

文章编号: 1004 - 7271(2005)04 - 0437 - 07

·综述·

罗非鱼染色体组操作研究现状与展望

Current situation and prospects of chromosomal manipulation in tilapias

邹曙明, 李思发

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

ZOU Shu-ming, LI Si-fa

(Key laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem, Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 罗非鱼; 雌核发育; 雄核发育; 三倍体; 四倍体

Key words: tilapias; gynogenesis; androgenesis; triploid; tetraploid

中图分类号: S 917 文献标识码: A

罗非鱼属鲈形目(Perciformes), 丽鱼科(Cichlidae), 约有 700 种, 主要分布于非洲。按照 Trewavas^[1]分类法, 可把罗非鱼分为 3 个属, 即 *Tilapia* 属、*Sarotherodon* 属和 *Oreochromis* 属。目前, 有生产应用价值的主要是 *Oreochromis* 属的尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)、奥利亚罗非鱼(*O. aureus*)以及莫桑比克罗非鱼(*O. mossambicus*)^[2]。

罗非鱼具有生长快、食性杂、繁殖快、产量高和味道鲜美而少刺等优良特征, 近年来, 全球罗非鱼养殖产量逐年递增, 现已成为世界性主要养殖鱼类之一。这就迫使人们不断对养殖罗非鱼进行遗传改良, 以防其种质退化。当前, 国内外除了人工选育和性别控制外, 主要是通过染色体组操作技术来进行罗非鱼的遗传改良。首先想到的是生产不育的三倍体, 试图利用其不育性来解决性早熟及养殖过程中的过度繁殖等问题。生产三倍体的最早尝试是由 Valenti^[3]在奥利亚罗非鱼上进行的。随后, 人们进行雌核发育和雄核发育以搞清罗非鱼性别决定的机制, 从而为大规模生产单性罗非鱼奠定理论基础^[4,5]。另外, 染色体组操作能够生产出高度近交系和克隆系, 而且还能从低温冷冻保存的精液中恢复丢失的基因型。

罗非鱼染色体组操作研究的对象主要集中在生产上广泛应用的 3 个种, 即尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼以及莫桑比克罗非鱼, 到目前为止还无对其它罗非鱼种进行染色体组操作研究的报道。本文综述了罗非鱼雌核(雄核)发育、多倍体(3n 与 4n)研究的国内外现状, 阐述了进行罗非鱼染色体操作的技术限制及实际应用。

收稿日期: 2004-01-02

基金项目: 上海市教委青年基金(科 00 - 102), 上海市重点学科建设项目资助(Y1101)。

作者简介: 邹曙明(1972 -), 男, 江西宜黄人, 副研究员, 博士, 主要从事水产动物种质资源与遗传育种研究。Tel: 021 - 65710705, E-mail: smzou@shfu.edu.cn

通讯作者: 李思发(1938 -), 男, 江苏镇江人, 上海水产大学首席教授, 博士生导师, 主要从事水产动物种质资源与种苗工程研究。Tel: .021 - 65710333, E-mail: lisifak@online.sh.cn

1 雌核(雄核)发育研究

1.1 雌核发育和雄核发育单倍体的诱导

采用遗传失活(UV照射)的罗非鱼精子与罗非鱼卵子受精,受精后不作任何处理,即可获得雌核发育单倍体(gynogens haploid)。在罗非鱼精子紫外线照射过程中,同样存在“Hertwig效应”,精子在UV照射一定时间后,随着照射强度的增加,精子诱发雌核发育的能力反而大幅度提高,最高可使90%的卵进行胚胎发育^[3]。对于尼罗罗非鱼,UV照射剂量依不同作者研究结果而异,如Penman等^[6]认为200 J/m²最佳,而Casayuran^[7]的研究却显示剂量为360~372 J/m²更合适;对于奥利亚罗非鱼,照射剂量为1 228~2 763 J/m²^[3];而对莫桑比克罗非鱼,照射剂量为1 764~2 520 J/m²^[8,9]。3种罗非鱼雌核发育单倍体孵出后的存活时间均不超过48 h,表现出典型的“单倍体综合症”。到目前为止,尚无研究显示在罗非鱼中也存在自发的染色体加倍现象,而此现象在鳎(*Pleuronectes platessa*)^[10]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[11,12]中是存在的。

罗非鱼雄核发育单倍体则是通过紫外线照射(430~540 J/m²)卵子,使卵子染色体遗传失活,再与正常精子受精,不经休克处理而产生的。有30%的雄核发育单倍体胚胎可顺利发育到色素期^[13]。

1.2 雌核发育和雄核发育二倍体的诱导

采用物理休克如冷、热和静水压处理受精卵(精子已经遗传失活),可诱导产生雌核发育二倍体。早期二倍化诱导是通过抑制第2极体排出而实现的,称为减数分裂雌核发育(meiotic gynogenesis),由于产生的后代存在一定的杂合度,通常称为杂合雌核发育二倍体;晚期二倍化诱导是通过抑制胚胎第1次卵裂而实现的,称为有丝分裂雌核发育(mitotic gynogenesis),由于后代基因完全纯合,因此,又称为纯合雌核发育二倍体^[14]。

在莫桑比克罗非鱼中,受精后2.5 min,用热休克(42±0.5℃)处理3 min,可获得32~54%的杂合雌核发育后代^[8,15];在尼罗罗非鱼中,诱导率相对低些,受精后9 min,以55.12 MPa静水压处理2 min,杂合雌核发育后代的诱导率从0到63%,平均为24%^[16];在奥利亚罗非鱼中,采用与尼罗罗非鱼相同的热休克处理条件,平均只能获得2.1%的杂合雌核发育后代^[17],另外,Don等采用39.5℃热休克,对受精3 min的受精卵处理3.5~4 min,第2代杂合雌核发育后代的诱导率有所提高,达3.6%。不同的研究表明,奥利亚罗非鱼杂合雌核发育的诱导率较低,不同的雌鱼诱导率存在很大的差异^[8,18]。

由于纯合雌核发育后代基因完全纯合,隐性有害和致死等位基因表达的几率也大大提高,再加上罗非鱼卵子大、不透明等有别于一般鲤科鱼类的自然属性。因此,无论是采用热休克,还是静水压来处理后期受精卵(一般受精后25~40 min),获得二倍体雌核发育后代的成活率均很低。诱导尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及莫桑比克罗非鱼纯合雌核发育的平均成活率分别为2.9%、0.8%和0.8%^[8,18]。

罗非鱼雄核发育的研究在国内外还比较少^[19],由于精子不存在类似卵子的“第2极体”,因此,精子与遗传失活的卵子受精后,只能对受精卵进行晚期处理,即抑制第一次卵裂,获得完全纯合的雄核发育后代。Myers等^[20]分别在奥利亚罗非鱼、莫桑比克罗非鱼、尼罗罗非鱼以及安德逊尼罗非鱼(*O. andersonii*)中,诱导获得3%雄核发育二倍体。

相对而言,罗非鱼雄核发育和纯合雌核发育后代的诱导率均很低,除了因纯合导致的隐性有害和致死等位基因表达几率增加而产生的效应外,物理诱导也是造成存活率低下的的重要因素。例如,通常采用的热休克温度就已接近罗非鱼卵的致死温度^[21],这种极端休克处理在抑制受精卵卵裂的同时,也影响到胚胎的正常发育,降低了细胞质酶的活力。此外,完全纯合也可能引发中期分裂相染色体拓扑结构的紊乱而导致死亡^[22]。

2 多倍体研究

2.1 三倍体诱导

国内外对罗非鱼多倍体的研究,大多集中在诱导三倍体上,即通过抑制正常受精卵第2极体的排出而实现。通过冷休克、热休克或静水压处理,在尼罗罗非鱼^[23-25]、奥利亚罗非鱼^[3,25,26]及莫桑比克罗非鱼^[26,27]中均达到100%的三倍体诱导率。此外,还有诱导莫桑比克罗非鱼♀×红罗非鱼♂异源三倍体成功的报道^[28]。一般而言,通过静水压和热休克处理,诱导罗非鱼三倍体的效果较好,出苗率较高,但由于有效诱导区间较窄,需要对各个相关因子进行优化。

诱导的三倍体在孵化出苗后,经卵黄囊吸收,到达开口阶段的存活率较低,通常只有对照组的37~85%。异源三倍体后代的存活率较同源三倍体高。

2.2 四倍体诱导

通过抑制受精卵的第1次卵裂,可诱导产生四倍体。目前,进行尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及莫桑比克罗非鱼等3种养殖罗非鱼四倍体的诱导已成为热点之一。通过冷休克方法,已成功诱导出1.3~4%存活的奥利亚罗非鱼四倍体后代^[29];在尼罗罗非鱼和莫桑比克罗非鱼中,通过热休克和静水压休克仅获得2.9~12.5%的四倍体胚胎,还伴随着严重的身体和眼睛畸形,无四倍体苗存活到开口阶段^[13]。

另外,一些学者试图通过化学方法来诱导罗非鱼多倍体。理论上讲,采用专门抑制纺锤体形成的化学药物,诱导效果应高于专一性不强的物理休克处理。但实际上,不同的化学抑制剂诱导效果并不佳,用长春花碱(Vinblastine)在尼罗罗非鱼中诱导纯合雌核发育二倍体未获成功,采用秋水仙素和细胞松弛素B诱导莫桑比克罗非鱼也只获得少量嵌合体(2n~4n)^[27]。

3 罗非鱼染色体组操作的技术限制

3.1 人工授精

进行鱼类染色体组操作的先决条件之一,是获得未受精的、成熟的(处于4~5期)卵子。迄今为止,进行罗非鱼染色体组操作的卵子,一般是通过人工挤卵或采集自然成熟雌鱼自然排出的卵而获得。这要对雌鱼进行持续的监控,通过观察雌鱼泄殖空的膨胀程度、鳍条颜色和发情行为,掌握恰当的卵成熟度,挤出的卵才可用;另外,罗非鱼雌鱼不同个体成熟的同步性很差,每次获得卵子量少(1000个上下)。基于罗非鱼人工繁殖技术尚未完全取得突破,因此,成熟卵的数量和质量都会限制罗非鱼染色体组操作的效果。

3.2 父本遗传物质在雌核发育后代中的遗留

进行罗非鱼雌核发育诱导时,多采用同源精子,在进行精子UV照射时,并不能达到100%的遗传失活,这就不可避免在后代中引入少量的父本遗传物质。采用DNA指纹分析,在奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的雌核发育后代中,曾检测到少量的父本遗传物质残留^[30]。采用种间或属间精子诱导,利用远缘种遗传物质的渗入导致后代不能存活特性,可减少父本遗传物质的渗入。例如,利用*Tilapia*属中某些种的遗传失活的精子,诱导奥利亚罗非鱼、莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼进行雌核发育,杂种后代只有少量能存活^[31];采用遗传失活的鲤精子,诱导莫桑比克罗非鱼雌核发育,杂交二倍体后代不能孵化出苗^[15];采用遗传失活的鳊(*Siniperca chuatsi*)精子,诱导奥利亚罗非鱼的雌核发育,杂交后代虽能孵化出苗,但出苗率极低,仅千分之一、二,染色体检查为单倍体^[32]。然而,采用种间或属间精子也不能完全排除父本遗传物质渗入的可能性。理论上讲,采用物理或化学方法来直接诱导罗非鱼卵进行胚胎发育,是避免父本遗传物质渗入的最有效途径。然而,采用Ca²⁺来引发尼罗罗非鱼卵进行胚胎发育未获得成功。

3.3 休克方法

在进行罗非鱼染色体组操作时,采用何种诱导方法,应根据罗非鱼的种类和诱导目的而定。一般选择冷休克、热休克或静水压处理^[33]。抑制第2次减数分裂和第1次卵裂的有效诱导时间的精确判断,还有待于更深入的研究,如果有效诱导区间很小,就有必要对第1次卵裂前的胚胎发育特征进行研究,以及研究在不同阶段实施处理的效果。尼罗罗非鱼的初步研究结果显示,孵化温度对罗非鱼胚胎发育的同步性和发育速度有很大的影响,另外,热休克处理也会加速胚胎有丝分裂的速度。组织切片结果揭示尼罗罗非鱼受精卵约在受精后50 min进入第1次有丝分裂中期,这就意味着抑制第1次卵裂的有效起始时间为受精后30 min^[23],只有在较早期处理,才能更有效的抑制纺锤体的形成和细胞质的分裂。

3.4 遗传标记

遗传标记除了可用来探测父本遗传物质在雌核发育后代中的渗入现象外,还可用来区分杂合和纯合雌核发育。尤其在罗非鱼,具有产卵量小、发育不同步的特征,有的受精卵已发育到第1次卵裂,而另外部分受精卵还处于第2极体排出时期,诱导区间的部分重叠会同时产生杂合和纯合雌核发育后代,这就需要研究适当的分子遗传标记来进行检测。

生化遗传标记(*Ada*, *Ap* 和 *Me-2*)在家系中完全符合孟德尔遗传,可用来对杂合雌核发育的区分和计算其重组发生频率,这比形态和体色标记更准确和易行。其中最有效的标记为 *Ada* 位点,该位点在减数分裂过程中具有很高的重组频率,其在尼罗罗非鱼杂合雌核发育后代中达100%,在其它2种罗非鱼中的重组频率也很高^[34],因此,该位点可用来进行杂合或纯合雌核发育后代的区分。

3.5 倍性检测

在鱼类中,对染色体倍性进行检测的方法很多,不同的种类或许有些不同,但一般都采用核型分析、红细胞大小或DNA含量来检测。在上述具有养殖价值的3种罗非鱼中,二倍体染色体数目均为44,其中包括1对特大亚中部(sm)着丝点染色体,可方便用来进行倍体检测。进行血红细胞涂片,测量的红细胞的纵轴,可方便而有效地检测三倍体和四倍体^[29]。

3.6 雌核遗传失活

罗非鱼雄核发育诱导实验中,首先要对罗非鱼卵进行UV照射,破坏卵核染色体组,再与正常精子受精后,进行二倍化诱导处理。罗非鱼卵子较一般淡水、海水鱼类大许多,且卵子具有很厚的、不透明的外膜,对其进行UV照射难以使母本遗传物质失活^[19,20]。另外,由于UV照射使卵子细胞质成分也受到一定的影响,因此,雄核发育后代的诱导效率比纯合雌核发育还低。另一种方法为采用四倍体雄鱼的精子与遗传失活的卵子受精,不需休克处理,可直接产生雄核发育二倍体后代,但前提是必须先获得四倍体。

4 罗非鱼染色体组操作的实际应用

4.1 雌核发育

人工雌核发育的应用主要在性别控制、基因-着丝点作图、自交系的快速建立、产生单性种群、突变以及染色体组型研究等方面^[22]。罗非鱼雌核发育研究的最初目的也是为了快速建立近交系,雌核发育高度近交系可用于遗传图谱等诸多研究领域,雌核发育后代的基因组高度纯合,后代遗传表型非常一致,可作为免疫学和内分泌学研究中的实验生物。

有观点认为,通过建立雌核发育纯系,由于携带纯合隐性致死和有害基因的后代不能存活,可使得此类基因得以剔除;再进行不同纯系间的交配,可获得不同优良性状基因组合、遗传性能稳定的良种^[35]。Kinghorn^[36]曾对这种观点提出过异议,认为通过染色体组操作技术,尽管亦能大量诱导出高度纯合的雌核发育后代,但是雌核发育后代高度近交而导致的衰退,使得人们开始怀疑该技术在罗非鱼上的实用性。Komen等^[37]在鲤中的研究表明,纯合和杂合雌核发育后代的生长,存在着明显的近交衰退和

表型变异现象;但在繁殖力方面,雌核发育系后代的卵与兄妹近交系相比,具有很高的正常苗孵化率;另外,通过纯系间的杂交,体重和性腺发育程度的表型变异得以控制。因此,通过雌核发育进行罗非鱼遗传改良的前景还有待进一步研究的结果。

由于罗非鱼卵母细胞在形成卵子的过程中,姐妹染色体间具有较高的重组率,杂合雌核发育往往不能有效产生纯系。通过公式 $F = 1/2(2 - \alpha)$ 进行估计^[14],式中 $\alpha = 0.463$ (平均重组频率),可以计算出罗非鱼杂合雌核发育后代的近交系数为 0.77,这与鳙(0.79)^[10]和鲤(0.82)^[37]相一致;如果根据公式 $F = 1 - \alpha$,可得出罗非鱼杂合雌核发育后代的近交系数为 0.537,相当于 3~4 代全兄妹交配或 6~7 代半兄妹交配所达到的近交效果,与虹鳟($F = 0.44$)相类似。

尽管纯合雌核发育诱导率较低,其产生的后代为纯合(近交系数为 1),再通过第 2 次纯合雌核发育,就能获得完全纯合的克隆。通过不同克隆系之间的杂交,有望获得某些遗传性能改良的罗非鱼新品系^[30],但由于罗非鱼纯合雌核发育的诱导效率低下,应用于实际生产还有一段路要走。

纯合雌核发育技术还可用于罗非鱼性别控制。尼罗罗非鱼和莫桑比克罗非鱼的雌核发育后代中绝大部分个体性别为雌性,为 XX 型。如果对性转化雌鱼(XY)进行纯合雌核发育诱导,那么雌核发育后代中的雄性个体为 YY 超雄鱼,这种超雄鱼可用于生产全雄鱼^[4]。该技术可用来快速制作超雄罗非鱼,不必对子代进行任何检测,并且可有效剔除稀有“性别修饰基因”,以防在超雄罗非鱼子代中出现少量雌性个体^[5,17,38]。但是,杂合雌核发育就不能有效用于罗非鱼的性别控制,原因是,在尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼性染色体上的性别决定基因位点存在很高的重组概率^[4,5,17,38]。在生产全雄罗非鱼方面,尽管纯合雌核发育有很大的应用潜力,但其诱导率的低下和可能伴随的近交衰退,限制了其在罗非鱼性别控制上的应用。

4.2 雄核发育

通过诱导第 1 次有丝分裂,获得纯合雌核发育后代的诱导率很低。可以想象,通过同样的方法,诱导正常精子与遗传失活的罗非鱼卵子受精胚胎进行雄核发育也同样困难^[39]。低温保存的精液,可通过雄核发育使得保存的基因型得以恢复,尤其在当前国内外罗非鱼杂交现象非常普遍的情况下,在野生型罗非鱼尚未混杂前即对其精液进行保存,全面建立野生型基因库,在适当的时期采用雄核发育技术对野生型基因型进行恢复,就能实现罗非鱼种质资源的保护^[19,20]。

4.3 三倍体

三倍体鱼中的 3 套同源染色体,在进行减数分裂时,不能形成正常的二价体,从而产生了染色体数目不平衡的配子,往往导致三倍体鱼不育。因此,三倍体可用来解决罗非鱼的性早熟和过度繁殖问题,避免罗非鱼几代同“塘”,造成商品鱼规格小、产量低^[40]。尽管直接诱导的三倍体虹鳟生长速度并不优于二倍体^[41],但也存在这种可能,即三倍体罗非鱼由于不育,在性成熟后,生长速度可能快于二倍体;如在生产中采用三倍体鱼,就能有效控制过度繁殖所带来的生产危害,提高罗非鱼的商品规格。

然而,三倍体还处于研究阶段。尽管三倍体罗非鱼的性腺发育程度远远低于二倍体鱼,但其生产性能却不尽如人意^[42,43]。三倍体尼罗罗非鱼在循环水和水族箱中的养殖性能均劣于二倍体,三倍体奥利亚罗非鱼在孵化筒中的养殖情况也类似。此外,三倍体胚胎和仔鱼阶段的死亡率也高于二倍体^[44,45]。至于罗非鱼不育三倍体生产性能低下的原因是不育导致的生理变化如性激素释放影响了罗非鱼的生长,还是直接诱导造成胚胎损伤而引起的,尚缺乏研究。另外,由于罗非鱼不易进行人工授精和物理休克处理,这种直接诱导产生罗非鱼不育三倍体的技术在实际应用上存在很大缺陷,人们更倾向于采用性别控制方法,产出全雄罗非鱼来解决实际生产中的过度繁殖问题。

4.4 四倍体

四倍体罗非鱼的潜在应用价值为生产不育的倍间三倍体(通过与二倍体进行倍间交配),产生的倍间三倍体由于不育和基因杂合度的增加而提高生产速度。第 2 代四倍体虹鳟具有很高的胚胎存活率、优良的生产性能和较高的杂合度^[46]。倍间杂交的途径可为生产提供大量的不育三倍体罗非鱼苗种,这

是当前罗非鱼育种研究的方向之一。倍间三倍体虹鳟($4n♀ \times 2n♂$)的生长性能和存活率均显著高于直接诱导获得的三倍体鱼^[47]。另外,四倍体雄鱼精液($2n$)的低温保存,可为罗非鱼种质资源的有效保护提供一种重要的途径,可使罗非鱼的杂合基因型得以恢复,尤其在一些濒危种或品系中。因此,研究有效诱导获得罗非鱼四倍体的技术,是将来罗非鱼染色体组操作研究的热点^[31]。以往研究表明,鱼类四倍体的诱导率很低,但是,如果能够获得少量的可育四倍体,再通过交配就可获得一个四倍体群体,尽管这种四倍体群体只具有很窄的遗传基础,仍可为生产倍间不育三倍体提供物质基础^[48,49]。

本文承楼允东教授审阅,特此致谢!

参考文献:

- [1] Trewavas E. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia* [M]. London: Brit Mus (Nat Hist), 1983. 583.
- [2] 李思发. 中国淡水鱼类种质资源和保护 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 75.
- [3] Valenti R J. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (steindachner) by means of temperature shock treatment [J]. J Fish Biol, 1975, 7: 519-528.
- [4] Mair C G, Abucay J S, Beardmore J A, et al. Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L.: On station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations [J]. Aquaculture, 1995, 137(1-4): 313-323.
- [5] Mair C G, Abucay J S, Skibinski D O F, et al. Genetic manipulation of sex-ratio for the large-scale production of all-male tilapia. *Oreochromis niloticus* [J]. Cana J Fisheries and Aquatic Sciences, 1997, 54(2): 396-404.
- [6] Penman D J, Shah M S, Beardmore J A, et al. Sex ratios of gynogenetic and triploid tilapia [A]. In: K Tiews (Editor), proceedings of the World Symposium on selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture II [C]. Berlin: Heenemann, 1987, 267-274.
- [7] Casayuran M J C. Optimization of UV irradiation treatment and cytopreservation of *O. Niloticus* spermatozoa for induced gynogenesis [D]. Msc Thesis University of Stirling, 1992, 74.
- [8] Varadaraj K. Dominant red color morphology used to detect contamination in batches of *Oreochromis mossambicus* (Peters) gynogens [J]. Aquaculture Fish Manage, 1990, 21: 163-172.
- [9] Pandian T J, Varadaraj K. Development of monosex female *Oreochromis mossambicus* broodstock by integrating gynogenetic technique with endocrine sex reversal [J]. J Exp Zool, 1990, 255: 88-96.
- [10] Thompson D, Purdom C E, Jones B W. Genetic analysis of spontaneous gynogenesis in the plaice *Pleuronectes platessa* [J]. Heredity, 1981, 47: 269-274.
- [11] Cherfas N B, Rothbard S, Hulata G, et al. Spontaneous diploidization of maternal chromosome set in ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L [J]. J Appl Ichthyol, 1991, 7: 72-77.
- [12] 吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1999. 98.
- [13] Myers J M. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp [J]. Aquaculture, 1986, 57: 281-287.
- [14] Purdom C E. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes [J]. Aquaculture, 1983, 33: 287-300.
- [15] Varadaraj K. Production of diploid *Oreochromis mossambicus* gynogens using heterologous sperm of *Cyprinus carpio* [J]. Indian J Exp Zool, 1990, 28: 701-705.
- [16] Hussain M G, Penman D J, McAndrew B J, et al. Suppression of first cleavage in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. - a comparison of relative effectiveness of pressure and heat shocks [J]. Aquaculture, 1993, 111: 263-270.
- [17] Mair C G, Scott A, Penman D J, et al. Sex determination in the genus *Oreochromis*. I. Sex reversal, hybridization, gynogenesis, and triploidy in *O Niloticus* (L.) [J]. Theor Appl Genet, 1991, 82: 144-152.
- [18] Don J, Avitalion R R. Production of F₁ and F₂ diploid gynogenetic tilapias and analysis of the "hertwig curve" obtained using ultraviolet irradiated sperm [J]. Theor Appl Genet, 1988, 76: 253-259.
- [19] Marengoni N G, Onoue Y. Ultraviolet-induced androgenesis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and hybrid Nile x blue tilapia, *O Aureus* [J]. Aquaculture Research, 1998, 29(5): 359-366.
- [20] Myers J M, Penman D J, Basavaraju Y, et al. Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Theoretical and Applied Genetics, 1995, 90(2): 205-210.
- [21] Subasinghe R P, Sommerville C. Effects of temperature on hatchability, development and growth of eggs and yolk sac fry of *Oreochromis mossambicus* (Peters) under artificial incubation [J]. Aquaculture Fish Manage, 1992, 16: 121-127.
- [22] 楼允东. 鱼类育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 172-175, 190.
- [23] Hussain M G, Chatterji A, McAndrew B J, et al. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Using pressure, heat and cold shocks [J]. Theor Appl Genet, 1991, 81: 6-12.

- [24] Kim D S, Choi G C, Park I S. Triploidy production of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [C]. Contributions of the Institute of Marine Science, National Fisheries University of Pusan, 1991, 23:235 - 244.
- [25] Perman D J, Skibinski D O F, Beardmore J A. Survival, growth rate and maturity in triploidy tilapia[A]. In: K Tiews (Editor), Proceedings of the World Symposium on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture II [C]. Berlin: Heenemann, 1987, 277 - 287.
- [26] Don J, Avitalion R R. Comparative study on the induction of triploidy in tilapias, using cold - and heat-shock techniques[J]. J Fish Biol, 1988, 32:665 - 672.
- [27] Varadaraj K, Pandian T J. Induction of triploids in *Oreochromis mossambicus* by thermal, hydrostatic pressure and chemical shocks[J]. Proc Aquaculture Int Congr & Expo, 1988, 531 - 535.
- [28] Varadaraj K, Pandian T J. Induction of allotriploids in the hybrids of *Oreochromis mossambicus* female and red tilapia male[J]. Proc Indian Acad Sci (Anim Sci), 1989, 98: 351 - 358.
- [29] Don J, Avitalion R R. Production of viable tetraploid tilapias using the cold shock technique[J]. Bamidgeh, 1988, 40(1):17 - 21.
- [30] Carter R E, Mair G C, Skibinski D O F, et al. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia[J]. Aquaculture, 1991, 95:41 - 52.
- [31] Chourrout D, Genetic manipulations in fish: review of methods[A]. In: K. Tiews (Editor), Proceedings of the World Symposium on Selection, Hybridization, and genetic engineering in Aquaculture II [C]. Berlin: Heenemann, 1987, 111 - 122.
- [32] 潘峰, 胡玫, 王利海, 等. Artificial induced gynogenesis by allogeneous sperm in tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. 水生生物学集刊, 1994, 18(1):90 - 91.
- [33] Hussain M G, Penman D J, McAndrew B J, et al. Suppression of first cleavage in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L.-A comparison of the relative effectiveness of pressure and heat shocks[J]. Aquaculture, 1993, 111:263 - 270.
- [34] McAndrew B J, Majumdar K C. Tilapia stock identification using electrophoretic markers[J]. Aquaculture, 1983, 30:249 - 261.
- [35] Tave D. Inbreeding and brood stock management[R]. Fisheries Technical Paper, 1999, 392:49 - 71.
- [36] Kinghorn B P. A review of quantitative genetics in fish breeding[J]. Aquaculture, 1983, 31:283 - 304.
- [37] Komen J, Wiegertjes G F, van Ginneken, et al. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). 3. The effects of inbreeding on gonadal development of heterozygous and homozygous gynogenetic offspring[J]. Aquaculture, 1992, 104(1-2):51 - 56.
- [38] Muller-Belecke A., Horstgen-Schwark G. Sex determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*), sex ratios in homozygous gynogenetic progeny and their offspring[J]. Aquaculture, 1995, 173(1-4):57 - 65.
- [39] Lutz G. Practical Genetics for Aquaculture[M], New York: Blackwell, 2001. 124.
- [40] 夏德全. 中国罗非鱼养殖现状及发展前景[J]. 科学养鱼, 2000, 5:(1), 21.
- [41] Thorgaard G H. Application of genetic technologies to rainbow trout[J]. Aquaculture, 1992, 100:85 - 97.
- [42] Hussain M G, McAndrew B J, Penman D J. Phenotypic variation in meiotic and mitotic gynogenetic diploids of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) [J]. Aquaculture Research, 1995, 26(3): 205 - 212.
- [43] Hussain M G, Rao G P S, Humayun N M, et al. Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L.[J]. Aquaculture, 1995, 38(1-4):87 - 97.
- [44] Bramick U, Puckhaber B, Langholz H J, et al. Testing of triploid tilapia (*Oreochromis niloticus*) under tropical pond conditions[J]. Aquaculture, 1995, 137(1-4):343 - 353.
- [45] Chang S L, Chang C F, Liao I C. Comparative study on the growth and gonadal development of diploid and triploid tilapia, *Oreochromis aureus* [J]. Journal of Taiwan Fisheries Research, 1993, 1(1):43 - 49.
- [46] Chourrout D, Chevassus B, Quillet E, et al. Improvement of salmonids: selective breeding or genetic manipulations[J]. Colloq INRA, 1988, 44: 183 - 197.
- [47] Chourrout D, Nakayama T. Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout[J]. Theor Appl Genet, 1987, 74:687 - 692.
- [48] Liu S, Liu Y, Zhou G, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp x common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. Aquaculture, 2001, 192(2-4): 171 - 186.
- [49] Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan[J]. Aquaculture, 2001, 197:205 - 228.