

生物技術在魚類養殖之應用研究—— 生長激素及其基因 * *

黃鵬鵬、周冠裕、王誌義、吳淑美*、吳金洌

中央研究院動物研究所 * 國立嘉義農專水產養殖科

摘 要

含豬生長激素基因之大腸菌，以0, 20, 100, 200 μ g大腸菌 / g魚體重之濃度混在餌料中，每日餵給吳郭魚仔魚。十日後，在體重上尚無明顯之差異。但到第二十日，20 μ g濃度之處理組體重顯著高於其它各組($P < 0.05$)，而且到第三十日不論是那一濃度，處理組(平均64.7mg)皆顯著高於對照組(平均36.5mg)，尤其是20ppm更是極顯著高於對照組($P < 0.01$)。體長隨成長之變化，在處理後二十日各組皆無顯著差異，直到第三十日才顯出20ppm對其體長之影響效果($P < 0.05$)。肥滿度(condition factor: $CF = \text{體重} / \text{體長}^3$)之值隨著成長逐漸升高。處理組在處理後二十日之CF值較對照組高，但第三十日則較對照組低，經檢定無顯著差異。

微量注射受精卵之方法已在吳郭魚、泥鰍、香魚建立。大部份實驗，注射後之受精卵均達到40%以上之孵化率。從1991年7月至1992年6月間進行金魚受精卵微量注射虹鱒生長激素基因(rtGH)之實驗，每次注射平均只能處理30-50個受精卵。注射時間多在1-2細胞期。注射DNA量由1.5-111pg / 每個卵。注射高劑量者，孵化率較低約為40-60%，其餘均有70-100%而與未注射之對照組接近。飼育一個月之金魚，將注射111pg組仔魚，進行基因體DNA 抽取，進行PCR，然後再進行southern hybridization，結果證實已有轉殖之rtGH基因存在，轉殖率約為38%。飼育一年後，將其餘注射1.5, 11pg之金魚經過上述相同步驟，均未發現轉殖成功。顯示生長激素基因轉殖魚類技術，基本上已建立，但仍有許多問題尚待繼續解決。

* * 本報告部份數據已在嘉農學報發表

一、前言

魚類養殖是我國最重要的產業之一，它提供我國豐富而高營養的蛋白質來源，也為我國賺取許多外匯。除了魚苗外，餌料、設備、場地、人力為養殖過程最大部份的成本，任何可以改善魚類生長，均可以減少在餌料、空間、人力、時間上之成本，提高養殖業之收益，進而改進產業之結構及民生經濟之狀況。

脊椎動物的正常生長，除了外界環境因子之影響外，受到體內許多荷爾蒙因子之交互作用之控制。這些因子包括：類固醇、甲狀腺素、類胰島素生長因子、生長激素等，而其中以生長激素為最重要。生長激素為分子量約22 KD的單一鏈狀的多肽，由下垂體前葉的somatotroph細胞分泌。這個激素是脊椎動物正常生長及發育所需要的。

很早以前，學者們就想到利用生長激素(GH)於魚類養殖上。1976年，Higgs et al.就發現牛的生長激素可以增加coho salmon的體重。Prack et al. (1980)也證明哺乳類之生長激素可以增進魚類的生長速率。隨後，學者們發現魚類本身之生長激素在增進生長上效果更好。Cook et al. (1983)發現鯉魚生長激素可以增加金魚3.3倍的生長速率，Wagner and McKeown (1981) 和Weatherley and Gill(1987)也發現純化的chum salmon生長激素可以促進虹鱒稚魚體重和體長之增加。由於純化工作費時費力，必需收集大量(數千個以上)之魚下垂體，在實際應用上有相當大之困難。最近由分子生物技術之進步，經由重組DNA之方法生合成魚類生長激素，省去大量純化工作，使得實際應用上進了一大步。Agellon et al. (1988)利用生合成之鱒魚生長激素，增加一年虹鱒生長速率2-4倍。同樣的方法發現在牡蠣也有效(Paynter and Chen 1991)。

分子生物學的發展，建立選殖基因之方法，並利用轉殖動物之方法研究基因之表現、調控等問題。基因轉殖動物已在許多動物包括果蠅、海膽、兩棲類及哺乳類等建立(Ozato et al. 1989)。為了生產生長更快、體型更大之動物，帶有外來生長激素基因之轉殖動物已在鼠、羊、豬、兔等發展(Brem et al. 1988, Palmiter et al. 1982)。Zhu et al. (1985)首先建立生長激素基因轉殖魚類，他是以metallothionein為起動子的人類生長激素基因轉殖到金魚、泥鰱和鯉魚等，隨後，Chen and Powers (1990)也建立以retroviral vector攜帶鱒魚生長激素基因轉殖到鯉魚，均得到體型較正常魚大1-7倍之結果。

以生長激素基因轉殖魚類，以生產生長快速或體型較大之魚種，可以免除直接投用生長激素所需之純化、生合成、投與之勞力物力外，並可以建立穩定之新品種，以達到減低成本、增加產業收益之效果。綜觀國外研究之狀況，生長激素及基因之生物技術在魚類養殖上應用研究，方興未

已，雖然仍有許多問題仍待解決(Fletcher and Davies 1991)，但是初步之結果，得知其可行性極高。過去數年來，在農委會及生物技術中心等機關之委託，本研究室也進行了相關之研究，希望在國內建立相關之技術以便實際應用於國內魚類養殖上。

二、材料與方法

(一)、魚種：

香魚(*Plecoglossus altivelis*)、吳郭魚(*Oreochromis mossambicus*)、泥鰍(*Misgurnus anguillicaudatus*)及金魚(*Carassius auratus*)等均為實驗魚種。

(二)、受精卵及仔稚魚：

香魚、泥鰍及金魚之成熟種魚購自民間養殖場，吳郭魚則來自水試所台南分所。種魚經適度之摧熟，進行人工採卵、採精及人工採精，以獲得所需之受精卵。吳郭魚則以光線控制，經自然產卵，以取得受精卵；吳郭魚仔稚魚由本實驗室自行以人工餌料養成。

(三)、生長激素之實驗：

由生技中心供應之含豬生長激素(rpGH)基因之大腸菌，經超音波打破後混入鰻飼料。體長0.8cm體重0.1g左右之吳郭魚仔魚，每日餵給體重10%鰻飼料，其中添加不同濃度之大腸菌(2, 20, 100, 200ug大腸菌 / g魚體重)。每隔10日測量體長及體重，並調整投飼量，實驗期間並無殘餌產生。水溫維持在27-29°C，並採用循環過濾用水。

所有之數據之統計分析方法是以且肯分析(Duncan's Multiple-Range Test)進行顯著性測驗。

(四)、生長激素基因轉殖實驗：

1. 生長激素基因

(1)質體DNA之備製

培養含有質體DNA (pRSV-rtGH cDNA來自美國馬里蘭大學陳鐵雄教授)大腸菌500ml，離心收集細菌，以solution I、II、III處理後，再加入isopropanol，經超高速離心(105000rpm, 10min)，得到之DNA再以CsCl處理，加入EtBr，經8000rpm離心，經UV判斷質體DNA所在，以針頭抽出，經萃取、透析、沉澱、乾燥，最後以TE buffer溶解，測定260/280吸光值。

(2)基因轉殖用之質體DNA

上述所得之質體DNA，以限制酶作用，經電泳鑑定大小、並確定切割反應是否完全。再經萃取、沉澱、乾燥，溶解於TE buffer中，測定260/280吸光值以計算濃度，再以TE稀釋成所需之濃度，-20°C保存。

2. 基因轉殖方法

(1) 設備

採用Narishige顯微操作儀，包含micropipette puller、microgrinder、micromanipulator、picoinjector及氮氣桶等。

(2) 製備顯微注射針

將直徑 1mm 的毛細管經puller以70°C拉成針形，於grinder上，以30度俯角磨針，針內裝95%酒精，將針磨成平滑暢通後，以紫外線照射。

(3) 製備holder

將直徑1.2mm的毛細管經puller以70°C加熱18秒。

(4) 顯微注射

將受精卵以holder固定並調整其方向使胚盤面向注射針，調整manipulator，將注射用之微針注射DNA量，一次注射數nl質體DNA溶液。

3. 轉殖結果之評估

(1) 受精卵之孵化及仔稚魚飼育

經注射及未注射之受精卵，分別置於恆溫水槽中培育以待其孵化，計測孵化率。孵化之仔魚以人工餌料飼育。一個月及一年後，採樣測體重、體長，並偵測基因轉殖結果(如後述之方法)。

(2) 魚體組織基因體DNA抽取

割取新鮮魚體組織，直接加入萃取液在37°C處理1小時用，再加入蛋白酶在50°C作用12-18小時。以phenol分離蛋白質，經離心抽取DNA，再經沉澱、乾燥，以TE溶解，測260/280吸光值，再以膠體電泳檢測基因體DNA是否完整。

(3) 聚合酶鏈鎖反應(PCR)

以基因體DNA或質體DNA為template。離心管中分別加入buffer、dNTP mixture、primer、template、H₂O、混合均勻後，再加入Taq DNA polymerase。然後在DNA熱循環儀的block中，以94°C 1min, 50°C 2min, 72°C 3min，進行35 cycles，最後72°C則為10min。

(4) 半乾式轉移(semi-dry transfer)

DNA膠體電泳跑至適當距離後，將膠片裁成適當大小，在TBE buffer中清洗。直接移入semi-dry transfer cell，膠片下放置nylon membrane，通電1小時後，以NaOH與tris buffer先後處理，再以UV cross-link固定後即可。

(5) 雜合(hybridization)

上述之membrane以2x SSC於68°C進行prehybridization 2-4小時，然後加入已經³²P或Dig標誌之探針(rtGH cDNA)，於68°C進

行隔夜之hybridization。最後清洗之條件為0.1x SSC；0.5% SDS 68°C，然後進行X光底片之曝光，再進行顯影。

三、結 果

(一)、菌體豬生長激素(rpGH)之投與效果

吳郭魚仔魚最初體重多在 10.4 ± 0.2 mg左右，以含rpGH之大腸菌(E. coli)飼餵十日後，在體重上尚無明顯之差異。但到第二十日，20 ppm濃度之處理組體重平均45.1mg，顯著高於其它各組($P < 0.05$)，而且到第三十日不論是那一濃度，處理組(平均64.7mg)皆顯著高於對照組(平均36.5mg)，尤其是20ppm更是極顯著高於對照組($P < 0.01$) (圖一)。圖二表示體長隨成長之變化，在處理後二十日各組皆無顯著差異，直到第三十日才顯出20ppm對其體長之影響效果($P < 0.05$)。觀察其三十日內之特異性成長速率(specific growth rate, $SGR = [\ln V_n - \ln V_o / T_n - T_o] \times 100\%$)， V_n 及 V_o 是實驗最初及最後之體重或體長， T_n 及 T_o 是實驗最初及最後之時間)不論是體重(W)或體長(L)之SGR，皆以20ppm效果最佳(WSGR: 6.7%，LSGR: 5.5%)，而100ppm (WSGR: 5.9%，LSGR: 4.6%)、2ppm (WSGR: 6.0%，LSGR: 4.3%)與200ppm (WSGR: 5.9%，LSGR: 4.8%)效果相近，但皆比對照組(WSGR: 4.2%，LSGR: 3.3%)高(圖三，圖四)。肥滿度(condition factor: $CF = \text{體重} / \text{體長}^3$)之值隨著成長逐漸升高。圖五中顯出處理組在處理後二十日之CF值較對照組高，但第三十日則較對照組低，經檢定無顯著差異。

(二)、受精卵微量注射

經由表二得知，微量注射受精卵之方法已在吳郭魚、泥鰍、香魚建立。大部份實驗，注射後之受精卵均達到40%以上之孵化率。泥鰍則有較大的差異，有些注射組及對照組只有10%以下之孵化率。

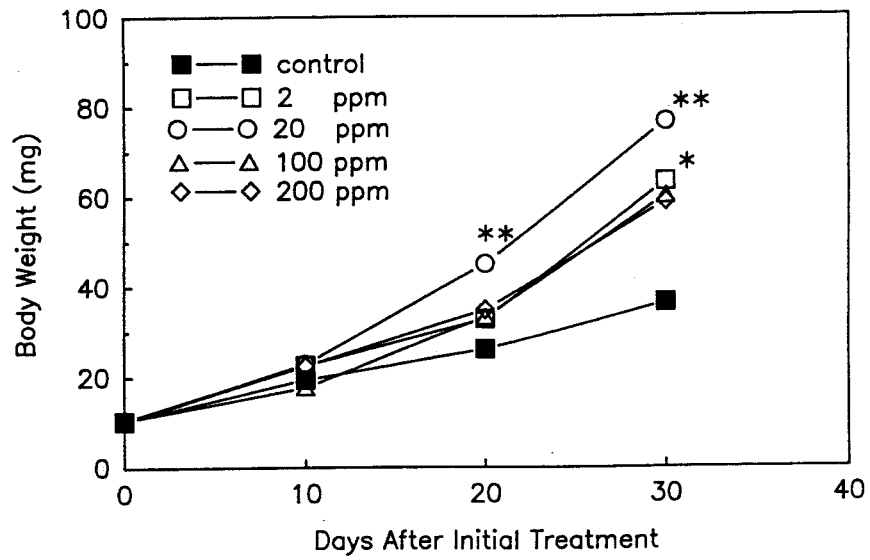
(三)、生長激素基因轉殖

從1991年7月至1992年6月間進行數十次金魚受精卵微量注射之實驗，將其中有順利孵化之10次記錄整理於表三。由表中得知，受限於金魚之卵裂時間，每次注射平均只能處理30-50個受精卵。注射時間多在1-2細胞期。注射DNA量由1.5-111pg / 每個卵。注射高劑量者，孵化率較低約為40-60%，其餘均有70-100%而與未注射之對照組接近。

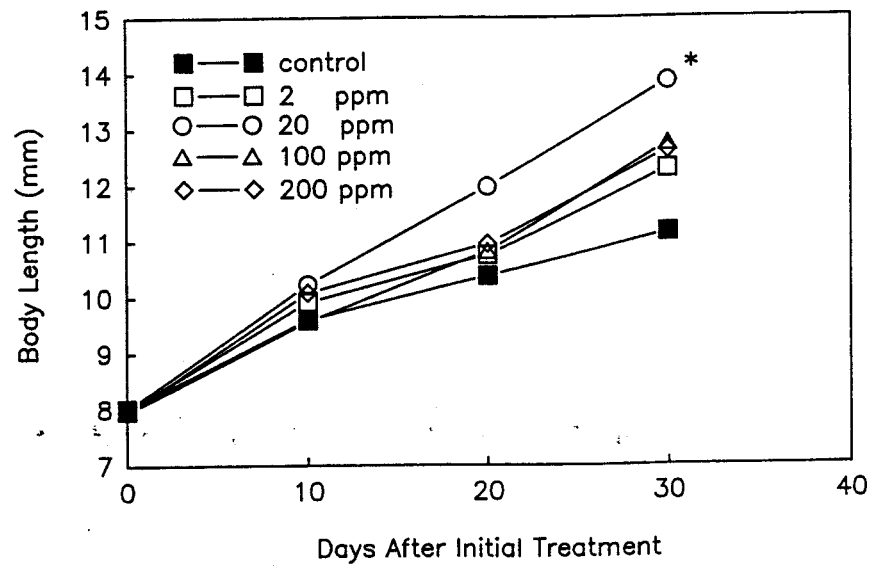
飼育一個月之金魚，將注射111pg組16尾及未注射1尾，進行基因體DNA抽取，進行PCR，然後再進southern hybridization，結果有5尾證實已有轉殖之rtGH基因存在，轉殖率約為38%。

飼育一年後，將其餘注射1.5, 11pg之金魚共60尾，採取尾鰭組織

圖一



圖二



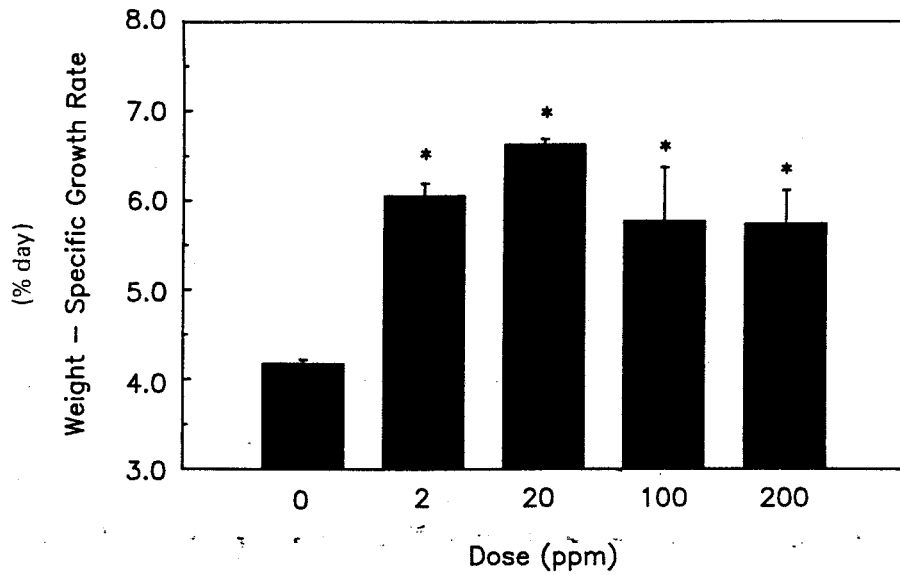
經過上述相同步驟，均未發現轉殖成功，爲了慎重起見，再重複一次之鑑定工作，仍沒有任轉殖之結果。

四、討論

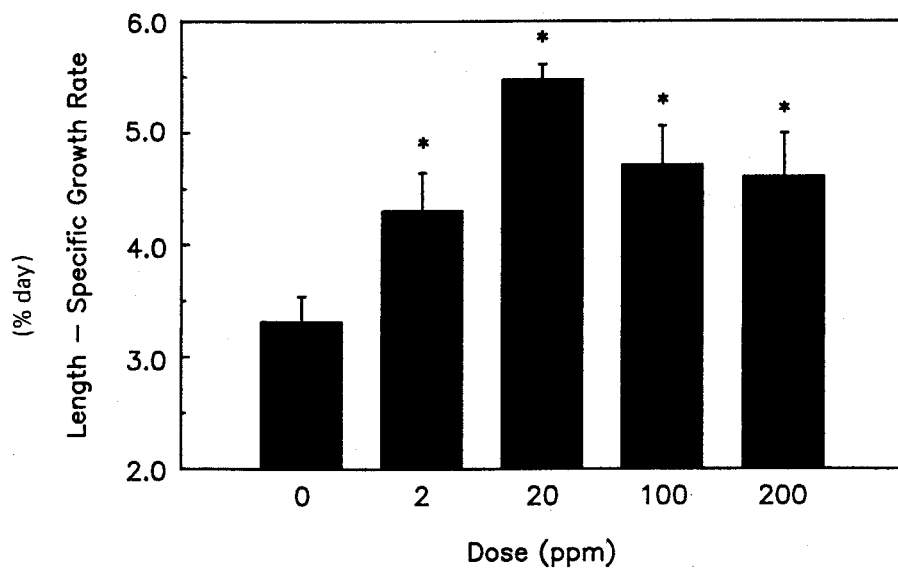
(一)、菌體豬生長激素

過去即有學者認爲以口投方式投給GH，GH會被消化酵素(如try-

圖三

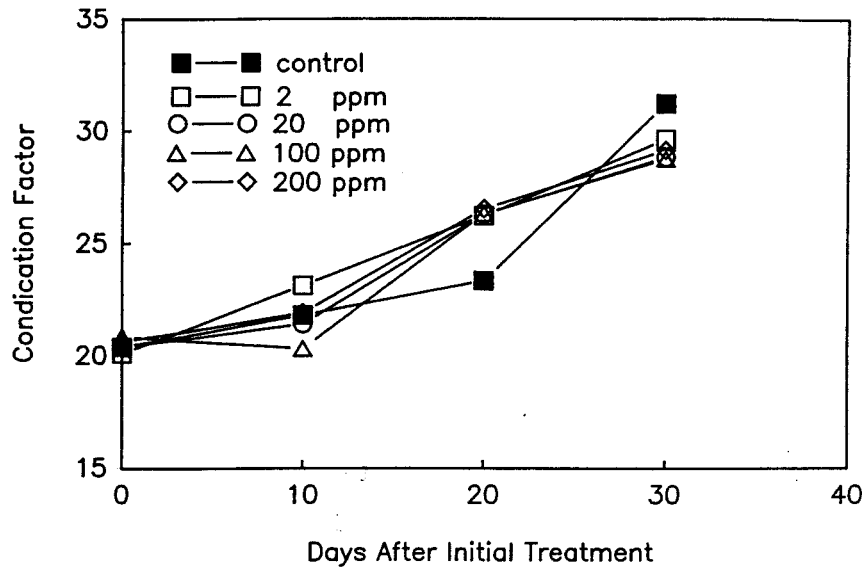


圖四



psin, chymotrypsin, pepsin)分解，因此僅有少部份GH能完整進入細胞內(Donaldson et al. 1979)，但近年來有許多研究者發現飼餵大分子之蛋白質可被仔魚之直腸細胞吸收，而且仍具生物活性。例如 McLean and Ash (1990)以芥酮酸鉀過氧化酶(horseradish peroxidase; HRP MW=40,000)口投虹鱒(*Oncorhynchus mykiss*)，可藉由其細胞化學反應觀察蛋白質之吸收；Schulte et al. (1989)和Le Bail et al. (1989)以重組bovine GH餵給魚吃，有促進成長之效果。

圖五



表二 生理食鹽水微量注射對吳郭魚、泥鰱及香魚孵化率(%)之影響

實驗組別	魚種	注射組	對照組
1	Tilapia	40	60
2	Ayu	50	90
3	Ayu	40	60
4	Ayu	100	60
5	Loach	0	0
6	Loach	11	7.7
7	Loach	25	—
8	Loach	42	61
9	Loach	41	—

Hertz et al. (1992)以胰島素(insulin)口投鯉魚(*Cyprinus carpio*)仍具生物活性。因此口投方法可用於GH之生物分析(bioassay)。惟若經包被處理，可以保護GH較完整地到達吸收部位。例如Hertz et al. (1991)以hGH口投給鯉魚，發現若以deoxy-cholate處理GH將可使其吸收量增加1000倍；Tsai et al. (1993)以含有GH之酵母餵給烏魚仔魚，也發現經包被處理的較無包被處理的更能促進魚的成長。

表三 生長激素基因轉殖金魚之記錄(1991年7月至1992年6月)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	對照組
注射卵數	54	34	31	39	49	55	40	47	14	378
注射時期 (細胞期)	1-2	2-4	4	2-4	4	1-2	1-2	1-2	2-4	
DNA量 (pg/卵)	11.1	11.1	11.1	11.1	1.5	111	111	1.5	11.1	0
孵化率(%)	79.6	70.5	58.0	76.9	91.8	41.8	57.5	82.8	100	94.1

本試驗中，實驗組不論那一種濃度皆較對照組顯著的可促進魚體成長，比較四種濃度之間，在處理後第二十及三十日有顯著差異，尤其20 ppm之濃度效果較佳。參考過去一些最近五年內，有關重組基因合成GH應用於水產物之報告(表一)，本試驗所用之劑量與過去報告所用之注射方式相似，但因注射造成之壓迫(stress)會影響成長效率(Takahashi et al. 1991)，而且較不具應用性；而浸泡方法雖方便，但其有效劑量約為口投之10-100倍，因此較不符合經濟效益。顯示投餵之方式是最實際可行。

大部份之仔魚與無胃魚是利用胞飲作用(pinocytosis)吸收蛋白質(Ash 1985)，而且無胃魚對GH之吸收速度較有胃魚快很多(McLean and Ash 1987)。例如鯉魚(無胃魚)經hGH處理後30分鐘，其血清中之GH即可達最高量，爾後漸漸下降。但虹鱒(有胃魚)經GH處理後15

表一 最近五年以純化或重組生長激素處理水產動物之部份報告所用劑量比較

種名	激 素	方 法	劑 量	參 考 文 獻
<i>Salmo gairdneri</i>	純化虹鱒GH	浸泡	50-500 µg/g	Agellon et al. (1987)
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	重組牛GH	肌肉注射	0.5, 5.0 µg/g	Down et al. (1988)
<i>Salmo gairdneri</i>	重組牛GH	肌肉注射	10 µg/g	Schulte et al. (1989)
		浸泡	100 mg/g	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	重組鮭GH	肛門注射	0.1-1 µg/g	Moriyama et al. (1990)
<i>Crassostrea virginica</i>	重組虹鱒GH	浸泡	10 mg/g	Paynter & Chen. (1991)

小時，其血液中的GH才增高(Moriyama et al. 1990)直到第19小時下降。此外，外因性GH之吸收亦將受到環境因子所影響。在亮光下，GH分泌量較黑暗高(Bjornsson et al. 1989, Clarke et al. 1989, Barrett and Mckeown 1989)，金魚之GH在夏季分泌較冬季高(Marchant et al. 1986)，因此進行GH之生物分析時，魚之發育期、消化機制、季節及光線皆可能是影響結果之因素。本試驗中所使用之吳郭魚仔魚是屬於有胃魚，雖在此試驗未探討其消化機制，但其在孵化後一日腸道便已形成(未發表)，且由此結果亦顯示GH具有生物活性，而Agellon et al (1988)也證實浸泡三十分鐘GH，魚之成長直到第八週實驗組仍顯著高於對照組，顯示出短暫的外因性GH處理具有長時間之效果。因此將GH應用在仔魚比應用在成魚可能更具經濟效益，因為處理仔魚所需之GH量較少。

肥滿度之大小，可判斷GH作用之效果在魚之體長或是體重。Sumpter (1992)認為若CF值低表示該飼料之營養性較差，但其公式之計算有人使用(體重 / 體長^{3.32})(Schulte et al. 1989)，另有人使用(體重 / 體長^{2.83})(Down et al. 1988)。本試驗無法指出何者較為正確，因此採用較一般性之Fultou's方程式計算(體重 / 體長³)。由其結果發現，吳郭魚仔魚不論是對照組或是實驗組，隨著成長其體重增加皆較體長快速。Down et al. (1988)認為GH對魚之成長影響在體長之效果較體重顯著；而Donaldson (1979)則提到，經GH長時間處理之Atlantic salmon較短時間處理者有較高之成長率與較低之肥滿度。處理時間長短與魚種之差異可能是本結果與其不同之原因。從本試驗之成長速率觀察，對吳郭魚仔魚成長促進最有效之濃度分別是：20 ppm > 100 ppm > 2 ppm = 200 ppm；由於外因性之GH對處理後之魚類不具有毒性，但若過量可能將發生負回饋機制(review of Donaldson et al. 1979)，所以本試驗實施劑量與成長之結果，顯示可能也是一種負回饋之現象。

(二)、生長激素基因

以微量注射轉殖生長激素基因之方法，基本上已經建立。本研究中，以111pg高劑量DNA注射組，可以得到約38%之轉殖率，與過去的報告比較(1-75%)，屬於平均水準若只與金魚之報告相較，亦屬平均水準，(Fletcher and Davies 1991)。

Fletcher and Davies (1991)綜觀過去之研究，發現注射之DNA量與轉殖率有密切關係。斑馬魚若果注射50pg DNA，會造成84%之死亡(Stuart et al. 1988)。相反的鮭鱒魚則可以忍受200pg之DNA，高達5000pg之DNA才會造成死亡。鮭鱒卵的體積為斑馬魚的200倍，可以解釋這個差異(Fletcher and Davies 1991)。顯然注射量愈高，死亡率愈高。另一方面，學者們又發現注射之DNA量必須遠高於卵

本身基因的DNA量，才能得到高轉殖率。以鮭魚為例，必須高達100倍。Guyomerd et al. (1989)發現，當DNA量由200增加到500pg，虹鱒之轉殖率則由28%增為74%。本研究之結果亦符合這些現象，111pg (約 1×10^6 copy)死亡率最高，轉殖率也最高；1.5及11pg雖然活存率與對照組(未注射組)相近，卻沒有轉殖成功，這些可以做為未來繼續實驗及實際應用之參考。

過去的報告也提到，注射到卵之DNA會留在基因體外(所謂extrachromosomal DNA)而沒有植入基因體，因此在評估轉殖率時會造成一些困難。一般而言，注射入卵內之DNA如留在基因外，會互相連結成很大的分子，而這些基因體外之DNA會隨發育逐漸減少，而這個減少之速率隨魚種或細胞(如果是mosaic)而有不同；產生基因體外DNA之比率則與注射之DNA量有關(Fletcher and Davies 1991)。通常胚胎及孵化仔魚大都含有基因體外DNA，目高魚注射後3個月仍有25%含基因體外DNA，9個月則只剩5%。斑馬魚4個月時只有5%(Stuart et al. 1988)。泥鰱則在30天只有5%(Kozlov et al. 1988)。因此，最可靠之方法應該是評估F1甚至F2之狀況(Fletcher and Davies 1981)。本實驗111pg組雖然是在孵化後一個月檢測，仍然無法完全排除基因體外DNA之可能性。但因檢測當時，已將所有仔魚全部犧牲，因此無法進行再一次之確認。

如上述，因為檢測有轉殖之仔魚已全數犧牲，因此無法檢測基因表現之狀況。過去之研究，所使用之起動子大都為非魚類，其中以老鼠metallothioneine起動子，Rous Sarcoma病毒(RSV)和SV40為最常用之起動子(Du et al. 1992)。考慮到未來市場之接受問題，應考慮使用魚類本身之起動子，或其他表現強而無礙人體健康之起動子為宜。Du et al. (1992)最近首度使用魚類抗凍蛋白(AFP)基因起動子，得到很好之結果。未來之後續研究，應考慮這方面之問題。總而言之，微量注射生長激素基因轉殖金魚之技術大致上已建立，但是仍有許多問題等待未來繼續解決，才能向實際應用之目標邁進。

謝 辭

本研究之經費由農委會及生物技術中心補助。感謝水試所台南分所丁雲源分所長及林明男博士提供吳郭魚種魚，中研院生化所黃銓珍博士在轉殖評估技術上之指導，還有本實驗室助理董育琪小姐協助實驗工作及文稿之整理。

參考文獻

- Agellon LB, Emery CJ, Jones JM, Davies SL, Dingle A, Chen TT. 1988. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45 : 146-151.
- Ash R. 1985. In "Nutrition and feeding in fish" ed Cowey CB, Mackie AM and Bell JG Academia Press, London, pp 69-93.
- Barrett B, Mckeown BA. 1989. *Comp. Biochem. Physiol.* 94 A : 791-794.
- Bjrrrett BT, Thorarensen, H, Hirano TO, Kristinsson JB. 1989. *Aquaculture* 82, 77-91.
- Brem G, Brenig B, Horstgen-Schwark G, Winnacker EL. 1988. *Aquaculture* 68 : 209-219.
- Chen TT, Power DA. 1990. *Tibtech.* 8, 209-216.
- Clarke WC, Shelbourn J, Ogasawara T, Hirano T. 1989. *Aquaculture* 82: 51-62.
- Cook H, Cook AF, Peter RE. 1983. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50: 348-353.
- Donaldson EM, Fagerlund DAH, Mcbride JR. 1979. In "Fish phtsiology" ed Hoar W. S. Academic Press, New York, Vol III, pp. 455-587.
- Down NE, Donaldson EM, Dye HM, Langley K, Souaz LM. 1988. *Aquaculture* 68: 141-155.
- Donoghue DJ, Scanes CG. 1991. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84: 344-354.
- Du SJ, Gong Z, Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Idler DR, Hew CL. 1992. *Bio/Tech.* 10: 176-181.
- Fletcher GL, Davies PL. 1991. In "Genetic engineering" ed Setlow, JK Plenum Press, New York, Vol. 13: 331-370.
- Guyomard R, Chourrout D, Leraux C, Houdebine LM, Pourrain F. 1989. *Biochimie* 71, 857-863.
- Hertz Y, Tchelet A, Madar Z, Gertler A. 1991. *J. Comp. Physiol. B* 161: 159-163.
- Hertz Y, Shechter Y, Madar Z, Gertler A. 1992. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A: 19-22.
- Higgs DA, Donaldson EM, Dye HM, CcBride JR. 1976. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 1585-1603.
- Kozlov AP, Reshetnikov VL, Korzh VP, Neifakh. 1988. *Molecular Biol.* 22: 1286-1293.
- Le Bail, PY, Sire MF, Vernier JM. 1989. *J. Exp. Zool.* 251: 101-107.
- Markert JR, Higgs DA, Dye HM, Macquarrie DW. 1977. *Can. J. Zool.*, 55: 74-83.
- Marchant TA, Cook AF, Peter RE. 1986. *Aquaculture of Cyprinids* 43-54.

- McLean E, Ash R. 1987. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A: 507-510.
- McLean E, Ash R. 1990. *Aquaculture* 87: 373-379.
- Moriyama S, Takahashi A, Hirano T, Kawauchi H. 1990. *J. Comp. Physiol. B* 160: 251-257.
- Ozato K, Inoue K, Wakamatsu Y. 1989. *Zool. Sci.* 6: 445-457.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Brinberg NC, Evans RM. 1982. *Nature, London*, 300: 611-615.
- Paynter K, Chen TT. 1991. *Biol. Bull.* 181: 459-462.
- Prack M, Antoine M, Caiati M, Roskowski R, Treag T, Vodcnick MJ, De Vlaming VL. 1980. *Comp. Biochem. Physiol.* 67A: 307-310.
- Prack M, Antoine M, Caiati M, Roskowski R, Treag T, Vodcnick MJ, De Vlaming VL. 1980. *Comp. Biochem. Physiol.* 67A: 307-310.
- Richman NH, Zaugg W. 1987. *Gen. Comp. Endocrinol.* 65: 189-198.
- Schulte P, Down NE, Donaldson EM, Souza LM. 1989. *Aquaculture*, 76: 145-156.
- Stuart GW, McMurray JV, Westerfield M. 1988. *Aquaculture*, 76: 145-156.
- Sumpter JP. 1992. *Aquaculture*, 100: 299-320.
- Takahashi A, Ogasawara T, Kawauchi H, Hirano T. 1991. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 231-235.
- Tsai HJ, Kuo JC, Lou SW, Kuo TT. 1994. *Prog. Fish Cult* (in press).
- Wanger CF, McKeown BA. 1981. In "Current trends in comparative endocrinology" ed Lofts B. and Holmes, W. N. *Proc. 9th Int. Symp. Comp. Endocrinol. Hong Kong*, p.211.
- Weatherley AH. Gill, HS. 1987. *Aquaculture* 65, 55-66.
- Yamauchi K, Nishioka RS, Young G, Ogasawara TH, Bern H. 1991. *Aquaculture*, 92: 33-42.
- Zhu Z, Li G, He L, Chen S. 1985. *J. Appl. Ichthyol.* 1: 31-34.