,紫菜的去壁效果最差,因此认为海藻细胞壁组成与高等植物上不同,对高等植物去壁处理方法在藻类上不完全适用。张大力(1983)在长石莼和袋礁膜间进行细胞融合试验,结果表明只有用幼嫩新鲜的藻体制备的原生质体进行融合才有可能成功,而且融合率的高低又与融合液和洗涤液有关。融合后的细胞经过培养后虽能形成细胞团,但尚未得到再生植株。Cheney(1984,1986)在 2 种江蓠(*Gracilaria tikvahiae* 和 *G. lemaneiformis*)上,获得原生质体,并见有 2 个新生的原生质体发生融合,经过分裂形成细胞团。

已知海带是一种二年生的大型藻类,在日本的分布以南至宫城县为限。荒布(黑海带)是野生的,可生长 7—8 年,在南方也有分布。鬼头钧(1983)提出通过海带和荒布间的细胞融合,如果能得到一种多年生种间杂种的话,则在南方海域也能生长,成为海洋中的藻林,作为海胆、鲍的饵料,那是很有意义的。

六、珍珠品质控制的可能性

以往珍珠培育,都是切取别的珍珠贝的外套膜小片,再将此小片与珠核一起插入贝内。但一只贝只能供应十个左右插核用的小片,而且小片的好坏又关系到成珠的质量,即使移植了优质的外套膜小片,也不能确保移植的质量。现在,日本东京水产厅养殖研究所已研究成功了外套膜细胞悬液,他们采用优质珍珠贝外套膜细胞,在试管或烧瓶中进行组织培养。然后,将珠核浸入培养液内便附上外套膜细胞,再插入马氏珍珠贝内,这样,附在核表面的细胞便可生长、增殖并分泌出珍珠层。这种核移植手术很简单,也可解决优质外套膜细胞的持续供应,所以采用这一方法可大大提高成珠效率。该研究所还计划马氏珍珠贝和黑碟贝的外套膜细胞融合,把这种融合细胞用组织培养法加以保存,然后再移入

珍珠贝中,以制作至今未有的色彩艳丽多变的新型珍珠。

七、鲍和鲑鳟的遗传工程

最近 Morse(1984)在“改良鲍和其他经济贝类生产的生化和遗传工程”一文中,提出用遗传工程的方法,从精子中提取 DNA,再用 DNA 限制性内切酶切除,获得与控制生长激素合成有关的基因,再将此基因与切断的质粒结合在一起,构成重组 DNA,由这些重组体引入受体细菌或酵母菌内增殖,达到生长激素和抗阻因子(如干扰素)的大量生产。Morse 认为采用这种遗传工程的技术,效果是显著的,廉价的,而且易于使用,这也应用于牡蛎、扇贝、贻贝、硬蛤等其他经济贝类上。

现在在贝类上大量生产生长激素和抗阻因子图解如下:

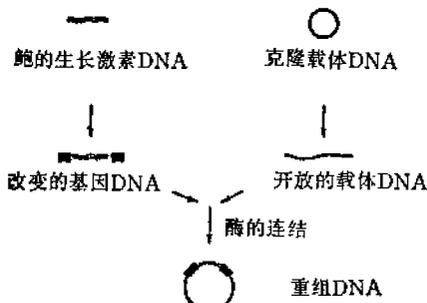


图3 DNA重组

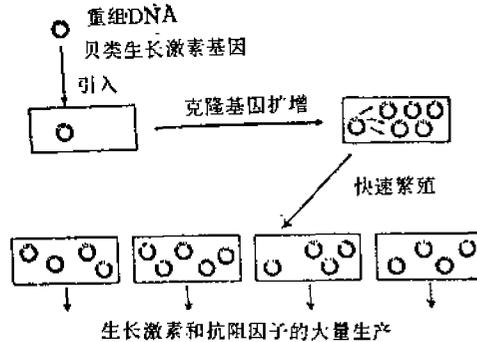


图4 贝类生长激素基因的克隆和扩增

据高桥明义等(1985)报导,日本协合发酵工业株式会社和北里大学,用遗传工程的方法,通过基因重组由大肠杆菌生产大麻哈鱼生长激素获得成功。对平均体长9厘米,体重11克的虹鳟稚鱼,每隔4天注射一次,剂量为1微克,连续7次腹腔注射后,到第40天体长可达11.3厘米,体重22克,而对照组体长为9.3厘米,体重13.8克,即实验鱼平均体长为对照鱼的1.2倍,在平均体重上为1.6倍。

英国《星期日泰晤士报》1984年6月30日报导,英国南安普敦大学用遗传工程将来自鼠和蛙的三个外来基因移入虹鳟,望能培育出一种新超鳟鱼品种。第一个基因来自鼠,表现有抗重金属的特性,这样使超鳟鱼能在含有因酸雨所释放的重金属水域中生长。第二个基因来自蛙,具有控制一种球蛋白合成的能力,从而提高了这种鱼的吸收率,可生活在比一般水温要高的水域中,并且在低氧含量时仍能生存。第三个基因来自鼠,它控制生长激素的产生,结果使超鳟鱼比普通鳟鱼长得既快又大。所有这三个基因,已被分离,通过在体外人工繁殖的方法形成克隆。他们相信,将带有该基因的克隆细胞核移入去核的未受精鳟卵内,基因会得到表达。

参 考 文 献

- [1] 杨永铨等, 1979. 莫桑比克罗非鱼性别生理遗传控制的初步研究. 遗传学报, 6(3):305—310.
- [2] ———, 1980. 应用三系配套生产遗传上全雄莫桑比克罗非鱼. 遗传学报, 7(3):241—246.
- [3] ———, 1981. 人工诱导鱼类雌雄核发育的实验研究, 淡水渔业, 4:1—4.
- [4] 蒋一珪等, 1982. 鲫鱼人工和天然雌雄核发育. 水生生物集刊, 7(4):471—480.

- [5] 蒋一珪等,1983. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学集刊, 8(1):1—13.
- [6] 童弟周等,1963. 鱼类细胞核的移植. 科学通报,7:60—61.
- [7] 童弟周等,1973. 鱼类不同亚科间的细胞核移植. 动物学报,19(3):201—212.
- [8] 童弟周、牛满江,1973. 核酸诱导金鱼性状的变异. 中国科学,4:389—394.
- [9] 童弟周、牛满江,1975. 由核酸诱发所产生的单尾鳍金鱼的子代. 中国科学,3:295—301.
- [10] 童弟周、牛满江,1977. 鲤鱼信使核糖核酸对金鱼尾鳍变异的作用. 中国科学, 2:146—148.
- [11] 中国科学院动物研究所细胞遗传研究组等,1980. 硬骨鱼类的细胞核移植——鲤鱼细胞核和鲫鱼细胞质配合的杂种鱼. 中国科学, 4:376—380.
- [12] 崔悦礼、管瑞光,1982. 滇池高背鲫鱼雌核发育的研究. 动物学研究, 3(增刊):237—242.
- [13] 陈宏溪,1983. 鱼类的雌核发育. 鱼类学论文集, 3:135—146.
- [14] 吴清江等,1981. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究. 遗传学报, 8(1):50—55.
- [15] 丁瑞华,1977. 池养条件下银鲫与鲫鱼的生物学特性比较及其生产上的意义. 水生生物学集刊, 6(2):163—176.
- [16] 楼允东,1984. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报, 8(4):343—356.
- [17] 楼允东,1986. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用. 水产学报, 10(1):111—123.
- [18] 余廷基、赖仲义,1984. 吴郭鱼苗增产技术试验. 养鱼世界(台湾),9:84—94.
- [19] 袁世贤,1985. 鱼类育种新技术,遗传工程之理论及其应用. 养鱼世界(台湾),9:32—37.
- [20] “台湾行政农业委员会”, 1986. 农业生产结构之调整与有关科技之改进. 中国水产(台湾),2:3—9.
- [21] 夏镇澳等,1979. 海藻原生质体的分离. 水产科学实验, 厦门水产学报, 2:13.
- [22] 陈国宜,1980. 关于坛紫菜自由丝状体的培养和直接采苗的研究. 水产学报, 4(1):19—30.
- [23] 唐延林,1982. 紫菜营养细胞和原生质体的分离和培养. 山东海洋学院学报, 12(4):37—50.
- [24] 张大力,1983. 两种绿藻——长石莼和袋藻膜原生质体的制备、培养和融合. 山东海洋学院学报, 3(1):57—65.
- [25] 赵焕登、张学成,1984. 条斑紫菜营养细胞分离培养试验. 水产学报, 8(3):197—201.
- [26] 戴继勋、方宗熙,1976. 单倍体在海带遗传研究中的应用. 遗传学报, 7(1):19—25.
- [27] 方宗熙、戴继勋,1980. 海带孤雌生殖的初步观察. 遗传学报, 3(1):32—38.
- [28] 方宗熙等,1986. 紫菜营养细胞的酶法分离和在水产养殖中的应用. 海洋科学, 10(3):46—47.
- [29] 小島吉雄,1979. 鱼类的细胞遗传学. 水产生物的遗传与育种. 水产生シリーズ26,46—63. 水产学シリーズ26, 恒星社厚生阁.
- [30] 鈴木亮等,1984. バイオテクノロジー——の水産の展开(上). 水産の研究, 2(3):17—29.
- [31] 鈴木亮等,1984. バイオテクノロジー——の水産の展开(下). 水産の研究, 2(4):16—33.
- [32] 岡田凤二,1985. 全雌化不妊化によるニジマス大型魚の生産. 养殖, 22(2):48—51.
- [33] 上野紘一,1985. A₃养殖に対する倍数体育種の導入. 养殖, 22(5),62—65.
- [34] 上野紘一,1986. 鱼类における三倍体の不妊性とその利用. 水産の研究, 5(6):78—79.
- [35] 上野紘一,1986. 染色体工学の基づくライラピア不妊化技術. 养殖, 23(11):104—105.
- [36] 小野里坦,1984. サケ、スズの染色体工学と应用. 遗传, 38(8):17—23.
- [37] 小野里坦,1984. 魚の雌性、雄性発生とその应用. 细胞工学, 13(7)643—650.
- [38] 小野里坦、山羽悦朗,1982. 紫外线照射によるサケ目鱼类4種の雌性発生誘起. 日本水产学会志, 48:1237—1244.
- [39] 鬼头钧,1985. 生物技术在紫菜研究中的应用. 国外水产, 2:3—5.
- [40] 高桥明义、川内浩司,1985. サケ成長ホルモンの成長促进作用. 养殖, 22(8):102—105.
- [41] Cassani, J. R. et al., 1985. Induced triploidy in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* Val. *Aquaculture*, 46(1): 37—44.
- [42] Cheney, D. 1984. Genetic modification in seaweed: applications to commercial utilization and cultivation. In Colwell, R; Parisier, X. & Sinkey, A. (Eds.) *Biotechnology in the Marine Science*. Wiley-Interscience, New York, pp. 161—175.
- [43] Cheney, D., 1986. Genetic engineering in seaweed: applications and current status. *Beihfte Zur Nova Hedwigia*
- [44] Cheney, D. et al., 1986. Protoplast isolation and cell division in the agar-producing seaweed *Grac-*

- Mar's (Rhodophyta). *J. Phycol.* **22**:238-243.
- [45] Courroux, D., 1984. Pressure induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout; production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics *Aquaculture*, **38**: 111-116.
- [46] Gervai, J. et al., 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.* **17**(6): 667-671.
- [47] Hopkins, K. D. et al., 1979. Estrogen sex-reversal of *Tilapia aurea*. *Aquaculture*, **18**(3):263-268
- [48] Hunter, G. A. et al., 1983. Production of monosex female groups of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. *Aquaculture*, **33**, 355-364.
- [49] John, G. et al., 1984. Artificial gynogenesis in two Indian major carps, *Labeo rohita* (Ham.) and *Catla catla* (Ham.) *Aquaculture*, **42**(2):161-168
- [50] Johnstone, R., 1985. Induction of triploidy in Atlantic salmon by heat shock. *Aquaculture*, **49**(2): 133-139.
- [51] Lou, Y. D. and Purdom, C. E., 1984. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, **24**: 665-670.
- [52] Lou, Y. D. and Purdom, C. E., 1984. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Fish Biol.*, **25**: 345-351.
- [53] Morse, D. E., 1984. Biochemical and genetic engineering for improved production of abalones and other valuable molluscs. *Aquaculture*, **39**(1-4): 263-282.
- [54] Kirpichnikov, V. S., 1981. Genetic bases of fish selection. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [55] Lincoln, R. F. and Scott, A. P., 1983. Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture*, **30**: 375-380.
- [56] Nagy, A. et al., 1979. Genetic analysis in carp (*Cyprinus carpio*) using gynogenesis. *Heredity*, **43**: 95-40.
- [57] Onozato, H., 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture*, **43**: 91-97.
- [58] Purdom, C. E., 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, **33**: 287-300.
- [59] Suzuki, R. et al., 1985. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, **48**(1): 45-55.
- [60] Suzuki, R. et al., 1985. Survival, growth and sterility of induced triploids in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **51**: 889-894.
- [61] Refstic, T., 1983. Induced of diploid gynogenesis in Atlantic salmon and rainbow trout using irradiated sperm and heat shock. *Can. J. Zool.* **61**(11): 2411-2416.
- [62] Valenti, R. J., 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *J. Fish Biol.* **7**: 519-528.
- [63] Wohlfarth, G. and G. Hulata, 1983. Applied genetics of *Tilapia*. ICLARN. Studies and Reviews, **6**, 26 pp.
- [64] Yamazaki, F. 1983. sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, **33**: 329-354.