

## マツカワ *Verasper moseri* における三倍体 および雌性発生二倍体の誘起

森 立成,<sup>1\*</sup> 齊藤節雄,<sup>1a</sup> 岸岡稚青,<sup>2</sup> 荒井克俊<sup>2</sup>

(2003年7月7日受付, 2003年10月31日受理)

<sup>1</sup>北海道立中央水産試験場, <sup>2</sup>北海道大学水産科学研究科育種生物学講座

Induction of triploids and gynogenetic diploids in barfin flounder *Verasper moseri*

TATSUNARI MORI,<sup>1\*</sup> SETSUO SAITO,<sup>1a</sup>  
CHI HARU KISHIOKA<sup>2</sup> AND KATSUTOSHI ARAI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hokkaido Central Fisheries Experimental Station, Yoichi, Hokkaido 046-8555, <sup>2</sup>Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Minato-cho, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

The optimum conditions for inducing triploidy and gynogenesis by cold and pressure shock in barfin flounder *Verasper moseri* were examined. The sperm of barfin flounder was genetically inactivated by the dose of 10 mJ/cm<sup>2</sup> UV irradiation. Triploids were induced by applying cold shock treatment with -1.5°C at 9 min after fertilization for 90 min duration. In this condition, hatching rate relative to the control was 29.2% and triploidy rate was 90.9%. Meiotic gynogenetic diploids were obtained by fertilizing eggs with UV-irradiated sperm and subsequent cold shock (-1.5°C) at 3-9 min after fertilization for 60-90 min duration and pressure shock (650 kg/cm<sup>2</sup>) at 7 min after fertilization for 6 min duration. Mitotic gynogenetic diploids were obtained by pressure shock (650 kg/cm<sup>2</sup>, 6 min) and applied at 150-240 min after fertilization.

キーワード：マツカワ, 精子の不活化, 三倍体, 第二極体放出阻止, 第一卵割阻止, 雌性発生二倍体, 低温処理, 圧力処理

マツカワ *Verasper moseri* は、太平洋側では茨城以北、日本海側では若狭湾以北に分布する北方性の大型カレイで、北海道の重要栽培漁業対象種として位置づけられており、種苗生産と放流が行われている。<sup>1)</sup> 本種は市場単価が高く、低水温で成長が良好であることから養殖魚として有望視され、海面養殖に関する試験も行われている。<sup>2)</sup> 今後、本種の養殖を進展させるには、品種改良(育種)による生産性の向上が重要な課題になると考えられる。

多くの養殖対象種において、染色体操作技術の導入により性の統御や不妊魚の作出が可能となった。<sup>3,4)</sup> 本種においては、雌が雄よりも良好な成長を示すことから、<sup>5)</sup> 全雌種苗あるいは不妊全雌三倍体は養殖に有用であると考えられる。一方、優良形質の遺伝的固定の促進には人為的な雌性発生二倍体が有用である。<sup>3,4)</sup> これまで、異体類の染色体操作に関する最初の研究は、Purdom により

plaice (*Pleuronectes platessa*) について成され、<sup>6)</sup> その後本邦でもヒラメ *Paralichthys olivaceus*,<sup>7-10)</sup> マコガレイ *Limanda yokohamae*<sup>11)</sup> について行われてきた。現在、欧州産異体類についてもその研究は活発であり、turbot (*Scophthalmus maximus*),<sup>12)</sup> Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*),<sup>13)</sup> sole (*Solea solea*)<sup>14)</sup> について、三倍体ならびに雌性発生二倍体誘起の報告がある。これらの研究により、各種における三倍体や雌性発生二倍体誘起条件とそれらの養殖特性等が明らかにされ、特に、ヒラメでは第一卵割阻止型雌性発生二倍体作出の成功により、次世代における雌性発生二倍体作出の繰り返しによるクローン集団の作出が可能となっている。<sup>10)</sup> これらはいずれも養殖対象異体類における染色体操作育種進展の可能性を示すが、三倍体あるいは雌性発生二倍体の誘起条件は共通ではなく、対象魚種毎に最適誘起条件の検討が必要である。マツカワについては、染色体操作条件に

\* Tel : 81-135-23-8701. Fax : 81-135-23-3141. Email : morit@fishexp.pref.hokkaido.jp

<sup>a</sup> 現所属：北海道立栽培漁業総合センター (Hokkaido Institute of Mariculture, Shikabe, Hokkaido 041-1404, Japan)

関する研究は現在まで行われていない。そこで本研究では、本種の育種基盤の確立に資するため、紫外線による精子の遺伝的不活化ならびに受精卵の第二極体放出および第一卵割阻止による染色体倍数化のための好適処理条件を検討した。

### 材料と方法

**供試魚** 実験番号と供試魚を実験目的別に Table 1 に示した。マツカワ親魚は、道立栽培漁業総合センター(鹿部町)において親魚養成された2+~3+魚を道立中央水産試験場(余市町)に搬入し、これらを1トンおよび4トンFRP水槽で、餌料にはヒラメ用配合飼料を用い、天然海水のかけ流しにより3+~4+まで飼育した。これらのうち雌親魚8尾(#1~#8)および雄親魚11尾(#20~#30)を用いて、三倍体(実験2)、第二極体放出阻止型雌性発生二倍体(実験3)および第一卵割阻止型雌性発生二倍体(実験4)の作出条件の検討を行った。予備実験では、紫外線(UV)照射精子を受精したマツカワ卵のほとんど全ては孵化前に死亡し、半数体孵化仔魚出現の確認とフローサイトメトリーによるこれらの倍数性判定は困難であった。そこで、マツカワ精子の遺伝的不活化条件を検討した実験1では、ヒラメクローン魚(77系統)から得た卵を用いた。ヒラメクローン魚(77系統)は、道立中央水産試験場においてヒラメ天然魚から作出した第一卵割阻止魚から採卵し、第二極体放出阻止して作成したホモ型クローン<sup>15)</sup>であり、同水試で飼育、成熟させたものである。

**採卵と受精** マツカワおよびヒラメクローン魚(77

系統)の成熟卵は、魚を取り上げた後、腹部を手で圧迫してシャーレに採取した。マツカワ卵の場合は7°C、ヒラメ卵の場合は15°Cの恒温庫で保存した。マツカワ精子も卵と同様に、腹部を圧迫することによりシャーレに採取し、7°Cの恒温庫で保存した。これらの卵を、処理群毎に500 mlの計量カップに10~15 g ずつ分注し、媒精後直ちに海水を添加して軽く攪拌し、1~2分間静置することにより人工受精を行った。実験期間中の受精水温は、平均8.1°C(最低7.2~最高8.5°C)とした。

**卵管理と孵化率** マツカワ受精卵を、処理群毎に60 Lおよび100 L水槽に設置した孵化ネット(直径20 cm, 深さ30 cm)に収容し、水温8~10°Cの流水で卵管理を行った。受精後10日目に孵化仔魚数を計数し、対照群を100%とした場合の相対孵化率を求めた。同一雌の卵に由来する各処理群の相対孵化率は、 $\chi^2$ 検定を用いて有意差( $P < 0.05$ )を検定した。今回、用いた雌親魚8尾(#1~#8)および雄親魚11尾(#20~#30)の組み合わせによる対照群の孵化率は平均28.5%(最低10.4~最高74.0%)であった(Table 1)。

**マツカワ精子の遺伝的不活化条件の検討** 雄親魚(#20)の精液50  $\mu$ lにカレイ用リンゲル液(pH:6.0)<sup>16)</sup>を1.5 ml加えて希釈し、径90 mmのガラスシャーレ上に薄くのばした。そして、シェーカーで振とうしながら、上方300 mmに設置した殺菌灯2本(GL-15, 東芝)より紫外線を照射した。精液は、採取直後および紫外線照射後に、スライドガラス上に一滴とり、光学顕微鏡下において少量の海水を滴下して、いずれの場合も精子に運動性があることを確認した。紫外線の強度を、照

**Table 1** Identification number, age, total length (TL) of parental female and male fishes in four kinds of experiments and hatching rates in their control crosses

Exp. #	Aim of manipulation	Treatment	Female #	Age	TL (mm)	Male #	Age	TL (mm)	Hatching rate (%) <sup>*1</sup>
1	Haploid gynogenesis	UV irradiation	77 <sup>*1</sup>	5+	670	20	4+	480	21.2
2	Triploid	Temperature	1	4+	530	21	4+	480	13.4
		Temperature	2	4+	550	23	4+	480	20.8
		Temperature	3	3+	520	22	4+	430	13.2
3	Meiotic diploid gynogenesis	Temperature	3	3+	520	24	4+	450	74.0
			4	3+	470	25	4+	420	11.8
		Pressure	1	4+	530	26	4+	430	34.6
			5	3+	440	25	4+	420	31.8
			6	3+	520	27	4+	430	22.1
4	Mitotic diploid gynogenesis	Pressure	7	3+	500	28	4+	420	48.6
			3	3+	520	29	4+	430	20.8
			6	3+	520	29	4+	420	10.4
		Pressure	8	4+	550	30	4+	480	40.6

<sup>\*1</sup> Cloned Japanese flounder.

<sup>\*2</sup> In the control cross between a female and a male.

射時間を調整することにより、0~100 mJ/cm<sup>2</sup>の範囲で照射条件を設定した。これらの紫外線照射精子を、ヒラメクロン魚の卵に媒精して受精させ、生じた正常および奇形孵化仔魚の孵化率を求めた。これらの奇形孵化仔魚および通常受精したヒラメ孵化仔魚をそれぞれカレイ用リンゲル液に10尾ずつ懸濁させた後、70%アルコールに保存した。これらの固定孵化仔魚の倍数性は後述の方法に従い、細胞核あたりの相対DNA量をフローサイトメトリーにより判定した。

**三倍体誘起条件の検討** 雌(#1)の卵に無処理精子を媒精し、受精7分後に-1.5°C、+1.5°Cおよび+3.0°Cの冷却海水に90分間浸漬し、三倍体誘起のための低温処理温度を検討した。処理卵は、その後8°Cのかけ流し水槽に再び移した。海水水温は冷凍庫で凍結した海水水を用いて調節した。各水温区から孵化仔魚の一部を20尾ずつ固定し、フローサイトメトリーにより三倍体出現率を求めた。

三倍体誘起の最適処理開始時間を検討するため、処理温度を-1.5°C、処理持続時間を90分間とし、雌(#2)の卵に無処理精子を媒精し、受精後3~11分の間で処理を行った群について孵化率を求めた。そして、処理群毎に孵化仔魚10尾を固定し、フローサイトメトリーにより三倍体出現率を求めた。さらに、最適な処理持続時間を検討するため、雌(#3)の卵を用い、処理開始を受精後7分とし、処理持続時間30分~150分の間で処理を行った群について、孵化率と三倍体出現率を求めた。

**第二極体放出阻止型雌性発生二倍体誘起条件の検討** 雄(#24~#28)の精子を、40~45 mJ/cm<sup>2</sup>の条件で紫外線照射を行い、これらの精子の受精により雌性発生を誘起した。半数体は孵化し得ないことから、雌性発生二倍体の誘起は孵化率によって推定しうる。<sup>3,4)</sup>そこでまず、雌親魚として#2および#4の卵を紫外線照射精子で受精後、処理水温を-1.5°C、処理持続時間を60分間とし、3~11分の範囲で最適な処理開始時間を雌個体毎に検討した。また、雌親魚#1および#5の卵を紫外線照射精子で受精後、処理水温を-1.5°C、処理開始時間を受精後7分とし、30分~120分の範囲で最適な処理持続時間を雌個体毎に検討した。さらに、圧力処理による雌性発生二倍体誘起を目的に、雌#6および#7由来の卵に紫外線照射精子を受精し、フレンチプレス(大岳製作所)により、圧力処理(650 kg/cm<sup>2</sup>, 6分間)を行った。そして、受精後の最適処理開始時間をそれぞれの雌毎に受精後3~9分の間で検討した。

**第一卵割阻止型雌性発生二倍体誘起条件の検討** 雌#2, #6および#8より得た卵に実験3と同様の紫外線を照射した雄#29および#30の精子をそれぞれ受精させ、圧力処理(650 kg/cm<sup>2</sup>, 6分間)を行った。そして、

孵化率を調べることに、受精後150分~300分の範囲で最適な処理開始時間をそれぞれの雌毎に検討した。

**倍数性の判定** リンゲル液および70%アルコールで保存した仔魚は、Partec社の動物細胞分析用キットのA液に再懸濁した後、DAPI染色用のB液を加えて、フローサイトメーター(Ploidy Analyzer PA型, Partec)により相対DNA量を測定し、倍数性の解析を行った。

## 結 果

**マツカワ精子の遺伝的不活化条件の検討** マツカワ精子をヒラメ卵に受精させた対照群の孵化率は21.2%で、異常孵化仔魚はほとんどみられなかった。紫外線照射精子で受精した卵から孵化した正常孵化仔魚は、紫外線照射強度1 mJ/cm<sup>2</sup>で急激に減少し、2~100 mJ/cm<sup>2</sup>では全くみられなかった(Fig. 1)。一方、奇形を示す異常仔魚の孵化率は、1 mJ/cm<sup>2</sup>でいったん増加し、2 mJ/cm<sup>2</sup>で0となった後、10 mJ/cm<sup>2</sup>以上で急激に増加し、これ以降、100 mJ/cm<sup>2</sup>まで、対照群と同程度の率を示した(Fig. 1)。フローサイトメトリーにおいて異常仔魚(n=16)の蛍光値は、ヒラメ二倍体の0.48倍を示し、異常仔魚のDNA量はヒラメ二倍体のおよそ1/2であった(Fig. 2A)。従って、10 mJ/cm<sup>2</sup>以上の紫外線強度でマツカワ精子は遺伝的に不活性化され、雌性発生半数体が生じたと結論された。

**三倍体誘起条件の検討** -1.5°C、+1.5°Cおよび+3.0°Cの水温に浸漬させたときの相対孵化率は、それぞれ、対照群の29.1%、29.2%および93.8%であった(Fig. 3A)。一部の孵化仔魚の相対的DNA量は、正常二倍体の1.51倍を示し、三倍体であった(Fig. 2B)。

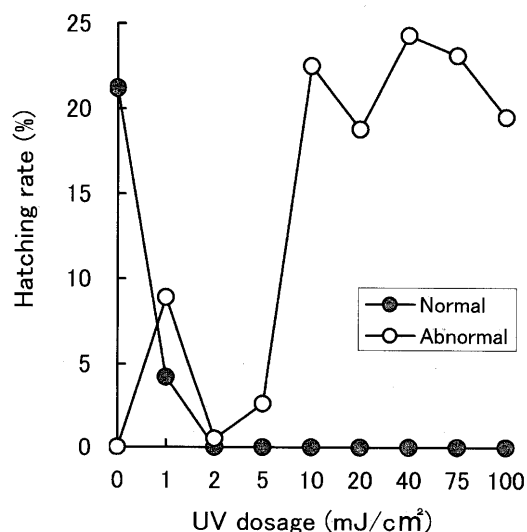
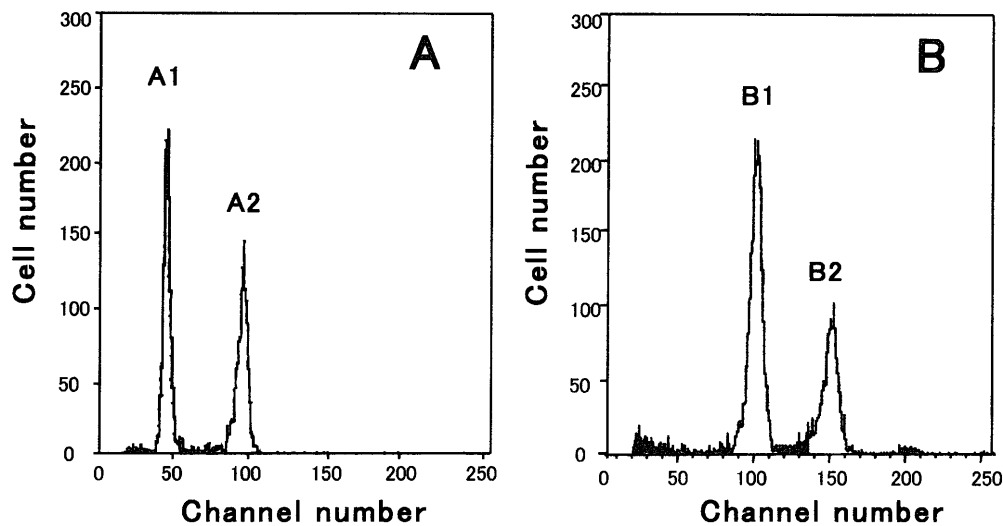
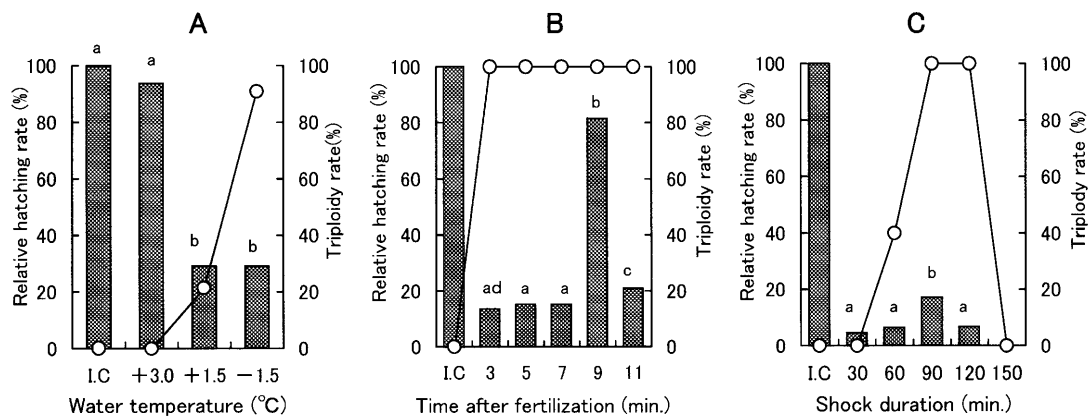


Fig. 1 Effects of the dosage of UV irradiation on hatching rate of Japanese flounder egg fertilized with UV-irradiated barfin flounder sperm.



**Fig. 2** (A) Ploidy analysis of abnormal hatching larvae (A1) of Japanese flounder fertilized with UV-irradiated sperm of barfin flounder. A2: Diploid larvae of Japanese flounder. (B) Ploidy analysis of hatching larvae of barfin flounder obtained by cold temperature shock. B1: Diploid, B2: Triploid.



**Fig. 3** Effects of temperature (A), starting time after fertilization (B) and duration (C) of cold shock treatment on hatching rates relative to control and triploidy rate in barfin flounder. Rectangle means hatching rate relative to control. Open circle indicates triploidy rate. I.C denotes intact control. Different letters on rectangles show significant difference at  $P < 0.05$ .

三倍体出現率は、 $-1.5^{\circ}\text{C}$ で90.9%、 $+1.5^{\circ}\text{C}$ で21.2%、 $+3.0^{\circ}\text{C}$ では0%であった。

低温処理温度を $-1.5^{\circ}\text{C}$ として、最適処理開始時間を検討したところ、受精後3~11分の処理開始で孵化仔魚が得られた (Fig. 3B)。中でも受精後9分の処理で最も高い相対孵化率 (81.7%) がみられた ( $P < 0.001$ )。三倍体化率は3~11分の処理開始条件で、100%であった (Fig. 3B)。次に、処理持続時間を検討したところ、30~120分間で孵化仔魚が得られ、90分間で最も高い相対孵化率 (17.1%) が得られた。三倍体出現率は90分間および120分間で100%であった (Fig. 3C)。

**第二極体放出阻止型雌性発生二倍体誘起条件の検討**  
雌#3由来の雌性発生胚を用いて低温処理開始時間の検討したところ、受精後3~7分の範囲で15.4~17.7%の

相対孵化率がみられ、この範囲で雌性発生二倍体の生後に有意な差はなかった ( $P > 0.05$ , Fig. 4A)。雌#4を用いた検討では、3~11分で孵化仔魚が得られ、中でも受精後9分が最も高い孵化率を示した ( $P < 0.05$ , Fig. 4A)。雌#1を用いた処理持続時間の検討では、60分間で相対孵化率7.3%を示した。一方、雌#5を用いた検討では60分間と90分間でそれぞれ、相対孵化率29.9および27.9%が得られ、これらの間に有意差はみられなかった ( $P > 0.05$ , Fig. 4B)。これらの結果は低温処理により、雌性発生二倍体誘起が可能なことを示している。

一方、圧力処理による誘起実験では、雌#6および雌#7由来の雌性発生胚のいずれにおいても、受精後7分に開始した処理で最も高い相対孵化率 (98.0%および

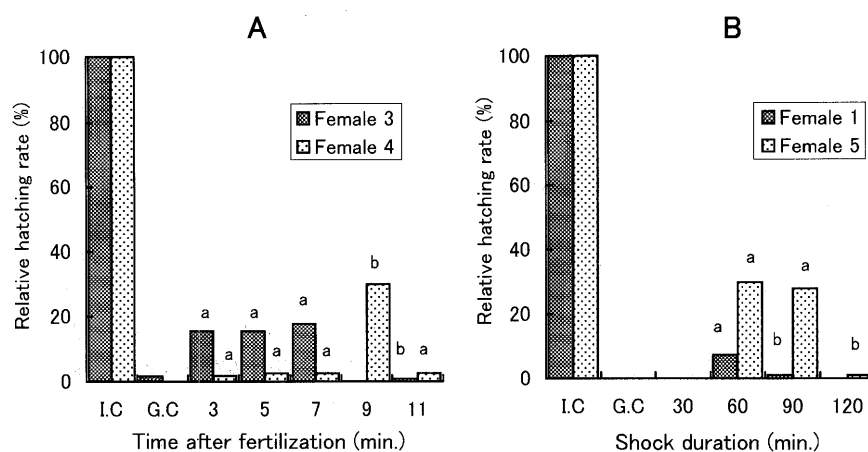


Fig. 4 Effects of starting time after fertilization (A) and duration (B) on hatching rates relative to control in inducing meiotic gynogenetic diploids by cold temperature shock in barfin flounder. I.C. and G.C. denote intact control and gynogenetic control respectively. Different letters on rectangles show significant difference at  $P < 0.05$ .

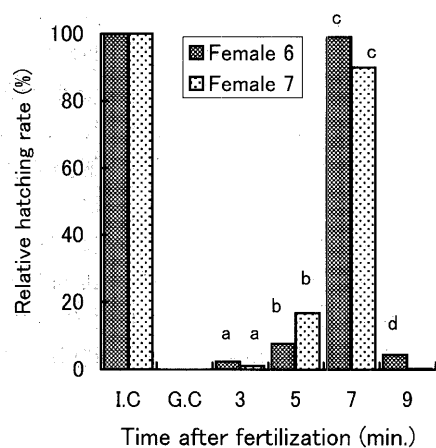


Fig. 5 Effects of starting time after fertilization on hatching rates relative to control in inducing meiotic gynogenetic diploids by pressure shock in barfin flounder. I.C. and G.C. denote intact control and gynogenetic control respectively. Different letters on rectangles show significant difference at  $P < 0.05$ .

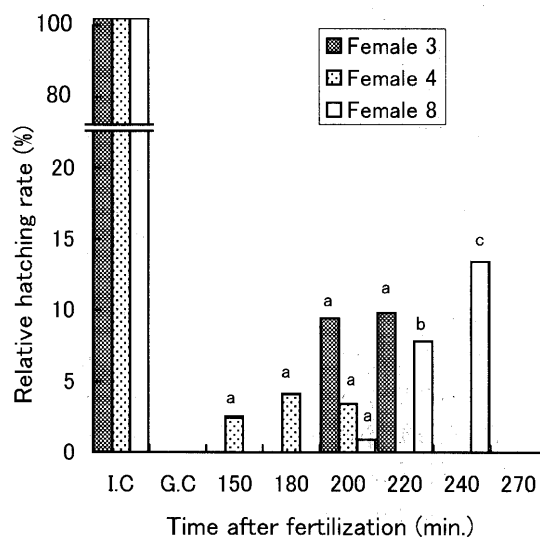


Fig. 6 Effects of starting time after fertilization on hatching rates relative to control in inducing mitotic gynogenetic diploids by pressure shock in barfin flounder. I.C. and G.C. denote intact control and gynogenetic control respectively. Different letters on rectangles show significant difference at  $P < 0.05$ .

90.4%) が得られた (Fig. 5)。

**第一卵割阻止型雌性発生二倍体誘起条件の検討** 圧力処理 (650kg/cm<sup>2</sup>, 6分間) 開始時間毎に得られた相対孵化率は, 雌個体により相違がみられ, 雌#3では処理開始時間200~220分 (相対孵化率: 10.1~10.6%), 雌#4では180~220分 (相対孵化率: 2.9~4.8%), 雌#6では200~240分 (相対孵化率: 0.1~14.9%) で孵化仔魚, すなわち雌性発生二倍体の出現率が高かった (Fig. 6)。

### 考 察

精子の遺伝的不活性化に必要な紫外線照射量について, ヒラメ<sup>7)</sup>では6.6~110 mJ/cm<sup>2</sup>, クロダイ

*Acanthopagrus schlegelii*<sup>17)</sup>では30 mJ/cm<sup>2</sup>, European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)<sup>18)</sup>では320 mJ/cm<sup>2</sup>と海産魚種の中でも相当な違いがみられる。今回のヒラメ卵を用いた実験では, 半数体奇形仔魚の出現状況から, マツカワ精子は, 10~100 mJ/cm<sup>2</sup>の範囲で遺伝的に不活化されていることが明らかになり, これはヒラメ<sup>7)</sup>における照射量と近い値であった。この範囲内では, より低い照射量を使用することが望ましいと思われたが, 今回は, 精子を確実に不活化させることを考慮に入れ, 紫外線強度を40~45 mJ/cm<sup>2</sup>とした。ニジマス *Oncorhynchus mykiss*では精子への紫外線照射が発生を

遅らせているとの指摘もあり<sup>18)</sup>, 今後はその後の孵化率や生残率への影響を考慮した, より最適な照射強度を検討する必要がある。

三倍体および雌性発生二倍体の作出にあたっては, 第二極体放出を抑制する処理の強度, タイミング (処理開始時間), 処理持続時間の三要素を組み合わせ, 作出率が高く死亡率が低い条件を選ぶことが重要とされている。<sup>3,4)</sup> 異体類における低温処理による染色体倍数化の研究では, ヒラメ<sup>7)</sup>で受精後 3~5 分, 0°C, 45 分間, マコガレイ<sup>11)</sup>で受精後 5 分, -0.8~-2.0°C, 60 分間, turbot<sup>12)</sup>で受精後 5 分, 0°C, 20 分間, Atlantic halibut<sup>13)</sup>で受精後 15 分, -1°C, 120~180 分間, sole<sup>14)</sup>では受精後 10~15 分, 2 および 4°C, 60~120 分間が, 最適な処理条件とされている。今回の実験からマツカワの第二極体放出阻止のための最適な低温処理温度, 処理開始時間および処理持続時間については, それぞれ -1.5°C, 受精後 7~9 分および 60~90 分間と考えられた。また, 650 kg/cm<sup>2</sup>, 6 分間処理も第二極体の放出阻止に効果があることが分かった。

低温処理温度については, 異体類では -2.0~+2.0°C が多く用いられており, 受精温度との水温差によって第二極体放出阻止が図られている。通常の受精水温が 7~8°C であるマツカワでは, +1.5°C の処理水温で, -1.5°C の場合よりも三倍体出現率が低下したことから, 作出効率を高めるためには受精水温と処理水温の間に 8~9°C の差があることが重要と考えられた。一方, 受精後の処理開始時間について, 雌親魚による個体差も認められた。第二極体放出時期は, このような親魚間の個体差の他, 卵の受精水温によっても影響される。従って, これらの影響を最小限にするためには, 特に採卵が比較的長期間にわたる場合は受精温度を一定にすることが重要と思われた。マツカワの場合, 最適処理持続時間は, 60~90 分間であった。他の異体類では, turbot<sup>12)</sup>の 20 分間を除いて, 60~180 分間の間に最適処理持続時間があり, 今回の結果はこれらとほぼ同様であった。

今回, 圧力処理に関しては, 一定条件 (650 kg/cm<sup>2</sup>, 6 分間) のもとで, 第二極体放出阻止と第一卵割阻止のための処理開始時間を検討した。最適な圧力強度や持続時間の検討も必要であるが, 第二極体放出阻止には, まず特別な装置を必要とせず, 一度に大量の卵を処理できる水温処理について, さらに好適条件を絞るべきと考え, これ以上の圧力処理の検討を行わなかった。しかし, 今回の試験では, 用いた親魚によって, 対照群の孵化率に違いがあった。これらは卵質と関連することから, 今後卵質の良好な親魚を養成し, 選別することが作出成否を握る重要な課題となると思われる。

第一卵割阻止による完全ホモ接合型雌性発生二倍体は, 遺伝的に均一な卵を産むので, これらを再度, 雌性

発生二倍体として発生させることにより, クローン系統を作出できる。<sup>3,4)</sup> このような完全ホモ接合体はクローン作出に不可欠であるが, 第一卵割阻止自体の副作用や劣性遺伝子の顕在化により, 一般にその作出は困難である。<sup>3,4)</sup> しかしながら, すでにヒラメ,<sup>8-10)</sup> マダイ<sup>20)</sup>において達成され, 両種ともにクローン系統作出に至っている。本研究においても, 受精後 150~240 分にわたる比較的長い期間における圧力処理 (650 kg/cm<sup>2</sup>, 6 分間) 開始により孵化仔魚が得られた。このことは, マツカワ雌親魚の間に卵発生速度の変異があり, 一定の処理により雌性発生二倍体を安定して作出することが困難であることを示す一方, 広い時期にわたり操作を施すことにより, 結果として, 第一卵割阻止型雌性発生魚が作出されることを示す。従って, マツカワにおいても今後, クローン系統樹立の可能性はある。しかしながら, 今回, これらの完全ホモ接合性の遺伝学的確認は行っていない。一般に魚類では, 第二極体放出の自然抑制が低頻度に生じることがある。<sup>3,4)</sup> 従って, 第一卵割阻止のように成功率が低い場合, 目的としないこれらの雌性発生二倍体の特異的に生残, 混入する可能性が考えられるので, 今回得られたマツカワの第一卵割阻止型雌性発生二倍体の候補については, 今後, 高感度の DNA マーカーを用いた完全ホモ接合性の確認が必要である。このような確認には, 第二極体放出阻止型雌性発生二倍体において, 動原体との組み換え率が高い染色体テロメア近傍に座するマイクロサテライト DNA マーカーが有効と考えられる。<sup>21)</sup>

## 謝 辞

マツカワ飼育機材の整備にあたり, ご協力頂いた工藤敬吾氏に厚くお礼申し上げます。本研究の一部は水産庁補助による地域先端技術共同研究開発促進事業によって行われた。

## 文 献

- 1) 萱場隆昭, 松田泰平, 杉本 卓, 吉田秀嗣, 高谷義幸. マツカワ. 平成 13 年度資源増大技術開発事業報告書魚類 C グループ, 水産庁, 東京. 2002; 1-18.
- 2) 齊藤節雄, 森 立成. マツカワ浮き生け養殖技術開発試験. 平成 11 年度北海道立中央水産試験場事業報告書, 1999; 243-245.
- 3) Arai K. Chromosome manipulation in aquaculture: Recent progress and perspective. *Suisanzoshoku* 2000; **48**: 295-303.
- 4) Arai K. Genetic improvement of aquatic finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 2001; **197**: 205-228.
- 5) 森 立成, 齊藤節雄, 杉本 卓, 萱場隆昭. マツカワの成長の雌雄差. 北水試研報 1999; **56**: 137-141.
- 6) Purdom CE. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity*, 1969; **24**: 431-444.
- 7) 田畑和男, 五利江重昭, 中村一彦. 紫外線によるヒラメ

- の雌性発生 2 倍体の誘起条件. 日水誌 1986; **52**: 1901-1904.
- 8) 田畑和男, 五利江重昭. 第 1 卵割阻止によるヒラメの雌性発生 2 倍体の誘起と飼育特性. 日水誌 1988; **54**: 1867-1872.
  - 9) 田畑和男. ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報 1991; **28**: 1-134.
  - 10) Yamamoto, E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* 1999; **173**: 235-246.
  - 11) 柿本芳久, 相田 聡, 荒井克俊, 鈴木 亮. マコガレイ *Limanda yokohamae* における温度および圧力処理による雌性発生二倍体の作出とメチルテストステロン浸漬処理による性転換. 広島大生物生産学部紀要 1994; **33**: 113-124.
  - 12) Piferrer F, M-Cal R, Álvarez-Blázquez B, Sánchez L, Martínez P. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* 2000; **188**: 79-90.
  - 13) Holmefjord I, Refstie T. Induction of triploidy in Atlantic halibut by temperature shocks. *Aquacult. Intern.* 1997; **5**: 169-173.
  - 14) Howell BR, Baynes SM, Thompson D. Progress towards the identification of the sex-determining mechanism of the sole, *Solea solea* (L.), by the induction of diploid gynogenesis. *Aquacult. Res.* 1995; **26**: 135-140.
  - 15) 斉藤節雄, 森 立成. ヒラメ・カレイ類の性統御およびクローン魚作出試験. 平成 12 年度北海道立中央水産試験場事業報告書, 2000; 91-93.
  - 16) 水上 稔. 生理的塩類溶液—その処方と作り方—. 啓学出版, 東京. 1979; 441.
  - 17) Sugama K, Taniguchi N, Seki S, Nabeshima H, Hasegawa Y. Gynogenetic diploid production in the red sea bream using UV-irradiated sperm of black sea bream and heat shock. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 1427-1433.
  - 18) Peruzzi S, Chatain B. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture* 2000; **189**: 23-37.
  - 19) 小林 徹. 染色体操作を施したニジマス初期胚の核の行動における細胞学的観察. 日水誌 1998; **64**: 782-791.
  - 20) Kato K, Hayashi R, Yuasa D, Yamamoto S, Miyashita S, Murata O, Kumai H. Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation. *Aquaculture* 2002; **207**: 19-27.
  - 21) Morishima K, Nakayama I, Arai K. Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Genetica* 2001; **111**: 59-69.