

生物技术在水产生物种质资源 开发利用研究中的应用

APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY TO THE EXPLOITATION OF AQUATIC ORGANISMS' GERMPLASM RESOURCES

张兴忠 申 艳 冯光化

(中国水产科学研究院长江水产研究所淡水鱼类种质资源与生物技术实验室, 沙市 434000)

Zhang Xingzhong Shen Yan Feng Guanghua

(State Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology,
Yantze River Institute of Fishery, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shashi 434000)

关键词 综述, 生物技术, 水产生物, 种质资源, 进展

KEY WORDS Roundup, Biotechnology, Aquatic organism, Germplasm resources, progress

自从实行 200 海里保护区以来, 世界水产业发生了很大变化。由于过度捕捞等原因造成海洋沿岸水产资源衰竭, 许多国家开始重视了近海和内陆水域养殖业。海淡水水产生物种质资源的养殖开发利用越来越引起了世人的重视, 据鹿田敏嗣报道 (1993), 近年来世界养殖业产量正在呈急速增长, 1990 年世界养殖产量 1532 万吨, 比 1985 年产量增加 40%, 其中淡水养殖鱼类产量 697 万吨, 占到养殖总产量的 45%。另据世界渔业杂志报道 (1993.a.b), 1990 年沿海养殖产量年增长 7.3%, 引种养殖产量年增长 10.3%; 内陆养殖产量年增长 11.3%, 引种养殖产量年增长 13.5%; 1991 年对虾养殖产量 69.9 万吨, 比 1990 年增长 7%。

在水产养殖业迅猛高速发展同时, 水产业也面临着十分严峻的问题, 据世界农林水平 (1993) 报道, 由于栖息环境遭受破坏, 对水产生物种质资源的过分开发利用和大量引进外来种, 破坏了水产生物的多样性, 鱼类种质资源受到严重威胁。Schweitzer, J(1992)年指出, 生物多样性最富有国家往往是经济上最贫穷的国家, 进而谈到, 经济增长本身取决于正常的经济体系作用和自然资源的大量供应, 应充分认识经济发展和保护环境的相互依赖关系。保护水产生物多样性和种质资源已成为许多国家关注的问题。Д.С.Павлов (1992) 年报道: 世界鱼类区系的近 3%已列入国际自然保护联合会 (IUCN) 红皮书。

生物技术自从七十年代中期崛起以来,冲击了各个领域,在许多领域得到快速发展。由于利用生物技术可在细胞水平,分子水平设计和构建新生物种,获得有用的次级代谢产物,而引起了水产界的重视,并很快引进并在水产生物种质资源养殖开发利用等方面得到了越来越广泛地应用。据平石一天(1993年)报道,应用染色体操作技术生产 3n 全雌鱼成功,日本水产厅 1992 年 7 月已发出“三倍体鱼等水产生物和利用要领”通告,确认了染色体操作研究成果,并批准了实际用于养殖生产。Hallerman 等(1990)报道,世界上有 15 个国家获得了最少 14 种鱼的转基因鱼,而 Figshetti(1991)报道,转 GH 基因鲤鱼和虹鳟比对照鱼生长快 20-40%,如上所述,在生物技术应用研究方面取得很大进展。

本文就近年来(1991-1993)年国外在这方面研究情况加以综述,与国内情况作大致比较,并在此基础上谈些个人看法,以供水产界同仁参考。

mtDNA 酶切分析及 PCR 技术在水产生物 种质资源研究中的应用

线粒体 DNA (mtDNA) 酶切分析技术在八十年代后期形成后,很快便为许多国家的学者应用于水产生物的种群遗传学和种群遗传结构等方面的研究。据 Bilington 等(1991)报道,到 1991 年为止,各国学者已查明了 40 多种鱼类的 mtDNA 变化,1991-1993 年国外应用 mtDNA 酶切分析和 PCR 技术对水产生物种群的部分研究情况和结果列于表 1。从表 1 所列材料中可以看出,国外应用 mtDNA 酶切分析和 PCR 技术对水产生物主要进行以下几个方面的研究。

1. 水产生物分类和系统发生研究 国外学者应用 mtDNA 分析在这方面进行的研究工作较多,解决了一些水产生物分类,系统发生及进化等方面的疑难问题,或为解决这些疑难问题提供了种群遗传学依据。

应用传统分类学方法进行白鲑亚科鱼类分类一直是一大难题。Bernatchez 等(1991)(表 1)对该亚科 21 个分类单位鱼类进行了 mtDNA 酶切分析、研究了它们的系统发生关系,这无疑将有助于这一分类难题的最终解决。

Salmo gairdneri 野生种被称为硬头鳟,用于养殖者称为虹鳟,以前一直认为它属 *Salmo* 属。近年来美国研究者查明它更与 *Oncorhynchus* 属鱼类相近,应属该类属。据此美国鱼类学会对它重新定名为 *Oncorhynchus mykiss*。俄国学者 S.V.Shedko(1991)(表 1)的研究也评价了类似问题。他对勘察加的 *Salmo mykiss* 作了 mtDNA 酶切分析,并将所得 mtDNA 酶切模式与北美洲 *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo clarki* 两种鱼的 mtDNA 酶切模式作了比较分析,结果发现 *S.mykiss* 甚近于 *O. mykiss*, 因此认为勘察加的 *S. mykiss* 应归属于 *O.mykiss*。

Seyoum 等(1992)(表 1)和 Ginitalina(1992)(表 1)进行了类似的分类研究。前者对东非和埃及尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 14 个种群 mtDNA 之 42 种酶切分析为基础,研究讨论了 *O.niloticus* 分为两个亚种问题。后者对包括库页岛在内之滨海区 *Oncorhynchus Keta* 的六个野生种群作了 mtDNA 酶切分析,他根据 mtDNA 酶切差异将滨海区的 *O.Keta* 分成了两个大群体。

2. 水产生物种群遗传结构研究

表 1 1991-1993 年水产生物种群遗传结构研究

生物名称	研究内容及结果	文献
Salmo salar S. trutta Oncorhynchus mykiss Salvelinus fontinalis	以查明线粒体 DNA(mtDNA)的核苷酸序列变化为手段, 研究了澳大利亚塔斯马尼亚产大西洋鲑、欧鲑、硬头鲑和美洲红鱼鲑的种群动态特性和这些鱼的起源。	Ovenden J. R., et al., 1993.
Oncorhynchus clarki lewisi O. e. bouvieri	研究了两种大麻哈全杂种种群的 mtDNA 和核的基因型。	Firbes S. H., et al., 1991. a. b.
Coregoninae	以 mtDNA 限制性内切酶, 酶切片段长度分析评价了白鲑亚科中 21 个分类单位间的系统发生亲缘关系。	Bernatchez L., et al., 1991.
Stizostedion	以对 mtDNA 24 种限制性内切酶, 酶分析查明了鲈属 4 个种: stizostedion lucioperca, S. Vitreum, S. Canadense. 及北美洲 S. vitreum 之间的系统发生关系。	Bilington N., et al., 1991.
Salvelinus fontinalis	通过对北美洲红鱼鲑 mtDNA 51 种限制性内切酶酶切分析进行了安大略(Ontario)该种鱼野生群体和人工孵化群体遗传鉴别。81 种酶的酶切呈现多态性。查明了 8 个孵化场鱼的 mtDNA 单倍体型, 它们仅有 0.41% 的序列歧异; Hills 湖品系(杂交系)有 7 个 mtDNA 单倍体型, Nipigon 湖品系(野生种群)有 2 个 mtDNA 单倍体型。这些 mtDNA 单倍体型可作为标志。	Danzmann, R. G., et al., 1991.
Salvelinus fontinalis	以对来自 Cape Race 和 Newfoundland 5 条河流北美红鱼鲑样品 42 个蛋白位点电泳分析, 及 4 条河流北美红鱼鲑样品 mtDNA 酶切片段长度多态性分析为基础, 评价了该鱼不同地区种群的不一致性。	Ferguson M. N., et al., 1991.
Salmonoidei	作者介绍了用 PCR 技术快速分析鱼类种 mtDNA 序列方法, 及用此新方法对鲑亚目鱼类的研究结果。	Beckenbach A. T., 1991.
Oreochromis niloticus	通过对东非和埃及尼罗罗非鱼 14 个种群 mtDNA 之 42 种限制性内切酶酶切分析研究该种的两个亚种。	Seyoum, S., et al., 1992.
Salmo mykiss	通过对勘察加鲑 mtDNA 的 12 种限制性内切酶酶切分析, 建立了该种鱼 mtDNA 酶切模式, 进而将该模式与北美 Oncorhynchus mykiss, Salmo clarki 等 2 种鱼 4 个种群的 mtDNA 酶切模式作了比较, 与 O. mykiss 三个种群的差异为 0.86%, 1.51% 及 2.75%; 与 S. clarki 一个种群的差异为 2.89%, 据此作者认为 S. mykiss 分类应归属于 O. mykiss。	Snedko, S. V., 1991.
Oncorhynchus keta	对包括库页岛在内的滨海区 O. keta 6 个野生种群作了 mtDNA 酶切分析, 根据 mtDNA 的差异将滨海区的 O. Keta 分成了两大群体。	Ginitalina, L. K., 1992.
Salvelinus alpinus	对采自 S. alpinus 7 个种群的 82 尾鱼的 mtDNA 进行了酶切片段长度多态性分析, 分析了细胞色素的基因序列, 测量了近 4% mtDNA 基因组, 发现了种群间的不同差异。	Hartley, S. E., et al., 1992.
Acipenser transmontanus	对采自 Columbia River 和 Fraser River 的 178 尾 A. transmontanus 进行了 mtDNA 酶切片段长度多态性分析, 查明了十种 mtDNA 基因型, 两河鲟鱼样品中 61% 个体具有相同基因型。在 Fraser 河鲟中仅发现一种基因型。Columbia 河是该鲟鱼在更新纪冰河期的避难所, 该河鲟鱼资源是 Fraser 河鲟的奠基者。近年对 Columbia 河鲟的过度开发利用及其栖息地的破坏是该河鲟鱼 mtDNA 差异(mtDNA 基因型)锐减的原因。	Brown, J. R., et al., 199.
Pecten	对扇贝属 7 个种进行了 mtDNA 基因组分析, 查明了 7 个种间 mtDNA 重复序列的变化。	Gjetvaj, B., et al., 1992.
Artemia	以 mtDNA 分析为基础, 研究了五个主要地区 Artemia 属有性繁殖种群和孤雌繁殖种群的歧异, 分类及进化差异, 讨论了分类问题。	Brown, R. A., et al., 1991.

应用 mtDNA 分析进行水产生物种群遗传及种群遗传结构研究, 其目的大多与对这些种群的开发利用或种质资源保护密切相关。

Oenden (1993) (表 1) 对澳大利亚塔斯玛亚所产 *Salmo salar*, *S. trutta*, *O. mykiss*, *Salvelinus fontinalis* 等 4 种鱼作了 mtDNA 酶切分析, 以此为据查明了 4 种鱼种的动态特性及其起源 R.G.Donzmman 等 (1991) (表 1), 对安大略 (Ontario) 的 *S. fontinalis* 之 mtDNA 作了 51 种酶的酶切分析, 查明了可作为该鱼野生种群, 人工繁殖种群和杂交种群标志的 mtDNA 单倍型。

Brown 等 (1992) (表 1) 应用的 mtDNA 分析技术查明了 *Acipenser transmontanus* 的 10 种 mtDNA 基因型, 并依此为据证明了 Fraser 河鲑鱼种群起源于 Columbia 河鲑鱼。进而指出了近年来对 Columbia 河鲑鱼的过度开发利用, 及该河鲑鱼栖息场的破坏等是使此种鲑鱼种群的 mtDNA 差异的 (mtDNA 基因型) 锐减的主要原因。

如上所述, mtDNA 酶切分析技术在分类学研究中应用解决过去无法解决的疑难问题; 纠正了以前分类工作中的一些误差; 提供了分类的新技术, 使得能较准确地进行种内分类。在种群遗传和遗传结构研究中的应用使不仅能较快且准确的提示种群遗传特性和结构, 而且为制定种群的开发利用和种质资源保护技术措施提供了可靠依据。

值得特别注意的是 Beckenbac (1991) (表 1) 的研究及结果, 他用将 mtDNA 酶切分析与 PCR 相结合, 国外学者称之 RAPD (Random Amplified polymorphic DNA)——随机扩增的多态性 DNA 技术, 对鲑亚目 (Salmonordei) 不仅作了 mtDNA 酶切分析, 而且快速测定了一些 mtDNA 片段的序列。RAPD 是八十年代末至九十年代初形成的新技术, 其特点是简单、快速、准确。将这一新技术应用于水产生物的分类, 进行、种群遗传和种群遗传结构等方面的研究, 无疑将能解决一些用以前的方法难以解决的疑难问题, 提高这些研究工作的水平。

我国尚未见有关应用 mtDNA 酶切分析进行水产生物分类、进化方面研究的报道。近几年来我国学者仅对草鱼、鲢鱼、鳙鱼、青鱼等“四大家鱼”及其它个别种进行了 mtDNA 酶切分析, 依 mtDNA 酶切片段长度多态性为根据进行了上述鱼类种群遗传结构研究。与国外同类研究相比, 我国这类研究工作存在的主要问题是:

- (1) 受种种因素制约, 采样范围小, 代表性不强。
- (2) mtDNA 酶切分析样品量少, 重复分析少。

由于上述两问题的存在, 所得的研究结果往往不是以作为研究种群遗传结构的依据。已公开发表的研究工作大多只停在 mtDNA 酶切片段多态性分析上。而对 mtDNA 单倍型, 基因型等尚无人进行研究。RAPD 技术对我国水产界大部分学者说来是生疏的。我国在这方面的研究水平与国外差距较大。

染色体操作技术在水产生物种质资源 养殖开发利用中的应用

染色体操作属生物技术领域的细胞工程范畴, 国内外学者以冷、热休克、静水压休克等手段进行受精卵染色体操作, 人工诱导了水产生物雌核发育、雄核发育及多倍体。近几年来国外学者所进行部分研究和结果列于表 2。

表2 1992-1992年水产生物染色体操作研究结果及应用

生物名称	研究内容及结果	文献
<i>Cyprinus Carpio</i>	40-41℃热休克, 1.5-2分钟诱导3n率80-100%, 胚胎成活率50-70%, 工业化养鱼条件下大批量生产鲤鱼3n苗种.	Recoubatsry A. V. 1992.
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	1991年加拿大大不列颠哥伦比亚省养殖全雌大麻哈鱼12800吨, 产值200万美元.	Donaldson E. M., 1992.
<i>Oncorhynchus Kisutch</i> O. masou. <i>Paralichthys</i>	日本水产厅人认定全雌银大麻哈鱼, 全雌马苏大麻哈鱼, 全雌牙鲆及3n马苏大麻哈鱼批准用于养殖生产.	河北新报 1993.
<i>Paralichthys olivaceus</i>	大批量生产全雌化牙鲆苗种技术框架, 已完成, 强调雌核发育卵孵化及5-7cm前的培育必须在20℃恒温下, 如温度波动大则雄性鱼可达37%.	山本荣一, 1992.
<i>Paralichthys olivaceus</i>	日本鸟取县已培育达性成熟牙鲆500尾, 即确立大量生产全雌牙鲆苗种技术.	日本海新闻. 1992.
<i>Verasper viriegatus</i> Pseudopleuronectes Microstomus achne <i>paralichthys olivaceus</i>	采用热休克, 静水压休克等染色体操作技术, 获得了星鲽, 黄鲽, 亚洲油鲽及牙鲆的3n鱼, 拟采用诱导雌核发育及性转技术建全雌系.	齐藤节雄等, 1993.
<i>Sparus macrocephalus</i>	静水压休克诱导3n鱼, 所得3n黑鲷养殖至2-4龄, 性腺全为雄鱼型比对照明显变小.	北村等. 1992.
<i>Perca flavescens</i>	23-30℃热休克10-25分钟, 及9000或11000psi静水压休克诱导黄鲈3n, 受精后5分钟处理. 3n率30-70%, 设三组对比试验证明, 热休克和静水压休克影响幼鱼生长.	Malison J. A., et al., 1993, a.b.
<i>Crassostrea virginica</i> .	美国西北部生产3n牡蛎采用的传统技术导致美国牡蛎死亡率达90%以上, 作者提出新的最佳技术, 要点为: (1)当观察到受精卵50%进行第二次减数分裂时处理; (2)细胞分裂抑制素(CB)浓度0.25mgCB/l; (3)处理时间10-15分钟. 结果D型幼虫成活率: (3n)96%, 对照(2n)84%.	Barberb. J., et al., 1992.
<i>Ostrea igas</i>	目标: 育成3n长牡蛎避免产卵期大量死亡, 提高商品质量, 比较了温度休克, 细胞松弛素B, 咖啡碱三种诱导3n方法, 认为第二种方法最好. 产开后2n牡蛎软体部重量下降软体糖含量下降3-5%, 3n牡蛎软体重量增, 为2n的1.5-2.5倍, 软体糖增加3-17%, 死亡率仅为2n的50%.	赤繁悟, 1992.
<i>Haliotis</i>	低温下静水压休克诱导鲍鱼3n, 3n率70%, 日本山形县水产试验场养殖结果生长速度比2n快一倍, 长到10CM规格只需1年.	"养殖"1992. 29(3): 138.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	热休克和静水压诱导虹鳟3n鱼生命力强, 不育的3n雌鱼可用于养殖4n鱼生命力很强但可用它与2n鱼交配生产3n鱼, 诱雌核发育可生产全雌系.	Thorgaard, G. H. 1992.

Donaldson (1992) (表2) 报道, 1991年加拿大的大不列颠哥伦比亚省, 计养成全雌大麻哈鱼 (*O. tshawytscha*) 12800吨, 产值高达200万美元, 是近年来水产生物技术研究成果应用于养殖生产, 产生高经济效益的突出事例之一。

近年来日本国水产生物染色体操作研究十分活跃, 获得的全雌牙鲆, 3倍体牙鲆, 全雌银大麻哈鱼 (*O. kisutch*), 马苏大麻哈鱼 (*O. masou*), (见表2) 等均已得到日本国水产厅认定, 并批准应用于养殖生产。

为了解决牡蛎繁殖期产品质量下降, 大量死亡等问题, 美国人工诱导三倍体牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 专利, 并进行了三倍体牡蛎苗种繁殖和养殖。Barber, B.T.等

(1992) 报道, 美国西北部生产三倍体牡蛎所使用的技术导致美国牡蛎死亡率高达 90% 以上。作者提高的最佳诱导三倍体牡蛎技术将 D 型幼虫成活率提高到了 96% (见表 2) 日本学者赤繁悟 (1992) (表 2) 用细胞松弛素 B 诱导长牡蛎 (*Ostrea gigas*) 三倍体方法。研究表明: 二倍体长牡蛎产卵后软体重量下降, 软体糖含量也下降 3-5%, 三倍体长牡蛎软体重量反而增加, 为 2 倍体的 1.5-2.5 倍, 软体糖也增加了 3-17%。

Recoubatsry (1992) 建立了在工业化养鱼条件下, 适用的大批量生产三倍体鲤鱼苗种的技术。我国天津农学院董仕等大批量诱导和生产了三倍体鲤鱼研究成果已于 1993 年通过鉴定验收。

除上述已可实际应用的研究成果外, 齐藤节雄等 (1993) 获得了星鲮、黄盖鲮, 亚洲细鲮三倍体鱼; 北村等 (1992) 获得了三倍体黑鲷并养殖成了 2-4 龄鱼; Malison (1993a.b) 诱导了黄鲈 (*Perca macrocephalus*) 三倍体, 并查明了热休克和静水压休克均影响幼鱼生长, 日本“养殖”杂志 1992 年报道日本山形县水产试验场获得了三倍体鲍鱼, 经养殖查明三倍体鲍鱼比二倍体生长快 1 倍, 提早一年达到 10cm 规格。

如上所述, 水产生物染色体操作技术已成为国外学者被利用并获得一批可实际应用的研究成果, 有的已产生巨大经济效益。我国除中国科学院水生生物研究所吴清江先生研制的全雌鲤被用于生产, 天津农学院董仕等提出的大批量生产三倍体鲤鱼苗种技术可用于生产外, 近年来我国在这方面研究进展不大, 与国外相比, 存在着明显的差距。

参 考 文 献

- [1] 魏彦章等. 1992. 人生长激素基因在转基因鲤鱼体内的遗传. 生物工程学报, 8 (2): 140-144.
- [2] Arkush K.D., et al. 1992. Production and initial characterization of monoclonal antibodies against channel catfish virus. J. Aquat. Anim. Hlth., 4(2): 81-89.
- [3] Bernatchez, L., et al., 1991. Phylogenetic relationships among the subfamily Coregoninae as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis. J. of Fish Biol., 39 (Supplement A: 283-290).
- [4] Billington N., et al., 1991. Mitochondrial DNA diversity in Fishes and its implications for introduction. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 48 (Supplement 1): 80-94.
- [5] Barber, B. J., et al., 1992. Optimization of triploid induction for the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Aquac., 106 (1): 21-26.
- [6] Brown, R. A., et al., 1991. Taxonomy and population genetics of *Artemia*. Boca Raton, USA, CRC Press, 221-235.
- [7] Brown, J. R., et al., 1992. Influence of pleistocene glaciations and human intervention upon mitochondrial DNA diversity in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) populations. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic sciences, 49 (2): 358-367.
- [8] Culp, P., 1991. 注入Zebrafish受精卵质粒DNA序列的高频种系传递. 生物技术通报, (5): 82.
- [9] Danzmann, R. G., et al., 1991. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook charr, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. J. of Fish Biol., 39 (Supplement A): 69-77.
- [10] Davies, P.L., 1992. 抗冻蛋白基因在转基因鲑鱼中的表达. 生物技术通报, (2): 80-81.
- [11] Donaldson, E. M., 1992. A comparison of the economic aspects of monosex chinook salmon production versus mixed sex stock for aquaculture. Aquac. Abstr., 9(4): 32.
- [12] Fishetti, M., 1991. 转基因对鱼类养殖的促进作用. 生物技术通报, (5): 83.
- [13] Forbers, S.H., et al., 1991. Mitochondrial genotypes have no detectable effects on meristic traits in cutthroat trout hybrid swarms. Evolution, 45 (6): 1350-1359.
- [14] Forbers, S. H., et al., 1991. Associations between mitochondrial and nuclear genotypes in cutthroat trout hybrid swarms. Evolution, 45(6): 1332-1349.

- [15] Ginitalina, L. K., 1992. Genetic differentiation among chum salmon, *Oncorhynchus keta* (Walbaum), from Primorye and Sokhalin. *J. of Fish Biology*, 40 (1): 33-38.
- [16] Gjetvaj, B., et al., 1992. Repeated sequences and large-scale size variation of mitochondrial DNA: a common feature among scallops (Bivalvia: Pectinidae). *Mol. Biol. and Evol.*, 9(1): 106-124.
- [17] Gross, M. L., et al., 1992. Molecular analysis and growth evaluation of northern pike (*Esox lucius*) microinjected with growth hormone genes. *Aquac.* 103(3-4): 253-273.
- [18] Hallerman, E. M., et al., 1990. In advance in fisheries technology and biotechnology for increased profitability. Technomic Publishing Company, 35-49.
- [19] Hartley, S. E., et al., 1993. Mitochondrial DNA analysis of Scottish populations of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *J. of fish Biol.*, 40(2): 219-224.
- [20] Hew, C. L., et al., 1993. Genetic engineering of freeze-resistant Atlantic salmon. *Aquac. Abst.*, 10(5):51.
- [21] Hayat, M., et al., 1991. Survival and integration rate of channel catfish and common carp embryos microinjected with DNA at various developmental stages. *Aquac.*, 99(3-4): 249-255.
- [22] Malison, J. A., 1993. Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock and spermatozoa inactivation. *Aquac.*, 110(3): 229-242.
- [23] Malison, J. A., 1993. The influence of triploidy and heat and hydrostatic pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquac.*, 116(2/3): 121-133.
- [24] Mclean, E., et al., 1991. Promotion of growth in diploid and triploid coho salmon with parenteral delivery of a recombinant porcine somatotropin. *Aquatic Living Resources*, 4(3): 155-160.
- [25] Ovenden J. R., et al., 1993. Mitochondrial DNA nucleotide sequence variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Brown trout (*S. trutta*), Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) from Tasmania, Australia. *Aquac.*, 114(3/4): 217-227.
- [26] Penman, D. J., et al., 1991. Patterns of transgene inheritance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development*, 30 (3): 201-206.
- [27] Павлов, D. C., 1992. 保护珍稀及行将消失鱼类的方法. *Вопросы ИХТИОЛОГИИ*, 32(5).
- [28] Pandian, T. J., 1992. 大鼠GH基因微注射到斑马鱼卵里以产生转基因斑马鱼. *生物技术通报*, (5): 83.
- [29] Rahman, M. A., 1992. Production of transgenic *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) by One-cell-stage microinjection. *Aquac.*, 105(3/4): 219-232.
- [30] Recoubatsky, A. V., 1992. Triploid common carp produced by heat shock with industrial fish-farm technology. *Aquac.*, 108(1.2): 13-19.
- [31] Seyoum, S., et al., 1992. Identification of the subspecies of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) using restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Aquac.*, 102(1-2): 29-42.
- [32] Schweitzer, J., 1992. Conserving biodiversity in developing countries. *Fish*, 17(3): 35-38.
- [33] Shedko, S. V., 1991. On the classification of the Kamchatka trout, *Salmo mykiss* (Salmoniformes, Salmonidae): restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Journal of Ichthyology*, 31(7): 107-112.
- [34] Yoshizaki, G., et al., 1991. Introduction of carp α -globin gene into rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 57(5): 918-924.
- [35] Zelenin A. V., 1992. 用高速微弹将外源基因打入受精鱼卵. *生物技术通报*, (4):83.
- [36] 川添一郎. 1993. クロマダロの成長ホルモン. *新食品工業*, 35(7): 1-7.
- [37] 玉井忠和等. 1991. ガ、h遺伝子導入にすぬ鱼类機能細胞株の樹立. *生物学ヒ工業*, 51(3): 213-216.
- [38] 平石一夫. 1993. 水产分野におけるバイオテクノロジーへ研究の開发现状. *养殖(临时増刊)*, 30(8): 125-127.
- [39] 鹿田敏嗣. 1993. 世界の养殖生产. *养殖(临时増刊)*, 30(8): 216-218.
- [40] 齐藤节雄. 1993. 染色体操作とヒメソ、カレイ类的育种. *水产技术与经营*, 39(4): 48-53.
- [41] 北村等. 1992. クロタイ3倍体魚の生殖腺の发达. *水产増殖*, 40(4): 411-415.