

高温诱导对尼罗罗非鱼性别分化及生长的影响

党广成^{1,3} 刘羽清² 付佩胜² 程安达¹ 刘 洋³

赵 燕¹ 朱永安² 宋憬愚¹ 季相山^{1*}

(¹山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

(²山东省淡水水产研究所, 济南 250117)

(³大连海洋大学生命科学与技术学院, 116023)

摘 要 采用自雌鱼口腔中取出受精卵人工孵化的方法建立了尼罗罗非鱼家系 20 个。受精后 9 d, 将各家系鱼苗分成两份, 分别在 28 °C (对照组) 和 36 °C (高温诱导组) 下养殖, 诱导处理 12 d 后, 统计高温诱导期成活率并将实验鱼转入自然水温下培育, 养殖 60~120 d 后对各实验组的雄性率及生长情况进行测定。结果表明, 高温处理对仔鱼的成活率没有影响, 但能显著提高某些家系的雄性率, 如 F27 (诱导组 88%, 对照组 49%)、F37 (诱导组 90%, 对照组 53%) 和 F41 (诱导组 91%, 对照组 53%); 高温处理后多数家系的雄性率略有升高, 但不显著; 有两个家系高温诱导组雄性率低于对照组, 分别是 F8 (诱导组 43%, 对照组 46%) 和 F35 (诱导组 29%, 对照组 38%), 这显示了尼罗罗非鱼性别分化受遗传和环境因子共同作用。生长情况测定结果表明, 高温诱导对发育初期罗非鱼的生长没有显著影响。本研究结果说明, 高温处理能显著提高某些家系的雄性率, 高温诱导和家系选择有望成为高雄性率尼罗罗非鱼新品种培育的新的技术手段。

关键词 尼罗罗非鱼 高温诱导 成活率 性比 生长

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)05-0032-06

Effect of high-temperature treatment on sex differentiation and growth in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

DANG Guang-cheng^{1,3} LIU Yu-qing² FU Pei-sheng² CHENG An-da¹
LIU Yang³ ZHAO Yan¹ ZHU Yong-an² SONG Jing-yu¹ JI Xiang-shan^{1*}

(¹College of Animal and Science Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

(²Shandong Freshwater Fisheries Research Institute, Jinan 250117)

(³College of Biology Science and Technology, Dalian Ocean University, 116023)

ABSTRACT The Nile tilapia *Oreochromis niloticus* is a species of great commercial interest in the world. Although various approaches have been introduced to improve productivity, difference in growth between male and female fish is still the major bottleneck for tilapia cultivation. Therefore, high-frequency or all male stocks are preferred to enhance overall productivity of Nile tilapia. In order to investigate the effect of high-temperature treatment on the sex differentiation in Nile tilapia and screen high and low frequency families of males, 20 families were established for Nile tilapia “Ji-Fu” strain. During the reproductive season of Nile tilapia, the 2~3 year-old

山东省自然科学基金(ZR2009DQ021)和山东农业大学青年科技创新基金共同资助

* 通讯作者。E-mail: xsji@sdau.edu.cn

收稿日期:2011-02-06;接受日期:2011-04-05

作者简介:党广成(1985-),男,硕士研究生,主要从事鱼类遗传育种和分子生物学方面的研究。E-mail: dangguangcheng@163.com

Nile tilapia females and males were cultivated in 10 m³ pond. The female mouth was checked to see whether there were fertilized eggs or not every 5~7 days. If there were fertilized eggs, the eggs were taken out, cultivated in a single tank, and named as a family. Fry were counted at 9 d post-fertilization and the every batch of offspring was divided into two groups: control group and high-temperature group. The control group was maintained at a constant 28°C water temperature, and the high-temperature group at 36°C. Treatment durations were 12 d, and at the end of the treatment, the number of fish in each group was recounted. Treated fry were gradually adapted to 28°C, and then all the fry was transferred into tanks in natural water temperature. Progenies were subjected to sexing at ages of 2 to 4 months. Sexing was conducted by observing the morphology of gonadal cell under microscope. The mortality of fry in control group and high-temperature group was not significantly different. Among 20 families, the frequency of males in high-temperature group was significantly higher than that in the control group in 3 families, including F27 (88% in treated group; 49% in control group), F37 (90% in treated group; 53% in control group), and F41 (91% in treated group; 53% in control group). The high-temperature treatment did not significantly increase the male frequency of most families. However, the frequency of males in high-temperature group was significantly lower than that in the control group in 2 families: F8 (43% in treated group; 46% in control group) and (29% in treated group; 38% in control group). These results prove the possibility to modify the sexual ratio of Nile tilapia and provide new methodology to breed new strain with high frequency of males.

KEY WORDS Nile tilapia *Oreochromis niloticus* High-temperature induction
Survival rate Sex ratio Growth

罗非鱼及其杂交种因具有高生长繁殖率、耐低氧和能高密度养殖、易较好地吸收利用低成本的植物蛋白饲料和广阔的市场前景,已成为全球一个重要的食用鱼养殖品种。中国是世界上主要的罗非鱼养殖和出口国家之一,近几年我国罗非鱼的养殖产量都保持在100万t以上(李家乐等 2001)。然而,罗非鱼性成熟早、繁殖力强,养殖的罗非鱼未达到商品规格就能自然繁殖,从而造成养殖池塘中出现二代同“塘”的现象,使得养殖密度过大、养殖个体生长速度减慢、上市规格减小,降低了养殖效益;而罗非鱼雄性生长速度又显著快于雌性,因此全雄罗非鱼养殖意义巨大。经过几十年的努力,人们已找到了许多培育高雄性率罗非鱼苗种的方法,如激素处理、种间杂交、染色体操作等(夏德全等 1999),但培育全雄罗非鱼苗种仍困难重重,仍是当前罗非鱼养殖业中亟待解决的问题。

鱼类的性别分化是具双向潜力的未分化性腺经过程序性发生的一系列事件,最终发育成精巢或卵巢的过程;而从分子水平上讲,就是性别决定基因在诱导信号等作用下,使特异基因选择性地表达,从而实现性别分化程序表达的过程。由于鱼类进化地位比较低,其性别分化除受遗传因素控制外,还受环境因素(如温度)等的调控,如Baroiller等(1995)研究发现,在尼罗罗非鱼性腺分化期32°C高温处理能使部分XX雌鱼性反转为雄鱼。近年来人们对温度诱导尼罗罗非鱼性逆转的适宜时期、处理温度、处理持续时间等进行了详细研究(Devin *et al.* 2002; Tessema *et al.* 2006)。Baroiller等(2001)用5×5双列杂交研究证实了亲本能影响高温诱导下尼罗罗非鱼各家系的性逆转率。Tessema等(2006)进一步研究发现,在性腺分化期高温(36°C)处理的各家系,有些家系的雄性率甚至达100%,这为培育高雌或全雄罗非鱼苗种提供了新的可能。Bezault等(2007)用生活于极端环境(高原湖、温泉和温度季节变化极大的沃尔特湖)的3个自然群体的尼罗罗非鱼为材料,研究高温处理对其性别分化的影响。结果发现,高温处理下各群体间性逆转率差异显著,而高温诱导对我国尼罗罗非鱼养殖群体性别分化的影响目前还未研究,由于尼罗罗非鱼在国内养殖较为广泛(陈林等 2008;李思发等

2008),研究温度对其性别分化的影响,有助于培育高雄性率甚至全雄尼罗罗非鱼苗种,研究意义重大。

罗非鱼有一种独特的繁殖习性,就是雌鱼口腔含卵孵化。繁殖季节,雄鱼在池底用咀挖窝,雌鱼产卵于窝中,接着即将卵含入口中,同时雄鱼排精,吸卵的同时也将精子吸入口腔,在口腔中精、卵完成受精过程。本研究利用尼罗罗非鱼这一独特的繁殖习性,将多尾雌鱼和雄鱼放养于同一池中,待雌鱼口腔孵卵后,将受精卵从口腔中取出人工条件下孵化以建立家系,用此法共建立尼罗罗非鱼家系 20 个,并研究了高温诱导对各家系雄性率及生长的影响,以期发现高温诱导后高雄性率和低雄性率家系。

1 材料和方法

1.1 罗非鱼亲鱼及养殖

尼罗罗非鱼亲鱼取自山东省淡水水产研究所国家级尼罗罗非鱼原良种场,是该场于 1998 年从无锡淡水渔业研究中心购进的鱼种繁殖、选育 6 代后的良种。挑选 500 g 左右的健康二龄鱼 84 尾作亲本,其中雌鱼 60 尾、雄鱼 24 尾,将 6~10 尾雄鱼和 20 尾雌鱼放养于 1 个 18 m³ 的水泥池中,共放养于 3 个池中用于构建家系,每 7 d 大换水 1 次,每次换水 3/4 量;每天早晚各投喂 1 次罗非鱼颗粒饲料。

1.2 各家系受精卵的获取及孵化

每次投饵时仔细观察亲鱼摄食情况,以便了解亲鱼口腔是否含卵,每隔 7 d 逐一检查雌鱼的口腔,若含卵,将卵取出,漂洗后转移至小网箱中单独孵化并标记家系号,孵化水温为 28~29℃,每个孵化网箱中放置充气石 1 个以增加溶氧并使卵保持一定的悬浮度。每天早晚将死卵挑出以保持良好的水质,每隔 3 d 用质量分数为 3×10⁻⁵ 二氧化氯消毒 1 次。

1.3 仔鱼高温诱导及高温诱导期成活率统计

仔鱼卵黄吸收完后,约在受精后 9 d 进入性腺分化期(Baras *et al.* 2001),此时将每个家系的仔鱼均分为两组,一组在 28℃ 水温下正常养殖(对照组),另一组在 4 h 内将水温升至 36℃ 进行高温诱导(高温诱导组)。各家系仔鱼数 200~400 尾不等,高温诱导时间为 12 d。诱导期间,用甲鱼粉料和成团状投喂,每天投喂 3~4 次,并定期泼洒质量分数为 1×10⁻⁵ 溴氯海因进行疾病预防,将每天死亡的仔鱼吸出并计数,至高温诱导期结束时,剩余仔鱼数除以诱导前仔鱼数求得各组高温诱导期成活率。

1.4 各实验组罗非鱼生长性能测定

2010 年 6 月 1 日~7 月 19 日完成了所有家系的构建工作。高温诱导结束后将各家系的对照组和高温诱导组仔鱼分别转入 0.8 m³ 的大网箱中进行养殖,养殖期间每 3 d 大换水 1 次,每次换水 3/4 量;每天早、中、晚各投喂 1 次罗非鱼颗粒饲料。经过 60~120 d 的养殖,对其中部分家系进行生长测定。测量指标主要包括全长(从吻端到尾鳍末端)、体宽、体重 3 个指标,每个家系对照组和实验组分别测量约 60 尾,对照组和实验组生长性能测定在同一天进行,以便准确比较高温诱导对罗非鱼生长性能的影响。

1.5 各家系罗非鱼雄性率测定

将罗非鱼解剖后,取其性腺置于载玻片上,压片后在显微镜下观察性腺细胞的形态以辨别雌雄。极个别不易分辨雌、雄的个体,玻片经吉姆萨染色后鉴定性别。

具体 Giemsa 染色方法:将涂有性腺细胞涂片的载玻片用甲醇固定 15 min,待甲醇挥发干后,PBS 稀释(5:1)的 Giemsa 染液染色 10 min,用水将玻片冲洗干净后在室温下自然晾干,显微镜下观察性腺细胞的形态以辨别雌、雄。每个家系对照组和实验组分别鉴定约 80 尾,统计各组的雄性率。

1.6 数据处理及统计分析

数据的统计分析采用 SPSS 13.0 软件进行,计算各指标的平均值和标准差。并进行单因素方差分析,

当 $P < 0.05$ 时说明对照组和高温诱导组间存在显著差异。

2 结果

2.1 尼罗罗非鱼家系的建立

本研究以尼罗罗非鱼雌鱼 60 尾、雄鱼 24 尾为亲本,采用自然交配、自然受精、人工将受精卵从雌鱼口腔中磕出的方式共获得罗非鱼家系 55 个,其中 8 个家系因各种原因未能孵化出膜,27 个家系孵出的仔鱼数量少于 200 尾而被舍弃,最终有 20 个家系用于高温诱导实验。

2.2 高温诱导对罗非鱼各家系仔鱼成活率的影响

各家系对照组和高温诱导组仔鱼在诱导期的成活率见图 1。绝大多数家系的对照组和高温诱导组仔鱼成活率没有差异,F43 和 F45 的对照组仔鱼成活率高于诱导组的,但 F27、F28、F29、F30、F35、F37 的对照组仔鱼成活率低于诱导组的,特别是 F35 的对照组仔鱼成活率显著低于诱导组的,但具体原因未知。总体上,36 °C 高温诱导对仔鱼的成活率没有影响。

2.3 高温诱导对罗非鱼各家系雄性率的影响

尼罗罗非鱼性腺细胞显微观察结果见图 2。卵母细胞体积相对较大,形状为圆形或者椭圆,排列很规则、清晰,细胞间隔易区分,而精原细胞体积很小,呈致密排列,难以区分其细胞间隔。卵母细胞直径是精原细胞的 20 倍以上。吉姆萨染色后细胞核被染成深紫色,雌性卵母细胞的核质对比明显,易于区分,而雄性则为致密的紫色斑点(未显示图片)。

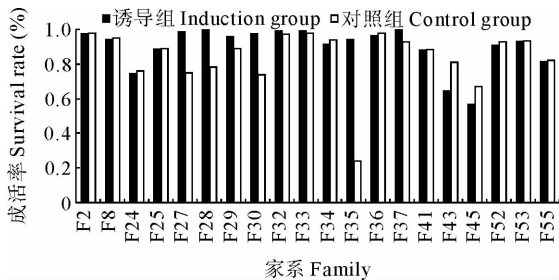


图 1 高温诱导对各家系仔鱼成活率的影响

Fig. 1 Effect of high-temperature induction on larvae survival rate of different families

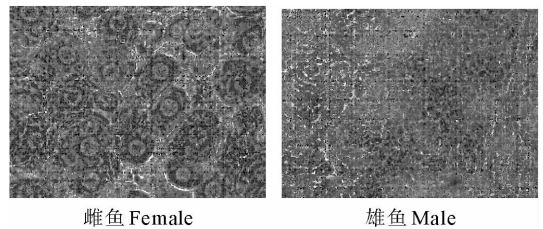


图 2 尼罗罗非鱼雌雄鱼性腺显微观察 (100×)

Fig. 2 Microscopic observation of female and male gonads of Nile tilapia (100×)

罗非鱼各家系仔鱼经 60~90 d 养殖后,性腺显微观察仔鱼性别鉴定发现,有 3 个家系高温诱导组雄性率显著高于对照组,分别是 F27(诱导组 88%,对照组 49%)、F37(诱导组 90%,对照组 53%)和 F41(诱导组 91%,对照组 53%);14 个家系高温诱导组雄性率高于对照组,但差异不显著;1 个家系(F31)高温诱导组雄性率与对照组没有差异;两个家系高温诱导组雄性率低于对照组,分别是 F8(诱导组 43%,对照组 46%)和 F35(诱导组 29%,对照组 38%)。以上结果说明,高温诱导能显著提高某些家系的雄性率,而对有些家系则没有显著影响,显示了尼罗罗非鱼性别分化受遗传和环境因子共同作用。多数对照组的雄性率都在 50%左右,但 F34 对照组的雄性率为 76%,高温诱导组的雄性率为 82%,并没有显著提高。F32、F35 对照组雄性率都在 40%以下,且 F35 高温诱导后雄性率降低。

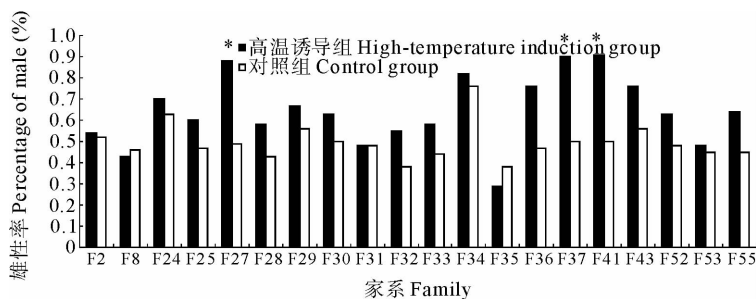
2.4 高温诱导对尼罗罗非鱼生长的影响

在 2010 年 6 月 30 日,成功孵化出足够数量鱼苗的家系有 4 个,分别是 F27、F28、F29、F30,为了减少实验误差,本实验只比较了这 4 个家系的高温诱导组和对照组之间的生长差异,其他家系由于孵化时间不一致,不

作比较(表1)。结果发现,高温诱导组雄性率显著高于对照组的F27家系,其体重、全长、体宽均高于对照组,但差异不显著;另外3个家系,F29高温诱导组的体重大于对照组,F28、F30高温诱导组的体重小于对照组,但差异均不显著,说明在发育初期高温诱导对罗非鱼的生长没有显著影响。

3 讨论

人工授精的方式构建罗非鱼家系较为费时费力,Tessema等(2006)采用人工挤卵、人工授精的方法构建了尼罗罗非鱼家系38个,但由于各家系的卵质差异较大,各家系获得的仔鱼数也差异悬殊,且人工获得未受精卵较为困难。Baras等(2001)曾采用一雌对多雄的策略构建罗非鱼家系。本实验将6~10尾雄鱼和20尾雌鱼混养于1个18 m³的水泥池中,每隔7 d检查一次雌鱼的口腔。若含卵,将卵取出置于孵化箱中单独培养并标注家系号。该法能确定家系的母本,通过指纹技术可以从6~10尾雄鱼中较容易地确定其父本(另文发表),具有省时、省力的优点,克服了高质量未受精卵难于获得的缺点,使大批量构建罗非鱼家系成为可能;另外本法获得的受精卵因在雌鱼口腔中已孵化数天,所以孵化率高;各家系获得的仔鱼数量也较为一致。



* 表示高温诱导组雄性率显著高于对照组

* : Male frequencies of high-temperature treatment group is higher than that of the control group

图3 高温诱导对尼罗罗非鱼各家系雄性率的影响
Fig. 3 Effect of high-temperature induction on the percentage of males in different Nile tilapia families

表1 高温诱导对尼罗罗非鱼各家系生长性能的影响

Table 1 Effect of high-temperature induction on growth characteristics in different Nile tilapia families

家系 Family No.	高温诱导组 High-temperature induction group			对照组 Control group		
	体重 (g) Body weight	全长 (cm) Body length	体宽 (cm) Body width	体重 (g) Body weight	全长 (cm) Body length	体宽 (cm) Body width
F27	10.4±2.03	6.64±0.41	2.69±0.31	10.3±1.53	6.52±0.79	2.58±0.18
F28	7.87±1.26	5.84±0.38	2.52±0.23	8.00±1.36	5.98±0.34	2.42±0.20
F29	10.77±2.36	6.38±0.53	2.83±0.25	10.03±1.73	6.46±0.34	2.68±0.19
F30	9.40±1.98	6.05±0.45	2.62±0.27	9.98±1.28	6.36±0.29	2.64±0.14

培养水温对仔鱼成活率的影响国内外研究较多,Baras等(2001)为研究诱导温度与仔鱼存活率的关系,设置了温度区间(20.4~39.0℃),在各温度下养殖28 d后发现,24~33℃间存活率为96.7%,低温21℃时为79.0%,高温35℃时为85.0%,37℃时成活率急剧下降,为64.7%。Bezault等(2007)发现卵黄吸收净后,在27和36℃下培养30 d,仔鱼死亡率分别为10%和17%,在正常水温下继续养殖60 d后死亡率分别为12%和4%,总体上36℃高温培养达30 d对罗非鱼成活率无影响显著。Tessema等(2006)在性别分化期,36℃下培养仔鱼10 d,各家系平均成活率为95.5%,对照组为96.1%,差异不显著。而在36.54±0.39℃下处理21 d,仔鱼成活率为67.72%,比对照组(71.86%)略低(Abucaay *et al.* 1999)。本研究发现,在罗非鱼仔鱼性腺分化期,36℃处理12 d对其成活率没有显著影响。综合本研究结果及近年来他人的研究数据可知,尼罗罗非鱼高温诱导处理的适宜温度是36℃。

早在1990年,Mair等(1990)认为,高温处理罗非鱼仔鱼后,其雄性率升高是由于雌鱼大量死亡造成的。Rougeot等(2008)将XX雌鱼和XX性反转雄鱼交配繁殖的仔鱼27℃下养殖,雄性率为0;36℃下高温养殖,

雄性率为 17.5%,有力地证明了高温处理能诱导雌鱼性逆转。Abucay 等(1999)在 36.54 ± 0.39 °C 下诱导 XX 全雌仔鱼也得出了相似的结论,这主要是因为鱼类进化较为低等,环境因素特别是温度能影响其性别分化,这在其他鱼类上也有类似报道,如邓思平等(2007)研究发现,28 和 32 °C 高温处理能显著提高半滑舌鲷群体中的雄性比例。尽管温度对鱼类性别分化影响较为普遍,而鲜有将其应用于高雄或高雌苗种培育的报道,一个很重要的原因是温度对不同亲本来源的仔鱼性别分化影响差异显著(Baroiller *et al.* 2009)。Bezault 等(2007)用生活于极端环境(高原湖、温泉和温度季节变化极大的沃尔特湖)的 3 个自然群体的尼罗罗非鱼为材料,研究高温处理对其性别分化的影响,发现尽管高温处理后这群体的后代都显示了比较高的雄性率,但群体间有较大差异。Tessema 等(2006)研究也发现,不同家系的仔鱼高温诱导后雄性率差异显著,这都与本研究的结果基本一致,然而高温诱导下亲本对各家系仔鱼雄性率影响的具体原因目前还不很清楚,很可能是由于性别分化相关基因多态性水平各亲本间有差异。

尼罗罗非鱼雄性生长速度显著快于雌性,获得高雄性率罗非鱼苗种能提高其生长速度、防止其性早熟引起的大量繁殖。高温诱导能使部分遗传型雌鱼性分化为表型雄鱼,但表型雄鱼是否与正常雄鱼一样具有较快的生长速度是一个非常值得关注的问题,然而,国内外对此均没有研究。本研究发现,高温诱导组雄性率显著高于对照组的 F27 家系,其体重、全长、体宽均高于对照组,但差异不显著;另外 3 个家系,F29 高温诱导组的体重大于对照组,F28、F30 高温诱导组的体重小于对照组,但差异均不显著,说明在发育初期高温诱导并未对罗非鱼生长产生显著影响,但在发育后期对其是否有影响仍需进一步观察研究。

本研究采用自雌鱼口腔中取出受精卵人工孵化的方法建立了尼罗罗非鱼家系 20 个,高温诱导后,获得了 3 个性逆转高温敏感家系(雄性率 88%以上)以及两个高温不敏感家系(雄性率 45%以下),这为高雄性率尼罗罗非鱼新品种培育提供了新的途径,为研究鱼类性别分化的分子机制提供了基础。

参 考 文 献

- 邓思平,陈松林,田永胜,刘本伟,庄志猛,王清印,邓 寒. 2007. 半滑舌鲷的性腺分化和温度对性别决定的影响. 中国水产科学,14(5):714~719
- 李家乐,李思发. 2001. 中国大陆尼罗罗非鱼引进及其研究进展. 水产学报,25(1):90~95
- 李思发,陈 林,蔡完其. 2008. 吉奥罗非鱼(新吉富罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)和 4 种近缘遗传型罗非鱼的遗传差异的 RAPD、SSR 比较分析. 水产学报,32(5):657~664
- 陈 林,李思发,简伟业,何学军,李先仁,蔡完其. 2008. 吉奥罗非鱼(新吉富罗非鱼♀×奥利亚罗非鱼♂)生长性能的评估. 上海水产大学学报,17(3):257~262
- 夏德全,曹 莹,杨 弘,吴婷婷. 1999. 罗非鱼杂交 F₁ 代与亲本的遗传关系及其杂种优势的利用. 中国水产科学,6(4):29~32
- Abucay, J. S., Mair, G. C., Skibinski, D. O. F., and Beardmore, J. A. 1999. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture, 173(1-4): 219~234
- Baras, E., Jacobs, B., and Mélard, C. 2001. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 192(2-4): 187~199
- Baroiller, J. F., Chourrout, D., Fostier, A., and Jalabert, B. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding Cichlid fish *Oreochromis niloticus*. J. Exp. Zool. 273(3): 216~223
- Baroiller, J. F., and D'Cotta, H. 2001. Environmental and sex determination in farmed fish. Comp. Biochem. Physiol. Part C. 130(4): 399~409
- Baroiller, J. F., D'Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., and Hoerstgen-Schwark, G. 2009. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 153(1): 30~38
- Bezault, E., Clota, F., Derivaz, M., Chevassus, B., and Baroiller, J. F. 2007. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. Aquaculture, 272(S1): S3~S16
- Devin, R. H., and Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208(3-4): 191~364
- Mair, G. C., Beardmore, J. A., and Skibinski, D. O. F. 1990. Experimental evidence for environmental sex determination in *Oreochromis* species. In: Hirano, R., Hanyu, I. (Eds.), The Second Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 555~558
- Rougeot, C., Prignon, C., Kengene, C. V. N., and Mélard, C. 2008. Effect of high temperature during embryogenesis on the sex differentiation process in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 276(1-4): 205~208
- Tessema, M., Müller-Belecke, A., and Hörstgen-Schwark, G. 2006. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. Aquaculture, 258(1-4): 270~277