

AFLP解析によるクロマグロ, *Thunnus orientalis* 雄特徴的DNA断片の探索

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
著者名	阿川, 泰夫 小宮, 貴文 本領, 智記 倉田, 道雄 岡田, 貴彦 村田, 修 熊井, 英水 澤田, 好史
発行元	日本水産学会
巻/号	77巻4号
掲載ページ	p. 639-646
発行年月	2011年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



AFLP 解析によるクロマグロ, *Thunnus orientalis* 雄特徴的 DNA 断片の探索

阿川 泰夫,^{1*} 小宮 貴文,¹ 本領 智記,¹ 倉田 道雄,²
岡田 貴彦,² 村田 修,³ 熊井 英水,⁴ 澤田 好史¹

(2010 年 12 月 9 日受付, 2011 年 4 月 21 日受理)

近畿大学水産研究所¹大島実験場, ²近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場,
³白浜実験場, ⁴浦神実験場

Screening of the male characteristic DNA fragment using AFLP analysis in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*

YASUO AGAWA,^{1*} TAKAFUMI KOMIYA,¹ TOMOKI HONRYO,¹ MICHIO KURATA,²
TOKIHIKO OKADA,² OSAMU MURATA,³ HIDEMI KUMAI⁴ AND YOSHIFUMI SAWADA¹

Fisheries Laboratories, Kinki University, ¹Oshima Experiment Station, ²Oshima Fish Nursery Center,
Kushimoto, Wakayama 649-3633, ³Shirahama Experiment Station, Shirahama, Wakayama 649-2211, ⁴Ura-
gami Experiment Station, Nachikatsuura, Wakayama 649-5145, Japan

AFLP, amplified fragment length polymorphism screening, was conducted to identify sex characteristic DNA markers of cultured Pacific bluefin tuna (PBT), *Thunnus orientalis*. The AFLP screening of 4 females and 4 males with 64 primer combinations produced a total of 1038 scorable bands, of which 183 were polymorphic between individuals. Male characteristic fragments were confirmed with *Eco*RI + AGG and *Mse*I + CAT primers by gel image analysis, which corresponded to 437 bp in 29 of 32 males and 3 of 32 females. Fragment detail was analyzed by electropherogram analysis and DNA quantification. The 437 bp fragment was detected in 30 individuals of average DNA concentration 0.231 ng/ μ L; while in females, 13 individuals were detected with average 0.080 ng/ μ L ($P < 0.01$).

キーワード : AFLP, 雄に特徴的な DNA 断片, クロマグロ, 雌雄

クロマグロ *Thunnus orientalis* の完全養殖技術は天然資源保護の観点から重要である。大西洋クロマグロは 1990 年代には過去最大量の漁獲が行われ,¹⁾ 2010 年 3 月にはワシントン条約締国会議において大西洋クロマグロの全面取引禁止の提案がなされたことは記憶に新しい。さらに太平洋クロマグロにおいても今後漁獲規制が行われる可能性がある。生簀内で養殖親魚から受精卵を得て、再び成魚、親魚にまで飼育する完全養殖技術は、天然資源に依存しない養殖生産法として注目されている。クロマグロの完全養殖は近畿大学水産研究所により達成された。²⁾ しかし、年間 40 万尾以上とも推計される養殖用種苗の国内需要に対して、³⁾ 2009 年の近畿大学水産研究所の生産尾数はおよそ 4 万尾であったことから、

現在のところ国内需要を満たせてはいないものの、すでに天然資源への負荷削減には一定の役割を担っており、将来の国内クロマグロ養殖に必要な全種苗の供給も期待される。

クロマグロ人工種苗の増産を行うには様々な方面からの取り組みが必要である。初期減耗、共食い、衝突死などによる大量死を防ぐ仔稚魚飼育方法の改善、沖出し後の中間育成での減耗防除等についてはこれまでも研究されてきた。⁴⁾ クロマグロ種苗生産のさらなる効率化を果たすには、これらの研究以外に安定的に良質な受精卵を得る技術の開発も望まれる。安定的な採卵には、親魚の多くが繁殖に参加することが望ましい。しかし実際には、生簀内クロマグロの生殖生態については次のような

* Tel : 81-735-65-0501. Fax : 81-735-65-0974. Email : agawa@kindaisuiken.jp

特徴が指摘, 観察されている。繁殖期に捕獲されるクロマグロ雄の多くは放精し性成熟が確認できる一方, 雌は産卵期において個体毎に卵巣成熟度が大きく異なり, 飼育下では, 成熟する個体の割合が低いことが報告されている。⁵⁾ 従って, 人工繁殖では親魚編成で雌個体の割合を雄個体よりも高めておくことが重要となる。また, 産卵行動に頻繁に参加する個体は, 多産親魚として有望である。多産個体に遺伝学的な特徴があれば, それら特徴を見出し選抜すれば受精卵安定供給へと繋がる。これはその他の遺伝形質でも同じであり, 成長の速い, 肉質の良い, 抗病性が高い個体等の選別においても応用が期待される。

しかしながらマグロ類では, 雌雄に顕著な形態的差が無いように, 大型の成魚は取り扱いの難しさから, 生殖腺の生体組織診断等で雌雄判別を行うことが困難である。クロマグロ血清に含まれるピテロジェニンを検出する事で性成熟雌の検出は可能であるが, 成熟魚である制限があるし必ずしも雌全個体を検出出来ない。⁶⁾ これに対しクロマグロ雌雄間で異なる DNA 断片を同定できれば, 少量の血液, 鱗の一部や体表粘液などを採取して雌雄の判別が出来, ハンドリングが比較的容易な幼魚期に雌雄の比率を最適化した親魚編成を行えることが期待される。さらに, そのような分子生物学的診断法は, 天然資源管理を目的とした標本調査でも, 魚を生かしたまま雌雄判別用の DNA 標本を採取しての再放流等や, 内臓を取り除いて市場に出荷される個体の雌雄判別が可能となるなど利点は多い。

本研究では, 飼育クロマグロについての形質を診断するための基本的な分子生物学的解析法開発と, その応用として AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) を用いて,⁷⁾ 雌雄に特徴的な DNA 断片の同定を試みた結果を報告する。

材料および方法

供試魚

クロマグロは近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場および大島実験場にて孵化, 飼育された平成 19 年産完全養殖第 3 世代目 (F3) を用いた。F3 世代は平成 14 年産 (F2) の子である。³⁾ 対象魚捕獲脱血時に採血し DNA 抽出の材料とした。

DNA 調製

収穫時には釣り上げた魚の体側静脈をナイフで刺して噴血させた。250 μ L の 0.5 M EDTA (pH 8.0) を入れた試験管にこの血液を約 10 mL 採取し, 実験室に持ち帰り分注を行った。収穫個体は船上で内臓摘出の際に生殖腺の形態から雌雄を判別しタグを付け上陸後, 体重, 体長, 尾叉長, 体幅および体高を測定し, 血液サンプルと対応がつくように記録保管した。血液サンプルを

DNA 標本として保存するのは以下の利点がある。鳥類や魚類の赤血球は哺乳類のそれとは異なる有核赤血球であり, 血液 5 μ L からおよそ 2 μ g の大量の total DNA が得られる (DNeasy Blood and Tissue kit, キアゲン)。有核赤血球を含む血液は, 哺乳類等の様な無核赤血球含有血液と同じ血液ゲノム DNA 調製法では DNA 抽出が困難であった。クロマグロ血液からの DNA 抽出法として種々の精製法を試験した結果,^{8,9)} キアゲン社キット (グアニジン塩酸塩, プロテナーゼ処理, スピнкаラム精製) が最も安定して total DNA 抽出出来た。血液は液体であるため扱いが容易であり, 1.5 mL のプラスチックチューブ等に小分けで保存が出来る。保存容器に収納し冷凍庫に保存しておけばいつでも目的の試料を取り出せ試験ができる。我々は 1 個体あたり 1.5 mL の血液を 2 本, 計 3.0 mL 程度標本として保存している。

AFLP

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 反応は Vos らの方法と,⁷⁾ 農水省公開テキスト (農林水産省研修テキスト 2000 分子マーカーを利用した有用形質の遺伝解析法—QTL 解析を中心として <http://ftp.staff.or.jp/rgp/protocols/QTL.pdf>) を参考に行った。両者の方法は基本的に同じであるが, ligase や制限酵素のユニット数, 反応温度等が若干異なる。両者を予備試験した結果, 後者において低分子のバンドが若干得易かった事から後者の方法に準じて行った。

以下の溶液を 0.2 mL チューブに調整した。10 \times T4 ligase buffer 2.2 μ L, ゲノム DNA 110 ng, 500 mM NaCl 2.0 μ L, BSA 1.0 μ g BSA, *Mse*I adaptor 10.0 pmol, *Eco*RI adaptor 1.0 pmol, 12 U *Eco*RI, 及び 2U *Mse*I を含む溶液に滅菌蒸留水を加え 21 μ L とし, 37°C 2 時間消化後, 3.5 U/ μ L T4 DNA ligase (タカラバイオ) 溶液 1.0 μ L を加え合計 22 μ L とし, 25°C 15 時間保温して cut and ligase 反応を行った。保温後 TE (10 mM Tris-HCl pH. 8.0, 1 mM EDTA) 溶液を 9 倍量 (198 μ L) 加え混合し, 10 倍希釈物とし冷凍保存した。T4 DNA ligase の希釈には 100 ng/ μ L BSA を含む 1 \times T4 DNA ligase buffer (タカラバイオ) を用いた。一次増幅には *Mse*I + C 5'-CGATGAGTCCTGAGTAAC, *Eco*RI + A 5'-AGACTGCGTACCAATTCA プライマー (インビトロジェン) を用いた。二次増幅には *Mse*I + C3 として *Mse*I + C プライマーの 3'末端配列 3 塩基が CAA, CAT, CAG, CAC, CTA, CTT, CTG, CTC の 8 種プライマーを用いた。同じく *Eco*RI + A3 として 3'末端配列 3 塩基が ACT, ACG, ACA, ACC, AGC, AGT, AGG, AGA の 8 種プライマーの総当たりで計 64 組み合わせの試験を行った。1 次増幅は, 2.0 μ L 10 \times Ex taq buffer, 2.5 mM each dNTPs 1.6 μ L, 5p mol *Mse*I + C, *Eco*RI + A primer, 0.5 U Ex taq, cut and ligase 10 倍希釈物 2.5 μ L を含む溶液を

滅菌蒸留水で 20.0 μ L とし 72°C 3 分保温の後、20 サイクルの 94°C 20 秒、56°C 30 秒、72°C 1 分の後、72°C 10 分保温した。2 次増幅 PCR 反応は、1 次増幅物反応と同じ要領であるがいくつかの点異なる。プライマー量に関しては、*MseI*+C3primer を 5.0 pmol, *EcoRI*+3 primer を 1.0 pmol 用いた。鋳型は 1 次増幅産物の TE による 10 倍希釈液を 1.5 μ L 用いた。1 次増幅と同じく 20 μ L の反応系で行った。温度条件は次の通り、94°C 1 分保温の後、12 サイクルの 94°C 20 秒、65°C 30 秒 (1 サイクル毎に温度を 0.7°C ずつ下げた)、72°C 1 分、その後 18 サイクルの 94°C 20 秒、56°C 30 秒、72°C 1 分、その後 72°C 5 分で保温した。サーマルサイクラーは ASTEC 社製 PC818 を用いた。反応産物は解析まで冷凍保存した。

AFLP 試験について、これまで報告のあるものは二次増幅に用いる primer の一端を P³² 放射標識するかあるいは蛍光標識したものをを用い、RI 感光システムや DNA シーケンサーを用いてデータ取得、分析をした例がほとんどである。^{7,10)} これらは変性高分解能ゲルによる電気泳動と、微量産物を検出する優れた試験系である。しかしながら、この方法では RI 実験室及び装置や、シーケンサーが必要である。本研究ではこれらの設備、装置の無いより簡便な方法を検討することとし、自動電気泳動装置 (MCE-202 Multi-NA, 島津製作所) を用いて分析を試みた。本研究で用いた自動電気泳動装置は、DNA シーケンサーの感度分解能には及ばないが、アガロース電気泳動後のエチジウムブロマイド染色よりも 10 倍以上の感度がある。本研究では AFLP 二次増幅 PCR 産物を、自動電気泳動装置を用いて DNA-1000 分離バッファー (島津製作所) にて泳動し、各 DNA 断片は Muti-NA の詳細解析モードで定量した。性に関連する可能性があるかと判断された 437, 454 bp 断片の絶対量を測定し、調査した全個体で共通に出

現するシグナルのうち最もシグナルが強い 400 bp 断片の絶対量との相対値を求めた (Table 2)。シグナル検出の際に、ピークが 1 つと判断された雄 19, 23, 25 については検出された定量値の半分を統計計算に用いた。400, 437, 454 bp 断片の絶対量、437, 454 bp 断片の 400 bp に対する相対値は SPSS (Statistical Package for the Social Science program for Windows 16.0) を使用して *t*-test により有意確率 1% で有意差検定した。

結 果

AFLP

クロマグロ雌雄表現型 4 個体ずつ計 8 個体の血液由来ゲノムをランダムに選定し、*EcoRI*+A, *MseI*+C プライマーで一次増幅を行い、*EcoRI*+A3 プライマー 8 種、*MseI*+C3 プライマー 8 種の計 64 プライマーの組み合わせで二次増幅を行った。その結果、合計 1038 の AFLP 二次増幅バンドが観察され、これらの内 183 (17.6%) が個体間で多型を示した (Table 1)。64 プライマーの内、二次増幅を *EcoRI*+AGG と *MseI*+CAT で行った場合に雌 1 個体 (Fig. 1A, ♀1), 雄 4 個体 (Fig. 1B, ♂1-4) において確認されるおよそ 437 と 454 bp 付近の断片を確認した (Fig. 1 矢印部分)。分析個体数を雌雄各 32 個体に増やし、ゲルイメージで分析した結果、雄 32 個体中 29 個体 (90.6%, Fig. 1 ♂7, 8, 9 除く)、雌 32 個体中 3 個体 (9.3%, Fig. 1 ♀1, 15, 16) に 437 bp 断片は陽性であった。さらにエレクトロフェログラムのシグナル詳細分析と定量的結果、雌 32 個体中 13 個体に 437 bp の、8 個体に 454 bp の DNA 断片が確認された (Fig. 2, Table 2)。雄では 32 個体中 30 個体に 437 bp の、29 個体に 454 bp の DNA 断片が検出され、これらは雄で検出される傾向が高かった。また、その DNA 断片の量は雌よりも雄が有意に ($P < 0.01$) 多い事が示された (Table 2)。

Table 1 Summary of the numbers of polymorphic bands produced by the 64 AFLP primer combinations in Pacific bluefin tuna by the 64 primer combinations

<i>MseI</i> primers	<i>EcoRI</i> primers								<i>EcoRI</i> total
	ACT	ACG	ACA	ACC	AGC	AGT	AGG	AGA	
<i>MseI</i> primers									
CAA	0	7	0	2	3	2	2	0	16
CAT	0	3	1	4	3	0	3	0	14
CAG	1	4	2	3	3	2	2	1	18
CAC	4	4	0	3	5	6	5	2	29
CTA	3	2	2	4	6	2	2	2	23
CTT	4	1	3	5	3	4	3	2	25
CTG	3	8	4	5	2	2	1	4	29
CTC	7	5	0	4	7	3	3	0	29
<i>MseI</i> total	22	34	12	30	32	21	21	11	183

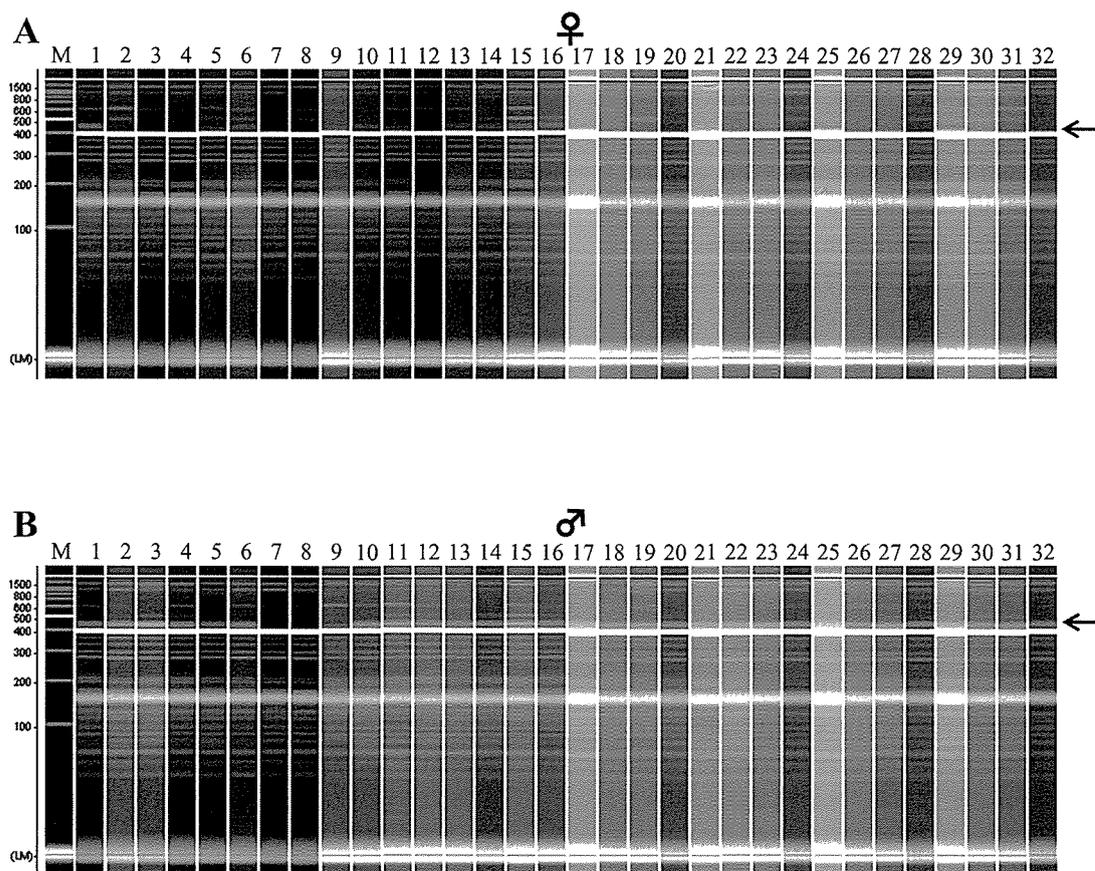


Fig. 1 AFLP 2nd amplification products were analyzed using the MCE-202 Multi-NA micro-chip auto electrophoresis system. A: female and B: male AFLP fragments are shown in gel images. Arrowhead indicates fragments typically detected in males. Characters at top of gel image indicate M: 100 bp ladder marker, numbers: individual ID.

考 察

養殖魚類の性に関連する AFLP 解析は, カラアカシタビラメ,¹¹⁾ パタゴニアンペヘレイ,¹²⁾ はじめ種々の生物で実施されている。カラアカシタビラメでは 64 プライマーセットで 28 個体が解析され, 4618 の断片がバンドとして計数された。およそ 1970 の断片が多型を示し, その内雌に特徴的な DNA 断片が 7 個特定された。¹¹⁾ パタゴニアンペヘレイでは 64 プライマーセットで 46 個体が解析され, 153 の DNA 断片が多型を示し, 雄に特徴的な DNA 断片と配列が同定された。¹²⁾ 本研究で行ったクロマグロ AFLP 解析では, 64 プライマーセットで 1038 の AFLP 断片が計数され, 内 183 (17.6%) が多型を示した。183 の多型 DNA 断片は, クロマグロ 24 対¹³⁾ の染色体 1 対平均 7.6 個に概算でき, 性染色体の一部を捕えるのは可能な数かもしれない。今回の 183 多型断片はカラアカシタビラメに比べてかなり少なく, パタゴニアンペヘレイの例に近い。これは Koshimizu らの指摘にもあるが対象魚の遺伝的な多様性の少なさに起因すると考えられる。¹²⁾ 今回分析し

たクロマグロは完全養殖 3 世代目である。我々のクロマグロ養殖生簀では一晩に産卵する雌親魚の個体数が 2 個体程度かそれよりも少し多い程度であり, 多型が世代を経るにつれて減少する。

本研究では, 雌雄間で極端に出現頻度が異なる DNA 断片を検出した。雄 32 個体中 29 個体 (90.6%), 雌 32 個体中 3 個体 (6.3%), に 437 bp の DNA 断片が検出された (Fig. 1)。エレクトロフェログラムの詳細解析の結果, 雄 32 個体中 30 個体 (93.7%), 雌 32 個体中 13 個体 (40.6%), に 437 bp 断片が検出された (Fig. 2, Table 2)。437 bp の断片は雄で検出される頻度が雌よりも高く, その量も多かった (Fig. 2, Table 2)。雄において雌よりも多く検出される事は, 雄ゲノム中に対象断片が多い可能性が考えられ, クロマグロの性染色体が雄 ZZ, 雌 ZW であることを示唆するかもしれない。一方で, AFLP 解析ではおおよその DNA 断片量を反映して PCR 増幅されるが定量 PCR ほどに厳密ではない。よって雄に特徴的な断片は雌のそれとは異なる配列を有しているとも考えられる。437 bp 断片の配列解析を試みたが繰り返し配列が多く含まれる事から, 全長の配列

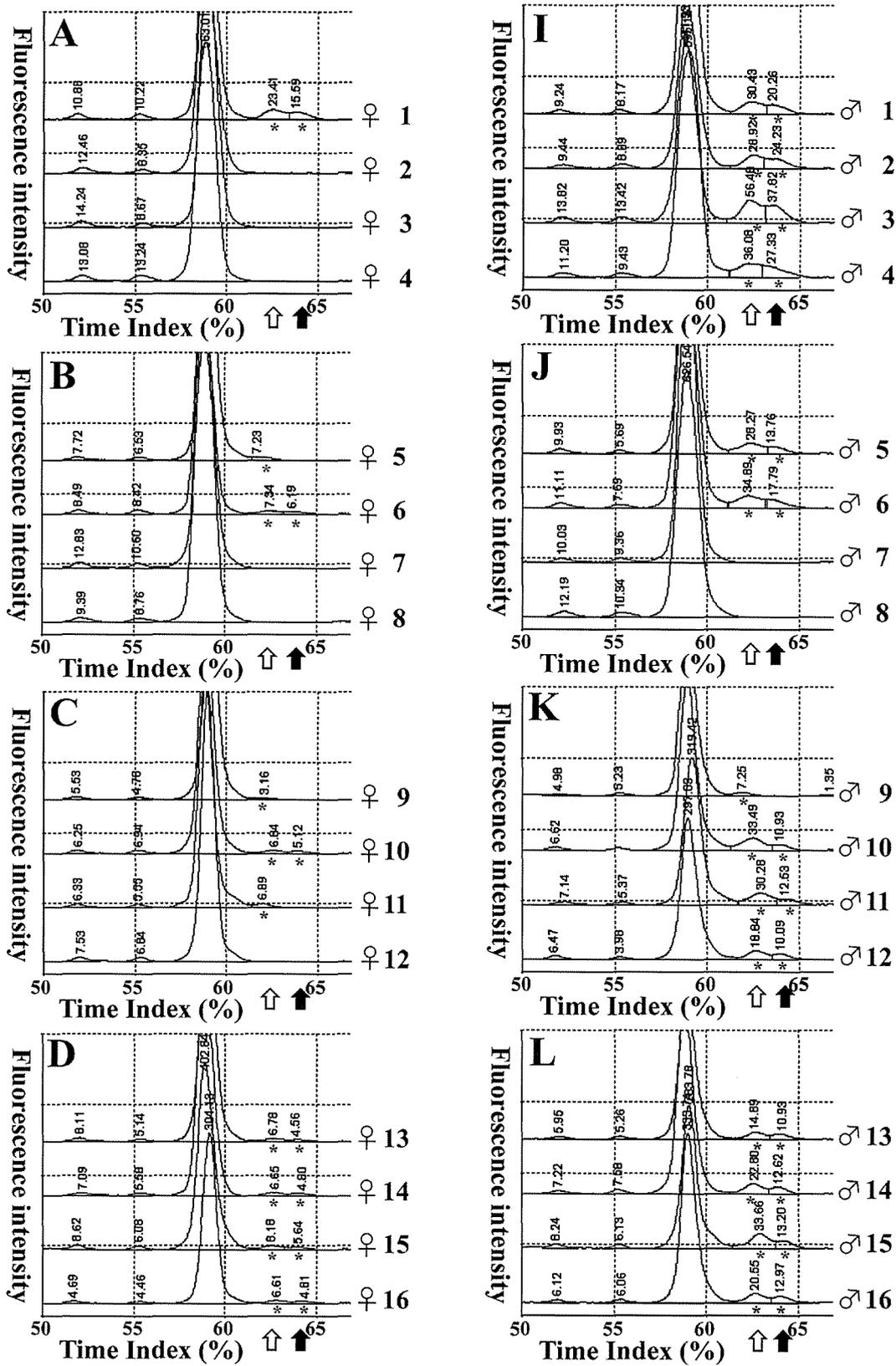


Fig. 2 Electropherogram of AFLP products, A to H: females and I to P: males. Vertical line indicates fluorescence intensity and horizontal line represents time index of electropherogram (%). Individual IDs are shown on the right side of the figures. Open and closed arrows indicate approx. 437 and 454 bp fragments, respectively. Numbers on the electropherogram indicate areal index of the fragments. Counted peak is shown by an asterisk under the electropherogram charts.

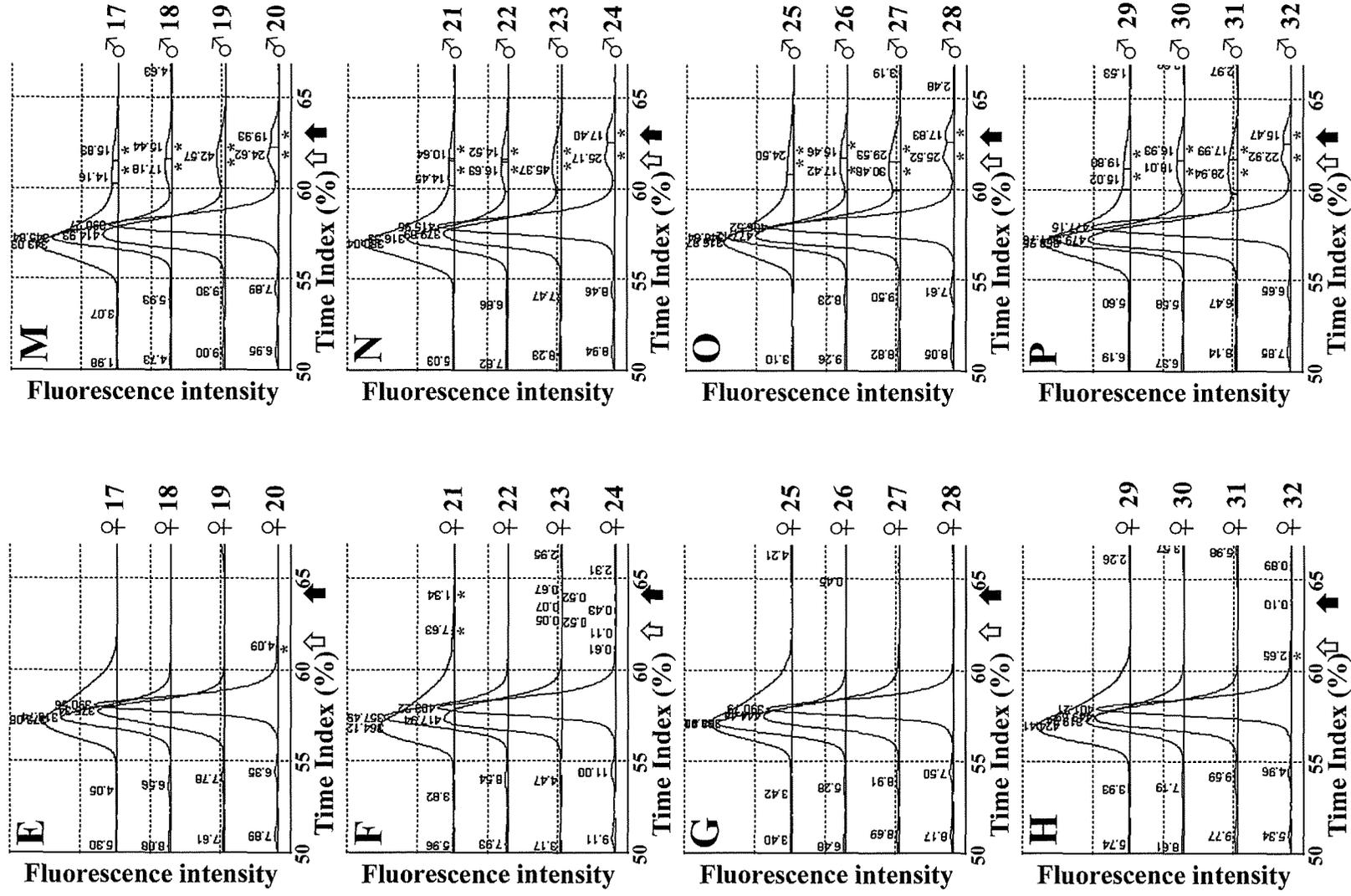


Fig. 2 (Contd.)

Table 2 Summary of the quantification analysis of the 400, 437, 454 bp DNA fragments between females and males

	Female			Male		
	Ind.	Average DNA content ng/ μ L	Ratio	Ind.	Average DNA content ng/ μ L	Ratio
400 bp	32	4.143 ^a	100	32	3.910 ^a	100
437 bp	13	0.080 ^a	1.93 ^a	30	0.231 ^b	5.91 ^b
454 bp	8	0.074 ^a	1.79 ^a	29	0.162 ^b	4.15 ^b

Values in the same row with different superscript letters are significantly different (*t*-test, $P < 0.01$).

取得には至らなかった。

437 bp 断片が雌雄に検出された理由については次の可能性が考えられる。トラフグでは仔稚魚を低水温で飼育する事により、またヒラメ¹⁴⁾やカレイ¹⁵⁾では、仔稚魚を高水温で飼育することで形態学的雄の割合が高まる。魚類は仔稚魚期の飼育水温によって形態学的な性が揺らぐ事が知られている。437 bp 陽性であったクロマグロ雌個体は遺伝学的には雄であるが、仔稚魚期に何らかのストレスを受け形態学的には雌に分化したのかもしれない。また全ての雄にこの断片が検出されなかった点については、遺伝学的な雌が形態学的な雄に分化する可能性も示唆される。まれな現象であるが、クロマグロでは形態学的に雌雄両生殖腺を持つ個体も報告されており、¹⁶⁾クロマグロの飼育水温と性分化の関係についてはこれまでに報告は無く興味を持たれる。

今回雄に偏在する DNA 断片を同定したが、AFLP 試験で観察される断片について本断片及び近傍の制限酵素サイトの配列や SNP 等を明らかにする事が望まれる。¹²⁾ suppression PCR 法を利用した本断片近傍配列を取得し、¹⁷⁾ 同定された断片末端及び隣接配列を明らかにするとともに、天然クロマグロ個体で 437 bp 断片の検出と生殖腺観察を行う必要がある。クロマグロ親魚群の遺伝子標本の分析は現在飼育中である事と巨大魚のハンドリング困難さから行われていないが、クロマグロ性染色体の基本情報を知る上で大変重要であり今後の詳細解析を要する。

近畿大学ではクロマグロの生簀内での完全養殖に成功し、²⁾ 2007 年からは国内養殖会社への種苗販売が行われている。クロマグロの生産効率を高めるために沈降、浮上死防除、電照による夜間死防除¹⁸⁾等の様々な取り組みがなされてきたが、今後はこれらに加え多産卵魚や抗病性等の優れた形質を持つ魚を選抜する事も望まれる。クロマグロ雄に偏在する DNA 断片として 437 bp の断片を同定した事は、今後雌の比率を高めた親魚編成に有益な情報である。今後は他形質にも関連する DNA マーカーを同定しクロマグロ育種を加速する事が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するに際し、近畿大学水産研究所及び大島実験場職員の皆様には多大なるお力添えを頂いた。特にクロマグロ血液標本作製については大島実験場技術職員中谷正宏氏、林正次氏、濱口康信氏、津路伸氏の協力無くしては成し得なかった。増養殖研究所張成年博士には論文に対する貴重な御意見を頂いた。本研究は文部科学省近畿大学グローバル COE プログラム (クロマグロ等の養殖科学の国際研究拠点) の支援を受けて行われた。

文 献

- 1) Fromentin JM, Powers JE. Atlantic bluefin tuna: population dynamics, ecology, fisheries and management. *Fish and Fisheries* 2005; **6**: 281-306.
- 2) Sawada Y, Okada T, Miyashita S, Murata O, Kumai H. Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquacult. Res.* 2005; **36**: 413-421.
- 3) 熊井英水, 宮下 盛, 小野征一郎, 共編著. 近畿大学プロジェクトクロマグロ完全養殖. 序章 成山堂書店 東京. 2010.
- 4) 熊井英水. クロマグロの人工ふ化飼育とその再生産に関する研究. *日水誌* 1998; **64**: 601-605.
- 5) Masuma S, Takebe T, Sakakura Y. A review of the broodstock management and larviculture of the Pacific northern bluefin tuna in Japan. *Aquaculture* 2011; **315**, 2-8.
- 6) Susca V, Corriero A, Bridges CR, De Metrio G. Study of the sexual maturity of female bluefin tuna: purification and partial characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Fish. Biol.* 2001; **58**, 815-831.
- 7) Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijnders M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995; **23**: 4407-4414.
- 8) Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning* third edition chapter 6. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- 9) Asahida T, Kobayashi T, Saitoh K, Nakayama I. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 727-730.
- 10) Arnold C, Metherell L, Clewley J P, Stanley J. Predictive modeling of fluorescent AFLP: a new approach to the molecular epidemiology of *E. coli*. *Res. Microbiol.* 1999; **150**: 33-44.
- 11) Chen S-L, Li J, Deng S-P, Tian Y-S, Qing-Yin Wang Q-Y, Zhuang Z-M, Sha Z-X, Xu J-Y. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Mar. Biotechnol.* 2007; **9**: 273-280.
- 12) Koshimizu E, Strüssmann CA, Okamoto N, Fukuda H, Sakamoto T. Construction of a genetic map and development of DNA markers linked to the Sex-determining locus in the Patagonian Pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). *Mar. Biotechnol.* 2010; **12**: 8-13.
- 13) Ida H, Oka N, Terashima H, Hayashizaki K. Karyotypes and cellular DNA contents of three species of the family

- Scombridae from Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 1319-1323.
- 14) Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned population in hirame flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 1999; **173**: 235-246.
- 15) Goto R, Tatsunari M, Kawamata K, Matsubara T, Mizuno S, Adachi S, Yamauchi K. Effects of temperature on gonadal sex determination in barfin flounder (*Verasper moseri*). *Fish. Sci.* 1999; **65**: 884-887.
- 16) Sawada Y, Seoka M, Nakatani M, Tamura T, Okada T, Kumai H. A hermaphroditic specimen of captive-raised Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* Temminck and Schlegel, 1844. *J. Fish Biol.* 2002; **60**: 263-265.
- 17) Lian C, Wadud M D, Geng Q, Shimatani K, Hogetsu T. An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers. *J. Plant Res.* 2006; **119**: 415-417.
- 18) Ishibashi Y, Honryo T, Saida K, Hagiwara A, Miyashita S, Sawada Y, Okada T, Kurata M. Artificial lighting prevents high night-time mortality of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, caused by poor scotopic vision. *Aquaculture* 2009; **293**: 157-163.