

ニゴロブナ雌性発生二倍体の作出とその特性

藤岡 康弘

Production and Some Properties of
Gynogenetic Diploids in Nigorobuna
Carassius Carassius Grandoculis

Yasuhiro Fujioka

Conditions for producing and some properties of gynogenetic diploids in the nigorobuna *Carassius carassius grandoculis* were examined. When the eggs were fertilized with nigorobuna sperm irradiated UV (ultraviolet-ray) of 300 ergs/mm², chromosome number in the embryo was 50 coincident with the haploid chromosome number. A UV dose of 2000~5000 ergs/mm² seems to be enough to genetically inactivate nigorobuna sperm. The optimum duration of cold-shock (CS: 0 °C) treatment for prevention of the formation of the second polar body was 40 min. The yield of gynogenetic diploids showed higher values when the CS treatments were started 5 min at 25.4 °C, 9 min at 20.4 °C and 12 min at 15.0 °C, respectively, after insemination. Gynogenetic diploids showed lower rates of survival than did the control diploids for 25 days after hatching. One batch of gynogenetic diploids produced from a mother was all female, but other batches of gynogenetic diploids from four different mothers contained several males. High water temperature for early life stages of the fish was considered to influence on the sex ratio. These results suggest that CS treatment (0 °C, for 40 min) is a practical method for the production of gynogenetic diploids in nigorobuna, preventing the formation of the second polar body. Further studies are need to clarify sex determination mechanism of nigorobuna.

近年の魚類における染色体操作技術の開発は、三倍体等の倍数体の作出や雌性発生による性の統御ならびに育種技術等の発達に大きく貢献しており、これらの技術はすでにサケ科魚類などの分野を中心に実用的な段階に達しているものもある。¹⁾ 染色体操作技術は、対象種が違ってもほぼ共通した手法が適用可能であるが、細部においてはかなり異なった操作が必要であり、目的とする種類毎に最適条件を明らかにしておくことが必要となっている。

「ふなずし」は琵琶湖の魚介類を用いた伝統食品の一つで、ニゴロブナ *Carassius carassius grandoculis* を用いたなれずしであり、特に冬季か

ら早春に漁獲される抱卵した雌を使用してつくられる。ニゴロブナは琵琶湖固有種で、現在のところ琵琶湖以外での分布はなく、かつ事業的規模の養殖も行われていない。最近、ニゴロブナの漁獲量は急激に低下していることから、早急な増養殖対策が求められている。今後、迅速かつ効率的に対策を進めるためには、増殖手法の確立と併せて大量種苗生産の効率化や優良品種の確立が必要である。

そこで本報は、ニゴロブナの性比の制御や優良品種の開発をめざして雌性発生法の開発と作出された雌性発生二倍体の特性について検討した結果について報告する。

材料および方法

実験は滋賀県水産試験場で人工飼育されているニゴロブナ（4・5年魚）およびホンモロコ（2・3年魚）親魚から人工的に採取した精液および卵を用いて行った。精液は実験直前に親魚から搾出した後、10mlのキャップ付きガラス瓶に保存して適宜必要量を分取して使用した。また、ニゴロブナ卵は、予め産卵間近い個体を選別し、実験前夜に日本薬局方体盤性腺刺激ホルモン（ゴナトロピン1000；帝国臓器製薬株式会社）を300 I.U./個体（約3 I.U./g体重）腹腔内注射し、翌朝排卵直後の卵を人工採卵して使用した。

精液は淡水硬骨魚類用リンゲル液(BSS；pH7.0)で100倍に希釈し（希釈精液は全て1時間以内に実験に使用した）、その1ccを直径9cmのガラスシャーレに取り振蕩しながら紫外線（東芝殺菌線灯,15GL）を照射した。その後この精液を直ちにニゴロブナ卵に媒精し、スリガラス板に付着させて一定水温で培養し、別に用意した低温水（氷水：0～0.3℃）または高温水（40℃）に浸漬することにより処理を行った。その後受精卵は室温で培養して受精2日後の生残率・孵化率および外見的に正常な孵化仔魚の出現率を求め、実験に使用した卵数に対する割合として表した。

雌性発生二倍体と通常受精の稚魚の生残率を比較するため、孵化仔魚を30ℓの丸型パンライト水槽に収容し、100日間は止水状態（3日毎に水を交換）でワムシおよびミジンコ等の生物餌料を与えて飼育した。それ以降は50ℓの水槽で鮎用の人工配合飼料を与えて流水条件下で飼育した。なお、飼育中の水温は孵化後100日間は17.0～29.0℃、それ以降は14.0～19.0℃であった。

雌性発生二倍体の性比を調査するため、ニゴロブナ雌親魚4個体から上記の方法により採卵し、紫外線不活化精子を受精し5分後に0℃40分間の低温処理により雌性発生二倍体を作成した。孵化仔魚は100日間は30ℓのパンライト水槽でワムシ・ミジンコ等の生物餌料を与えて室温で飼育した。その後60ℓの亚克力水槽に移しコイ用の配合飼料を与えた。孵化後120日以降に実験魚を取り上げて標準体長を測定した後、生殖腺を摘出して顕微鏡下で性別を調査した。

さらに、性分化期の飼育水温が性比に及ぼす影響を検討するため以下の実験を行った。すなわち、ニゴロブナの雌5個体から採卵し、各卵を半分に分けた。片方の卵には紫外線照射により不活化したホンモロコ精子を受精し、0℃30分間の低温処理によ

り雌性発生二倍体を作成した。もう一方の卵には3個体のニゴロブナから採取し混合した精子を受精した。これらの受精卵は室温（17～20℃）で孵化させた後、20℃（低水温区）と30℃（高水温区）に設定したウオーターバス中に置いた30ℓのパンライト水槽にそれぞれ約200尾の孵化仔魚を収容して60日間飼育した。61日から150日は室温（15.0～28.5℃）で、さらにそれ以降は17.5～19℃の地下水を注入して飼育した。実験魚は孵化後10か月に取り上げて生殖腺を摘出し顕微鏡下で性別を調査した。なお、孵化後60日間の飼育水温は低水温区では19.0～21.0℃、高水温区では28.0～31.0℃であった。

胚の染色体標本は小刻法²⁾により、また成魚の染色体標本は上野らの方法³⁾により作製した。

結果

紫外線照射精液を受精した卵の孵化成績 BSSで希釈したニゴロブナ精液に紫外線を照射しニゴロブナ卵に受精すると、受精後2日の胚生残率および孵化率とも紫外線量の増加に伴い低下し100 ergs/mm²で最低値を示した（Fig. 1）。しかしその後、紫外線量を増加すると胚生残率と孵化率ともにそれらの値は徐々に上昇し、孵化率は5000 ergs/mm²以上で50%以上に回復した。正常な孵化仔魚の割合は紫外線量が増加すると急激に低下し、100 ergs/mm²で1.3%となり、それ以上紫外線量を増加しても正常仔魚の出現は2.1%以下であった。

紫外線を40 ergs/mm²照射した精液を受精した卵の胚の染色体数は、ニゴロブナの染色体数である100に近いものからその半数に近いものまで見られ、いずれも異数体であった（Fig. 2 A, B）。しかし、300 ergs/mm²の紫外線を照射した精液で受精した胚の染色体数

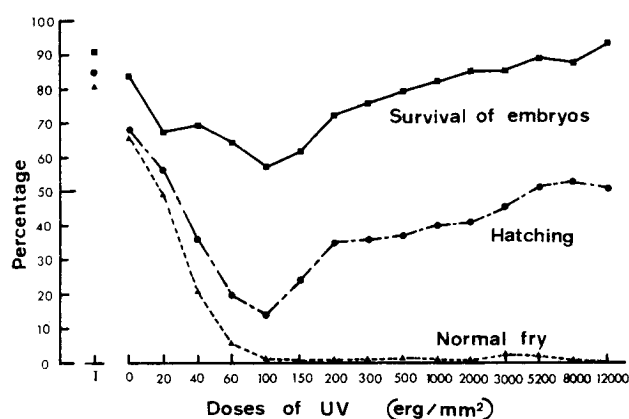


Fig. 1. Changes in survival of embryos (■), hatching (○) and rate of normal fry (▲) of nigorobuna eggs fertilized with UV-irradiated nigorobuna sperm.

ニゴロブナ雌性発生二倍体の作出とその特性

は50で、半数体であることを示し (Fig. 2 C)、8000 ergs/mm² の紫外線を照射した精液で受精した胚の染色体数も50であった (Fig. 2 D)。8000 ergs/mm² の紫外線照射精液を受精し7分後に0℃40分間の低温処理を施して孵化した稚魚の染色体数は100であった

(Fig. 2 E)。なお、150 ergs/mm² 以上の紫外線を照射した精液を受精した卵から孵化した奇形仔魚は、正常な孵化仔魚 (Fig. 3 A) に比較して、体は矮小で湾曲しており、小眼で腹水が貯留して典型的な半数体症候群を示した (Fig. 3 B)。

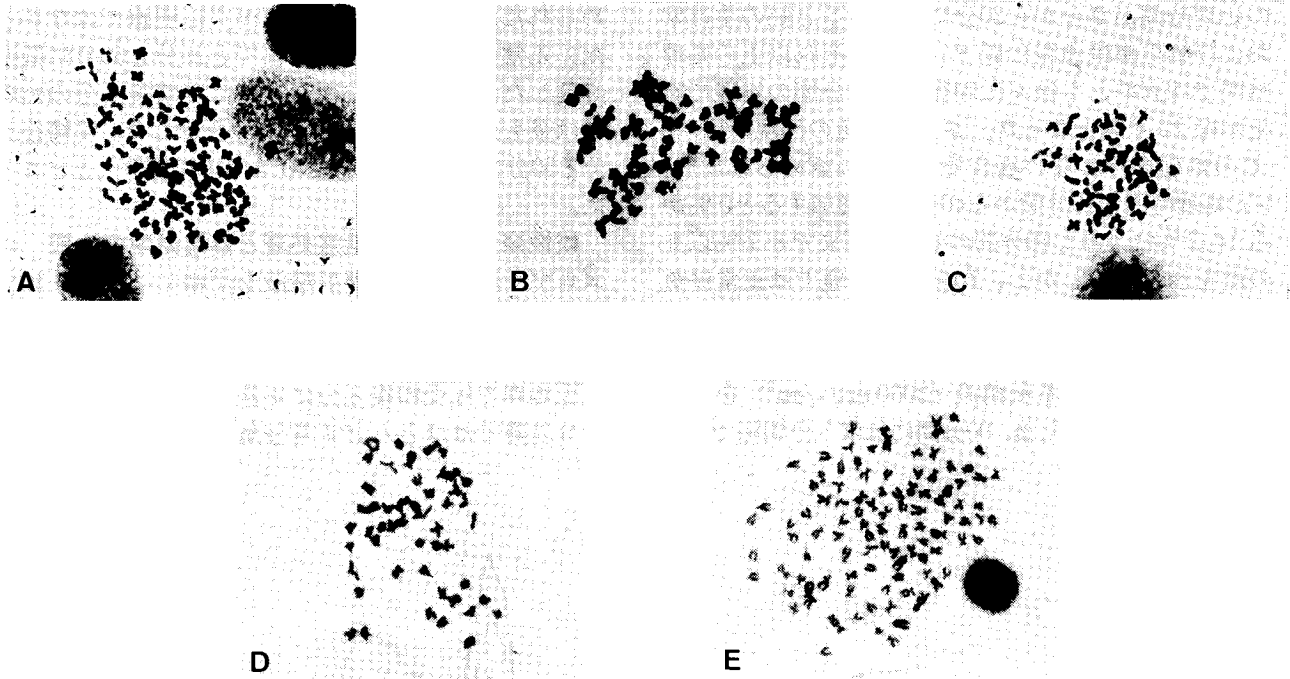


Fig. 2. The metaphase plates of the nigorobuna embryos fertilized with sperm exposed UV of 40 ergs/mm² (A : n = 88, B : n = 67), 300 ergs/mm² (C : n = 51) and 8000 ergs/mm² (D : n = 50), and of the gynogenetic fry (E : 2 n = 100).

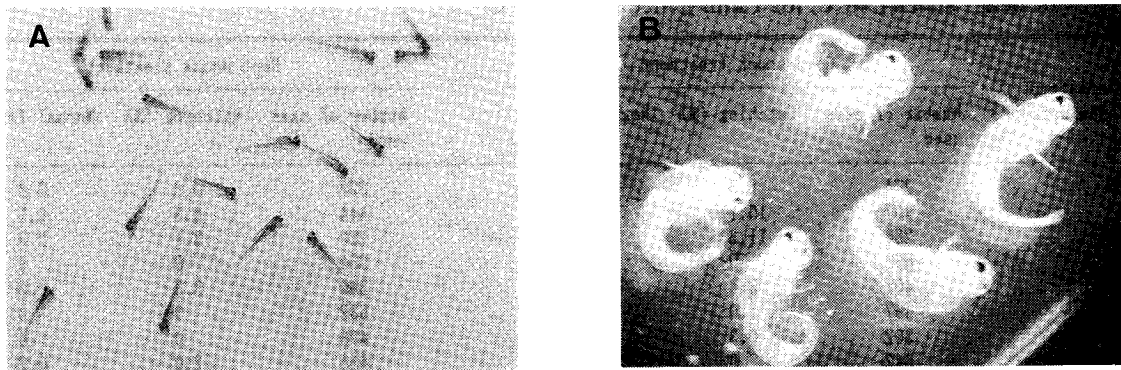


Fig. 3. Shapes of gynogenetic diploids (A) and haploids (B).

雌性発生のための低温処理時間 3000 ergs/mm²の紫外線を照射したホンモロコ希釈精液（ホンモロコ精液の紫外線による不活化は3000 ergs/mm²で十分であることが判明している⁴⁾）をニゴロブナ卵に受精し、22.5℃で培養して7分後に0℃の水に10～70分間処理したときの孵化成績の変化をFig. 4に示した。0℃の処理時間が0分から30分に増加すると胚の生残率および孵化率は急激に低下したが、それ以上の処理時間では両率とも徐々に回復し、50分間の処理で孵化率は22.4%となった。正常な仔魚の出現率は、0℃の処理を行わない場合でも1.0%認められたが、0℃処理時間を10分間から40分間に増加すると0%から14.2%に上昇し60分間の処理時間まで8.7%以上の値を示した。しかし、70分間の処理では正常仔魚の出現率は再び0.2%に低下した。

雌性発生のための低温処理開始時間 紫外線を照射したホンモロコ希釈精液（3000 ergs/mm²）をニゴロブナ卵に受精した後、90分間にほぼ5分間隔で0℃

の低温処理（継続時間は40分間、卵の培養温度は22℃）を行った場合の胚の生残率と孵化率および正常仔魚の出現率の変化をFig. 5に示した。胚の生残率は受精後7、30、55、80分に低温処理した場合にピークが認められ、各ピークは受精後の時間経過に伴い小さくなった。孵化率においてもほぼ同様な変化が認められたが、受精後80分のピークは明瞭ではなかった。正常仔魚は受精後10分までと25分と50分に低温処理した場合にのみ出現し、特に受精後7分の処理では最も高い出現率（42.7%）を示した。受精後25分と50分では各々0.8%と0.4%の出現率にとどまった。

雌性発生のための低温処理と高温処理の比較 ニゴロブナ卵に紫外線照射精液を受精し、0℃-40分間の低温処理と40℃-1分間の高温処理を、受精後5分から55分までに行った結果をTable 1に示した。低温処理では受精後8分に正常仔魚が9.9%出現し10分以降ではほとんど正常仔魚は出現しなかった。

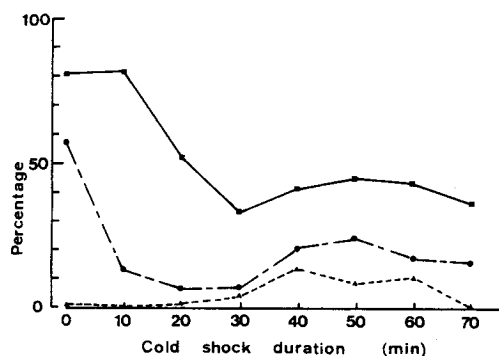


Fig. 4. Effect of duration of cold - shock (0℃) on the survival of embryos (■), hatching (●) and yield of normal fry (▲) in nigorobuna eggs fertilized with UV - irradiated sperm.

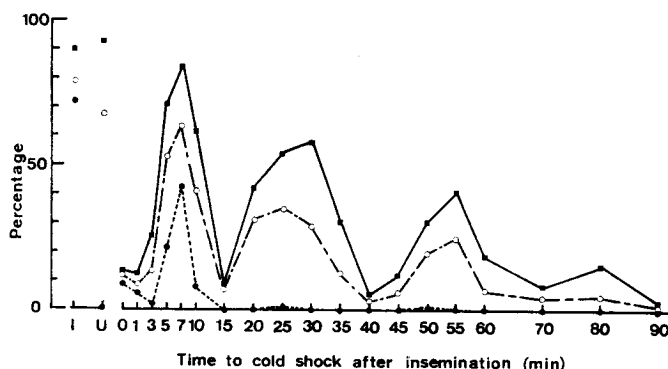


Fig. 5. Relationships between the time of start of cold - shock treatment (0℃, 40 min) and survival of embryos (■), hatching (○), and yield of normal fry (●) in nigorobuna eggs.

Table 1. Hatching and yield of normal from the eggs, which were treated cold - shock (0℃, for 40 min) or heat - shock (40℃, for 1 min), incubated 20.5℃

Time to treatment after insemination (min)	Cold-shock treatment			Heat-shock treatment		
	Number of eggs used	Hatching (%)	Normal fry (%)	Number of eggs used	Hatching (%)	Normal fry (%)
5	274	8.8	8.2	322	0.8	0.8
7	407	10.1	9.1	444	0.5	0.5
8	284	11.3	9.9	280	3.1	2.3
10	583	0	0	854	0	0
15	407	3.4	0	399	3.3	0.3
20	497	1.0	0	532	0	0
30	302	0.3	0	478	0	0
35	842	0	0	405	2.0	0.2
40	138	3.8	0	440	0	0
45	259	8.2	0.4	458	9.2	0.4
50	251	0.8	0	440	14.1	0.2
55	239	0	0	582	2.0	0.2

高温処理ではやはり受精後8分に2.3%の正常仔魚が出現したが、低温処理に比較して低率であった。

卵の培養温度が雌性発生のための低温処理開始時間に及ぼす影響 受精卵の培養温度と雌性発生のための低温処理時間の関係を明らかにする目的で15.0, 20.4, 25.4℃の3つの温度条件で培養したニゴロブナの受精卵(3000 ergs/mm²の紫外線を照射したホンモロコ精液を受精)を受精後3分から12分までの間にほぼ30秒間隔で0℃の低温処理(継続時間は40分間)を行った場合の胚の生残率、孵化率および正常仔魚の出現率の変化をFig. 6に示した。培養温度15.0℃では、調査した受精後6分から12分では6分と12分の値が胚の生残率、孵化率および正常仔魚出現率とも高い値を示し、この間の7分から11分では極めて低値であった。培養温度20.4℃では、受精後9分に3つの値とも最も高い値を示し、正常仔魚出現率では23.8%であった。受精後7分までの低温処理で正常仔魚の出現率は4分に若干の上昇傾向が認められた。培養温度25.4℃では受精後5分から5分30秒に胚生残率、孵化率および正常仔魚出現率が高値を示した。

以上の実験結果および別に培養温度を変えて行った実験結果から、最も正常仔魚の出現率の高かった低温処理を行った受精後の時間と培養温度の関係をFig. 7に示した。培養温度と低温処理開始時間との間には直線関係が認められ、回帰式は $Y = 33.12 - 1.47$

X ($r = -0.97$, Yは卵の培養温度, Xは正常仔魚の最も高い出現率を示す低温処理開始時間)で示された。

雌性発生二倍体の生残率 ニゴロブナの希釈精液に紫外線を8000 ergs/mm²照射し1尾のニゴロブナから採取した卵の半分は受精し、5~7分後に0℃40分間の低温処理により雌性発生二倍体を作出した。残り半分の卵には正常なニゴロブナ精液を受精して正常仔魚を得た。これらの仔魚各240尾について孵化後200日間の生残率の比較をFig. 8に示した。孵化後25日間における生残率は正常仔魚では89.2%であったが、雌性発生二倍体では42.1%と極めて低率であった。しかしそれ以降の生残率には大きな差は見られず、孵化後200日の生残率は正常仔魚で58.4%、雌性発生二倍体では18.0%であった。

雌性発生二倍体の性比 5尾の雌親魚から個別に作出した雌性発生二倍体と1尾の雌親魚から正常受精により孵化した正常魚の性比をTable 2に示した。5組の雌性発生二倍体の内1組では全て雌であったが、

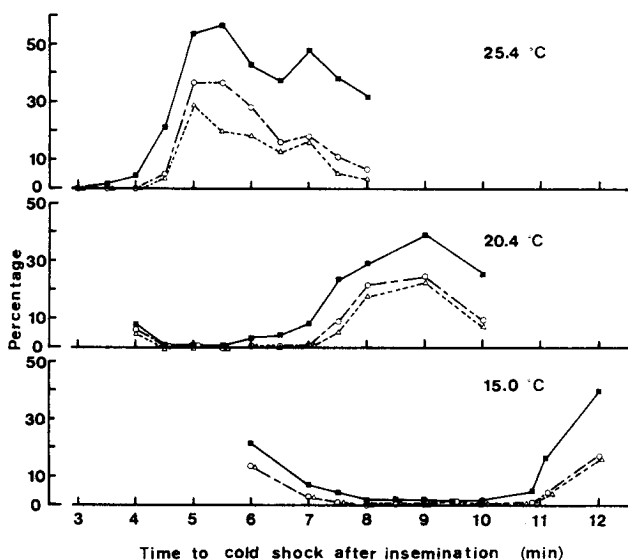


Fig. 6. Relationships between the time of start of cold shock treatment (0℃, 40 min) and survival of embryos (■), hatching (○), and yield of normal fry (△) in nigorobuna eggs incubated at three different temperatures.

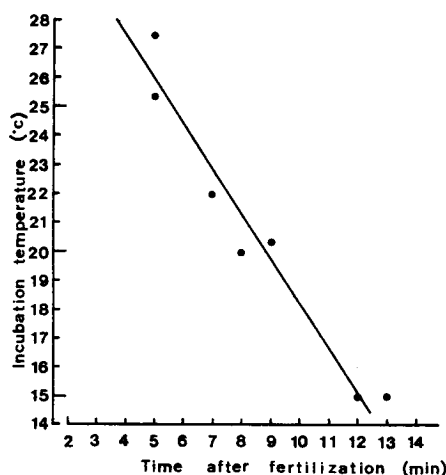


Fig. 7. Relationships between incubation temperature of eggs and the best time to cold shock after insemination.

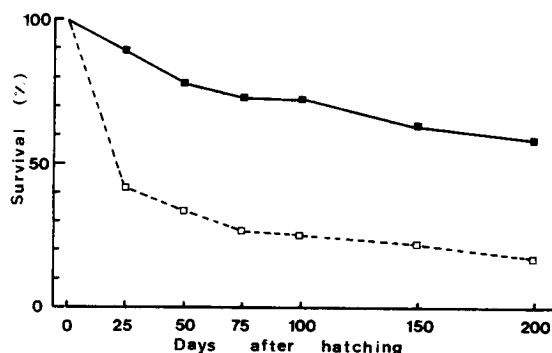


Fig. 8. Changes in survival of gynogenetic diploids (□) and control diploids (■) of nigorobuna for 200 days after hatching.

Table 2. Sex ratios of one - year old gynogenetic diploids and control diploids

Mother No.	Mean standard length (cm)	Number of fish examined	♀ (%)	♂ (%)	♀+♂ ^{*1}	Indif. ^{**2}
1	5.2	10	9 (90.0)	1 (10.0)	0	0
2	3.6	10	10(100)	0 (0)	0	0
3	4.4	20	10 (50.0)	10 (50.0)	0	0
4	3.6	24	9 (37.5)	14 (58.3)	0	1
5	4.8	11	7 (63.6)	3 (27.3)	1	0
Control	4.2	21	12 (57.1)	9 (42.9)	0	0

*1 Hermaphrodite. **2 Sexually indifferent.

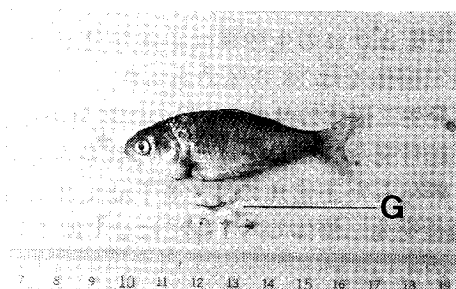


Fig. 9. A matured male in the gynogenetic diploids. G indicate testes of the fish.

1組で少数の雄が、また別の3組で多数の雄が出現した (Fig. 9)。未分化と雌雄同体の各1個体を除いて、雌雄とも生殖腺の発達に異常は認められず、雄ではすでに精子形成が認められ、雌では周辺仁期の卵母細胞が多数認められた (Fig. 10)。なお、正常交配による対象区の雌の割合は57.1%であった。

飼育水温が性比に及ぼす影響 4尾の雌親魚の卵から個別に作出した雌性発生二倍体と通常発生させた仔魚を孵化後60日間にわたり低温と高温で飼育した

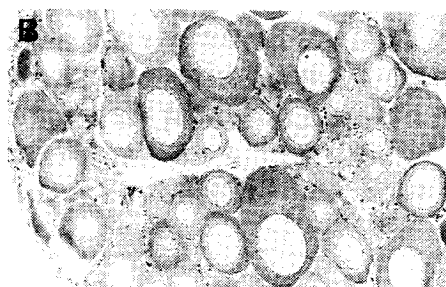


Fig. 10. Gonadal histology of testis (A) and ovary (B) in gynogenetic diploids nigrobona.

Table 3. Sex ratios of gynogenetic diploids and control diploids reared at low and high temperature

Group	Rearing condition ^{*1}	Sex	mother no.				Total (%)
			1. (%)	2. (%)	3. (%)	4. (%)	
Gynogenetic diploid	low temperature	male	0 (0)	0 (0)	1 (10)	- -	1 (3)
		female	20 (100)	8 (100)	9 (90)	- -	37 (97)
	high temperature	male	1 (5)	8 (53)	- -	1 (20)	10 (25)
		female	19 (95)	7 (47)	- -	4 (80)	30 (75)
Control diploid	low temperature	male	1 (4)	8 (50)	19 (61)	23 (79)	49 (50)
		female	25 (96)	6 (50)	12 (39)	6 (21)	49 (50)
	high temperature	male	0 (0)	22 (79)	16 (80)	17 (85)	55 (80)
		female	24 (100)	8 (21)	4 (20)	3 (15)	37 (40)

*1 The fish were reared at low (19.0 ~ 21.0 °C) and high (28.0 ~ 31.0) water temperature for 60 days after hatching.

実験魚の性別の調査結果を Table 3 に示した。母親 No. 2 は雌性発生二倍体では低水温区で雄は出現しなかったが高水温区で53%の雄が認められた。また対照区でも高水温区で雄の割合が大幅に増加した。母親 No. 3 および 4 では、対照において高水温区で雄の割合が増加する傾向を示した。なお、母親 No. 1 は雌性発生二倍体および対照とも雄の割合が少なかった。

考 察

以上の実験結果から、ニゴロブナの雌性発生二倍体の作出には卵の培養温度が20℃の場合、受精後8～9分に40～60分間の0℃の低水温処理が有効であることが判明した。

ニゴロブナの雌性発生にニゴロブナ精子を用いる場合、精子の不活化には200 ergs/mm²以上が必要であり2000 ergs/mm²以上であれば十分であると考えられた。精子に異種のものを使用する試みもなされているが、これは例え精子の不活化に失敗した場合でも異種間の交雑魚が生まれない場合に有効であり、ホンモロコの雌性発生にニゴロブナの精子を使用が有効であることは前報⁵⁾で示したところである。鈴木⁶⁾によれば、金魚とタモロコの交雑において金魚♂×タモロコ♀の組合せでは生存性の交雑魚はできないが、タモロコ♂×金魚♀の組合せでは生存性の交雑魚が生まれることを報告している。従って、ホンモロコ♂×ニゴロブナ♀の組合せにおいても生存性の交雑魚が出現する可能性が十分考えられる。今回、ニゴロブナ精子について検討したが、40 ergs/mm²という低線量を照射した精子を受精した胚の染色体数はすでに異数性を示し、300 ergs/mm²で胚は半数体となっていた。これらの結果から、ニゴロブナ精子を用いる場合でも2000～3000 ergs/mm²以上の強度であれば精子DNAの不活化には問題ないものと考えられた。しかし、今回の実験でUV線量を3000 ergs/mm²以上に増加しても正常な仔魚が少数ではあるが出現したことは、卵染色体の自然の倍数化によるものではないかと考えられる。

UV照射精子を受精したニゴロブナ卵を受精直後から経時的に低水温処理すると卵の生残率や孵化率は周期的な増減を示した。同様な現象はホンモロコでも知られており、細胞分裂の周期と密接に関係していることが示唆されている。⁵⁾ニゴロブナ卵では第一卵割が受精後60分(培養温度22℃)に観察されることから*、今回の実験(Fig. 5)で受精55分後に認められたピークは第一卵割に、また7分後のピークは

減数分裂(第2極体の放出)期にあたるものと考えられた。従って、低水温処理を受精後15分までに行つて出現した正常仔魚は第2極体放出阻止型の雌性発生二倍体であると考えられる。

卵の発生速度は培養温度の影響を強く受けることはよく知られている。⁷⁾卵の培養温度を変えると雌性発生のための低水温処理の最も良いタイミングは大きく変化し、培養温度と最適処理タイミングの間には直線関係が認められた。ホンモロコの雌性発生卵の研究⁵⁾から、第二極体放出阻止の低水温処理の最適タイミングは、両娘染色体セットが分離移動途上の減数分裂後期にあり、これはニゴロブナにおいては25.4℃では受精後5分、20.4℃では受精後9分、15.0℃では受精後12分に相当するものと考えられる。従って、15.0℃に認められた受精後6分にピークが認められたことは、減数分裂後期より早い段階にも第二極体放出阻止のタイミングが存在することを示しており、興味を持たれる。

人工的に作出された雌性発生二倍体の性比については、コイ⁸⁾、草魚⁹⁾、ドジョウ¹⁰⁾、ニジマス¹¹⁾、ギンザケ¹²⁾等で全雌あるいはほとんど全雌であったとされている。一方、ホンモロコ¹³⁾、Plaice¹⁴⁾、Zebra fish¹⁵⁾、ヒラメ¹⁶⁾等では比較的多く雄が出現し、性決定様式が雌ホモ型とされている金魚にも雄の出現が報告されている。今回の実験でニゴロブナの雌性発生二倍体にも多くの割合で雄が出現し、全雌となったのは5組中1組にとどまった。さらに、孵化後60日間高温および低温で飼育した場合、性比に変化が認められ、高水温飼育で雄の割合が増加する傾向を示した。また、通常の受精による場合でも全雌となる場合があり(Table 3, No. 1)、ニゴロブナの性決定様式についてはさらに詳細な検討が必要である。

以上のように、ニゴロブナの雌性発生二倍体の作出は低水温処理により比較的高率で可能であるが、当面の課題である全雌生産については、性決定様式の解明を平行して進めながら行う必要がある。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、広島大学生物生産学部鈴木亮教授および水産庁養殖研究所小野里坦部長に多大なる御指導と御助言を賜った。また、胚の染色体標本の作製について御教示下さった広島大学生物生産学部助教授(現東京大学農学部助教授)黒倉寿博士には大変お世話になった。ここに深謝の意を表す。

* ホンモロコ・ニゴロブナの雌性化技術開発に関する研究, 昭和62年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書, pp.1-23, 滋賀県水産試験場。

摘要

琵琶湖固有種であるニゴロブナの雌性発生二倍体の作出条件を明らかにするとともに、ニゴロブナ雌性発生二倍体の生残率や性比を調査したところ、以下のような結果が得られた。

1. 300 ergs/mm² の紫外線を照射されたニゴロブナ精子を受精したニゴロブナ卵の胚の染色体数は50で、すでに半数体となっており、ニゴロブナ精子の不活化には2000～5000 ergs/mm² の紫外線照射で十分であると考えられた。
2. 第二極体の放出阻止には低水温処理（0℃40分間）が有効であり、低水温処理の開始時間は卵の培養温度が25.4℃のとき受精5分後から、20.4℃のとき受精9分後から、また15.0℃のときは12分後からが最も多く雌性発生二倍体を得られた。
3. 雌性発生二倍体と通常二倍体（対照）の孵化後200日間の生残率を比較したところ、雌性発生二倍体では孵化後25日間に生残率が約40%に低下して対照との間に大差が生じたが、その後は対照との間に差は認められなかった。
4. 異なる母親から作出した5組の雌性発生二倍体の性比を調査したところ、1組では全雌であったが他の4組には雄が様々な割合で出現した。
5. 孵化仔魚を飼育初期（孵化後60日間）に低水温（20℃）と高水温（30℃）で飼育すると高水温飼育で雄の割合が増加する傾向があった。

文献

- 1) 鈴木亮編（1989）：水産増養殖と染色体操作，水産学シリーズ75, pp.1-122, 恒星社厚生閣，東京。
- 2) Yamazaki, F., H. Onozato, and K. Arai (1981) : The chopping method for obtaining permanent chromosome preparations from embryos of teleost fish, Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 47 (7), 963.
- 3) 上野紘一・岩井修一・小島吉雄（1980）：シマドジョウ属にみられた染色体多型と倍数性，ならびにそれらの染色体型の地理的分布，日本水産学会誌，46（1），9-18.
- 4) 田中秀具・澤田宣雄：ホンモロコ・ニゴロブナの雌性化技術開発に関する研究 I，滋水研報，41，1-9.
- 5) Fujioka, Y. (1993) : Induction of gynogenetic diploids and cytological studies in honmoroko *Gnathopogon caerulescens*, Nippon Suisan Gakkaishi, 59 (3), 493-500.

- 6) Suzuki, R. (1963) : Hybridization experiment in cyprinid fishes V. Reciprocal crosses between *Carassius carassius auratus* and *Gnathopogon elongatus elongatus*. Anno. Zool. Jap., 36 (4), 203-207.
- 7) 山本時男（1943）：魚類の発生生理，魚卵の発生速度と温度，pp. 110-120, 養賢堂，東京。
- 8) Nagy, A., K. Rajki, L. Horvath, and V. Csany (1978) : Investigation on carp, *Cyprinus carpio* L. gynogenesis, J. Fish Biol., 13, 215-224.
- 9) Stanley, J.G. (1976) : Female homogamy in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) determined by gynogenesis, J. Fish Res. Board Can., 33, 1372-1374.
- 10) Suzuki R., T. Oshiro, and T. Nakanishi (1985) : Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*, Aquaculture, 48, 45-55.
- 11) Chourrout D., and E. Quillet (1982) : Induced gynogenesis in the rainbow trout : sex and survival of progenies production on all-triploid population. Theor. Appl. Genet., 63, 201-205.
- 12) Refstie T., J. Stoss, and E.M. Donaldson (1982) : Production of all female coho salmon (*Oncorhynchus kistch*) by diploid gynogenesis using irradiated sperm and cold shock, Aquaculture, 29, 67-82.
- 13) 藤岡康弘（1993）：ホンモロコ，*Gnathopogon caerulescens* の17-methyltestosteroneの浸漬処理による性転換と全雌魚生産の試み，水産増殖，41（3），409-416.
- 14) Purdom C.E. (1972) : Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*) , Heredity, 29, 11-24.
- 15) Streisinger G., C. Walker, N. Dower, D. Knauber, and F. Singer (1981) : Productin of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) , Nature, 291, 293-296.
- 16) Tabata K. (1991) : Induction of gynogenetic diploid males and presumptin of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*, Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 845-850.