

## ヒラメのメチルテストステロン投与で全雄に誘導した 雌性発生 2 倍体および通常の 2 倍体の検定交配と 性を決定する遺伝子型についての考察

山本栄一・平野ルミ・増谷龍一郎

Progeny test of methyltestosterone-induced males of gynogenetic  
diploids and normal diploids in the hirame flounder,  
*Paralichthys olivaceus*,  
with evidence for the male heterogamety.

Eiichi Yamamoto\*<sup>1</sup>・Rumi Hirano\*<sup>1</sup>・Ryuichiro Masutani\*<sup>2</sup>

Sex ratios in F<sub>1</sub> offsprings of methyltestosterone-induced males (abbreviated as MT♂) of gynogenetic diploids produced by retention of the second polar body (G1-2n) and normal diploids (N-2n) were investigated in hirame. All of seven G1MT♂ and two of five NMT♂ sired nearly all-female progenies, whereas three of five NMT♂ and all control normal males sired progenies with a 1:1 sex ratio, when the offsprings were treated by estrogen (estradiol-17β) at a level so as to prevent reversals of sex differentiation. These results support the validity of a simple model involving major male heterogametic sex determining genes in hirame, though sex reversals of genetic females (XX) to phenotypic males occur frequently under the influences of environmental factors, which causes the fluctuation of sex ratios, as previously discussed by the authors.

著者ら<sup>1-3)</sup>は、ヒラメの人為的性統御技術の確立を目的として、染色体操作等による作出群を材料に、ヒラメの性決定機構の解明を試みてきた。すでに、性分化期における雄性ホルモン(メチルテストステロン:MT)の投与によって、ヒラメの全雄群への人為的な誘導が可能であることが判明しており<sup>4)</sup>、これは性転換雄の作出手法として有用である。さらに、作出雄の検定交配の結果は、他魚種において性を決定する遺伝子型の推定に利用されてきたように<sup>5-10)</sup>、ヒラメにおいても性決定の遺伝的側面についての新たな情報を提供するものと期待される。そこで、MT処理によって100%雄に誘導した極体放出阻止型雌性発生2倍体(G1-2nと略記)および通常の2倍体(N-2n)について、作出魚の検定交配を行ない、性転換雄の検索と性統御における有効性の判定を行なうとともに、ヒラメの性を決定する遺伝子型について考察した。

\*1: 鳥取県水産試験場栽培漁業部。 \*2: 境港水産事務所。

## 材 料 と 方 法

G1-2n と N-2n の作出群である G1 (N♀4) と N (N♀13) について、両者の MT 処理によって全雄に誘導した飼育群からそれぞれ 7 個体 (G1MT♂1~G1MT♂7) および 5 個体 (NMT♂1~NMT♂5) を無作為に選び出し、検定交配を実施した。すなわち、これらと、通常雌 2 個体 (N♀8, N♀9) および 1 個体のホルモン未処理の飼育群に出現した G1-2n 雄 (G1♂) の次世代雌 (F<sub>1</sub>(G1♂)♀1) との個別の交配によって、次世代 (F<sub>1</sub>(G1MT♂1)~F<sub>1</sub>(G1MT♂7), F<sub>1</sub>(NMT♂1)~F<sub>1</sub>(NMT♂5)) を作出し、通常雄 5 個体から得られた精液を混合して卵に媒精して作出した対照群 (N (N♀8), N (N♀9), N (F<sub>1</sub>(G1♂)♀1)) とともに、性分化期における性転換阻止レベルの雌性ホルモン (エストラジオール-17β : E<sub>2</sub>) 処理<sup>9)</sup> を施した飼育群について性比を求めた。

G1 (N♀4) と N (N♀13) の状況を Tab. 1 に示した。このうち、すでに G1 (N♀4) については、雌性発生の誘起方法、飼育方法、および MT の処理手法等を詳述した<sup>9)</sup>。また、N (N♀13) は山本ら<sup>10)</sup> の作出群である「N-2」の同朋飼育群であり、全雄群の誘導に前者で用いたと同様な 1 μg/l 飼育水の濃度での MT の浸漬処理を採用した。

検定交配を G1MT♂が満 2 歳、NMT♂が満 1 歳のそれぞれ 4 月および 5 月に行なった。交配の組合せ、作出群の卵発生成績、および E<sub>2</sub> 処理における状況等を Tab. 2 に示した。作出群の飼育を、山本ら<sup>10)</sup> が示したと同様な通常の方法により、夏期に向って上昇しつつある自然海水温下で行なった。E<sub>2</sub> 処理を、すでに報告した方法である 10.0 μg/l 飼育水の濃度での浸漬処理<sup>9)</sup> および 0.3 μg/g 飼料の濃度での経口投与<sup>9)</sup> によって実施した。

各飼育群とも、日齢 150 から 180 の間に、生残魚のすべてまたは無作為に抽出した個体について、性判定を行ない、各群の性比を求めた。雌雄の判定を生殖腺の外部形態および組織学的観察に基づいて行なった。

なお、本研究で用いたヒラメは、鳥取県沿岸で得られた天然魚から 2~4 代目にあたる人工養成魚である。また、「N♀4」や「G1MT♂5」などの個体番号は、著者らのヒラメについての作出および飼育実験における一連番号に相当する。

## 結 果

各検定群の性比を Tab. 3 に示した。

G1MT♂の次世代では、7 例中 6 例で雌 100% であり、1 例で雌 98% (F<sub>1</sub>(G1MT♂6)) であった。対照の N (N♀8) および N (N♀9) では、雌の割合は 50 および 62% であり、前者と同様な E<sub>2</sub> 処理の実施にもかかわらず、雌雄比 1 : 1 と有意差のない雄の出現がみられた。

NMT♂の次世代では、ほぼ雌 100% (98~100%) となった例 (F<sub>1</sub>(NMT♂2), F<sub>1</sub>(NMT♂3)) と、雌の割合が 33~52% で、雌雄比 1 : 1 と有意差のない性比となった例 (F<sub>1</sub>(NMT♂1), F<sub>1</sub>(NMT♂4), F<sub>1</sub>(NMT♂5)) とに分れた。対照の N (F<sub>1</sub>(G1♂)♀1) では、雌の割合は 54% であり、雌雄比 1 : 1 と有意差のない雄の出現がみられた。

Table 1. Sex distributions of gynogenetic diploids and normal diploids in their methyltestosterone (MT) treated, estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) treated, and hormone free rearing lots. Randomly selected individuals from MT treated rearing lots of each group were committed to their progeny tests. SS : sample size. MR : male rate. TP : ages (days after hatching) of fish at the start and end of hormone treatment. TL : average total length at the start and end of hormone treatment. SRT : survival rate of fish from the start to end of hormone treatment. SR-150 : survival rate of fish in the period from 35th to 150th day after hatching.

Rearing lot	Gynogenetic diploids, G1(N♀4)						Normal diploids, N(N♀13)					
	SS	♂ : ♀	MR	TP	TL		SS	♂ : ♀	MR	TP	TL	
MT treated	30	30 : 0	100	36→100	12.0→85.4	% 41.3	14	14 : 0	100	36→100	15.4→87.9	% 22.2
E <sub>2</sub> treated	44	0 : 44	0	31→95	12.0→75.1	% 27.6	31	17 : 14	54.8	36→85	15.9→81.0	% 50.0
free	40	21 : 19	52.5	--	--	% 43.1	18	15 : 3	83.3	--	--	% 35.0

MT treatment : Immersing dosage in the concentration of 1.0 $\mu$ g MT / l rearing water for two hours in a day.  
E<sub>2</sub> treatment : G1(N♀4), immersing dosage in the concentration of 10.0 $\mu$ g E<sub>2</sub> / l rearing water for two hours in a day; N(N♀13), dietary dosage in the concentration of 0.3 $\mu$ g E<sub>2</sub> / g food weight. Each treatment is at a level so as to pretend sex reversals.

Table 2. Test crosses of methyltestosterone-induced G1-2n and N-2n males with control females, and characteristics of their groups in embryonic and larval survivals and in the estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) treatment to prevent sex reversals. FLR : floated eggs / spawned eggs. FER : fertilized eggs / floated eggs. EDR : embryo-developed eggs / floated eggs. DAE<sub>2</sub> : ages (days after hatching) of fish at the start and end of E<sub>2</sub> treatment. TLE<sub>2</sub> : averages of total length at the start and end of E<sub>2</sub> treatment. SRE<sub>2</sub> : survival rate of fish from the start to end of E<sub>2</sub> treatment.

Group	Parental cross		Embryonic performance				Survival rate		E <sub>2</sub> treatment				Survival rate	
	♂ (TL mm)	× ♀ (TL mm)	FLR	FER		EDR	0-35		DAE <sub>2</sub>	TLE <sub>2</sub>		SRE <sub>2</sub>	35-150	
				%	%		%	%		mm	%		%	
F <sub>1</sub> (G1MT♂1)		G1MT♂1(350) × N♀8(505)	91.2	66.0	70.8	62.0	I*	36→85	14.5→73.5	68.6	54.3			
F <sub>1</sub> (G1MT♂2)		G1MT♂2(355) × ditto	86.3	75.8	73.0	69.6	I	36→85	14.2→74.2	35.7	22.4			
F <sub>1</sub> (G1MT♂3)		G1MT♂3(331) × ditto	86.5	63.0	64.6	56.2	I	36→85	14.4→71.4	61.4	57.1			
F <sub>1</sub> (G1MT♂4)		G1MT♂4(366) × ditto	76.5	66.4	61.1	76.4	I	36→85	14.6→62.5	36.1	26.0			
N(N♀8)		N♂(385-406) × ditto	70.1	57.8	38.1	54.4	I	36→85	14.2→56.2	8.3	8.3			
F <sub>1</sub> (G1MT♂5)		G1MT♂1(352) × N♀9(518)	78.7	81.5	68.1	47.1	I	36→85	14.4→63.7	46.2	36.8			
F <sub>1</sub> (G1MT♂6)		G1MT♂1(331) × ditto	78.8	51.7	48.0	30.8	I	36→85	14.5→55.1	51.9	43.8			
F <sub>1</sub> (G1MT♂7)		G1MT♂1(325) × ditto	78.3	82.7	57.5	65.6	I	36→85	14.5→62.1	46.0	34.5			
N(N♀9)		N♂(370-427) × ditto	77.2	70.2	48.0	59.0	I	36→85	14.1→54.5	13.5	12.0			
F <sub>1</sub> (NMT♂1)		NMT♂1(253) × F <sub>1</sub> (G1♂)♀1(530)	72.0	77.7	29.0	39.4	D**	41→70	17.4→66.5	47.1	43.7			
F <sub>1</sub> (NMT♂2)		NMT♂2(271) × ditto	78.1	64.0	54.9	43.2	D	41→70	18.0→67.3	67.3	65.0			
F <sub>1</sub> (NMT♂3)		NMT♂3(291) × ditto	80.1	52.1	37.4	36.5	D	41→70	17.1→66.0	65.8	60.7			
F <sub>1</sub> (NMT♂4)		NMT♂4(272) × ditto	77.0	78.1	42.3	50.5	D	41→70	17.8→65.4	64.0	60.0			
F <sub>1</sub> (NMT♂5)		NMT♂5(244) × ditto	76.2	71.4	55.6	7.0	D	41→70	19.1→63.1	57.1	55.2			
N(F <sub>1</sub> (G1♂)♀1)		N♂(440-445) × ditto	79.8	84.3	42.6	71.7	D	41→70	19.2→70.5	70.6	55.0			

\* : Immersing dosage in the concentration of 10.0  $\mu$ g E<sub>2</sub> / l rearing water for two hours in a day.

\*\* : Dietary dosage in the concentration of 0.3  $\mu$ g E<sub>2</sub> / g food weight.

Table 3. Sex distributions, when treated with estradiol- $17\beta$  at a level so as to prevent sex reversals, in test groups of progenies of methyltestosterone-induced G1-2n and N-2n males mated with control females, and probable genotypes of parental fishes. SD from 50 % FR : significant difference from 50 % of female rate.

Test group	Sample size	♂ : ♀	Female rate	SD from 50 % FR	Probable genotypes of parents
			%		
F <sub>1</sub> (G1MT♂1)	38	0 : 38	100	**	XX♂ × XX♀
F <sub>1</sub> (G1MT♂2)	17	0 : 17	100	**	XX♂ × XX♀
F <sub>1</sub> (G1MT♂3)	38	0 : 38	100	**	XX♂ × XX♀
F <sub>1</sub> (G1MT♂4)	100	0 : 100	100	**	XX♂ × XX♀
N(N♀8)	4	2 : 2	50	NS	XY♂ + × XX♀
F <sub>1</sub> (G1MT♂5)	66	0 : 66	100	**	XX♂ × XX♀
F <sub>1</sub> (G1MT♂6)	54	1 : 53	98	**	XX♂ × XX♀
F <sub>1</sub> (G1MT♂7)	53	0 : 53	100	**	XX♂ × XX♀
N(N♀9)	13	5 : 8	62	NS	XY♂ + × XX♀
F <sub>1</sub> (NMT♂1)	33	20 : 13	39	NS	XY♂ × XX♀
F <sub>1</sub> (NMT♂2)	51	1 : 50	98	**	XX♂ × XX♀
F <sub>1</sub> (NMT♂3)	27	0 : 27	100	**	XX♂ × XX♀
F <sub>1</sub> (NMT♂4)	52	25 : 27	52	NS	XY♂ × XX♀
F <sub>1</sub> (NMT♂5)	12	8 : 4	33	NS	XY♂ × XX♀
N(F <sub>1</sub> (G1♂)♀1)	46	21 : 25	54	NS	XY♂ + × XX♀

\*\* :  $p < 0.001$ , NS (not significant) :  $p > 0.1$ .

+ : All or majority of five males are XY males, but they may include fewer XX males attributable to the spontaneous sex reversals.

## 考 察

ヒラメの種々の作出群は、ホルモン未処理の自然水温条件下の飼育群でほとんど統一性を欠くような性比の変動を示すことが知られている。たとえば、ホルモン未処理のG1-2nの場合、著者ら<sup>3,4,12)</sup>の調査した例では雌32~93%、田畑<sup>13,14)</sup>の調査した例では雌0~100%の広範囲で性比が変動することが判明している。さらに、著者ら<sup>1,3)</sup>は、性分化期の飼育水温の制御によって同一作出姉妹群の性比を大きく変動させうること(G1-2nについての1例:20.0℃飼育群で雌97%、27.5℃飼育群で雌0%)や、染色体操作によって作出されたクローン内に雌雄のいずれもが出現すること(未発表)をみだし、ヒラメの性分化が環境要因によってきわめて影響を受け易いものであることを明らかにした。

一方、著者ら<sup>1-3)</sup>は、ヒラメのG1-2n、ホルモン未処理の通常の飼育群に出現するG1-2n雄(G1♂)の次世代(F<sub>1</sub>(G1♂)-2n)、およびN-2nを材料に、性分化期において、異なる強度のE<sub>2</sub>処理を施した群と、異なる水温による恒温飼育を施した群の性比を調査した。その結果、ヒラメの性決定には明瞭な遺伝子支配が存在し、遺伝的雄は性分化が安定しているものの、遺伝的雌は環境要因の影響によって容易に機能的雄に転換し、これによって雄に偏ったヒラメの性比の変動が生じていることが推定された。その中で、本報告で採用した低レベル

でのE<sub>2</sub>処理は、遺伝的雄を雌に誘導するには有効ではないが、遺伝的雌の性分化の転換を高い割合で阻止することによって性比の変動を減少させ、処理群の本来の性比を知るのに好適な方法であることを示した。

本研究の結果、性転換阻止レベルのE<sub>2</sub>処理を施した検定群は、G1 MT♂の次世代のすべて、およびNMT♂の次世代のうちF<sub>1</sub>(NMT♂2)とF<sub>1</sub>(NMT♂3)で、雌の割合がほぼ100%であり、これらと雌雄比1:1、さらに1:3(雄:雌)の性比との有意差が明らかであった。一方、他の検定群および対照群では、標本数の少なさのために群の本来の性比を確定することのできない例が含まれるものの、同様なE<sub>2</sub>処理にもかかわらず、およそ雌雄比1:1の性比が推定された。この両者の明らかな相違は、ヒラメの性決定に遺伝的支配が存在することを確認するとともに、前者は遺伝的全雌群であり、後者には50%の遺伝的雄が含まれることを示唆した。従って、G1 MT♂のすべて、およびNMT♂のうちNMT♂2とNMT♂3は性転換雄、すなわち遺伝的雌であり、NMT♂1、NMT♂4およびNMT♂5は通常の雄、すなわち遺伝的雄であるものと判断された。

このような検定群に認められた性比の2峰化は、同じく性転換阻止レベルのE<sub>2</sub>処理を施した飼育群において、G1-2n、卵割阻止型雌性発生2倍体(G2-2n)、およびホルモン未処理の飼育群に出現するG1♂とG2♂の次世代がいずれも雌100%に、そして対照のN-2nが雌50%に、それぞれ性比が収束することで明確となっている<sup>1-4,12,15</sup>。さらに、同様な性比の2峰化は、G1-2n、F<sub>1</sub>(G1♂)-2n、およびN-2nの性分化期に適水温(20℃)による恒温飼育を経過した群でも共通している<sup>15</sup>。これらのことは、ヒラメの遺伝的性決定機構が決して複雑なものではなく、1組の性決定遺伝子モデルで十分に説明されうるものであることを示している。

Tab. 4とTab. 5に、性決定遺伝子モデルをそれぞれ雄性ヘテロ型(XX-XY型)および雌性ヘテロ型(ZZ-ZW型)とした場合の、すべての遺伝子型を持った雌雄の組合せによる次世代に想定される遺伝子型の比率と遺伝的性比について示した。両表から明らかなように、本研究の検定群と同様、1個体の雌親に由来する次世代が雄親によって雌雄比1:1または雌100%の性比を示すのは、(1)XX♀とそれぞれXY♂またはXX♂の掛合わせであるか、(2)ZW♀とZZ♂またはWW♂の掛合わせ、さらに(3)ZZ♀を想定したときのZW♂またはWW♂の掛合わせの場合に限られる。(1)の場合は、通常の雌雄および性転換雄の遺伝子型について無理がない。しかし、(2)および(3)の場合は、次世代を全雌にする性転換雄が、ZW♂ではなく、通常存在する可能性の薄いWW個体に限られるという矛盾を持っている。加えて(3)では、通常雄との次世代で全雄になってしまう。ちなみに、WWの遺伝子型を持つ個体はZW♂(性転換雄)とZW♀の掛合わせで25%、ZW♀の次世代のG2-2nで50%、および同じくG1-2nで性を決定する遺伝子座におけるG-C組換え率<sup>16</sup>によって0~50%の範囲で出現することが想定されるが、WW個体が100%である群の出現には雌親としてのWW♀の存在が必須である。

これらの比較より、本研究の検定群の性比には、雄性ヘテロ型の性決定遺伝子モデルがよく適合する。一方、雌性ヘテロ型とした場合は、上述の矛盾に加え、MT処理による全雌群の誘導に用いた作出群であるG1(N♀4)とN(N♀13)の性比の状況(Tab. 1)にも具体的な矛盾

Table 4. Ratios of genotypes and genetic sexes in progenies of the presumptive crosses among phenotypic males and females with various genotypes in the male heterogametic sex determining mechanism.

Phenotypic female		Normal ♀ XX	Sex reversed ♀ XY	Sex reversed YY ♀ YY
Phenotypic male				
Normal ♂	XY	XY : XX = 1 : 1 ♂ : ♀ = 1 : 1	YY : XY : XX = 1 : 2 : 1 ♂ : ♀ = 3 : 1	YY : XY = 1 : 1 ♂ = 1
Sex reversed ♂	XX	XX = 1 ♀ = 1	XY : XX = 1 : 1 ♂ : ♀ = 1 : 1	XY = 1 ♂ = 1
YY ♂	YY	XY = 1 ♂ = 1	YY : XY = 1 : 1 ♂ = 1	YY = 1 ♂ = 1

Table 5. Ratios of genotypes and genetic sexes in progenies of the presumptive crosses among phenotypic males and females with various genotypes in the female heterogametic sex determining mechanism.

Phenotypic female		Normal ♀ ZW	Sex reversed ♀ ZZ	WW ♀ WW
Phenotypic male				
Normal ♂	ZZ	ZZ : ZW = 1 : 1 ♂ : ♀ = 1 : 1	ZZ = 1 ♂ = 1	ZW = 1 ♀ = 1
Sex reversed ♂	ZW	ZZ : ZW : WW = 1 : 2 : 1 ♂ : ♀ = 1 : 3	ZZ : ZW = 1 : 1 ♂ : ♀ = 1 : 1	ZW : WW = 1 : 1 ♀ = 1
Sex reversed WW ♂	WW	ZW : WW = 1 : 1 ♀ = 1	ZW = 1 ♀ = 1	WW = 1 ♀ = 1

盾が生じる。従って、ヒラメの性を決定する遺伝子型は雄性ヘテロ型 (XX-XY 型) であり、雌性ヘテロ型ではあり得ない。雄性ヘテロ型では、G1-2n や G2-2n と、それらの次世代の性比も無理なく説明される。MT 処理で得られた性転換雄は XX♂ であり、また、本研究で用いた F<sub>1</sub> (G1♂) ♀ 1 は、N♀ 8 および N♀ 9 と同様に、XX♀ であることも明らかである (Tab. 3)。

このように、ヒラメの雌性化種苗生産における遺伝的性の統御に有用である性転換雄が、G1-2n の MT 処理によってばかりでなく、検定交配による検索を必要とするものの、N-2n の MT 処理によっても作出できることが確認された。なお、ホルモン未処理の通常の飼育群において得られる G1♂ も XX♂ であり、G1 MT♂ と同様に、性転換雄としての性統御における有効性に相違がないことは、G1♂ の検定交配の結果等<sup>12,17)</sup> と本結果の比較においても明らかである。それゆえ、MT 処理は性転換雄をより効率的に得るための手法として位置づけられるが、ヒラメでは、性分化期の高水温飼育も XX 個体を高い割合で雄に誘導し<sup>3)</sup>、これも同様な手法として利用できる。

ところで、田畑<sup>14</sup>もヒラメのG1-2nのMT処理個体の検定交配の結果について報告している。彼は、変動する性比の状況から、ヒラメの遺伝的性決定がYamamoto<sup>19</sup>の示したような多くの遺伝子が関与するものである可能性や、グループによっては雌性ヘテロ型の遺伝子支配を持つ可能性に言及しつつ、ヒラメにおける雄性ヘテロ型の遺伝的性決定機構の存在を主張し、一方、ホルモン未処理のG1-2nに出現する雄は遺伝的雄(XY♂)であり、G1-2nの雄の割合の高い例は性転換雌(XY♀)の親魚としての利用に起因するものとしている。これらは、彼のヒラメの性決定機構の検討が、ホルモン未処理の自然水温条件下で飼育された群の性比のみに基づいてなされ、それらが遺伝的性比を直接的に示すものとみなされたことによるものである。著者らの一連の研究の結果は、彼の結論がヒラメの特殊な性分化についての吟味に欠けた根拠に薄いものであることを示すとともに、ヒラメの性統御における「性分化の問題」の重要性を示している。

#### 引 用 文 献

- 1) 山本栄一・増谷龍一郎(1990): ヒラメの雌性発生2倍体およびその次世代の性比と雌性化種苗量産の実証。平成2年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 56.
- 2) 山本栄一・増谷龍一郎・平野ルミ(1991): エストラジオール-17β経口投与によるヒラメの性比におよぼす影響と性決定機構の推定。水産育種, 16, 57~62.
- 3) 山本栄一・平野ルミ(1991): ヒラメの性統御と飼育水温。平成3年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 118.
- 4) 山本栄一・増谷龍一郎(1988): ヒラメの染色体操作技術等を応用した優良種苗生産に関する研究-II。鳥取栽漁試事報, 6, 68~94.
- 5) Yamamoto, T. (1958): Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the Medaka (*Oryzias latipes*). J. Exp. Zool., 137, 227~263.
- 6) Yamamoto, T. and T. Kajishima (1968): Sex hormone induction of sex reversal in the gold fish and evidence for male heterogamity. J. Exp. Zool., 168, 215~222.
- 7) Takahashi, H. (1975): Functional masculinization of female guppies, *Poecilia reticulata*, influenced by methyltestosterone before birth. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 41, 499~506.
- 8) Takahashi, H. (1975): Masculinization of the gonad of juvenile guppier, *Poecilia reticulata*, induced 11-ketotestosterone. Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ., 26, 11~22.
- 9) Clemens, H. P. and T. Inslee (1968): The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyl testosterone. Trans. Am. Fish. Soc., 97, 18~21.
- 10) Okada, H., H. Matumoto and F. Yamazaki (1979): Functional masculinization of genetic females in rainbow trout. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45, 413~419.
- 11) 岡田鳳二(1985): ニジマスの人為的性統御に関する研究。北海道水産孵化場研報, 40, 1~49.



- 12) 山本栄一・増谷龍一郎 (1989) : ヒラメの染色体操作技術等を応用した優良種苗生産に関する研究 - III. 鳥取栽漁試事報, 7, 60~82.
- 13) 田畑和男 (1989) : 染色体操作技術の水産増養殖への導入と問題点. 雌性発生. 41~49. 鈴木亮編. 水産増養殖と染色体操作. 恒星社厚生閣. 東京.
- 14) 田畑和男 (1991) : ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報, 28, 1~134.
- 15) 山本栄一・平野ルミ (1991) : ヒラメの染色体操作技術等を応用した優良種苗生産に関する研究 - V. 鳥取水試年報, 平成2年度, 106~109.
- 16) 谷口順彦 (1986) : 魚類の雌性発生2倍体におけるG-C組換率と固定指数について. 水産育種, 11, 49~58.
- 17) 山本栄一・増谷龍一郎 (1990) : ヒラメの雌性発生2倍体の自然産卵実験と雌性化種苗量産の実証. 鳥取水試報告, 32, 28~38.
- 18) Tabata, K. (1991) : Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 845~850.
- 19) Yamamoto, T. (1969) : Sex differentiation. 117~175. In Hoar, W. S. and D. J. Randall eds. Fish physiology, III. Academic Press. New York.