



Title	第1卵割阻止に由来するアマゴにおける配偶子の倍数性
Author(s)	山木, 勝; YAMAKI, Masaru; 荒井, 克俊 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 51(3), 135-152
Issue Date	2000-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24210
Type	departmental bulletin paper
File Information	51(3)_P135-152.pdf



第1卵割阻止に由来するアマゴにおける配偶子の倍数性

山木 勝¹⁾・荒井 克俊²⁾

Ploidies of Gametes Produced by Putative Tetraploid Amago Salmon Induced by Inhibition of the First Cleavage

Masaru YAMAKI¹⁾ and Katsutoshi ARAI²⁾

Abstract

In amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*, hydrostatic pressure shock (650 kg/cm², 6 min duration) was made to inhibit the first cleavage in the period from 4 to 7 hours after fertilization. Putative tetraploids were selected by investigating maximum nucleoli number in the fish developed from the treatment. When 33 putative tetraploids (18 females, 15 males) were flow-cytometrically examined for DNA content of erythrocytes in the spawning season, 30 fish were diploids but the one male was tetraploid or near tetraploid and the two fish (one female, one male) were diploid-tetraploid mosaics. Erythrocyte measurements in these fish revealed that 14 fish (8 females, 6 males) including two mosaics showed a small proportion of large erythrocytes (nuclear size 9.8-11.2 μm , 0.1-13.0%) other than normal erythrocytes (6.7-7.7 μm). The tetraploid male gave erythrocytes with intermediate nuclear size (8.7 μm). Its spermatozoa were larger (3.8 μm) than those (2.9-3.3 μm) of normal diploid amago salmon. Determination of ploidies in progenies of the tetraploid male suggests the production of diploid or near diploid spermatozoa in its testis. The diploid-tetraploid mosaic female which had two types of erythrocytes, laid very small number of large eggs (diameter 12 μm) and such eggs might be diploid judging from ploidies of the resultant progenies. Thus, most putative tetraploids show diploid-tetraploid mosaicism in different organs including gonads and diploid gametes can be generated from tetraploid germ cells in mosaic gonads.

Key words: Amago salmon, Tetraploid, Mosaic, *Oncorhynchus*

魚類では、受精卵の第一卵割を高水温あるいは高水圧処理で阻止することにより、染色体を倍加させて四倍体とすることができるが、誘起率と生残率は多くの場合著しく低い (Thorgaard et al., 1981; Chourrout, 1982; Chourrout, 1984; Chourrout et al., 1986; 荒井, 1992; Diter et al., 1993; Yamazaki and Goodier, 1993)。しかし、一度四倍体魚が作出できれば、これらは二倍体配偶子を産生するので、二倍体との交配により容易に三倍体が得られる (Chourrout, 1984; Chourrout et al., 1986; Chourrout and Nakayama, 1987; Blanc et al., 1987; Diter, et al., 1988)。また、

¹⁾ 愛媛県立宇和島水産高等学校 (社会人入学; 北海道大学大学院水産科学研究科 生命資源科学専攻 育種生物学講座)

Ehime Prefectural Fishery High School (Laboratory of Breeding Science, Division of Marine Biosciences, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

²⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科 生命資源科学専攻 育種生物学講座

(Laboratory of Breeding Science, Division of Marine Biosciences, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

四倍体同士の交配や染色体操作との組み合わせにより四倍体集団の維持・増殖の他、五倍体、六倍体等の高次倍数体魚の作出にも応用できる (Chourrout and Nakayama, 1987; Diter, et al., 1988; Thorgaard et al., 1990; Arai et al. 1999)。以上のように、魚類四倍体の作出自体は困難であるが、水産育種における応用の範囲は広く、極めて有用であると考えられる。

山木ら (1997) は、アマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* 受精卵を高水圧処理し、生残した稚魚の鱗細胞の最多核小体数 4 により選別した四倍体候補について、赤血球核 DNA 量および赤血球サイズから倍数性の再調査を行った。その結果、これらの多くは二倍体で、完全な四倍体個体は見いだされなかったが、二倍体細胞と四倍体細胞を併せ持つモザイク個体が少数存在した。さらに、これらの四倍体候補が産生する卵と通常精子の交配により、二倍体の他に三倍体が高率に出現する場面があることを見出した (山木ほか, 1999)。このことは、核小体数 4 を示す雌親魚が半数体と二倍体の二種類の卵を産生し、二倍体卵と半数体精子の受精により三倍体が作出されたことを示唆する。従って、四倍体候補が見かけ上二倍体であっても、生殖腺が二倍体—四倍体モザイクとなっている個体の二倍体配偶子を利用することにより、次世代で四倍体を作成できる可能性が示された。

本研究ではアマゴを材料に、第一卵割阻止により生じる最多核小体数 4 を示す個体が生殖腺を含む様々な組織・器官で二倍体—四倍体モザイクとなっていると想定し、四倍体候補同士の交配、あるいは四倍体候補と二倍体との交配に染色体操作を組み合わせることにより四倍体を作成しようとした。そして、交配子孫の倍数性から四倍体候補の産生する配偶子について倍数性を検討した。

材料および方法

供試魚

材料として、愛媛県東宇和郡宇和町佐藤アマゴ養殖場のアマゴを使用した。本研究で用いたアマゴ四倍体候補は 1997 年産高水圧処理群 (山木ほか, 1999) のうち、生残した 6 カ月齢稚魚の鱗を試料として Carman et al. (1992) の方法で作製した核小体標本について細胞の最多核小体数が 4 を示した 75 個体である。

血液塗抹標本

尾柄部より採取した血液から常法に従い血液塗抹標本を作成し、ギムザ染色後、ビデオミクrometer (VM-60, Olympus) を用いて各個体 50 個以上の赤血球について核長径を測定した。また、サイズの異なる赤血球が観察された場合、撮影した写真からその比率を調査した。

核 DNA 量

細胞核の DNA 量フローサイトメトリー (FCM) の試料として、血液、精子および発眼胚を使用した。血液および精子は細胞培養用培地 (Eagle's MEM) で保存またはアルコール (70%) 固定したものを、胚体は生体またはカルノア (エタノール: 酢酸=3:1) 固定標本を用いた。核 DNA 量の測定は通常二倍体アマゴの血液を対照として、動物細胞用試薬キット (Partec) を用いて DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 染色後、フローサイトメーター (PA, Partec) を用いて行った。試料が胚体の場合は、50 μm のメッシュで濾過して所定の方法により分析した。

精子サイズの測定

下記の交配時に採取した精液の一部を 10% ホルマリンで固定し、100 倍の対物レンズ下でビデオ

オミクロメーターを用いて、各個体当たり50精子の頭部幅長（短径）を測定した。

四倍体候補魚の交配

四倍体候補は熟度鑑別を行い、成熟している個体から順次交配実験に供した。交配実験は四倍体候補魚同士、または四倍体候補魚の産生する配偶子を使って下述の染色体操作を組み合わせで行った。すなわち、通常卵の四倍体候補魚雄精子による媒精後の高水温処理（媒精8分後、27°C、23分間）、あるいは四倍体候補魚雌の産生卵の紫外線照射精子（人工精漿（高橋ほか、1987）100倍希釈、紫外線照射量約5,400 erg/mm²、以下UV精子と略す）による媒精後の高水温処理による四倍体作出操作である。

交配実験時、四倍体候補魚の体重、体長、生殖腺重量の測定を行い、採取した血液と精子を核DNA量測定等の倍数性調査に供した。

1999年11月1日に四倍体候補魚の雄12個体（4nM # 1-12）が、11月9日は雌10個体（4nF # 1-10）と雄2個体（4nM # 13, 14）、11月12日には雌4個体（4n # F11-14）と雄1個体（4nM # 15）、そして11月20日には雌4個体（4n # F15-18）の四倍体候補魚がそれぞれ成熟したので、下述の交配実験 Exps. 1-4 を行った。

Exp. 1 では、通常二倍体雌9個体（2nF # 1-9）から採取した卵をプールして13の区に分け、通常二倍体から採取した精子による受精（2n×2n）と四倍体候補魚雄12個体（4nM # 1-12）の各々から採取した精子による受精（2n×4n）を行った。この時、誤って4nM # 11由来精子を4nM # 10精子で媒精した区と混合した（# 10+11）。各区の受精卵を2分し、一方に高水温処理を行った（2n×2n/HS, 2n×4n/HS）。

Exp. 2 では、通常二倍体雌（2nF # 10, 11）由来の卵および四倍体候補魚雌（4nF # 1-10）各個体から採取した卵にUV精子を媒精した（2n×UV, 4n×UV）。各個体由来の受精卵を2分し、一方に高水温処理を行った（2n×UV/HS, 4n×UV/HS）。また、四倍体候補魚雌9個体（4nF # 1-3, 5-10）の卵の一部は四倍体候補魚雄2個体（4nM # 13, 14）と交配した（4n×4n）。

Exp. 3 では、四倍体候補魚雌2個体（4nF # 11, 12）および雄1個体（4nM # 15）と通常二倍体魚の雌雄（2nF # 12, 2nM # 3）を用いて同様に交配実験と染色体操作を行った（4n×4n, 4n×UV/HS, 2n×4n/HS, 2n×UV, 2n×UV/HS）。

Exp. 4 では、四倍体候補魚雌4個体のうち3個体（4nF # 15, 16, 18）から卵が採取できたので、通常二倍体雄（2nM # 4）と交配した（4n×2n）。

交配子孫の生残率は積算水温が約300°C・日時の発眼卵数から求めた。この時、正常発眼卵の胚体を前述のFCMによる倍数性調査に供した。

結 果

四倍体候補魚

稚魚期の胸鰭細胞の最多核小体数4により選別した1997年産アマゴ四倍体候補魚75個体（山木ほか、1999）のうち、交配時（1999年11月）に生残していた33個体（雌18, 雄15, 生残率44.0%）の魚体測定の結果をTable 1に示す。四倍体候補魚雄15個体の平均体長は34.1±7.2 cm（19.5-44.5 cm）、平均魚体重は792.0±346.0 g（220-1,411 g）、平均生殖腺熟度指数（GSI）は2.2±8.9（0.5-3.1）であった。雄4nM # 11の体長（19.5 cm）、体重（220 g）、GSI（0.5）は四倍体候補魚雄中最も小さく、脊柱が屈曲する奇形を示した（Fig. 1）。

四倍体候補魚雌18個体のうち15個体（4nF # 1-12, 15, 16, 18）から成熟卵が採取できたが、3個体（4nF # 13, 14, 17）から採取した卵は未熟であった。これら雌18個体の平均体長、体重およ

Table 1. Body length, body weight, gonad weight and gonad somatic index (GSI) in putative tetraploid amago salmon.

Parent		Fish #	Body length (cm)	Body weight (g)	Gonad weight (g)	GSI* ¹ (%)
Ploidy	Sex					
2n	Male	1	37.0	780	24	3.1
	Female	10	34.5	534	106	19.9
11		30.4	553	133	24.1	
Mean±S.D.		32.5±2.9	543.5±13.4	119.5±19.1	22.0±3.0	
4n* ²	Male	1	42.5	1139	22	1.9
		2	40.0	1134	24	2.1
		3	33.5	711	21	3.0
		4	35.5	827	25	2.9
		5	29.5	755	21	2.8
		6	37.0	761	19	2.5
		7	41.0	1232	31	2.5
		8	28.5	554	10	1.8
		9	39.0	1044	27	2.9
		10	44.5	1411	27	1.9
		11	19.5	220	1	0.5
		12	23.5	241	3	1.2
		13	33.5	573	10	1.7
		14	36.5	693	13	1.9
		15	28.2	585	18	3.1
	Mean±S.D.	34.1±7.2	792.0±346.0	18.1±8.9	2.2±0.7	
	Female	1	36.5	890	205	23.0
		2	30.5	568	112	19.8
		3	29.5	796	196	24.6
		4	29.5	369	54	14.6
		5	34.5	750	128	17.1
		6	27.0	659	194	29.4
		7	36.0	835	92	11.0
		8	42.5	1186	293	24.7
		9	37.5	999	204	20.4
		10	24.0	398	91	22.9
		11	35.1	1060	163	15.4
		12	34.5	1010	N.D.* ³	—
13		24.5	640	140* ⁴	21.9	
14	33.0	705	120* ⁴	17.0		
15	33.5	930	150	16.1		
16	24.2	420	54	12.9		
17	39.2	1540	N.D.* ⁵	—		
18	33.6	1050	63* ⁶	6.0		
Mean±S.D.	32.5±5.3	822.5±300.0	141.2±65.9	18.7±6.0		

*¹ Gonad weight/body weight ×100.

*² Putative tetraploidy determined by maximum four nucleoli at the juvenile stage.

*³ No data

*⁴ Unmatured eggs.

*⁵ No eggs were obtained due to unovulation.

*⁶ Over-ripened eggs.

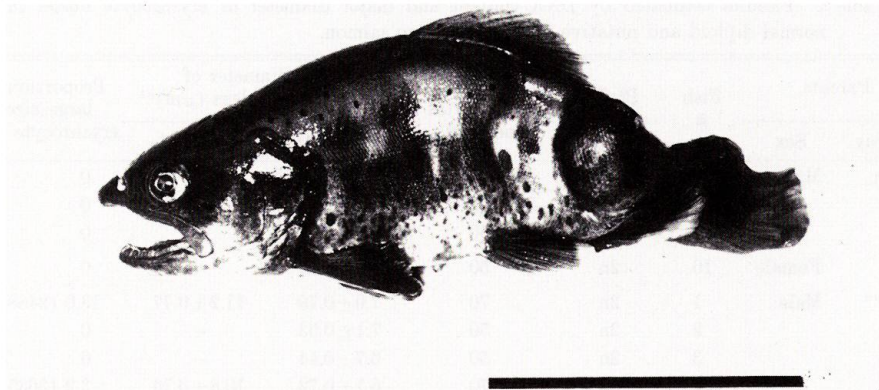


Fig. 1. External appearance of a putative tetraploid amago salmon male 4 nM # 11. Scale indicates 10 cm.

び GSI (4 nF # 12, 17 を除く) は、それぞれ 32.5 ± 5.3 cm (24.0–39.2 cm), 822.5 ± 300.0 g (369–1,540 g), 18.7 ± 6.0 (11.0–24.7) であった。これらの値は通常二倍体雌 2 個体 (2 nF # 10, 11) の平均体長 (32.5 ± 2.9 cm), 魚体重 (543.5 ± 13.4 g) および GSI (22.0 ± 3.0) と大差なかった。

四倍体候補魚の赤血球核 DNA 量

赤血球核 DNA 量による倍数性を Table 2 に示す。雄 4 nM # 11 は対照とした二倍体 (Fig. 2a) の示す核 DNA 量 (99.1, CV 2.3%) の約二倍の DNA 量 (201.9, CV 3.8%) を示すことから、四倍体と判定しうる (Fig. 2b)。また、雌 4 nF # 13 は対照と同じ二倍体細胞 (104.0, CV 1.7%) の他に、約二倍の DNA 量を示す少数の四倍体細胞 (210.1, CV 1.3%) が見られたことから (Fig. 2c)、二倍体—四倍体モザイクと判定した。雄 4 nM # 13 も同様の二倍体—四倍体モザイク性を示した。残りの四倍体候補魚 30 個体は対照二倍体の核 DNA 量と等しい DNA 量をもつ細胞のみを有する二倍体であった。

四倍体候補魚の赤血球サイズ

四倍体候補魚 33 個体のうち、溶血により赤血球サイズが測定できなかった雄 4 nM # 8 を除く 32 個体について赤血球核長径を測定した (Table 2)。

雄 7 個体 (4 nM # 2, 3, 5, 6, 9, 12, 14) と雌 10 個体 (4 nF # 1, 4, 6, 8–11, 14, 16, 17) の平均核長径 (6.5 – 7.9 μ m) は対照二倍体 (7.2 – 8.0 μ m) の赤血球とほぼ同じ大きさであった。残りの雄 6 個体 (4 nM # 1, 4, 7, 10, 13, 15) と雌 8 個体 (4 nF # 2, 3, 5, 7, 12, 13, 15, 18) では、対照二倍体魚と同じ大きさの赤血球 (6.7 – 7.5 μ m) の他に少数の大型の赤血球 (9.8 – 11.9 μ m) が観察された (Fig. 3a)。

大型の赤血球は顕微鏡観察により明瞭に区別することができるので、大きさの異なる 2 種類の赤血球が観察される 14 個体について、撮影した写真から大型赤血球の比率を調査した (個体毎調査赤血球数; 平均 1,875, 範囲 697–3,382 個)。その結果、大型赤血球の出現率が 10% 以上のものが 2 個体 (雄 4 nM # 1, 雌 4 nF # 13), 1–10% のものが 7 個体 (雄 4 nM # 4, 7, 10, 13, 15, 雌 4 nF # 12, 15), 1% 未満のものが 5 個体 (雌 4 nF # 2, 3, 5, 7, 18) で、14 個体の大型赤血球出現率は平均 3.6% であった。

四倍体候補魚雄 4 nM # 11 において、平均赤血球核長径 (8.7 μ m) は対照二倍体より大きかった

Table 2. Ploidies estimated by DNA content and major diameter of erythrocyte nuclei in normal diploid and putative tetraploid amago salmon.

Parents		Fish #	Ploidy status* ¹	No. of erythrocytes measured	Major diameter of erythrocyte nucleus (μm)* ²		Proportion of large-sized erythrocyte (%)
Ploidy	Sex				Normal* ³	Large* ⁴	
2n	Male	1	2n	50	8.0±0.59	—	0
		2	2n	50	7.4±0.39	—	0
		3	N.D.* ⁶	50	7.6±0.71	—	0
	Female	10	2n	50	7.2±0.49	—	0
4n* ⁵	Male	1	2n	70	7.0±0.79	11.2±0.77	13.0 (2468)* ⁹
		2	2n	50	7.1±0.53	—	0
		3	2n	50	6.7±0.44	—	0
		4	2n	70	6.7±0.72	10.8±0.76	3.2 (3635)
		5	2n	50	6.5±0.46	—	0
		6	2n	50	6.8±0.45	—	0
		7	2n	70	7.3±0.43	10.5±0.96	2.0 (3382)
		8	2n	N.D.* ⁸	—	—	—
		9	2n	50	7.3±0.52	—	0
	10	2n	70	7.1±0.47	10.4±0.63	3.2 (2371)	
	11	4n	68	8.7±0.77	—	0	
	12	2n	50	7.3±0.51	—	0	
	13	2n/4n* ⁷	100	7.1±0.55	11.9±13.22	6.1 (2056)	
	14	2n	50	7.7±0.49	—	0	
	15	2n	50	7.1±0.68	10.2±0.86	1.5 (1373)	
	Female	1	2n	50	7.1±0.52	—	0
		2	2n	61	7.2±0.43	10.7±0.68	0.1 (919)
		3	2n	55	7.5±0.42	10.0±0.54	0.3 (1037)
4		2n	50	7.9±0.36	—	0	
5		2n	73	6.9±0.40	10.0±0.80	0.2 (1037)	
6		2n	50	7.9±0.48	—	0	
7		2n	71	7.2±0.44	10.3±0.72	0.2 (1571)	
8		2n	50	7.3±0.43	—	0	
9		2n	50	6.9±0.49	—	0	
10	2n	50	7.0±0.42	—	0		
11	2n	50	6.8±0.53	—	0		
12	2n	75	7.0±0.51	11.0±0.89	5.6 (2799)		
13	2n/4n* ⁷	250	6.7±0.70	10.5±0.65	11.4 (1530)		
14	2n	50	7.2±0.65	—	0		
15	2n	70	7.0±0.69	9.8±0.89	1.9 (697)		
16	2n	50	7.3±0.49	—	0		
17	2n	50	7.7±0.49	—	0		
18	2n	70	7.0±0.53	9.9±0.58	0.3 (1378)		

*¹ Based on DNA contents of erythrocytes determined by flow cytometry.

*² Mean ± S.D..

*³ Normal-sized erythrocyte nucleus.

*⁴ Large-sized erythrocyte nucleus.

*⁵ Putative tetraploidy determined by maximum four nucleoli at the juvenile stage.

*⁶ No data.

*⁷ Diploid-tetraploid mosaic.

*⁸ No data due to hemolysis.

*⁹ Parenthesis denotes no. of total erythrocytes counted (100%).

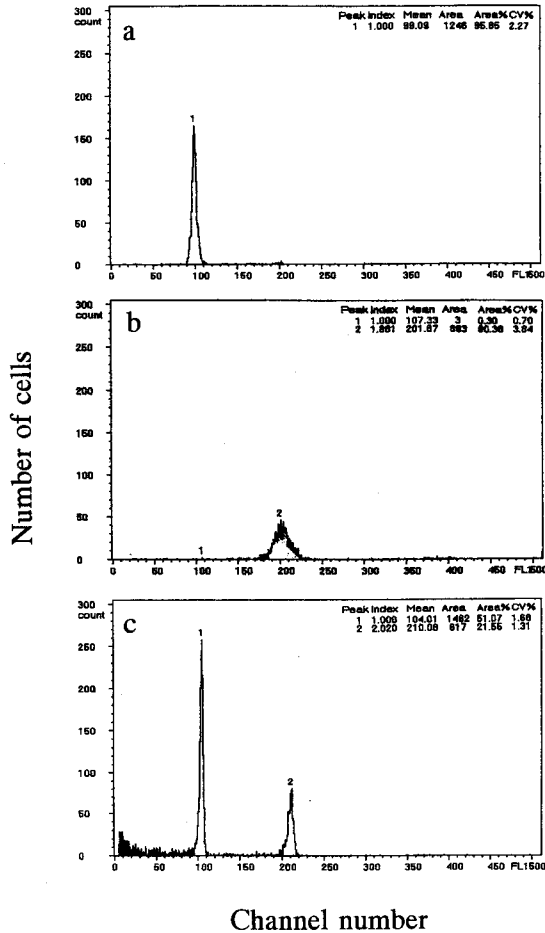


Fig. 2. Flow cytometric histograms for DNA content of normal diploid (a), tetraploid, 4n#11 (b) and diploid-tetraploid mosaic, 4nF#13 (c).

が、大型赤血球よりは小さかった (Fig. 3b)。

精子のサイズと倍数性

四倍体候補魚雄 15 個体から採取した精子について核 DNA 量調査から、倍数性を判別することができなかった。そこで、四倍体候補魚雄 15 個体から採取した精子の内、13 個体 (4n#1-12, 15) について精子頭部の測定を行った (Table 3)。雄 4n#11, 12 および 15 の 3 個体を除く 10 個体の精子頭部長 (3.0-3.2 μm) は対照二倍体アマゴ (2n#1) 由来の精子 (3.0-3.1 μm , Fig. 4a) と差はなかったが ($p > 0.01$)、残り 3 個体 (4n#11, 12, 15) の精子頭部の幅 (3.3-3.8 μm , Fig. 4b) は有意に大きかった ($p < 0.01$)。

子孫の生残率と倍数性

四倍体候補魚の配偶子を使った交配実験の発眼率および胚体の倍数性を Table 4 に示す。

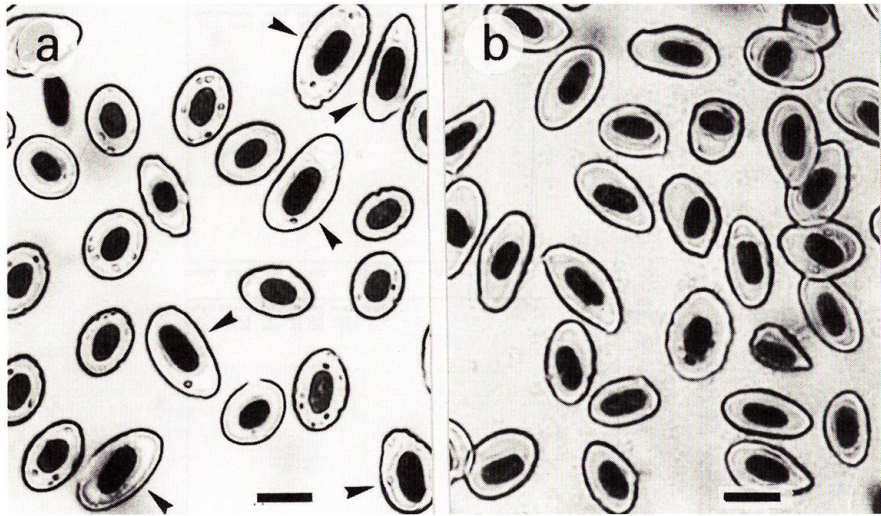


Fig. 3. Erythrocytes of the putative diploid-tetraploid mosaic (a) and the tetraploid (b) amago salmon. (a) Both normal and a few large-sized erythrocytes observed in 4 nF # 13 ; (b) Middle-sized erythrocytes observed in 4 nM # 11. Arrowheads indicate large-sized erythrocyte. Scale indicates 10 μ m.

Table 3. Size of spermatozoa in male amago salmon used.

Sample		Fish #	Length of sperm. head width (μ m)		No. of sperm. measured
Ploidy	Sex		Range of min. to max.	Mean \pm S.D.	
2n	Male	1	2.4-3.4	3.03 \pm 0.27a* ²	50
		2	2.4-3.6	3.08 \pm 0.29a	50
4n* ¹	Male	1	2.4-3.4	3.13 \pm 0.26a	50
		2	2.4-3.6	3.05 \pm 0.25a	50
		3	2.4-3.4	3.05 \pm 0.22a	50
		4	2.4-3.6	3.08 \pm 0.28a	50
		5	2.2-3.2	2.91 \pm 0.23a	50
		6	2.2-3.6	3.01 \pm 0.27a	50
		7	2.2-3.4	2.96 \pm 0.24a	50
		8	2.4-3.8	3.00 \pm 0.28a	50
		9	2.4-3.6	3.15 \pm 0.27a	50
		10	2.6-3.6	3.06 \pm 0.20a	50
		11	3.0-4.8	3.81 \pm 0.37b	50
		12	2.4-4.0	3.29 \pm 0.29b	50
		13	—	—	N.D.* ³
14	—	—	N.D.		
15	2.8-3.6	3.31 \pm 0.20b	50		

*¹ Putative tetraploidy determined by maximum four nucleoli at the juvenile stage.

*² Different superscript letters denote significant differences ($p < 0.01$).

*³ No data.

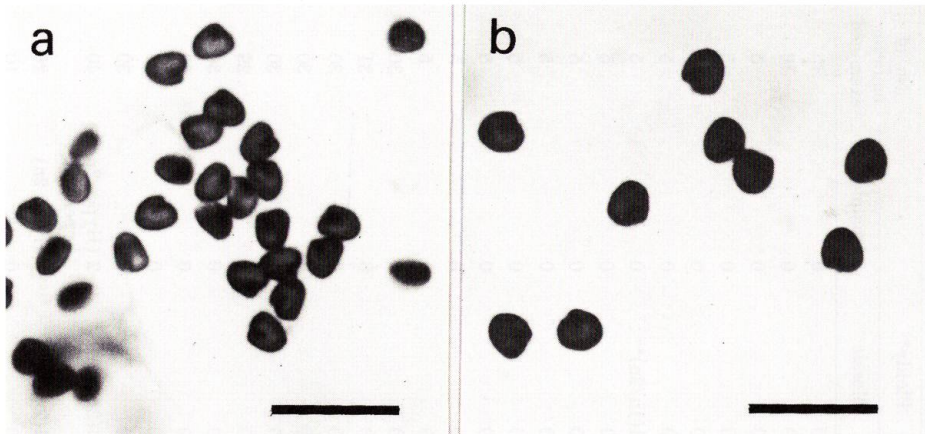


Fig. 4. Spermatozoa of diploid (a) and putative tetraploid, 4 nM # 11 (b). Scale indicates 10 μ m.

1. $2n \times 2n$

交配実験の対照として行った通常二倍体同士の交配区 ($2n \times 2n$) の発眼卵における正常発眼率は 86.3% (Exp. 1) および 89.8% (Exp. 2) と高く、使用した卵と精子に問題はなかった。また、調査した胚体はすべて二倍体 (Fig. 5a) であった。

2. $2n \times 2n/HS$

通常卵の受精卵に高水温処理を行った区 ($2n \times 2n/HS$, Exp. 1) の発眼率は 62.3% と通常交配区 ($2n \times 2n$) に比べて低下した。通常交配卵の高水温処理区 ($2n \times 2n/HS$) から生じた胚 (16 個体) はすべて三倍体 (Fig. 5b) であった。

3. $2n \times UV$

通常卵を UV 精子で媒精する区 ($2n \times UV$) からは、正常な発眼卵は出現せず、異常発眼卵のみが得られ (Exp. 2, 70.1%; Exp. 3, 14.6%)、調査した胚 5 個体すべてが半数体 (Fig. 5c) であった。

4. $2n \times UV/HS$

UV 精子で媒精後に高水温処理を行った区 ($2n \times UV/HS$) では、異常発眼卵の出現率が著しく減少し、正常な発眼卵が生じた (Exp. 2, 80.5%; Exp. 3, 20.0%)。これら正常発眼胚体 (11 個体) はすべて二倍体 (Fig. 5d) であった。

5. $2n \times 4n$

通常二倍体雌の卵を四倍体候補魚雄の精子で媒精した区 ($2n \times 4n$) の発眼率は、Exp. 1 では、雄 4 nM # 6 由来の子孫で 39.7% と低かったが、他は 61.8-91.7% (平均 71.2%) と高かった。同様の交配を行った Exp. 2 では、雄 4 nM # 13 の正常発眼率が 97.0% と高かったが、雄 4 nM # 14 は 7.7% と低かった。これら交配群から生じた正常発眼胚について倍数体性の調査を行った。調査した 105 個体のうち、雄 4 nM # 5 の子孫 1 個体が半数体-二倍体モザイク (Fig. 5e) であったが、残りはすべて二倍体であった。

6. $2n \times 4n/HS$

通常卵を四倍体候補魚雄 13 個体 (4 nM # 1-12, 15) の精子で媒精して高水温処理区を行った区 ($2n \times 4n/HS$) の発眼率は、雄 4 nM # 1-12 (Exp. 1) では 32.3-74.7% (平均 55.0%) となり、各雄毎にばらついた。雄 4 nM # 15 を使用した区 (Exp. 3) からは、正常発眼卵が生じなかった。

Table 4. Rate of eyed eggs and ploidy status based on DNA content by flow cytometry in the cross experiments in which putative tetraploidy.

Exp. #	Cross	Parents #		No. of eggs used	Eyed embryos (%) ^{*1}	Normal embryos (%) ^{*2}	Ploidy ^{*3}					No. of embryos examined	
		Female	Male				1n	2n	3n	Mosaic	Aneuploid		
1	2n × 2n	2nF#1-9	2nM#1	248	86.3	100	0	15	0	0	0	15	
	2n × 2n/HS ^{**}	2nF#1-9	2nM#1	257	62.3	100	0	0	16	0	0	16	
	2n × 4n	2nF#1-9		4nM#1	276	62.0	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#2	124	71.8	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#3	165	61.8	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#4	240	77.5	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#5	181	91.7	100	0	4	0	1(1n/2n) ^{*5}	0	5
				4nM#6	247	39.7	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#7	204	81.4	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#8	122	80.3	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#9	158	84.2	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#10	269	89.2	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#10+11	339	86.1	100	0	5	0	0	0	5
				4nM#12	173	87.3	100	0	5	0	0	0	5
	2nF × 4n/HS	2nF#1-9		4nM#1	2009	68.9	100	0	1	29	0	0	30
				4nM#2	306	32.3	100	0	1	30	0	0	31
				4nM#3	414	53.6	100	0	0	30	0	0	30
				4nM#4	754	58.5	100	1	3	26	0	0	30
				4nM#5	291	34.4	100	0	0	30	0	0	30
				4nM#6	786	73.2	100	0	0	29	0	0	29
4nM#7				238	59.7	100	0	1	29	0	0	30	
4nM#8				405	48.4	100	0	0	30	0	0	30	
4nM#9				253	42.3	100	0	1	29	0	0	30	
4nM#10				807	59.5	100	0	0	30	0	0	30	
4nM#10+11				643	74.7	100	0	0	37	1(2n/4n)	2 (Hyper 2n, hyper 3n)	40	
4nM#12				284	54.2	100	0	0	19	1(2n/3n)	1(Hyper 2n)	20	
2	2n × 2n	2nF#10+11	2nM#2	166	89.8	98.0	0	10	0	0	0	10	

Table 4. (Continued)

Exp. #	Cross	Parents #		No. of eggs used	Eyed embryos (%) ^{*1}	Normal embryos (%) ^{*2}	Ploidy ^{*3}					No. of embryos examined
		Female	Male				1n	2n	3n	Mosaic	Aneuploid	
	2n × UV ^{*6}	2nF#10+11	2nM#2	127	70.1	0	5	0	0	0	0	5
	2n × UV/HS	2nF#10+11	2nM#2	194	44.8	80.5	0	9	0	0	0	9
	4n × UV	4nF#1	2nM#2	424	56.4	1.3	1	2	0	0	0	3
278				57.6	0	14	0	0	0	14		
309				74.8	0	—	—	—	—	N.D. ^{*7}		
172				5.2	11.1	0	1	0	0	1		
295				32.2	1.1	—	—	—	—	N.D.		
414				22.2	3.3	1	2	0	0	3		
161				16.1	3.8	0	1 ^{*8}	0	0	1		
577				72.1	0	—	—	—	—	N.D.		
411				75.2	0	—	—	—	—	N.D.		
311				25.7	2.5	1	1	0	0	2		
	4n × UV/HS	4nF#1	2nM#2	869	24.3	73.9	0	25	0	0	0	25
573				17.5	45.0	0	16	0	0	16		
973				25.9	36.1	0	26	0	0	26		
347				0	0	—	—	—	—	N.D.		
745				23.5	52.6	0	27	0	0	27		
789				18.0	86.6	0	20	0	0	20		
228				1.3	100	0	3	0	0	20		
562				25.3	86.6	0	38	0	2 (1n/2n/3n, hypo 2n/2n)	40		
896				15.6	72.9	0	18	0	0	18		
457				18.2	48.2	0	12	0	0	12		
	2n × 4n	2nF#10+11	4nM#13	428	85.3	97.0	0	34	0	0	34	
			4nM#14	508	58.5	7.7	0	15	0	0	15	
	4n × 4n	4nF#1	4nM#13	348	76.1	95.1	0	27	2	0	1 (Hypo 2n)	30
			4nF#2	196	75.0	95.2	0	29	1	1 (1n/3n)	0	31
			4nF#3	169	76.3	75.2	0	32	0	0	0	32

山本・荒井：第1卵割阻止由来アヤマリの配偶子

Table 4. (Continued)

Exp. #	Cross	Parents #		No. of eggs used	Eyed embryos (%) ^{*1}	Normal embryos (%) ^{*2}	Ploidy ^{*3}					No. of embryos examined
		Female	Male				1n	2n	3n	Mosaic	Aneuploid	
		4nF#5		125	40.8	54.9	0	16	0	0	0	16
		4nF#6		148	41.9	83.9	0	24	0	0	0	24
		4nF#7		95	18.9	77.8	0	12	1 ^{**}	1 (2n/3n)	0	14
		4nF#8		224	83.5	63.1	0	36	0	0	0	36
		4nF#9		290	52.4	70.4	0	32	0	0	0	32
		4nF#10		115	74.8	84.9	0	20	0	0	0	20
	4n × 4n	4nF#1	4nM#14	344	61.9	6.6	0	12	0	0	0	12
		4nF#2		161	34.2	7.3	0	4	0	0	0	4
		4nF#3		250	72.4	8.8	0	16	0	0	0	16
		4nF#5		150	30.0	4.4	0	2	0	0	0	2
		4nF#6		163	30.7	6.0	0	3	0	0	0	3
		4nF#7		106	14.2	6.7	0	1	0	0	0	1
		4nF#8		279	64.5	2.8	0	5	0	0	0	5
		4nF#9		352	13.9	14.3	0	7	0	0	0	7
		4nF#10		188	72.9	2.9	0	4	0	0	0	4
3	2n × UV	2nF#12	2nM#3	294	14.6	0	-	-	-	-	-	N.D.
	2n × UV/HS	2nF#12	2nM#3	297	3.4	20.0	0	2	0	0	0	2
	2n × 4n/HS	2nF#12	4nM#15	594	0.3	0	-	-	-	-	-	N.D.
	4n × UV/HS	4nF#11	2nM#3	416	0	0	-	-	-	-	-	N.D.
		4nF#12		1080	1.2	76.9	0	12	0	0	0	12
	4n × 4n	4nF#11	4nM#15	665	0	0	-	-	-	-	-	N.D.
		4nF#12		1339	0	0	-	-	-	-	-	N.D.
4	4n × 2n	4nF#15	2nM#4	1225	2.0	100	0	20	0	0	0	20
		4nF#16		1183	29.0	99.4	0	20	0	0	0	20
		4nF#18		574	0.7	100	0	4	0	0	0	4

^{*1} Relative to no. of eggs used (100%). ^{*2} Relative to no. of eyed eggs examined (100%). ^{*3} Flow cytometry for DNA content of eyed embryo.

^{*4} Heat shock treatments by 27 °C temperature, 23 min duration, 8 min after fertilization. ^{*5} Parenthesis indicates ploidy status.

^{*6} Fertilized with UV irradiated sperm. ^{*7} No data. ^{*8} Diameter of the egg was about 12 mm.

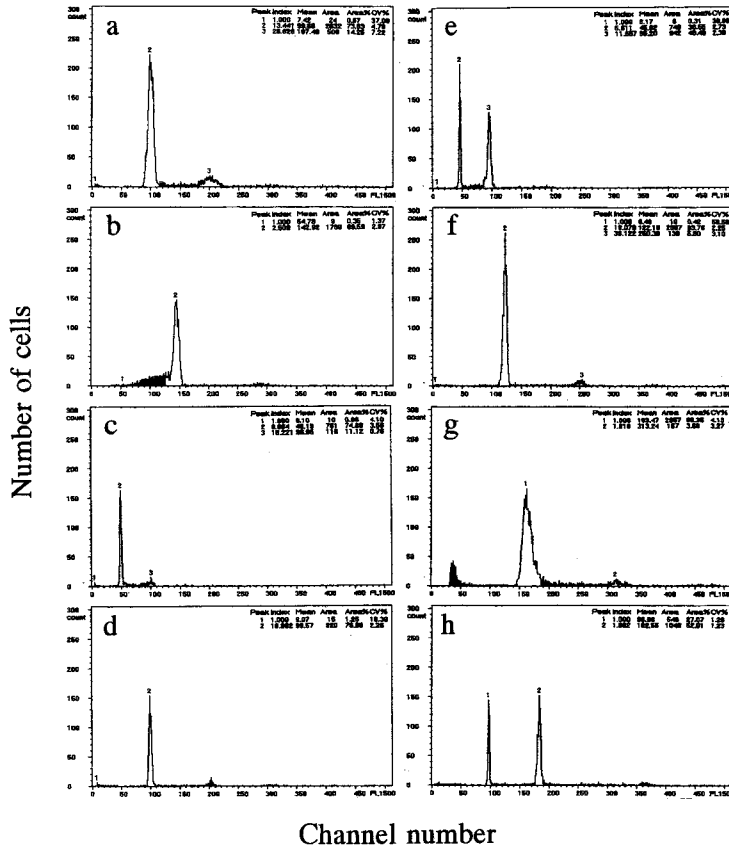


Fig. 5. Flow cytometric histograms for DNA of eyed embryos from putative tetraploid males. (a) control diploid from 2 nF # 1-9×2 nM # 1; (b) triploid from 2 nF # 1-9×2 nM # 1/HS; (c) haploid from 2 nF # 10+11×UV; (d) diploid from 2 nF # 10+11×UV/HS; (e) haploid-diploid mosaic from 2 nF # 1-9×4 nM # 5; (f-h) hyperdiploid, hypertriploid, and diploid-tetraploid mosaic from 2 nF # 1-9×4 nM # 10+11/HS, respectively.

2n×4n/HS交配区 (Exps. 1, 3) の発眼胚 360 個体について倍数性調査を行った結果, 349 個体 (96.9%) は三倍体であったが, 雄 4 nM # 4 由来の胚体に半数体 1 個体, 雄 4 nM # 1, 2, 4, 7, 9 由来の胚体に二倍体 7 個体, 雄 4 nM # 10+11 由来の胚体に高二倍体 (Fig. 5f), 高三倍体 (Fig. 5g) および二倍体—四倍体モザイク (Fig. 5h) 各 1 個体が観察された。

7. 4n×2n

3 個体の四倍体候補魚雌 (4 nF # 15, 16, 18) の卵を通常二倍体雄の精子で交配した区 (4n×2n, Exp. 4) の発眼率は, 0.7-29.0% (平均 10.6%) と低かった。この区の正常発眼卵の胚体はすべて二倍体であった。

8. 4n×UV

四倍体候補魚雌 10 個体 (4 nF # 1-10) が産生した卵を UV 精子で媒精した区 (4n×UV, Exp. 2) においては, 異常発眼率が高かったが, 6 個体の雌 (4 nF # 1, 4-7, 10) からはごく少数の正常発眼卵が得られた (発眼率 1.1-11.1%, 平均 3.9%)。これら正常発眼胚 24 個体 (4 nF # 1, 2, 4, 6, 7, 10)

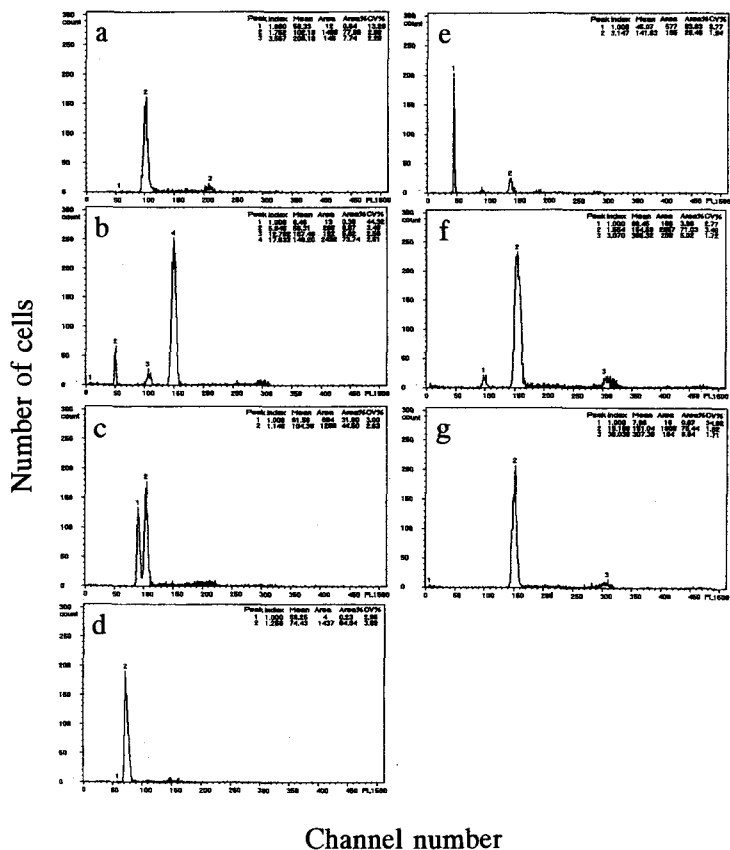


Fig. 6. Flow cytometric histograms for DNA of eyed embryos from putative tetraploid females. (a) diploid from 4 nF # 7×UV; (b, c) haploid-diploid-triploid and hypodiploid-diploid mosaic from 4 nF # 8×UV/HS; (d) hypodiploid from 4 nF # 1×4 nM # 13; (e) haploid-triploid mosaic from 4 nF # 2×4 nM # 13; (f) diploid-triploid mosaic from 4 nF # 7×4 nM # 13; (g) triploid from 4 nF # 7×4 nM # 13.

由来) について倍数性の調査を行った結果, 雌 4 nF # 2 の子孫はすべて半数体であったが, 雌 4 nF # 1, 6 および 10 の子孫からは半数体と二倍体の両方が観察できた。また, 雌 4 nF # 7 由来の二倍性を示す胚体 (Fig. 6a) の卵径は約 12 mm と明らかに大きかった。このような大型の卵は他の親に由来する発眼卵 (卵径 7 mm) には見られなかった。

9. 4n×UV/HS

四倍体候補魚雌 12 個体 (4 nF # 1-12) のそれぞれの卵を UV 精子による媒精後に高水温処理を行った区 (4 n×UV/HS) において, 雌 4 nF # 1-10 (Exp. 2) の正常発眼率は 0-100% (平均 60.2%) と高水温処理を行わなかった区に比べて改善した。雌 4 nF # 11 および 12 (Exp. 3) の発眼率は低かった (0, 1.2%)。高水温処理群から生じた発眼卵について倍数性調査を行ったところ, 199 の胚体のうち 197 (99.9%) が二倍体であった。しかし, 雌 4 nF # 8 の子孫では半数体—二倍体—三倍体モザイク (Fig. 6b) と低二倍体—二倍体モザイク (Fig. 6c) が各々 1 個体観察された。

10. 4n×4n

四倍体候補魚同士の交配 (4n×4n) を2回行った。雌9個体 (4nF # 1-3, 5-10) の卵を雄4nM # 13と4nM # 14の精子で各々交配した場合 (Exp. 2), 各交配区の正常発眼率は雄4nM # 13を用いた群では各々54.9-95.2% (平均77.8%), 雄4nM # 14を用いた群では, 2.9-14.3% (平均6.6%) となり, 雄4nM # 13に由来する群の正常発眼率が高かった。雌4nF # 11および12を雄4nM # 15で交配した Exp. 3からは発眼卵は生じなかった。

この交配区で, 雌4nF # 1-3, 5-12の卵と雄4nM # 13, 14の精子で交配した群 (Exp. 2) からのみ発眼胚が得られた。調査した胚289個体のうち雄4nM # 13の子孫からのみ三倍体4個体, 半数体—三倍体および二倍体—三倍体モザイクが各1個体観察され, 残りの雄4nM # 13由来の胚体と雄4nM # 14由来の胚体はすべて二倍体であった。すなわち, 雄4nM # 13と雌4nF # 1の間の交配子孫 (30個体) から低二倍体1個体 (Fig. 6d) と三倍体2個体, 雄4nM # 13と雌4nF # 2の間の交配子孫 (31個体) から三倍体および半数体—三倍体モザイク (Fig. 6e) が各1個体, 雄4nM # 13と雌4nF # 7との間の交配子孫 (14個体) から三倍体および二倍体—三倍体モザイク (Fig. 6f) 各1個体が観察された。雄4nM # 13と雌4nF # 7の交配由来の三倍体性 (Fig. 6g) を示す発眼卵の卵径は約12mmと大きかった。

考 察

四倍体候補魚の倍数性

アマゴ受精卵の高水圧処理により生じた最多核小体数4を示す四倍体候補魚のアマゴ33個体から採取した赤血球について核DNA量を測定した結果, 雄4nM # 11のみが四倍体性を示した。

この個体の赤血球核長径 (8.7 μm) は対照二倍体の赤血球 (7.6 μm) に比べて約1.2倍大きかったが, 既報 (山木ら, 1997) の二倍体—四倍体モザイク個体において観察された大型赤血球 (核径11.0 μm) と比べると明らかに小さく, 赤血球サイズから四倍体性を決定することは困難であった。赤血球サイズが二倍体—四倍体モザイク個体の大型赤血球よりも小さかった原因については不明であるが, 本個体のDNA量のCV値が大きいため, 正四倍体ではない可能性も考えられる。また, 血球サイズから低四倍体性の可能性も想像される。この個体から採取した精子頭部の幅長 (3.8 μm) は対照二倍体 (3.1 μm) よりも大きかったが, 核DNA量から精子の倍数性を確認できなかった。この個体は他の四倍体候補魚雄に比べ小型で, 精巣も小さく, 脊椎骨が屈曲する形態異常を示した。第1卵割阻止により作出したニジマス四倍体が通常魚の半分程度しか成長しなかったことが報告されているが (Chourrout et al., 1986), このような低い成長率が細胞の四倍体化に起因するのかどうかは目下のところ不明である。

四倍体候補魚雄4nM # 13および雌4nF # 13は, 核DNA量および赤血球サイズの調査からも二倍体—四倍体モザイク個体であった。しかし, 核DNA量から二倍体と判じられた四倍体候補魚31個体のうち12個体 (38.7%) の血液塗抹標本から0.1-13.0%の率で大型赤血球が観察された。

倍数性の増加に伴う核および細胞容積の増大は, 多くの魚類倍数体で報告されていることから (Benfey et al., 1984; Suzuki et al., 1985; Aliah et al., 1991), これら大型赤血球は四倍体性細胞と考えられる。従って, 最多核小体数4を示す個体の器官は, 様々な比率でモザイクとなっていることが考えられる。

ところが, 核DNA量の調査からは少数の大型赤血球をもつ個体のモザイク性を判別できなかった。本研究における大型赤血球の混在率調査は, 大型赤血球が確認される視野について撮影した写真から行ったことから, 大型赤血球の混在率は, 実際には更に少ないことが予想される。大型赤血球の混在率がきわめて低い場合, FCMでは検出できないのかもしれない。従って, 倍数性

の検証には核 DNA 量調査と併せて血液塗抹標本による血球サイズの観察も重要である。今後、最多核小体数 4 を示す個体の各器官毎の倍数性について詳細に調査する必要がある。

配偶子の倍数性

DNA 量と血球サイズから四倍体候補魚雄 4 nM # 11 は四倍体の公算が大きかったが、4 nM # 11 と # 10 の混合する精子の受精に由来する $2n \times 4n$ では、期待された $3n$ は見られなかった。 $2n \times 4n$ /HS 区では 40 個体中 38 個体が三倍体 (通常二倍体の交配後の極体放出阻止により出現)、1 個体が二倍体 (通常二倍体の受精)、そして、残り 1 個体が二倍体—四倍体モザイクであった。このモザイクは 4 nM # 11 の産生した二倍体配偶子に由来すると考えられる。

4 nM # 11 が四倍体の公算が大きいのに関わらず、二倍体配偶子の子孫が生じなかった理由として、① 4 nM # 11 由来の精子を誤って M # 10 の精子と混合したため、もともと量的に少なかった M # 11 の精子が淘汰され、相対的な受精への寄与率が低下した可能性、② 二倍体精子は頭部が大きいいため、受精率が低下した可能性、③ 4 nM # 11 の作る精子が正二倍体ではなかった可能性の 3 点が考えられる。四倍体魚の産生する精子の頭部が卵門内径に比較して大きく、受精率が低下する現象はニジマスでも指摘されている (Chourrout et al., 1986)。四倍体候補魚 4 nM # 11 の DNA 量の CV 値が高く、赤血球が予定される大きさよりも小さかったことは、この個体が四倍体以外の低四倍体細胞をもつ可能性を示す。4 nM # 11 の子孫に高二倍体、高三倍体が出現したことは、この個体が高半数体、低二倍体精子を作っていることを示唆するかもしれない。

四倍体候補魚雌のうち、4 nF # 1, 4, 6, 7, 10 の 5 個体の卵より誘起した雌性発生個体で生残したものは二倍体であった。また $4n \times 4n$ 交配において、4 nF # 1, 2 および 7 の 3 個体の卵と 4 nM # 13 精子の受精から生じた子孫の中に少数の三倍体ならびに三倍体細胞をもつモザイクが生じた。

四倍体候補魚 4 nM # 14 とこれら 3 個体の四倍体候補魚雌の交配 ($4n \times 4n$) 子孫に四倍体ならびに三倍体細胞をもつモザイクがみられないこと、および 4 nM # 13 は血液の DNA 量とサイズでは二倍体—四倍体モザイクであることから、これら三倍体は 4 nM # 13 の作る二倍体精子の受精による可能性が高い。ただし、4 nF # 1, 4, 6, 7 は UV 精子で雌性発生させた時、少数ではあるが正常な二倍体子孫を作っているため、特に、4 nF # 1 と # 7 では雌が二倍体卵をつくり、その受精により三倍体が出現した可能性を否定できない。しかしながら、これらの二倍体がもともと二倍体の卵として生じたのか、受精時に第二極体放出が自然に戻ったのかは不明である。自然の第二極体放出抑制の例は多く報告されており (Thorgaard and Gall, 1979; Thompson et al, 1981; Cherfas et al., 1991; Cherfas et al., 1995)、その可能性も否定できない。また、赤血球サイズと DNA 量から 4 nF # 7 以外はモザイクの可能性が低い。しかし、4 nF # 7 に由来する雌性発生二倍体と三倍体の卵が大きかったことは、少なくともこれらの卵が二倍体であった可能性を示す。倍数性に伴う卵径の増大は Arai et al. (1999) が報告している。

以上の結果より、今回の四倍体候補魚のうち、4 nM # 11, # 13 はごく少数の二倍体精子を作った可能性があり、これらは生殖細胞において四倍体細胞を持つことが示された。また 4 nF # 7 は、二倍体卵をもち、4 nF # 1, 2, 4, 6 においてもその可能性を否定できなかった。しかし、4 nF # 7 以外は半数体卵の第二極体の自然的抑制による二倍体化の可能性も考えられた。

本研究では、アマゴ受精卵の高水圧処理を行って生じた最多核小体数 4 を示す個体から四倍体性あるいは四倍体に近い倍数性を示す雄 1 個体を見出すことができたが、この個体の子孫において四倍体を作出できなかった。一方、最多核小体数 4 を示す個体の多くは、赤血球が様々な比率で二倍体—四倍体モザイクとなっていることが再確認され、このような個体の中には、大型の二倍体性卵を産生するものがあることが示された。従って、核小体数 4 を示す個体から、次世代で完全四倍体を作出する可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を行うに当たって、佐藤アマゴ養殖場の佐藤正治氏、佐藤治平氏には、長期間にわたって実験魚の飼育管理を行っていただいた。記して感謝申し上げる。

文 献

- Aliah, R.S., Inada, Y., Yamaoka, K. and Taniguchi, N. (1991). Effect of triploidy on hematological characteristics and oxygen consumption in ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 833-836.
- 荒井克俊 (1992). 高温処理によるシロサケ雌-イワナ雄間の異質三倍体と四倍体の誘起. 水産育種, **18**, 65-72.
- Arai, K., Taniura, K. and Zhang, Q. (1999). Production of second generation progeny of hexaploid loach. *Fisheries Sci.*, **65**, 186-192.
- Benfey, T.J., Sutterlin, A.M. and Thompson, R.J. (1984). Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **41**, 980-984.
- Blanc, J.-M., Chourrout, D. and Krieg, F. (1987). Evaluation of juvenile rainbow trout survival and growth in half-sib families from diploid and tetraploid sires. *Aquaculture*, **65**, 215-220.
- Carman, O., Oshiro, T. and Takashima, F. (1992). Variation in the maximum number of nucleoli in diploid and triploid common carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2303-2309.
- Cherfas, N.B., Rothbard, S., Hulata, G. and Kozinsky, O. (1991). Spontaneous diploidization of maternal chromosome set in ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Appl. Ichthyol.*, **7**, 72-77.
- Cherfas, N., Gomelsky, B., Ben-Dom, N. and Hulata, G. (1995). Evidence for the heritable nature of spontaneous diploidization in common carp, *Cyprinus carpio* L., eggs. *Aquaculture Res.*, **26**, 289-292.
- Chourrout, D. (1982). Tetraploidy induced by heat shocks in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Develop.*, **22**, 569-574.
- Chourrout, D. (1984). Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout. Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, **36**, 111-126.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G. and Renard, P. (1986). Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females-Potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.*, **72**, 193-206.
- Chourrout, D. and Nakayama, I. (1987). Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout. *Theor. Appl. Genet.*, **74**, 687-692.
- Diter, A., Guyomard, R. and Chourrout, D. (1988). Gene segregation in induced tetraploid rainbow trout. genetic evidence of preferential pairing of homologous chromosomes. *Genome*, **30**, 547-553.
- Diter, A., Quillet, E. and Chourrout, D. (1993). Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *J. Fish Biol.*, **42**, 777-786.
- Suzuki, R., Nakanishi, T. and Oshiro, T. (1985). Survival, growth and sterility of induced triploids in the cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 889-894.
- 高橋一孝・猪田利夫・森沢正昭 (1987). ニジマス精子の簡便な保存法. 養殖, **24**, 緑書房, 東京. 50-59.
- Thompson, D., Purdom, C.E. and Jones, B.W. (1981). Genetic analysis of spontaneous gynogenetic diploid in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Heredity*, **47**, 269-274.
- Thorgaard, G.H. and Gall, G.A.E. (1979). Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics*, **93**, 961-973.
- Thorgaard, G.H. and Jazwin, M.E. and Stier, A.R. (1981). Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **110**, 546-550.
- Thorgaard, G.H., Scheerer, P.D., Hershberger, W.K. and Myers, J.M. (1990). Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival. *Aquaculture*, **85**, 215-221.

- 山木 勝・佐藤正治・佐藤治平・昆 洋一・張 全啓・内村祐之 (1997). 高水圧および高水温処理によるアマゴ四倍体の誘起とその最大核小体数と DNA 量測定による確認. 水産育種, **25**, 37-48.
- 山木 勝・佐藤治平・谷浦 興・荒井克俊 (1999). 二倍体—四倍体モザイクアマゴの子孫. 日水誌, **65**, 1084-1089.
- Yamazaki, F. and Goodier, J. (1993). Cytogenetic effects of hydrostatic pressure treatment to suppress the first cleavage of salmon embryos. *Aquaculture*, **110**, 51-59.