

二倍体—四倍体モザイクアマゴの子孫

山木 勝, 佐藤 治平, 谷浦 興, 荒井 克俊

(1999年3月25日受付)

Progeny of the Diploid-Tetraploid Mosaic Amago Salmon

Masaru Yamaki,^{*1,†} Haruhei Satou,^{*2}
Kou Taniura,^{*3,*4} and Katsutoshi Arai^{*3,*5}

Induction of tetraploid amago salmon was attempted by treating inseminated eggs with hydrostatic pressure shock (650 kg/cm², 6 min duration) in 1996 and 1997. Based on the appearance of four nucleoli in the epithelial cells of pectoral fins, putative tetraploids were selected among six-month-old juveniles developed from pressure-shocked eggs of both year classes. At the age of twenty three months, the surviving ten females of the 1996 year class were flow-cytometrically determined to be diploid by measuring DNA content of erythrocytes. However, both diploids and triploids were detected in the progeny, when one of these diploid females was crossed with normal diploid males. Other females gave no triploid progeny. Among eleven individuals examined in the one-year-old 1997 year class salmon, a diploid-tetraploid mosaic male was found, but the others were diploid. All the progeny examined were diploid, when the eggs of a normal diploid were fertilized by spermatozoa of this mosaic male. The present results suggest the possible production of tetraploid and other polyploid lines using diploid gametes of fish which developed from the chromosome manipulation to inhibit first cleavage for induction of tetraploids but were determined to be diploid in adult stage by cellular size and DNA content of somatic cells. Such chromosomally-manipulated fish are likely to be mosaics including tetraploid cells in their germ line, in spite of a large population of diploid cells in soma. The present results also demonstrate a different case in which the apparent diploid-tetraploid mosaic generated only haploid spermatozoa.

キーワード：四倍体，モザイク，倍数体，アマゴ

魚類では，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，染色体を倍化させて四倍体を作ることができる。¹⁻⁷⁾しかし，四倍体の誘起率と生残率は低く，作出した四倍体が成魚にまで成育した例は少ない。^{4,5,8-10)}ところが，ニジマス *Oncorhynchus mykiss* では，四倍体が成魚まで育成され，交配実験の結果から，これら四倍体は二倍体配偶子を形成することが示された。^{4,5,10)}すなわち，四倍体の作出は困難であるが，一度四倍体を得ることができれば，二倍体配偶子(卵，精子)の受精により，四倍体系統の維持・増殖が可能となる。^{4,5)}

山木ら¹¹⁾は，アマゴ *Oncorhynchus masou ishikawai*

受精卵を媒精 4-7 時間後に高水圧処理し，生残した稚魚の鱗細胞から核小体数 4 を有する四倍体候補を選別した。その後 24 ケ月齢魚および 12 ケ月齢魚について赤血球サイズおよび赤血球核 DNA 量により倍数性を再調査したところ，1 個体が二倍体細胞 (77%) と四倍体細胞 (23%) を併せもつモザイクであった。このことは，1 個体の中で用いた組織・細胞により倍数性が異なる可能性を示唆する。従って，核小体数 4 を示す個体の中には，赤血球では二倍体細胞しか認められない場合であっても，生殖細胞が四倍体あるいは様々な程度の二倍体—四倍体モザイクとなっていることが予想される。

本研究では，第 1 卵割阻止操作から生じた子孫は様

*1 愛媛県立宇和島水産高等学校 (Ehime Prefectural Fishery High School, Uwajima, Ehime 798-0068, Japan).

*2 佐藤アマゴ養殖場 (Satou Amago Salmon Farm, Uwa, Higashi-uwa, Ehime 797-0010, Japan).

*3 広島大学生物生産学部 (Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Higashi-hiroshima 739-8528, Japan).

*4 現住所：須磨海浜水族園 (Suma Aqualife Park, Suma, Kobe 654-0049, Japan).

*5 現住所：北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan).

† Corresponding author.

々な程度で二倍体—四倍体モザイクとなっている場合があると考え、このような操作から生じたアマゴ子孫について、稚魚期では鱗の核小体数、幼・成魚期では赤血球核 DNA 量および赤血球サイズの観察により倍数性ならびにモザイク性の推定を行った。そして、これらアマゴの配偶子と正常二倍体の配偶子を受精させて作出した子孫の倍数性を発生初期に調べることににより、生殖細胞が二倍体配偶子を形成し得る四倍体となっているかどうか調査した。

材料と方法

供試魚 材料として、愛媛県東宇和郡宇和町の佐藤アマゴ養殖場のアマゴ（導入系統は不詳。1973年より養殖）を使用した。四倍体誘起に用いた雌はすべて正常二倍体間の交配に由来するが、雄は性転換雄（遺伝的雌）または通常の雄を使用した。性転換雄は、第2極体放出阻止型雌性発生二倍体を祖先とするアマゴを岡田¹²⁾の方法に従い性転換させ、この雄と通常の雌を交配して得られる全雌種苗の一部を同様の方法により性転換して継代した個体である。

下述の染色体操作により生じた子孫の一部は同養殖場の通常二倍体アマゴ雌雄を用いて交配した。

受精卵の高水圧処理 アマゴ四倍体の誘起は1996年に性転換雄で媒精した受精卵を用いて1回、1997年に通常雄で媒精した受精卵で4回実施した（Table 1）。卵は雌3-11個体、精液は雄1-6個体より採取し、プールした卵と精液を混合した。そして、淡水を加えた時を媒精の時間とした。アマゴ第1卵割の細胞学的観察¹³⁾および発眼胚から細胞当たり4個の核小体が観察される高水圧処理開始時間が媒精4時間から7時間であったことから¹¹⁾受精卵を4-8のグループに分け、媒精4時間から7時間30分まで（それぞれの培養水温は約14-15°Cであった）、10-30分毎に高水圧処理（650 kg/cm², 6分間）を行った。卵は処理開始時間毎に縦型孵

化水槽内の孵化盆に収容した。孵化管理中の水温は13-15°Cで推移した。積算水温が約300°C・日で検卵を行い、正常発眼卵のみを収容し孵化させた。

核小体標本の作製 6ヶ月齢稚魚の胸鱗あるいは発眼胚をカルノア（エタノール：酢酸=3：1）液で固定した。標本は Carman *et al.*¹⁴⁾の方法に従い作製した。

赤血球核径の測定 尾柄部より採取した血液から常法により血液塗抹標本を作製した。ギムザ染色後、ビデオマイクロメーター（VM-60, Olympus）で赤血球核長径を測定した。

核DNA量フローサイトメトリー 体細胞核のDNA量フローサイトメトリーの試料として採取した血液あるいは正常発眼胚は、細胞培養用培地（Eagle's MEM）で冷蔵保存（4°C）し、広島大学生物生産学部へ輸送した。核DNA量フローサイトメトリーは通常交配二倍体アマゴの血液を対照として、Zhang and Arai¹⁵⁾の方法に従って行った。すなわち、採取した血液は2%クエン酸ナトリウムで2回の洗浄後、遠心分離を行った。そして、赤血球細胞を1mlの染色液（50 μg/ml Propidium iodide (PI), 2 μg/ml Nonidet P40, 0.1% クエン酸ナトリウム）に入れ、脱核と染色を同時に行った。細胞懸濁液は、分析前に40 μm メッシュに通し、細胞塊等を除去した。フローサイトメーター（FACS Calibur, Becton Dickinson）のアルゴンイオンレーザーの波長を480 nmに調整しDNA量分析を行った。材料が胚体の場合はCMF-PBS（NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 0.2 g, DW 1000 ml）内で小刻した後、遠心分離を行い、上述と同様の方法で染色し分析した。

染色体操作魚の交配 1996年および1997年の高水圧処理により生じた稚魚より最大核小体数4を示す個体を四倍体候補として選び、飼育を行った。1998年10月に、これらについてDNA量フローサイトメトリーを行った後、11月に成熟魚を順次交配実験に供した。交配は1998年11月から12月の期間に1996年産雌7

Table 1. Treating conditions of fertilized eggs by hydrostatic pressure (650 kg/cm², for 6 min) for production of tetraploid amago salmon

Cross	Date	No. of parents		Maintained water temperature (°C)	Starting time of treatment*2	Interval of treatment
		Female	Male			
1	Nov., 18, 1996	3	3*1	15.1	6 h-7 h 30 min	30 min
2	Nov., 1, 1997	7	3	13.7	6 h-7 h 10 min	10 min
3	Nov., 2, 1997	4	1	13.7	4 h-7 h 30 min	30 min
4	Nov., 8, 1997	7	3	14.3	6 h 15 min-7 h 30 min	15 min
5	Nov., 22, 1997	11	6	14.7	4 h 30 min-7 h 30 min	30 min

*1 Sex-reversed males.

*2 After fertilization.

個体, 1997年産雄1個体を用いて, 通常アマゴの配偶子を受精することにより行った。発眼率は積算水温300°C・日に調べた。この時, 子孫の倍数性を核小体数とDNA量フローサイトメトリーにより調査した。

結 果

1996年および1997年産高水圧処理群の正常発眼卵から孵出し, 6ヶ月を経て生残していた稚魚はそれぞれ33個体と135個体であった。このうち, 最大核小体数4を示したのは, 1996年産では16個体(48.4%), 1997年産では75個体(55.6%)であり, これらは, 1998年10月に各々10個体と69個体が生残していた。そこで, 1996年産全個体(#1-10)と1997年産一部個体(#11-21)について魚体重を測定後, 二倍体アマゴの赤血球核DNA量を2Cとしてフローサイトメトリーにより相対DNA量を調査した(Table 2)。その結果, #1-20は相対DNA量が2Cであったことから二倍体と判定されたが(Fig. 1a), #21は2Cと4Cに相当する2つのピークが認められたことから二倍体-四倍体モザイク(Fig. 1b)と判定され, また, この個体は脾臓においても血液と同様モザイク性を示した。これら21個体について, 血液塗抹標本作製し, 観察した。その結果, #21の赤血球は約41%が対照とした正常二倍体アマゴ($7.1 \pm 0.49 \mu\text{m}$, 核長径平均±標準偏差)と同様のサイズ($7.5 \pm 0.84 \mu\text{m}$, 核長径平均±標準偏差)であったが, 残り約59%は大型($11.2 \pm 1.29 \mu\text{m}$, 核長径平均±標準偏差)であった。フローサイトメトリーによる相対DNA量から二倍体と判定した20個体について平均1,500(範囲748-2,034)個の赤血球を観察したところ, 15個体は正常サイズの赤血球のみを有し, 大型赤血球はまったく認められなかった。しかし, 残り5個体(#4, 6, 14, 15, 18)は, ごく少数(0.4-4.2%)の大型赤血球(核長径平均9.1-11.2 μm)の混在を示した(Fig. 2)。

1998年10月から12月に, 1996年産四倍体候補10個体中3個体(#7, 標識脱落2個体)が斃死したが, 7個体(#1, 4, 6, 8, 9, 10, 標識脱落1個体)は成熟に達した。成熟個体はすべて雌であった。また, 1997年産#21は瀕死の状態となったが排精し, 雄であった。

7個体の成熟雌より得た成熟卵を通常二倍体の精子で受精し, 交配実験を行った。通常二倍体の卵と精子で受精した群を対照区とした。また, 雌#1の卵についてのみ雄#21より得た少量の精子で受精した。

以上の各交配より生じた胚の発眼率と孵化率をTable 3に示す。11月4日(Exp. 1)と11月20日(Exp. 2)における対照群の正常発眼率が94%, 86%と高かったことから, これらの精子の受精能力に問題はなかった。Exp. 1の#9と#10の子孫の発眼率は不良であ

Table 2. Ploidy based on DNA content, proportion of large-size erythrocytes, sex, and body weight of putative tetraploid amago salmon which exhibited four nucleoli at the juvenile stage

Year-class	Fish #	Ploidy based on DNA contents*1	Large erythrocytes (%) ^{*2}	Sex* ³	Body weight (g) ^{*4}
1996	1	2n	0	Female*	643
	2	2n	0	Female	551
	3	2n	0	Female	420
	4	2n	0.4	Female*	615
	5	2n	0	Female	1021
	6	2n	0.4	Female*	776
	7	2n	0	Female	728
	8	2n	0	Female*	573
	9	2n	0	Female*	793
	10	2n	0	Female*	826
1997	11	2n	0	—	163
	12	2n	0	—	246
	13	2n	0	—	68
	14	2n	0.7	—	73
	15	2n	4.2	—	325
	16	2n	0	—	104
	17	2n	0	—	195
	18	2n	2.2	—	123
	19	2n	0	—	206
	20	2n	0	—	169
	21	2n-4n	59.4	Male**	105

*1 Flow cytometry for DNA content of erythrocytes.

*2 Relative to number of total erythrocytes counted (100%).

3 Sex was determined based on ovulation or spermiation of each sample. "" means females which laid eggs.

The other females laid eggs, but was not identified due to the drop of tag.

"**" means male which gave milt. "—" means immature individuals.

*4 Measured on Oct., 15. 1998.

ったが, Exp. 2の#4と#6のそれは対照と変わらなかった。雌親魚#1の卵を雄#21の精子で交配した区の正常発眼率, 孵化率は著しく悪かった。対照区をおくことができなかったが, 12月4日(Exp. 3), 9日(Exp. 4), 15日(Exp. 5), 21日(Exp. 6)の交配の成績は悪く, 正常発眼率は0-24.3%であった。

以上の交配群のうち, 雌#10と正常雄二倍体の交配に由来する発眼胚にのみ, 最大核小体数3(Fig. 3)が認められた。雌親魚2n2, #1, 4, 6および10の子孫(発眼胚)についてフローサイトメトリーを行い, 相対DNA量から倍数性を判定した結果, 雌#10の子孫10個体中に3個体の二倍体, 5個体の三倍体(Fig. 1c), 1

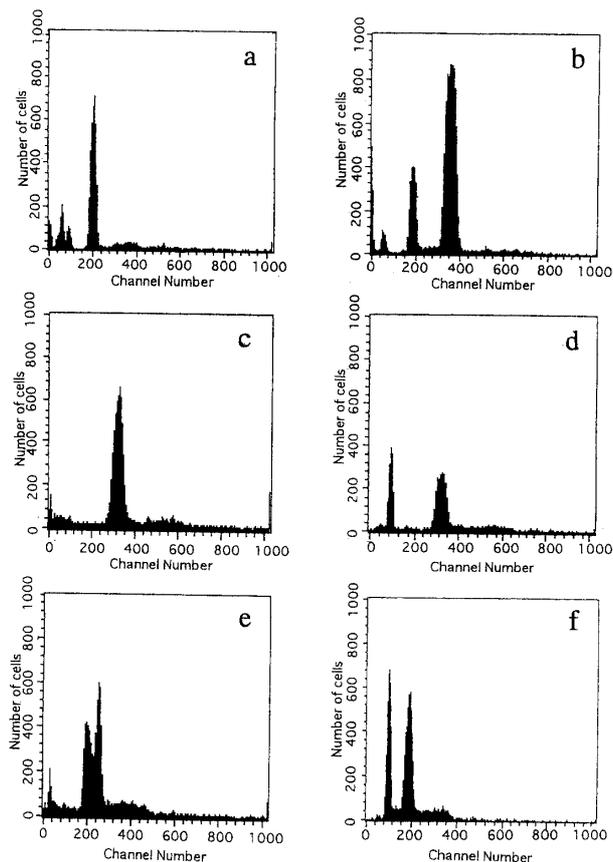


Fig. 1 Flow cytometric histograms for DNA contents of erythrocytes (a, b) and eyed embryos (c-f).

(a) Normal diploid amago salmon having erythrocytes with 2C DNA; (b) diploid-tetraploid mosaic having erythrocytes with 2C and 4C DNA; (c) triploid progeny of #10 female; (d) haploid-triploid mosaic progeny of #10 female; (e) diploid-hyper diploid mosaic progeny of #10 female; (f) haploid-diploid mosaic progeny of #6 female.

個体の半数体—三倍体モザイク (Fig. 1d), 1個体の二倍体—高二倍体モザイク (Fig. 1e) が認められた。また、雌 #6 の子孫 10 個体中 9 個体は二倍体であったが、1 個体は半数体—二倍体モザイク (Fig. 1f) であった。雌 #4 と正常二倍体との交配の子孫ならびに雌 #1 と二倍体—四倍体モザイクであることが判明している雄 #21 の交配に由来する子孫の 5 個体中には、二倍体のみしか認められなかった。

考 察

第 1 卵割阻止による四倍体作出を目指し、高水圧処理を施した卵から生じたアマゴの胸鰭細胞の最大核小体数 4 を指標として選別した 21 個体について、赤血球の DNA 量フローサイトメトリーを行ったところ、1 個体 (#21) のみが二倍体—四倍体モザイクであることが判

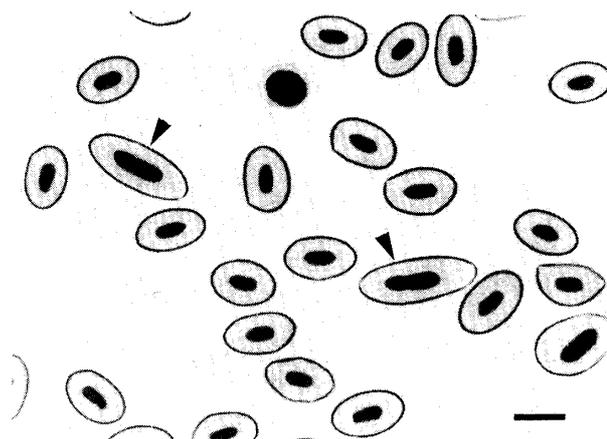


Fig. 2 Many normal and a few large-size erythrocytes observed in chromosomally manipulated amago salmon (#15) which showed four nucleoli at the juvenile stage.

Arrowhead indicates large erythrocyte. Scale indicates 10 μm .

った。この個体は、平均核長径 11.2 μm の大型赤血球を約 59% 含んでいた。ニジマス四倍体の平均赤血球核長径が約 11.5–13.0 μm と二倍体、三倍体に比較して大型であること、⁴⁾ならびに既報¹¹⁾のアマゴ二倍体—四倍体モザイクの有する大型赤血球の平均核長径が 11.0 μm であったことから、この大型赤血球は四倍体と考えられる。従って、赤血球サイズからもこの個体はモザイクと考えられる。DNA 量フローサイトメトリーでは二倍体と判定した 20 個体のうち 5 個体は、血液塗抹標本の観察から四倍体と判定される大型赤血球をわずか (0.4–4.7%) にもつことが判明し、ごく少数の四倍体細胞をもつモザイクと推定された。今回は、赤血球細胞のみしか調べなかったが、同様の四倍体細胞の出現は他の器官においても予想できる。今後、染色体操作魚の倍率判定には、モザイクの存在を前提とした検討が必要と考えられる。

最大核小体数 4 を指標として選別した 1996 年産アマゴのうち成熟した 7 個体はすべてが雌であった。これは、交配に用いた雄がすべて性転換雄 (遺伝的雌) であったことから説明できる。これら 7 個体の卵を用いた交配のうち、6 個体 (#1, 4, 6, 9, 10, 標識脱落 1 個体) から発眼卵が得られた。正常発眼率は親魚間で大きく変動し、特に雌 #1 と #10 由来の卵を用いた区の率は低かった。しかし、この様な低い発生成績が下述の二倍体配偶子の産生と関係があるか否かは、現時点では不明である。雌 #10 由来の交配から核小体数 3 を示す発眼胚が見られ、これらを含む 5 個体が 3C の DNA 量をもつ三倍体であることが明らかになった。以上の結果から、雌 #10 は赤血球のサイズと DNA 量からは見かけ上二倍体

Table 3. Proportion of eyed eggs and hatched fry, maximum number of nucleoli, and ploidy status based on DNA content by flow cytometry in the cross experiments in 1998

Exp.	Date	Cross		No. of eggs used	Eyed embryo (%) ^{*1}		Hatched fry (%) ^{*1}	Maximum number of nucleoli			Ploidy based on DNA content ^{*3}			
		Female	Male		Normal	Abnormal		2	3	Total ^{*2}	2n	3n	mosaic	Total ^{*2}
1	Nov., 4, 1998	2n1	2n1	183	94.0	5.5	61.2	5	0	5	—	—	—	
		#9		270	53.0	17.4	22.2	10	0	10	—	—	—	
		#10		575	6.3	50.8	2.1	3	2	5	3	5	2 ^{*5}	10
2	Nov., 20, 1998	2n2	2n2	325	86.2	7.4	70.8	5	0	5	5	0	0	5
		#4		239	96.7	0.8	83.7	10	0	10	10	0	0	10
		#6		507	92.9	4.3	87.6	10	0	10	9	0	1 ^{*6}	10
3	Dec., 4, 1998	#1	#21	255	7.1	53.7	3.9	5	0	5	5	0	0	5
		#? ^{*4}	2n3	790	24.3	11.0	4.2	5	0	5	—	—	—	—
4	Dec., 9, 1998	#8	2n4	745	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—

^{*1} Relative to number of eggs used (100%).^{*2} Number of normal eyed embryos examined.^{*3} Determined by flow cytometry.^{*4} Not identified due to the drop of tag.^{*5} Haploid-triploid and diploid-hyper diploid mosaics.^{*6} Haploid-diploid mosaic.**Fig. 3** Three nucleoli observed in a putative triploid eyed embryo from #10 female × 2n1 male amago salmon.

Scale indicates 10 μm.

と判定されるが、その生殖細胞の一部は四倍体細胞に起源し、二倍体卵を形成していると推定できた。すなわち、この雌 #10 は生殖細胞において二倍体—四倍体モザイクとなっていると考えられる。雌 #10 の子孫に同時に生じた二倍体は、二倍体の生殖細胞に起源する半数体卵の受精に由来するのであろう。無処理の受精卵から自然発生の三倍体が生じる例¹⁶⁾が報告されていることから、今回使用した卵にこのような現象が起こった可能性は否定できないが、子孫における高い三倍体発生率をみると、モザイク性による説明の方が妥当であろう。半数体—三倍体ならびに二倍体—高二倍体モザイクが本研究で見られたが、現時点でこれらの出現機構を特定することは困難であった。このようなモザイク^{4,5)}や異数体⁵⁾の出現自体はニジマス人為四倍体と二倍体との交配により生じた子孫においても報告されており、両生類の染色体操作によってもしばしばみられる。¹⁷⁾

雌 #4 と #6 は塗抹標本の観察より、ほんの少数の四倍体赤血球を含む二倍体—四倍体モザイクであることが示唆されたが、これらの子孫は1個体(半数体—二倍体)を除き、すべて二倍体であった。また、標識脱落個体の子孫もすべて二倍体であった。このことは、これらの個体の生殖腺には四倍体細胞は殆ど含まれなかったことを示す。一方、二倍体—四倍体モザイクであることが判明している雄 #21 と雌 #1 の交配には、三倍体の出現が期待されたが、今回調査した子孫には二倍体しか観察されなかった。調査例数が少ない点に問題はあがるが、雄 #21 の赤血球は二倍体—四倍体モザイクであったが、生殖腺には四倍体細胞は含まれていないため、この様な結果が得られたと思われる。

以上のように、赤血球には四倍体細胞がみられず、見

かけ上二倍体と判定される雌であっても、生殖腺は二倍体—四倍体モザイクと考えられ、半数体卵の他に二倍体卵が形成される例が見られた。また逆に、赤血球のDNA量から二倍体—四倍体モザイクと判定された雄であっても、生殖腺には四倍体細胞はなく、半数体精子のみが形成される例も見られた。すなわち、アマゴ受精卵の第1卵割阻止により生じた胚は完全な四倍体として発生することは少なく、異なる器官に四倍体細胞を様々な程度でもつ二倍体—四倍体モザイクとして発生することが多いことが示された。本研究において、核小体数から四倍体候補として選抜した個体を赤血球サイズにより再調査した結果、四倍体細胞を有する個体は28.6%と低く、また、四倍体の大型赤血球の割合は12ヶ月齢魚の方が24ヶ月齢魚に比べて高かった。このように四倍体細胞の出現率は成長に伴って減少するようにも思われる。胚期で四倍体が比較的多く観察される場合でも、発生の進んだ孵化仔魚や幼魚では見当らなくなる事例^{2,7)} また、幼魚期以降で二倍体—四倍体のみしか見られない事例¹¹⁾があることは、染色体操作により誘起された四倍体細胞がその後の発生過程において二倍体化する場合があることを示す。このような魚類四倍体の作出を困難にする四倍体細胞の二倍体化は、卵割期における高水圧処理による微小官の発達異常、4極性分裂などに起因することが考えられているが、その詳細は不明である。¹⁸⁾

四倍体誘起の研究では、幼魚期までに四倍体候補の魚を選別し、親魚として育成することが多いが、^{4,5)} 本研究から、見かけ上二倍体の個体であっても、四倍体の生殖細胞をもつ場合があり、このような個体の交配から四倍体系統の作出が可能なが示唆された。従って、今後は第1卵割阻止操作に由来する魚の中から、生殖細胞が四倍体化した個体を障害を与えず、かつ効率的に選別する方法を見いだす必要がある。

謝 辞

本研究を行うに当たり、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佐藤アマゴ養殖場の佐藤正治氏に感謝申し上げます。本研究の一部は平成10年度(財)東和食品研究振興会学術奨励金の研究助成によった。

文 献

- 1) G. H. Thorgaard, M. E. Jazwin, and A. R. Stier: Polyloidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **110**, 546-550 (1981).
- 2) D. Chourrout: Tetraploidy induced by heat shocks in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Develop.*, **22**, 569-574 (1982).
- 3) C. A. Bidwell, L. C. Chrisman, and S. G. Libey: Polyploidy induced by heat shock in channel cat fish. *Aquaculture*, **51**, 25-35 (1985).
- 4) D. Chourrout, B. Chevassus, F. Krieg, A. Happe, G. Burger, and P. Renard: 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 (1986).
- 5) D. Chourrout and I. Nakayama: Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout. *Theor. Appl. Genet.*, **74**, 687-692 (1987).
- 6) A. Diter, E. Quillet, and D. Chourrout: Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *J. Fish. Biol.*, **42**, 777-786 (1993).
- 7) 荒井克俊: 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 (1992).
- 8) J. M. Blanc, D. Chourrout, and F. Krieg: Evaluation of juvenile rainbow trout survival and growth in half-sib families from diploid and tetraploid sires. *Aquaculture*, **65**, 215-220 (1987).
- 9) A. Diter, R. Guyomard, and D. Chourrout (1988): Gene segregation in induced tetraploid rainbow trout: genetic evidence of preferential pairing of homologous chromosomes. *Genome*, **30**, 547-553 (1988).
- 10) G. H. Thorgaard, P. D. Scheerer, W. K. Hershberger, and J. M. Myers: Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival. *Aquaculture*, **85**, 215-221 (1990).
- 11) 山木 勝, 佐藤正治, 佐藤治平, 昆 洋一, 張 全啓, 内村祐之: 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 (1997).
- 12) 岡田鳳二: ニジマスの人為的性統御と不妊化. *水産育種*, **12**, 1-16 (1987).
- 13) T. Kobayashi: Survival and cytological observation on early development of normal, hybrid, and gynogenetic embryos of amago salmon. *Fisheries Sci.*, **63**, 33-36 (1997).
- 14) O. Carman, T. Oshiro, and F. Takashima: Variation in the maximum number of nucleoli in diploid and triploid common carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2303-2309 (1992).
- 15) Q. Zhang and K. Arai: Flow cytometry for DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach. *Fisheries Sci.*, **62**, 870-877 (1996).
- 16) G. H. Thorgaard and G. A. E. Gall: Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics*, **93**, 961-973 (1979).
- 17) Y. Muto: Haploid-triploid mosaic toads induced by heat-treatment of the unfertilized eggs. *J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B. Div.*, **1**, 39-46 (1951).
- 18) 上野紘一: 同質倍数体, 「水産増養殖と染色体操作」(鈴木 亮編), 恒星社厚生閣, 東京, 1989, pp. 70-81.