

カダヤシ *Gambusia affinis* の卵巣周期に及ぼす水温 および光周期の影響

古屋康則¹・石川早苗¹・澤口小有美²

¹〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 岐阜大学教育学部

²〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 岐阜大学大学院連合農学研究科

(2003年7月1日受付；2003年10月3日改定；2003年10月24日受理)

キーワード：胎生魚，卵形成，受精，妊娠，出産

魚類学雑誌
Japanese Journal of Ichthyology

© The Ichthyological Society of Japan 2004

Yasunori Koya*, Sanae Ishikawa and Sayumi Sawaguchi. 2004. Effects of temperature and photoperiod on ovarian cycle in the mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Japan. J. Ichthyol.*, 51(1): 43–50.

Abstract Mosquitofish, *Gambusia affinis*, repeat parturition at constant intervals under constant temperature and photoperiod. Although the intervals change with rearing condition, it is unclear whether or not environmental factors affect the process from vitellogenesis to parturition. To clarify the effects of temperature and photoperiod on the ovarian cycle (between successive parturition events), the parturition intervals and oocyte and embryonic development were investigated under various temperatures (20–31°C) and photoperiod (14–16 hr light-phase). The parturition intervals became shorter at higher temperatures under constant photoperiod. It is suggested that temperature primarily influences the rate of embryonic development; the effects being large at less than 25°C, and smaller at more than 25°C. The parturition intervals became shorter under long daylength periods at a constant temperature. It is suggested that photoperiod primarily affects the progress of vitellogenesis (timing of fertilization after parturition) and has little effect on embryonic development.

*Corresponding author: Faculty of Education, Gifu University, Gifu 501-1193, Japan (e-mail: koya@cc.gifu-u.ac.jp)

般に、魚類の生殖周期が光周期や温度などの外部環境要因に支配されていることはよく知られた事実であり、配偶子形成の開始および進行や産卵の時期などが外部環境要因によって影響を受けている(Bye, 1984; Stacey, 1984)。カダヤシ *Gambusia affinis* はカダヤシ科 Poeciliidae に属する北アメリカ南部原産の胎生魚で、春から夏の間に約1ヶ月間隔で妊娠と出産を数回繰り返す生殖年周期をもっている(Krumholz, 1948)。夏期に繰り返される妊娠および出産では、1回の出産から次の出産までの間(卵巣周期)に、卵黄形成、卵成熟、受精および妊娠が行われ、妊娠中には次の妊娠のための卵黄形成も並行して起きる(Koya et al.,

2000).

本種の出産間隔についての記載を調べると、27°C15L9D で平均 24.8 ± 2.6 日 (Ishii, 1961), 16L8D の日長では 30°C で 18.6 日, 25°C で 22.6 日 (Vondracek et al., 1988), 25–28°C で自然日長条件下では平均 35 日 (Carlson, 1969), 春の終わりから夏の間では平均 30 日であるが、冬季には加温飼育しても 85 日と長くなる(Turner, 1937)などの記載がなされており、外部環境が出産周期に影響を及ぼしていることが推察される。しかし、これら光周期や温度がどれほど出産間隔に影響するのか、また、卵巣周期の何に影響を与えていているのかについては不明である。

本研究では、これらの外部環境要因がカダヤシの雌の卵巣周期のどこにどのように影響しているのかを調べることを目的として、水温と光周期の様々な組み合わせの下で飼育したカダヤシの出産間隔を調べ、さらにその間の卵母細胞および胚の発達の過程を組織学的に調べた。

材料と方法

飼育 本研究では、三重県長島町で採集した標準体長28.2–38.0 mmの雌のカダヤシを室内に設置されたガラス製水槽(50リットル)で飼育し、適宜使用した。飼育条件は31°C16L8D(以下24時間周期なのでDを省略)、28°C16L、25°C16L、20°C16L、25°C15L、31°C14L、25°C14L、および20°C14Lの8群を設けた。各実験群には雌魚をそれぞれ5、5、7、2、4、2、5、および5尾用い、魚を各飼育条件で2–3週間馴致してから実験に使用した。雌魚を市販のプラスチック製の産卵箱(16×9×9 cm³; ニッソー社製)へ入れて隔離し、一度出産したことを確認した後、産卵箱で継続して飼育し、次の出産までの日数を調べた。通常カダヤシの雌は卵巣内に精子を蓄えているため、このように雌だけを隔離しても数回の妊娠・出産は起きる。また、31°C16L、28°C16L、25°C16L、25°C14L、および20°C14Lの5群について、出産した日を0日目として、0、5、および10日に2–7個体の魚を殺し、卵巣の組織学的観察に供した。

組織観察 卵巣組織の観察は、31°C16L(n=9)、28°C16L(n=9)、25°C16L(n=12)、25°C14L(n=9)、および20°C14L(n=8)の5群について行った。雌

魚を4-アミノ安息香酸エチルで麻酔した後、標準体長、体重、および卵巣重量を計測し、生殖腺体指数(GSI=生殖腺重量/体重×100)を算出した。卵巣をBouin液で固定した後、通常の方法でパラフィンに包埋し、厚さ6 μmの連続切片を作成した。切片にはヘマトキシリソーエオシンの二重染色を施し、光学顕微鏡により観察を行った。卵母細胞および妊娠中の胚の発達段階の分類はKoya et al.(1998)に従い、周辺仁後期(LPN)、油球期(OD)、卵黄球前期(EYG)、卵黄球後期(LYG)、胚発生前期(EE)、および胚発生後期(LE)に分け、存在の有無を調べた。卵黄球期の卵母細胞については組織切片を用いて直径を計測し、各群2–5個体分(卵数3–176個)の卵黄球期の卵母細胞の直径をひとまとめにして頻度分布を調べた。

統計解析 数値のデータは全て平均値±標準誤差で表わした。また、各データについて分散分析(ANOVA)を行った後、Tukey-Kramer法により多重比較検定を行った。有意水準はP<0.05とした。

結果

出産間隔 各飼育群における異なる雌の出産間隔をTable 1に示した。出産間隔の平均は光周期が16Lの群では、20°Cで47.5日、25°Cで22.1±0.5日、28°Cでは21.4±0.5日、31°Cでは21.2±0.6日であった。これら16Lの25–31°Cの3群の間には出産間隔に有意な差は見られなかつたが、20°Cでは出産間隔が著しく長くなる傾向がみとめられた。25°C15L群では平均28.3±1.3日で、16Lの25–31°Cの3群よりも有意に大きい値を示した(Tukey-

Table 1. Parturition intervals in mosquitofish under various environmental conditions

| Photoperiod Temperature | 16L8D | | | | 15L9D | | 14L10D | |
|------------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | 20°C | 25°C | 28°C | 31°C | 25°C | 20°C | 25°C | 31°C |
| Parturition intervals (days) | 46 49 21 21 22 23 23 24 | 21 21 21 21 22 23 23 24 | 20 20 21 21 22 23 23 24 | 20 20 21 21 22 23 23 24 | 25 28 29 29 31 31 31 31 | 42 44 44 45 45 50 50 50 | 29 30 30 32 32 34 34 34 | 23 24 30 30 32 32 34 34 |
| Mean* | 47.5 | 22.1 ^a | 21.4 ^a | 21.2 ^a | 28.3 ^b | 45.0 ^c | 31.0 ^b | 23.5 |
| SEM | – | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 1.3 | 1.3 | 0.9 | – |

* Different superscripts indicate significant difference at P<0.05 (Tukey-Kramer test).

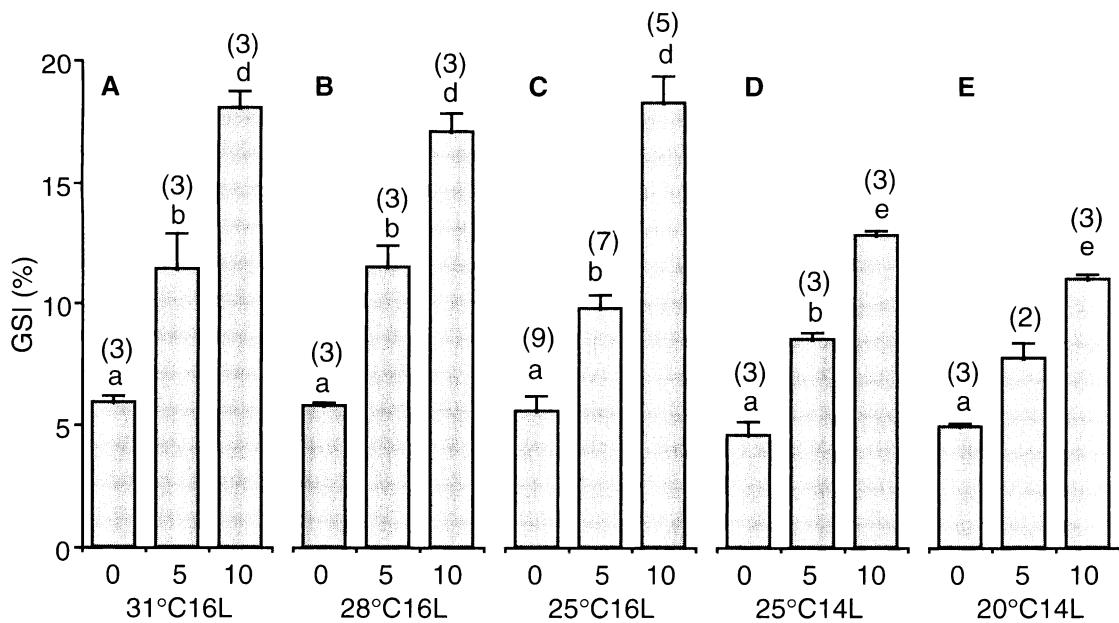


Fig. 1. Changes in gonadosomatic index (GSI) from post-parturition (day 0) to 10 days after parturition in female mosquitofish under various environmental conditions. A, 31°C16L; B, 28°C16L; C, 25°C16L; D, 25°C14L; E, 20°C14L. Numbers in parentheses indicate sample size. Same letters (a–e) indicate not significantly different (Tukey–Kramer test, $P \geq 0.05$).

Kramer test, $P < 0.01$). 14Lの群では、20°Cで平均 45.0 ± 1.3 日であったのが、25°Cで 31.0 ± 0.9 日と有意に短く (Tukey–Kramer test, $P < 0.01$)、31°Cでは23.5日とさらに短い傾向がみとめられた。同じ水温25°Cで光周期の違う3群を比較すると、16Lでは15Lおよび14Lの2群に比べ出産間隔は有意に短かったが (Tukey–Kramer test, $P < 0.01$)、15Lおよび14L群間には有意な違いはなかった。

生殖腺体指数 (GSI) の変化 31°C16L, 28°C16L, 25°C16L, 25°C14L, および20°C14Lの5群における出産後0, 5, および10日目のGSIをFig. 1に示した。各群とも、0日目, 5日目, および10日目の順にGSIは有意に増加した。各群の0日目のGSIを比較すると、全ての群間で有意な差は見られなかった。5日目のGSIの平均値についても統計検定ができなかった20°C14L群を除けば全ての群で有意な差は見られなかった。10日目のGSIの平均値は、31°C16L群では $18.0 \pm 0.7\%$ 、28°C16L群では $17.7 \pm 0.8\%$ 、25°C16L群では $18.3 \pm 1.1\%$ と有意差が見られなかったのに対し、25°C14L群および20°C14L群ではそれぞれ $12.8 \pm 0.2\%$ および $11.0 \pm 0.1\%$ と16Lの3群に比べ有意に低かった (Tukey–Kramer test, $P < 0.05$)。

卵巣卵組成の変化 31°C16L, 28°C16L,

25°C16L, 25°C14L、および20°C14Lの5群について、卵母細胞および胚の発達段階の出現状況を出産後の日数ごとに調べた (Table 2)。周辺仁後期、および油球期の卵母細胞は、全ての群で常に卵巣内に存在していた。

31°C16L群では、0日目には卵黄球前期および後期の卵母細胞も存在しており、5日目には胚発生前期の胚も現われた。10日目には、胚発生前期の胚がすべて後期へと移行していた。卵黄球後期の卵母細胞は見られなくなったが、卵黄球前期の卵母細胞はわずかに見られた。28°C16Lおよび25°C16Lの両群でもこれと同様の変化を示し、0日目には卵黄球後期までの卵母細胞が見られ、5日目には胚発生前期、10日目には胚発生後期の胚がそれぞれみとめられ、10日目には卵黄球前期の卵母細胞がわずかに見られた。

25°C14Lおよび20°C14Lの両群では、0日目には周辺仁後期および油球期の卵母細胞の他には、卵黄球前期および後期の卵母細胞も存在していた。5日目も0日目と同様の組成を示したが、10日目には胚発生前期の胚が卵巣内に初めて観察された。

卵径の変化 各飼育群について卵黄球前期以降の卵胞の直径 (直径0.2 mm以上) を計測し、直径

の頻度分布の経日変化を調べた(Fig. 2)。全ての飼育群のいずれの日においても、直径0.2–0.4 mmの卵母細胞は常に最大の割合で存在していた。

31°C16L群(Fig. 2A)では、0日目には直径0.6–0.8 mmに2つ目のピークが見られ、最大の卵母細胞の直径は約1.1 mmであった。5日目にも0.6–0.8 mmに2つ目のピークが見られたが、大型卵の受精に伴って0.8 mm以上のものは減少した。10日目には0.2–0.4 mmの小型の卵黄球前期の卵母細胞のみが見られた。28°C16L群(Fig. 2B)でもこれとほぼ同様で、5日目には大型卵の受精に伴って0.8 mm以上のものが見られなくなり、10日目には0.2–0.4 mmの小型の卵黄球前期のもののみが観察された。

25°C16L群(Fig. 2C)では、0日目には2番目のピークが0.8–1.0 mmあり、31°C16L群および28°C16L群よりも大型の卵母細胞が見られたが、5日目には1.0–1.8 mmの受精直前の卵母細胞が依然として見られ、2つ目のピークを形成していた。しかし、10日目には31°C16L群および28°C16L群と同様、0.2–0.4 mmのもののみとなっていた。

25°C14L群(Fig. 2D)では、0日目には直径0.6–0.8 mmに2番目のピークが見られ、最大の直径が1.2 mmであった。5日目には2番目のピーク

が0.8–1.0 mmへと増大し、最大の卵径も1.2–1.4 mmへと移行して、ほぼ25°C16L群の0日目の状態となった。しかし、10日目には大型卵径群の受精に伴い1.0 mm以上のものは見られなくなつた。20°C14L群(Fig. 2E)でもこれとほぼ同様で、0日目から5日目にかけて最大卵径群が1.2–1.4 mmへと増大し、10日目には大型卵径群の受精に伴い1.0 mm以上のものが見られなくなった。

考 察

カダヤシは春季には光周期にかかわらず18°C以上の水温条件によってのみ繁殖(卵黄形成および妊娠)を開始し、秋季には水温にかかわらず明期が12.5時間以下になると繁殖(卵黄形成)を終了することが示されている(Koya and Kamiya, 2000)。本研究で設定した飼育条件は全て水温と日長の両面から、繁殖を継続し得る条件であるといえる。

本研究では、16Lおよび14Lの群に関しては、同じ光周期条件において水温が高いほど出産間隔は短くなる傾向がみとめられた。また、15Lに関しては、本研究の25°C15LとIshii(1961)の27°C15Lを比較すると、28.3日および24.8日と、やはり温度が高いほど出産間隔は短くなっている。したがって、本種においては一般的に出産間隔は

Table 2. Changes in each stage of oocyte composition and embryonic development in mosquitofish reared under various environmental conditions

| Condition | Day | n | Stage of oocytes and embryos* | | | | | |
|-----------|-----|---|-------------------------------|----|-----|-----|----|----|
| | | | LPN | OD | EYG | LYG | EE | LE |
| 31°C16L | 0 | 3 | + | + | + | + | | |
| | 5 | 3 | + | + | + | + | + | |
| | 10 | 3 | + | + | + | | | + |
| 28°C16L | 0 | 3 | + | + | + | + | | |
| | 5 | 3 | + | + | + | + | + | |
| | 10 | 3 | + | + | + | | | + |
| 25°C16L | 0 | 4 | + | + | + | + | | |
| | 5 | 3 | + | + | + | + | + | |
| | 10 | 5 | + | + | + | | | + |
| 25°C14L | 0 | 3 | + | + | + | + | | |
| | 5 | 3 | + | + | + | + | | |
| | 10 | 3 | + | + | + | + | + | |
| 20°C14L | 0 | 3 | + | + | + | + | | |
| | 5 | 2 | + | + | + | + | | |
| | 10 | 3 | + | + | + | + | + | |

* LPN: late peri-nucleolus stage, OD; oil-droplet stage, EYG; early yolk globule stage, LYG; late yolk globule stage, EE; early embryo stage, LE, late embryo stage. Presence of oocytes and embryos indicated by +.

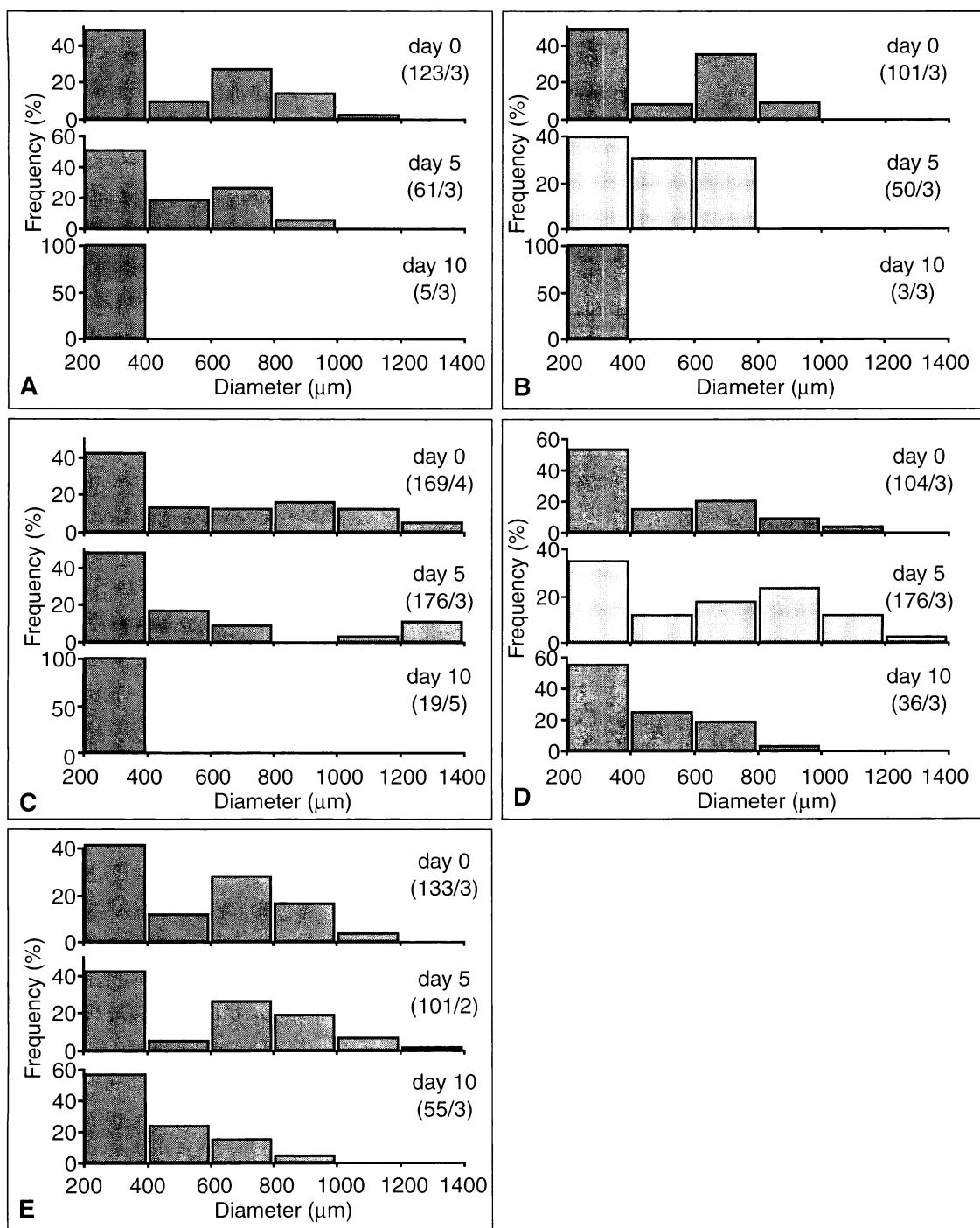


Fig. 2. Changes in oocyte follicle diameter from post-parturition (day 10) to 10 days after parturition in female mosquitofish under various environmental conditions. A, 31°C16L; B, 28°C16L; C, 25°C16L; D, 25°C14L; E, 20°C14L. Numerals in parentheses indicate number of oocytes/number of fish measured.

温度の上昇と共に短くなると考えられる。Vondracek et al. (1988) も、同一日長下では水温が高いほど出産間隔が短くなることを指摘している。一

方、16L群の25°C以上の3群を比べるとほとんど差はなく21–22日となっている。このことは、本種の出産間隔の最短の限界日数がこのあたりにあ

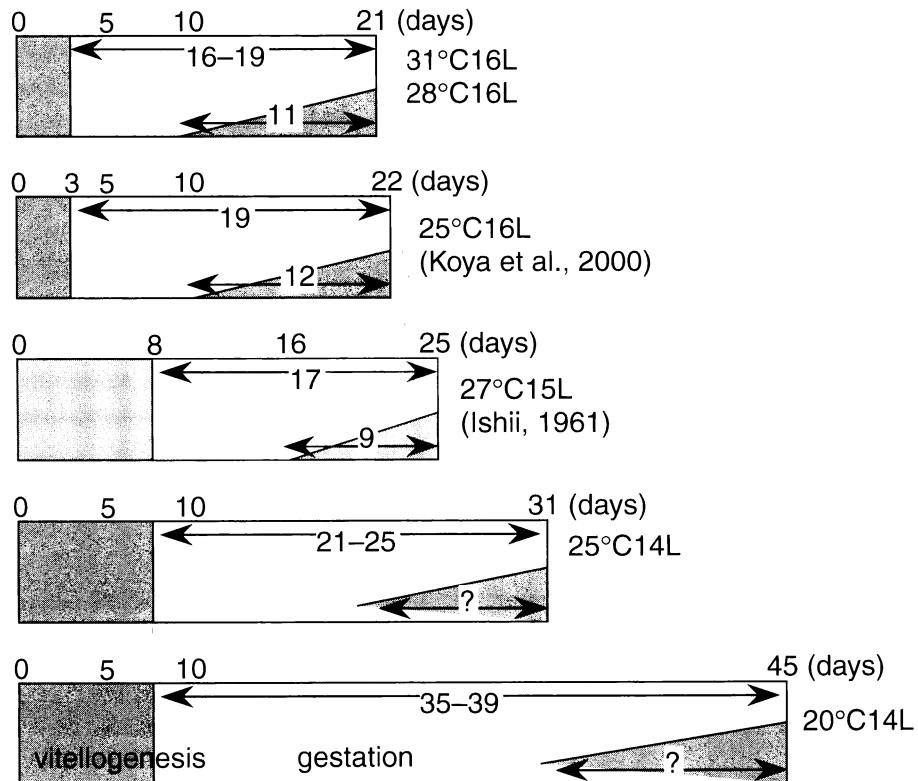


Fig. 3. Diagrams showing periods of vitellogenesis (shaded) and embryonic development (open) within one ovarian cycle (total length of column) in female mosquitofish under various environmental conditions. Numerals above column indicate days after parturition. Numerals in column indicate number of days necessary for embryonic development and vitellogenesis during the gestation period.

ることを示しているのかもしれない。同じ水温 25°C で日長の違いについて見ると、明期が長いほど出産間隔は短くなった。このことは、日長もまた本種の出産間隔を調節する重要な環境要因であることを示す。

カダヤシの出産から次の出産までの周期（卵巣周期）の中で起きる現象は、卵黄形成、卵成熟、受精、妊娠、および出産に大別できる。このうち卵母細胞の卵黄形成は、妊娠の途中に開始して妊娠中は徐々に進行し、出産後に急激に進展する (Ishii, 1961; Koya et al., 2000)。その後、卵成熟と受精はおそらく連続した現象として起きる。そこで以下では、出産から受精までの急激な卵黄形成の期間、受精してから出産されるまでの胚発生の期間、および妊娠中に進行する次の卵群のための卵黄形成の期間の3つの期間について、水温と日長がどのように影響するのかを考察する。各飼育条件による卵巣周期を比較するために、本研究の結果と Ishii (1961) の結果を併せて、これら3つの

期間を Fig. 3 に模式的に示した。

$31^{\circ}\text{C}16\text{L}$, $28^{\circ}\text{C}16\text{L}$, および $25^{\circ}\text{C}16\text{L}$ の3群では、出産から5日後に胚発生前期の胚が卵巣内に確認されたことから、出産後5日以内に受精が起きると見える。Koya et al. (2000) による $25^{\circ}\text{C}16\text{L}$ 条件での卵巣周期の詳細な研究から、受精は出産後2日から5日の間に大型の卵から順次起きることが示されている。0日目から5日目までのGSIの変化は、 $31^{\circ}\text{C}16\text{L}$, $28^{\circ}\text{C}16\text{L}$, および $25^{\circ}\text{C}16\text{L}$ の3群でほぼ同調していたことから、 $31^{\circ}\text{C}16\text{L}$ および $28^{\circ}\text{C}16\text{L}$ の条件下でも $25^{\circ}\text{C}16\text{L}$ とほぼ同様のこと起きていると思われる。しかし、卵黄球期の卵母細胞の直径の変化を詳細に比較すると、 $25^{\circ}\text{C}16\text{L}$ では5日目にはまだ受精可能と思われる大型の卵群が残っていたにもかかわらず、 $31^{\circ}\text{C}16\text{L}$ および $28^{\circ}\text{C}16\text{L}$ ではこの後退縮すると考えられる小型の卵群 (Koya et al., 2000) のみが残っていたことから、受精の時期は $25^{\circ}\text{C}16\text{L}$ よりも $31^{\circ}\text{C}16\text{L}$ および $28^{\circ}\text{C}16\text{L}$ の方がより早い、受精

の時期が一腹の卵で同調している可能性が考えられる。

25°C14L および 20°C14L では、出産の 5 日後にはまだ受精した胚は確認されず、10 日目によく胚発生前期の胚が確認された。このことから、これら 25°C14L および 20°C14L の 2 群では受精は出産後 5 日から 10 日の間に起き、16L の場合と比較すると、特に 25°C14L の結果から日長の短縮が受精の時期を遅らせることが示唆される。Ishii (1961) によると、27°C15L の飼育条件では受精は出産後 8 日目に起きるとされており、日長の短縮が受精の時期を遅らせる支持している (Fig. 3)。14L の 2 群では、出産直後の GSI には 16L 群との間に差は見られず、出産直後の卵黄球期の卵母細胞の直径の頻度分布にも 16L 群との間に大きな違いは見られなかった。ところが、GSI および卵径の頻度分布共に、出産後の発達が 16L 群に比べ遅れていた。すなわち、日長の短縮による受精の時期の遅れは、出産後の卵黄形成の進行の遅れに起因していると考えられる。

妊娠期間の長さと水温との関係について見ると (Fig. 3)、16L の 3 群の間には明らかな差はみとめられなかつたが、14L では 25°C に比べて 20°C で大きな妊娠期間の延長が見られた。これらの結果から、妊娠期間、すなわち胚発生速度は主に水温に依存しているが、25°C 以上の水温では発生速度はほぼ上限に達しているために、大きな差は表われなかつたものと考えられた。また、妊娠期間の長さと光周期との関係について見ると、28°C16L および 27°C15L の条件では大きな差は見られなかつたが、25°C16L および 25°C14L とを比較すると、日長の短縮によりわずかではあるが明らかな妊娠期間の延長が見られた。これらの結果は、日長も水温による影響より小さいものの、妊娠期間に影響を及ぼす一要因であることを示唆する。本種は胎生であるため、日長が胚に直接影響するのか、母体への影響を通じて間接的に影響するのかは判らない。卵生魚では光周期が発生速度に影響を及ぼす例がわずかだが知られており (タラ科の一種 *Melanogrammus aeglefinus*, Downing and Litvak, 2002), この場合も長日がふ化までの時間を短縮するという。最近、発生中の胚が光周期に反応してメラトニンを周期的に分泌することがニジマス *Oncorhynchus mykiss* (Yamada et al., 2002), およびマミチョグ *Fundulus heteroclitus* (Roberts et al., 2003) で確認されている。このことは、日長が胚に直接影響して発生速度を調節している可能性を示

唆している。

Koya et al. (2000) によると、25°C16L では出産後 10 日目に見られる小型の卵黄球期の卵母細胞は 8 日目には全く見られないものであることから、次回の妊娠のための卵群の発達によるものであることが示唆されている。本研究でも 25°C16L 群だけでなく 31°C16L および 28°C16L 群においても、10 日目にはこの新たな卵黄球期の卵群が出現しており 10 日目の GSI もこれら 3 群でほぼ等しかったことから、16L の 3 群は次回の卵黄形成開始の時期もほぼ等しいと考えられる。このように考えた場合、妊娠期と重なる卵黄形成期は、16L の 3 群ではおよそ 11–12 日間となる。Ishii (1961) は卵母細胞の外観に基づき、27°C15L の飼育条件では新たな卵群の発達は出産の 16 日後から始まるとしているが (Fig. 3), 卵母細胞を組織学的に観察しているわけではないので、顕微鏡レベルの卵黄形成開始はもう少し早い時期にあるものと思われ、妊娠期と重なる卵黄形成期は本研究の 16L の 3 群と大差はないと考えられる。したがって、妊娠期と重なる卵黄形成期の長さは、少なくとも 25°C 以上の水温および 15L 以上の日長ではあまり影響されないようである。本研究における 14L の 2 群では、卵黄形成開始の時期を特定することはできなかつた。出産直後の卵黄球期の卵母細胞の最大直径については、今回調べた 5 群間で大きな違いは見られなかつたことから、少なくとも出産までにはいずれの群でもある決まった段階 (直径で 1200 μm 程度) にまで卵母細胞は発達しているものと考えられる。出産後の卵黄形成の速度が日長に大きく影響されていることを考えると、出産前の卵黄形成の期間にも外部環境によって大きな違いが生じることが予想される。

以上をまとめると、水温はおもに胚発生速度に影響して妊娠の期間を決定していると考えられる。一般に水温と発生速度の関係は指数関数的であることから (Blaxter, 1988), 本研究の結果と併せて考えると、水温 25°C 以下では水温の発生速度に及ぼす影響は顕著であるが、25°C ではほぼ上限に達していると考えられる。また、光周期は発生速度と卵黄形成の両方に影響するが、特に出産後の卵黄形成の期間を決定する要因となっていると考えられる。Nishi (1981) は、24 時間の内に 6 時間の連続した明期にさらに 2 時間の明期を種々の時間帯に挿入した環境で、退縮した卵巣をもつカダヤシを飼育し続けると、付け加えた 2 時間の明期が 6 時間の明期の開始から 12 時間目と 16 時間目の間に

挿入された時に、卵巣の発達が誘導されることを示した。このことは、カダヤシの卵巣発達を誘導するための光刺激感受期が明期開始から12時間目以降に存在することを示している。光刺激感受期に光を受けることによりおそらく生殖内分泌系が活性化されるものと思われるが、光を受ける時間が長くなることにより、生殖腺刺激ホルモン(GTH)などのホルモン分泌もより活発になることは十分に考えられる。本研究では、光刺激感受期に実際に光を受ける時間が4時間から6時間の間で異なる実験群を設定したことになり、光を受ける時間の長さが生殖内分泌系の活性の度合に反映され、卵黄形成に要する期間が伸縮した可能性が示唆される。

引用文献

- Blaxter, J. H. S. 1988. Pattern and variety in development. Pages 1–58 in W. S. Hoar and D. J. Randall, eds. Fish physiology. Vol. XI. The physiology of developing fish. Part A. Eggs and larvae. Academic Press, San Diego.
- Bye, V. J. 1984. The role of environmental factors in the timing of reproductive cycles. Pages 187–205 in G. W. Potts and R. J. Wootten, eds. Fish reproduction: Strategies and tactics. Academic Press, London.
- Carlson, D. R. 1969. Female sexual receptivity in *Gambusia affinis* (Baird and Girard). Texas J. Sci., 21: 167–173.
- Downing, G. and M. K. Litvak. 2002. Effects of light intensity, spectral composition and photoperiod on development and hatching of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) embryos. Aquaculture, 213: 265–278.
- Ishii, S. 1961. Effects of some hormones on the gestation of the top minnow. J. Fac. Sci., Univ. Tokyo, Sec. 4, 9: 279–290.
- Koya, Y., T. Itazu and M. Inoue. 1998. Annual reproductive cycle based on histological changes in the ovary of the female mosquitofish, *Gambusia affinis*, in central Japan. Ichthyol. Res., 45: 241–248.
- Koya, Y. and E. Kamiya. 2000. Environmental regulation of annual reproductive cycle in the mosquitofish, *Gambusia affinis*. J. Exp. Zool., 286: 204–211.
- Koya, T., M. Inoue, T. Naruse and S. Sawaguchi. 2000. Dynamics of oocyte and embryonic development during ovarian cycle of the viviparous mosquitofish *Gambusia affinis*. Fish. Sci., 66: 63–70.
- Krumholz, L. A. 1948. Reproduction in the western mosquitofish, *Gambusia affinis affinis* (Baird & Girard), and its use in mosquito control. Ecol. Monogr., 18: 1–43.
- Nishi, K. 1981. Circadian rhythm in the photosensitive development of the ovary in the mosquito fish, *Gambusia affinis affinis* (Baird et Girard). Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 32: 211–220.
- Roberts, D., D. K. Okimoto, C. Parsons, M. Straume and M. H. Stetson. 2003. Development of rhythmic melatonin secretion from the pineal gland of embryonic mummichog (*Fundulus heteroclitus*). J. Exp. Zool., 296A: 56–62.
- Stacey, N. E. 1984. Control of the timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. Pages 207–222 in G. W. Potts and R. J. Wootten, eds. Fish reproduction: Strategies and tactics. Academic Press, London.
- Turner, C. L. 1937. Reproductive cycles and superfetation in Poeciliid fish. Biol. Bull., 72: 145–164.
- Vondracek, B., W. A. Wurtsbaugh and J. J. Cech, Jr. 1988. Growth and reproduction of the mosquitofish, *Gambusia affinis*, in relation to temperature and ration level: consequences for life history. Env. Biol. Fish., 21: 45–57.
- Yamada, H., H. Chiba, M. Amano, M. Iigo and M. Iwata. 2002. Rainbow trout eyed-stage embryos demonstrate melatonin rhythms under light-dark conditions as measured by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay. Gen. Comp. Endocrinol., 125: 41–46.