

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—2015

化学农药 青鳉多代繁殖试验准则

Chemical pesticide – Guideline for Medakd multigeneration test

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2015-XX-XX发布

2015-XX-XX实施

中华人民共和国农业部发布

前 言

本标准按 GB/T 1.1-2009 的规则起草。

本标准与经济合作与发展组织（OECD）化学品测试导则草案《青鳉多代繁殖试验》（英文版）技术内容相同。

本标准做了下列结构和编辑性修改：

——计量单位改为我国法定计量单位；

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F、附录 G、附录 H 和附录 I 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业部农药检定所、浙江省农业科学院农产品质量标准研究所

本标准主要起草人：

化学农药 青鳉多代繁殖试验准则

1 范围

本标准规定了化学农药等化学品对青鳉多代繁殖影响试验的材料、条件、操作、质量控制、数据处理、试验报告等的基本要求。

本标准适用于测试和评价化学农药等化学品对青鳉的多代繁殖影响试验，其他类型的农药可参照使用。

本标准不适用于易挥发、在常用有机溶剂和水中难溶解的化学农药等化学品。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 21854-2008 化学品 鱼类早期生活阶段毒性试验

GB/T 31270.12 化学农药环境安全评价试验准则 第 12 部分：鱼类急性毒性试验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

最低可见效应浓度 lowest observed effect concentration

在一定暴露期内，与对照相比，对供试鱼产生显著影响($p < 0.05$)的最低供试物浓度，用 *LOEC* 表示。

3.2

无可见效应浓度 no-observed effect concentration

在一定暴露期内，与对照组相比对供试鱼无明显影响的供试物浓度，用 *NOEC* 表示，即仅低于 *LOEC* 的供试物浓度。

3.3

x%效应浓度 Effect concentration for x% effect

指给定的试验期限内，和对照组相比引起 x% 供试鱼出现某种效应的供试物浓度，用 *EC_x* 表示。

注：单位为 mg a. i. /L。

4 试验概述

将性成熟的亲本（F₀ 代）日本青鳉雌鱼和雄鱼配对暴露于供试物，收集鱼卵继续暴露于一定浓度供试物溶液中至子一代（F₁ 代）达到生育期，收集 F₁ 代产的鱼卵继续暴露于供试物，直至子

二代（F₂代）仔鱼孵化或 F₂代仔鱼达到生育期。试验期间观察并评估供试物对鱼类多代繁殖的慢性毒性效应和内分泌干扰作用，并确定供试物对青鳉鱼存活、发育、生长和繁殖的无观察效应浓度（NOEC）和可观察效应浓度（EC_x）。

5 试验方法

5.1 材料和条件

5.1.1 供试生物

5.1.1.1 鱼种选择与驯化

选择健康、未接受疾病治疗并达到性成熟的日本青鳉（*Oryzias latipes*），在水质、光照和温度条件与试验条件相似的条件驯化至少两周。驯化期间用丰年虾、卤虫幼体饲喂，并进行观察记录。驯化期间，经 48 h 的稳定期后，记录培养鱼群的死亡数，并按照以下标准操作：

- 7 天内鱼群的死亡数超过 10%，该批鱼全部不能用于试验；
- 7 天内鱼群的死亡数在 5-10%之间，再驯化 7 d 直至 2 周的驯化期结束；若在第二个 7 d 内死亡数超过 5%，该批鱼全部不能用于试验；
- 7 天内鱼群的死亡数在 5% 以下，该批鱼可以用于试验；
- 在两周的驯化期间、暴露前和暴露期间不能进行疾病治疗；
- 具有疾病症状的鱼不能使用。

5.1.1.2 试验用鱼

选择在 25±2℃等条件下同一批驯化的、鱼龄为自受精卵≥12 周、性别差异明显且遗传稳定的成年鱼，应避免使用基因型为 XX 的假雄鱼，用来繁殖配对的雌雄 F₀代应该是 XX 基因型配对 XY 基因型。试验前一周，应确保试验成鱼具有活跃的繁殖能力（具有产卵能力）。试验至少需要雌雄 42 对鱼来保证足够的重复，当有溶剂对照时要用 54 对。

同性别的试验用鱼的体重差异应该保持在该性别鱼群体重的算数平均值的±20%范围内，在试验前应抽样测量试验用鱼的体重，计算平均体重和可接受误差。雌鱼体重应≥ 300 mg，雄鱼体重应≥ 250 mg。

试验期间用丰年虾、卤虫幼体每天饲喂两次，温度为 25 ±2℃，光暗比为 16 h: 8 h。

5.1.1.3 观察培养

鱼可以喂食卤虫丰年虾（24 h 龄幼虫），如需要，可补充喂食商用片状食品。商用片状食品应定期检测污染物含量，如有机氯杀虫剂、多环芳烃、多氯联苯等。应该避免使用具有雌激素效应的食物。未吃掉的食物及排泄物应按规定要求移出容器，如用虹吸小心地清除容器底部的残余食物及排泄物。鱼缸的边缘和底部每周用刮刀清洗 1~2 次。试验期间，应注意保证每个重复组喂食同样量的食物，饲喂时间表参见附录 E。

5.1.2 供试物

农药原药或制剂。难溶于水的可用少量对鱼类毒性小的有机溶剂、乳化剂或分散剂等助溶。

已知可用的助溶剂包括：二甲基亚砜、三甘醇、甲醇、丙酮、乙醇。应尽可能的避免使用助溶剂或载体，当使用助溶剂时，助溶剂的浓度不应超过 100 $\mu\text{L/L}$ 或 100 mg/L ，并以供试物使用的助溶剂最大浓度作为溶剂对照组。

5.1.3 主要仪器设备

主要仪器设备如下：

——溶解氧测定仪

——pH 测定仪；

——酸度计；

——空间大小适宜的温控监测系统；

——电子天平。

5.1.4 试验用水

试验用水应适合供试鱼的长期生长，整个试验期间水质应保持恒定。应对试验用水定期取样分析，测定重金属（如 Cu、Pb、Zn、Hg、Cd、Ni）、主要阴/阳离子（如 Ca、Mg、Na、K、Cl、 SO_4 ）、其他农药、总有机碳和悬浮物的含量。当已知试验用水的水质相对稳定，可每六个月测定一次。合格试验用水的化学特性见附录 B。

5.2 试验操作

5.2.1 方法的选择

按照农药的特性选择静态、半静态或流水式试验法。推荐采用流水式试验法。使用流水式试验法时，应利用合适的计量泵将供试物贮备液分配至试验系统，试验暴露前应将贮备液和试验溶液的流速调节成一致，并且在试验期间应定期检查流速。各个容器的试验溶液应根据供试物的稳定性和水质进行适当的更新（如每天更新 5-16 倍试验体积或流速 20 mL/min ）。

5.2.2 试验设计

5.2.2.1 试验浓度

选择浓度范围时应尽可能考虑所有的资料信息，包括定量结构活性关系（QSAR）、相似物的信息和已有的鱼类毒性试验结果。可进行包括繁殖试验在内的预试验，以确定试验浓度范围。在进行预试验时，其试验条件（水质、试验系统、生物负荷量）应尽可能的与正式试验一致。至少按等比使用 5 个浓度，最高浓度不应该超过最高水溶解度，10 mg/L 或是 96 h- LC_{50} 的 1/10。最低浓度应该低于最高浓度的 1/10-1/100，各浓度间级差应 ≤ 3.2 。

5.2.2.2 试验重复

每试验浓度至少 6 个重复容器（见附录 G）。在繁殖期间（ F_0 代除外），为了进行繁殖能力评估，重复组应设 2 个平行，每平行中只需放置一对配对鱼。

除试验的供试物处理组外，还应视需要设空白对照组和溶剂对照组。为确保能够进行统计分析，对照组的重复也需设 2 个平行（即对照组至少需设 12 个重复）。在繁殖期间，对照组的重复

数应加倍（即至少 24 个重复，且每个重复中只需放置一对配对鱼）。繁殖之后，对照组的重复组中不应超过 20 条鱼。

5.2.3 试验准备

试验前，将符合试验要求的配对鱼移入各个试验容器中。每个试验容器为一个重复组，将其放置于暴露系统并曝气。

5.2.4 试验暴露

5.2.4.1 暴露条件

试验参数和条件见附录 A。试验结束时，对照组的终点指标效应参数一般应与附录 C 中的所列要求一致，当试验成熟时，可以做适当调整。

试验过程中，各处理组和空白对照组至少测定一个试验容器中的溶解氧、pH、氨和温度。试验期间，温度每天进行测定，其他指标至少每周测定一次。

5.2.4.2 各暴露阶段

5.2.4.2.1 1-3 周 (F_0)

满足产卵要求的 F_0 代暴露 3 周，使发育中成鱼的配子体和性腺组织暴露在供试物溶液中。各重复试验容器放入一繁殖对（XX 雌鱼:XY 雄鱼繁殖对）。从试验第 1 天开始，连续 21 天收集鱼卵，计数并评价受精情况。

5.2.4.2.2 4 周 (F_0 和 F_1)

收集同一天的受精卵和存活卵（胚胎），当胚胎不足时，可收集两天内的胚胎。将收集到的胚胎混合随机分配到每一重复孵化器中，每孵化器 20 个胚胎（卵孵化器示例见附录 F）。如有一个处理需要第二天收集的胚胎，则所有处理组（包括对照组）也应按同一操作进行。当第二天收集的胚胎数不足时，可减少胚胎数至 15 个/孵化器。再低时，需减少重复数，以确保每个孵化器有 15 个胚胎。第 24 天时，对 F_0 繁殖成鱼实施安乐死并记录其体重和体长。

5.2.4.2.3 第 5-6 周 (F_1)

在预期孵化开始前 1-2 天，停止或减少孵化卵的搅动以促进孵化。胚胎每天孵化时，将刚孵出的 F_1 代小鱼合并在一起并系统分配到每一重复的幼鱼容器中，每一容器不超过 12 尾。分配时刚孵小鱼随机选择，每一刚孵小鱼随意汲取并放入连续重复中，通过重复间的有序移动直至处理内所有重复都有 12 尾刚孵小鱼。若刚孵小鱼不足时，确保尽可能多的重复有 12 尾刚孵小鱼来启动 F_1 阶段试验。记录孵化鱼数，计算每一重复的孵化率。

5.2.4.2.4 第 7-11 周 (F_1)

每天检查和记录所有重复中幼鱼的存活情况。第 43 天时，记录每一重复中存活鱼数，即各重复开始时放入的孵化幼鱼数（通常是 12 尾）。用于计算从孵化到亚成鱼阶段的存活率。

5.2.4.2.5 第 12-13 周 (F_1)

第 78-85 天时，从所有鱼的尾鳍部分采集小量样品用于检测个体遗传性别（如鳍剪下物）。遗传性别检测后 3 天内，每处理随机建立 12 对繁殖对，对照为 24 对。随机从每重复选择两尾基因型 XX 和基因型 XY 的 F₁ 代亚成鱼按性别混合在一起，然后随机选择建立 F₁ 代繁殖对 (XX:XY 对)。按每重复一对繁殖对，每处理至少 12 个重复，对照至少 24 个重复。当某重复不足两尾基因型 XX 或两尾基因型 XY 的 F₁ 代亚成鱼用于混合，可从同一处理其它重复中选择适宜的遗传性别。剩余的 F₁ 代亚成鱼（每重复最多 8 尾）实施安乐死并取样用于各种亚成鱼终点指标测定。保留所有亚成鱼样品的 DMY 基因数据（XX 或 XY）以确保所有终点指标数据与每一尾鱼遗传性别相关。

5.2.4.2.6 第 13-14 周 (F₁)

在亚成鱼繁殖对发育到成鱼阶段继续暴露。第 98 天卵收集开始前的时间，从试验容器中和雌鱼身上移走鱼卵。

5.2.4.2.7 第 15-17 周 (F₁)

连续 21 天每天收集各重复鱼卵，并评价产卵率和受精率。

5.2.4.2.8 第 18 周（与第 4 周重复）(F₁ 和 F₂)

第 120 天时，于清晨从各重复容器中收集 F₁ 代鱼卵。评价后将从各繁殖对中收集的受精卵（细丝移去）混合，并系统分配到卵孵化容器内，每容器 20 粒受精卵。孵化器可置于各处理分开建立的“孵化器容器”内或包含幼鱼的重复容器内。胚胎宜在一天内收集。若胚胎不足时，可收集两天内的胚胎，将收集到的胚胎混合随机分配到每一重复孵化器中，每孵化器 20 个胚胎。当一个处理需第二天收集的胚胎，则所有处理组（包括对照组）应按同一操作进行。如果第二天收集的胚胎数不足时，可减少胚胎数至 15 个/孵化器。再低时，需减少重复数，以确保每个孵化器有 15 个胚胎。第 121 天（或第 122 天，以确保 F₂ 已开始）时，对 F₁ 繁殖对实施安乐死并按照成鱼终点指标进行分析。

5.2.4.2.9 第 19-20 周 (F₂)

在预期孵化开始前 1-2 天，停止或减少孵化卵的搅动以促进孵化。若试验以 F₂ 孵化完成来结束，计数并丢弃每天刚孵小鱼。（延长孵化时间后，即在对照孵化期两倍天数尚未孵化的胚胎可认为是不能存活胚胎）。若试验暴露延伸到 F₂ 繁殖阶段，则可按 5.2.4.2.3 第 5-6 周的方法操作。

5.2.4.2.10 第 21-32 周（可选 F₂）

根据供试物特性（如高生物蓄积或持久性）确定试验是否延续至第 32 周，即 F₂ 代达到繁殖阶段。此期间试验操作按第 7-18 周的过程操作。第 218 天时（第 32 周第一天），对所有 F₂ 代繁殖对实施安乐死并按照成鱼终点指标进行分析。

具体时间安排参见附录 D。

5.2.5 分析方法

暴露开始前，应建立供试物浓度分析方法。试验过程中，供试物的浓度至少每周测定一次，并在每处理组的重复中轮流选择测定。

试验过程中，稀释液和储备液的流量定时检测（至少一周三次）。试验结果推荐使用实测浓度表示。但当实测浓度保持在理论浓度的±20%以内，试验结果也可用理论浓度表示。

5.2.6 观察和记录

5.2.6.1 一般要求

非内分泌干扰化合物观察指标包括生殖力、胚胎孵化率、生长存活率。每天也要进行行为观察并记录任何异常行为。内分泌干扰化合物观察指标包括免疫分析的肝脏卵黄蛋白原 mRNA 或者卵黄蛋白原蛋白水平、性别特征如雄鱼臀鳍乳突、性腺肾脏肝脏组织病理学评价（指标列表见表1）。组织病理学的高效应用应包括从高浓度处理组到最大无影响浓度组。在个体遗传性别确定条件下，这些观察指标的评价是以青鳉雄性决定基因 DMY 的存在与否为基础的。

5.2.6.2 观测指标

本试验是以观测供试物药液对鱼类繁殖产生不利效应为目的，一般包括：通过内分泌干扰途径如对丘脑、垂体、性腺（HPG）的干扰而影响繁殖的不利效应；通过非内分泌干扰途径造成鱼类慢性中毒如存活率、生长（体长和体重）和繁殖力的减少等不利效应，其他类型的试验如全生活史试验和早期生命阶段试验所需观测的不利效应制标均已包括在本试验观测制标中。此外，在记录死亡率的同时，还应在受精后 4 周（试验开始后 7 周和 21 周）剔除仔鱼后、受精后 9-10 周（试验开始后 26-27 周）幼鱼取样后、取样成对的成鱼三种情况下计算存活率。

本实验的数据，能同时评价至少两种一般类型的以损害繁殖为结果的有害结局通路（AOPs），一条是内分泌介导的通路涉及对下丘脑-垂体-性腺（HPG）路径的干扰，另一条路径是非内分泌路径介导的毒性所造成存活率、生长（体长和体重）和繁殖力的减少。在慢性毒性试验中测量的，用于评价非内分泌物质介导的毒性通路和内分泌物质介导的毒性路径的典型终点指标，如全生活史试验和早期生命阶段试验中的指标，都包含在本试验中。另外，应记录死亡率，并计算，在受精后 4 周（试验开始后 7 周和 21 周）剔除仔鱼后、在受精后 9-10 周（试验开始后 26-27 周）幼鱼取样后、和成对的取样成鱼三种情况下的存活率。

表 1 青鳉多代繁殖试验终点指标汇总

生活阶段	终点指标	代数
胚胎（2 wpf *）	孵化	F ₁ , F ₂
幼鱼（5 wpf）	存活	F ₁ , 或加F ₂
亚成鱼（9或10 wpf）	存活率	F ₁ , 或加F ₂

	生长（长度和重量）	
	卵黄蛋白原（mRNA或蛋白）	
	第二性征（臀鳍突起）	
成鱼（12-14 wpf）	繁殖（产卵率和受精率）	F ₀ , F ₁ , 或加F ₂
成鱼（15 wpf）	存活	F ₁ , 或加F ₂
	生长（体长度和体重）	
	第二性征（臀鳍突起）	
	组织病理学（性腺、肾脏和肝脏）	

*wpf: 受精后周数

5.2.7 注意事项

5.2.7.1 试验鱼的处理

每一代鱼（F₀、F₁ 和 F₂）暴露期结束时，对接近成年的试验鱼作二次抽样。并用一定剂量的麻醉液（如三卡因甲磺酸盐，MS-222(CAS.886-86-2)进行安乐死处理，三卡因浓度为 100-500 mg/L，用 300 mg/LNaHCO₃（碳酸氢钠，CAS.144-55-8）缓冲，濒死的鱼也应用麻醉剂进行安乐死处理。

5.2.7.2 胚胎和仔鱼的处理

5.2.7.2.1 卵收集

收集 F₀ 代的卵应在第四周的第一天或前两天进行，收集 F₁ 代的卵应在第 18 周的第 1 天或前两天进行，此时 F₁ 代的鱼龄是受精后 15 周的成年鱼。开始收集卵之前，务必先清除每对亲本以前产的卵，保证所收集的卵都是来自同一批次。卵通常粘着在雌鱼身上或沉淀于试验容器的底部，一般采用虹吸的方法小心将雌鱼身上或容器底部的卵收集移出，注意清除卵膜，以避免卵聚集成团。试验应保证同一处理的每个重复都能孵化出仔鱼。

5.2.7.2.2 受精卵培养

应采用水中充气、水流垂直扰动等方式不断搅拌受精卵使其运动起来，每天检查并记录受精卵（胚胎）的死亡数，并清除死卵。受精后第 7 天，停止或减小搅拌，使受精卵沉在孵化器底部，促进卵孵化，观察并记录每处理组和对照组中孵化的仔鱼数，超过对照组孵化期两倍时间（通常为受精后 16 天或 18 天）仍未孵化的受精卵，应视为死卵并予以清除。

刚孵出的仔鱼先混合在一起，然后系统地分配到每重复的容器中，整个试验期间试验鱼数量及容器设置原理见附录 G。每容器保证有相同数量的孵化仔鱼（一般每容器 12 条，最多 20 条）。仔鱼分配可先随机地从处理中挑出一条，然后按顺序放入容器中。前一步试验的每个处理组应尽

可能多设几个重复，以保证此阶段试验每容器中至少有 12 条仔鱼。多余的仔鱼应实施麻醉安乐死处理。

5.2.7.3 雌雄亲本配对

5.2.7.3.1 遗传学性别判断

在受精后 9-10 周采集鳍部组织来判断遗传学性别（F₁ 代的取样时间是受精后 12-13 周），采样前，先麻醉同一缸里的所有鱼，然后从每条鱼的背部或尾部腹鳍取少量的组织，也可采用其他方法取样，如切取背侧或腹侧的尾鳍。来自同一个鱼缸的样本宜分开放置，也可混合封装在一起。

提取每个鳍片组织的 DNA，通过聚合酶链式反应（PCR）鉴定个体是否具有 *dmy* 基因。具有 *dmy* 基因的个体是 XY 型雄性，不具有 *dmy* 基因的个体是 XX 型雌性。

5.2.7.3.2 繁殖对的建立

通过前述方法进行遗传学性别判断后，即可建立 XX:XY 型的性成熟的雌雄配对亲本，外形明显异常的鱼（如鱼鳔异常、脊柱畸形、体长异常等）不能用来作为繁殖亲本。如果 F₂ 代的试验延长（如到 26-27 周），则相应的取样时间点和试验步骤不变。在产卵期的 F₁ 代和 F₂ 代，每个鱼缸中只可放入一对 XX:XY 型配对亲本。

5.2.7.4 亚成鱼体的取样和终点指标的测定

5.2.7.4.1 非繁殖亲本的取样

建立繁殖亲本配对后，剩余 F₀ 代鱼应实施安乐死，并测定亚成年鱼终点指标。此时，F₁ 代的鱼龄为 12-13 周，F₂ 代的鱼龄为 26-27 周。每条鱼均需测定多项终点指标，包括：幼鱼或亚成鱼的存活率（测定时此指标时，F₁ 代的鱼龄为 7-12/13 周，F₂ 代为 21-26/27 周）、体长（如性别分析时剪掉了尾鳍，则应测量去除尾部的标准体长；如只对背鳍或腹鳍取样，则应测定总体长）、体重（如湿重或吸干表面水分后的体重）、肝脏 *vtg* mRNA（或者 VTG）和臀鳍乳突（参见表 1 和 2）。并应测定繁殖亲本的体重和体长用于计算平均生长速率。

5.2.7.4.2 组织取样的测定

肝脏解剖后储存在不高于 -70℃ 下直到完成 *vtg* mRNA(或 VTG)的测定，鱼尾等臀鳍用合适的固定剂（如 Davidson）保存或拍照保存，用于日后乳突物的计数，必要时，还可取其他组织（如性腺）。肝脏 VTG 浓度通常用 ELISA 法测定（参见附录 F 中 TG229 推荐的方法）。*vtg* mRNA 的含量测定（比如从肝脏样品提取的 *vtg* I 基因的 mRNA 的拷贝数的确定），可用定量 PCR 法测定，也可测定处理组或对照组的 *vtg* I 基因的表达量相对变化来表示其拷贝数。

5.2.7.4.3 第二性征

正常情况下，只有性成熟的雄性青鳉有乳突物，它位于臀鳍线的联合板处，乳突物可作为雄鱼的性征，也可作为内分泌干扰效应的生物标志。臀鳍乳突物（乳突联合板数量）的计数方法参

见附录 H。

5.2.7.5 繁殖力和受精率的评价

F_0 代的繁殖力和受精率的评价从试验开始后的 1-3 周内进行, F_1 代的繁殖力和受精率的评价从试验开始后的 15-17 周进行, F_2 代的繁殖力和受精率的评价从试验开始后的 29-31 周进行。每天都收集每对繁殖亲本产的卵, 连续收集 21 天。每天早上, 从雌鱼鱼体或者从鱼缸底部用虹吸法小心收集。每天记录每对繁殖亲本的繁殖力和受精率。繁殖力用产卵的数量来定义, 受精率用受精的数量和成活卵的数量来定义。卵收集后应尽快完成计数。

5.2.7.6 成鱼取样和终点指标评估

5.2.7.6.1 繁殖对的取样

试验进行 17 周后 (此时 F_2 代应已孵化成功, 即孵化 3 周后, 有 80% 以上存活率), F_1 代繁殖亲本鱼可实行安乐死并进行终点指标评估 (见表 1 和 2)。先对臀鳍进行拍照以便于统计臀鳍乳突数量 (见附录 H), 也可切下生殖孔后部的尾巴并用固定液固定方便日后统计乳突数量。还可对尾鳍取样用于 *dmy* 基因分析来鉴定性别。浸泡鱼体前, 可在鱼体上开洞便于固定剂 (如 Davidson) 充分进入鱼体。如有其它方法可使固定剂进入鱼体, 则不必在鱼体上打洞。若试验延长到 F_2 代, 则应采取相同操作要求和步骤 (暴露第 32 周)。

5.2.7.6.2 组织病理学

每条繁殖亲本鱼的性腺、肾脏和肝脏可用于组织病理学评价。当组织病理学指标数值出现从最高浓度处理组 (相对于对照组) 到无效应浓度处理组下降的趋势时, 则可视为最有效地利用了资源。性腺表型也来源于此评价。

6 质量控制

6.1 质量控制条件

试验有效性的质量控制应同时满足以下条件:

- 试验期间, 试验溶液的溶解氧浓度不小于 60% 空气饱和值;
- 试验期间的水温应控制在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 单个处理的水温差不超过 $\pm 2^\circ\text{C}$ 。同一处理的不同重复间和不同处理之间的温差不应有显著差异;
- 各代 (F_0 、 F_1 、 F_2) 的对照组的产卵量应 > 20 粒/d。在试验过程中所有卵的孵化率应 $> 80\%$ 。此外, 24 对对照亲本中至少 16 对的产卵量应 > 20 粒/天;
- 对照组 (F_1 和 F_2) 的卵孵化率平均值应 $\geq 80\%$;
- F_1 和 F_2 代对照组, 从孵化到受精后 3 周期间的仔鱼存活率平均值应 $\geq 80\%$, 同时从受精后第 3 周到本代试验结束 (约受精后第 15 周) 的存活率平均值应该 $\geq 90\%$;
- 试验期间供试物的理论浓度值与实测浓度值的差异 $\leq \pm 20\%$ 。

6.2 其它条件

以下条件虽不是试验有效性的质量控制条件，但可保证能够计算 *ECx* 或 *NOEC* 值：

——虽然在最高浓度处理组中繁殖量下降，但至少在第三高浓度处理组有足够数量的后代，并且在所有低浓度处理组中 F_0 代应产生充满孵化器的足量后代；

——在第三高浓度组和低浓度组的 F_1 代有足够的胚胎存活率保证在后续性成熟时终点指标评估的用鱼量；

—— F_1 代在第二高浓度组孵化后的仔鱼存活率应 $\geq 20\%$ 。

7 数据与报告

7.1 统计分析方法

7.1.1 不同性别试验用鱼的数据

不同性别试验用鱼的数据应该分别分析（如 XY 雄性和 XX 雌性的数据统计要分别进行）。数据统计分析可参照附录 I

7.1.2 试验设计和终点指标

应采用合理的试验设计以满足相应统计学方法要求，应该有足够的效力（80%或更高），并能对发现重要生物学终点指标的变化进行统计学量化分析，从而获得 *NOEC* 值。发现或估计每个重要终点指标的百分比变化应该能被鉴定。试验设计可根据上述要求进行调整，重点关注重要的终点指标。

7.1.3 数据处理和方法选择

数据处理的统计学方法或模型的选择参见附录 I，但不限于推荐的统计方法。应对每组重复内变异使用方差分析或其它恰当的统计分析方法。各浓度处理组和对照组之间的多重比较，宜采用步进方法处理。当数据与单一浓度反应数据不一致，则应使用 Dunnett's 检验或 Dunn's 检验（必要时应进行数据转换）。产卵率统计分析应采用各处理重复的平均值，转换后进行单因素方差分析，最后用 Dunnett 法比较。组织病理学数据先要进行严重程度评分，然后用一种新的统计检验方法 Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) 进行处理。应报告在处理组中观察到的那些与对照组明显不同的终点指标，统计上的显著差异可能有生物学意义。

7.2 数据分析

7.2.1 异常数据的处理

异常毒性症状是指在受精后 3 周到 9 周之间，任一重复的死亡数大于 4 尾，这种死亡又不能用技术误差来解释。其它异常毒性症状包括出血、异常行为、异常游动方式、厌食及其它一些临床病状。对于亚致死毒性症状，需要参照试验用水对照（清水）进行定性评价。若最高处理中有明显的异常毒性数据，建议删除这些数据。

7.2.2 溶剂对照

当比较溶剂对照组与空白水对照组的终点指标存在统计学显著性差异，则供试物处理组的相关数据应与溶剂对照组进行比较，或结合专业知识来鉴别毒性的有效性；当溶剂对照组与空白对照组间无统计学显著性差异，则可将供试物处理组与两对照组合并后的结果进行比较。

7.3 试验报告

试验报告必须包括以下内容：

——供试物信息：包括供试农药的通用名、化学名称、结构式、CAS 号、纯度、基本理化性质、来源等；

——供试生物信息，包括：学名，品系（若有），来源，受精卵的收集方法及其随后的处理；

——试验条件：包括光周期、试验设计（如容器大小，材料和水量，试验容器数和重复数，每重复孵化数等）、母液配制方法和更换频率（若使用溶剂，应列出名字及其浓度）、受试物给药方法（如泵，稀释系统）、方法回收率和理论浓度（定量限，平均测量值、标准偏差及其计算方法、参照真溶液中供试物浓度测量的证据）、试验用水特征（pH，硬度，温度，溶解氧浓度，残氯量，总有机碳含量，悬浮颗粒物，盐度及其它测量指标）、平均测量值及其标准偏差、试验容器中的水质（如氨，pH，温度（每天）和溶解氧浓度）、试验满足质量控制条件的证据、

——对照组（溶剂对照组，若有）和处理组的数据如下，F₁ 和 F₂ 的孵化（孵化率和孵化时间），F₁ 和 F₂ 的孵化后存活率，F₁ 和 F₂ 的生长（体长和体重），F₁ 和 F₂ 遗传性别和性分化（如基于臀鳍突起和性腺组织学的第二性征），F₁ 和 F₂ 表型性别，F₁ 和 F₂ 的第二性征（臀鳍突起），F₁ 和 F₂ 的 *vtg* mRNA（或卵黄原蛋白的蛋白质状态），F₁ 和 F₂ 组织病理学评价（性腺，肝脏和肾脏）和 F₀、F₁ 和 F₂ 繁殖（产卵力和受精力）；

——统计分析方法（回归分析或方差分析）和数据处理方法（统计学试验和使用的模型）；

——每一效应的无观察效应浓度（NOEC）；

——每一效应的最低可观察效应浓度（LOEC）（ $p=0.05$ ）；若适合，评价每一效应的 EC_x 和置信区间（如 90% 或 95%）和计算所用合适模型的图，浓度效应曲线的斜率，回归模型公式，模型参数估计值及其标准误差。

——准则和可接受标准的偏离，对试验结果的潜在后果的考虑。；

——终点指标测量结果，应写明平均值及其标准偏差。

附录 A
(资料性附录)
青鳉多代繁殖试验的条件

试验用鱼种：日本青鳉 (*Oryzias latipes*)

试验类型：流水式试验

水温：试验期间每个容器中推荐的平均温度为 $25.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

光照质量：荧光灯炮 (宽光谱 $\sim 150 \text{ lumen/m}^2$ 即 $\sim 150 \text{ Lux}$)。应注意光敏化合物如光敏过氧化物除草剂的光强，要在其毒性最大的光强下试验。

光周期：16 h 光照：8 h 黑暗

承载率： F_0 ：2 尾成鱼/每重复； F_1 和 F_2 ：开始时最多 20 粒卵 (胚胎)/每重复，孵化时减少到 12 个胚胎/每重复，在受精后 9-10 周减少到 2 尾成鱼 (基因型为 XX:XY 的繁殖亲本)

试验容器最低有效容积：1.8 L (如试验容器尺寸：18×9×15 cm)

试验溶液更换量：5-16 倍试验溶液体积/d (或流速 20 mL/min)

试验开始时试验生物年龄： F_0 ：受精后 12-16 周； F_1 和 F_2 ：从受精开始

处理数：5 个浓度处理组及空白对照组、或溶剂对照组

每处理重复数：处理组至少 6 个重复，对照组 (溶剂组，若有) 至少 12 个重复。 F_1 和 F_2 繁殖期重复数翻倍。

每个试验生物数量： F_0 至少 84 尾鱼， F_1 和 F_2 至少各需要 504 尾鱼。若有溶剂对照，则 F_0 至少 108 尾鱼， F_1 和 F_2 至少各需要 648 尾鱼。

饲喂：喂以丰年虾 (*Artemia spp.*) (24 h 龄幼虫) 供其自由取食，也可辅以商品化薄片饲料 (饲喂计划见附录 E)

曝气：当溶解氧 $< 60\%$ 空气饱和值时，应曝气充氧。

试验用水：清洁的地表水，井水或重组水或脱氯自来水

暴露周期：约 19 周 (从 F_0 到 F_2 代孵化)，或 32 周 (至 F_{32} 繁殖)

生物学终点指标 (主要)：孵化能力 (F_1 和 F_2)；存活率 (F_1 代，从孵化到受精后 3 周，受精后 4-9 周或 10 周，受精后 9-15 周)；生长 (F_1 代，受精后 9 周和受精后 15 周的体长和体重)；第二性征 (F_1 代，受精后 9 周和受精后 15 周的臀鳍乳突)；卵黄蛋白原 (F_1 代，受精后 15 周的 *vtg* mRNA 或 VTG 蛋白)；性别表型 (F_1 代，受精后 15 周的性腺组织学)；繁殖率 (F_0 和 F_1 代，连续 21 d 的产卵率和受精率)；组织病理学 (F_1 代，受精后 15 周的性腺、肝脏和肾脏组织病理学)

生物学终点指标 (可选)：存活率 (F_2 代，从孵化到受精后 3 周，受精后 4-9 或 10 周，受精后 9-15 周)；生长 (F_2 代，受精后 9 周和受精后 15 周体长和体重)；第二性征 (F_2 代，受精后 9 周和受精后 15 周的臀鳍乳突)；卵黄蛋白原 (F_2 代，受精后 15 周的 *vtg* mRNA 或 VTG 蛋白)；性别表型 (F_2 代，受精后 15 周的性腺组织学)；繁殖率 (F_2 代，连续 21 d 的产卵率和受精率)；组织病理学 (F_2 代，受精后 15 周的性腺、肝脏和肾脏组织病理学)

试验有效性质量控制条件：溶解氧浓度 $\geq 60\%$ 空气饱和值；试验期间平均水温是 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ；对照中雌鱼成功繁殖率 $\geq 65\%$ ；对照组的平均每天产卵量 ≥ 20 粒卵；对照组的 F_1 和 F_2 代各自的平均孵化率 $\geq 80\%$ ；对照组中 F_1 和 F_2 代各自的从孵化到受精后 3 周幼体的平均存活率 $\geq 80\%$ ，对照组中 F_1 和 F_2 代各自的从受精后 3 周到当代结束时的平均存活率 $\geq 90\%$

附录 B
(资料性附录)
合格试验用水的化学特性

合格试验用水的化学特性见表 B. 1。

表 B.1 合格试验用水的化学特性

物质	限量浓度
颗粒物	5 mg/L
总有机碳	2 mg/L
非离子氨	1 µg/L
残氯	10 µg/L
总有机磷农药	50 ng/L
总有机氯农药加多氯联苯	50 ng/L
总有机氯	25 ng/L
铝	1 µg/L
砷	1 µg/L
铬	1 µg/L
钴	1 µg/L
铜	1 µg/L
铁	1 µg/L
铅	1 µg/L
镍	1 µg/L
锌	1 µg/L
镉	100 ng/L
汞	100 ng/L
银	100 ng/L

附录 C
（资料性附录）
空白对照的典型参数

下列参数是通过一定数量的有效试验获得的，随着更多试验的积累可能需要修正。

1 生长量

采样测量受精后 9 或 10 周和 15 周时所有试验用鱼的体重和体长。本准则推荐：受精后 9 周大的雄鱼的湿重约 85 mg -145 mg，雌鱼的湿重是 95 mg -150 mg。受精后 15 周的雌雄鱼的体重分别约为 280 mg -350 mg 和 250 mg -330 mg。当出现单尾鱼偏离这个范围，对照组的平均体重也显著超出这个范围，尤其是超出下限，表明在饲喂、温度控制、水质、病害等单方面或多方面存在问题。

2 孵化率

对照的孵化率典型值约 90%左右，当低至 80%可视为不正常。当孵化率 < 75%时，可能表明卵发育过程中伴随的搅拌不够，或清除死卵不及时而感染真菌等对卵的处理不够仔细。

3 存活率

对照组从孵化到受精后 3 周和后续 时段的存活率通常为 90%或更高，但早期阶段存活率可低至 80%，但低于 80%时应引起注意，可能是试验容器不够清洁导致的仔鱼生病死亡或低浓度溶解氧引起的窒息死亡，或是容器清洁操作时受伤死亡及试验容器排水系统引起的仔鱼损失。

4 卵黄蛋白原基因

由于操作方法或仪器的不同，不同实验室测量的每 ng 总 mRNA 中卵黄蛋白原 vtg 基因的拷贝数差别会很大。但是，对照雌鱼的 vtg 基因的拷贝数比雄鱼一般高约 200 倍，高至 1000 到 2000 倍也不是不可能。当比率低于 200 倍时，可能存在样品污染或操作和/或试剂有问题。

5 第二性征

对于受精后 9-10 周的雄鱼来说，正常范围的第二性征定义为臀鳍突起上鳍条片数量为 40-80。受精后 15 周时，对照组中雄鱼臀鳍突起上鳍条片数量约为 80-120，而雌鱼为 0。在原因不清楚情况下，有时雄鱼在受精后 9 周没有突起但后来所有雄鱼在 15 周时又长出突起，这很有可能是由延迟发育引起的。对照中雌鱼出现突起表明种群中有基因型为 XX 的假雄鱼出现。

6 XX 假雄鱼

在 25℃时，通常 XX 假雄鱼出现概率为 4%或更低，随着温度的增加而升高。驯养应采取措 施尽量减 XX 假雄鱼比例。由于 XX 假雄鱼的发生具有遗传组分并可遗传，因此检测试验用鱼并确保 XX 假雄鱼不会在试验体系中增殖，是减少试验种群中 XX 假雄鱼发生的有效方法。

7 产卵活动

在评价繁殖力之前，应每天检测对照组各重复的产卵活动。通过对照组量化评估可提供产卵力参考依据。孵化后 12-14 周时，大部分对照繁殖配对都应产卵。产卵的繁殖配对数量低，表明健康、成熟度或环境条件存在问题。

8 繁殖力

健康的、喂养好的孵化后 12-14 周青鳉一般每天产卵 15-50 粒。所有对照繁殖配对的每天平均产卵数应超过 15 粒，最高可达 40 粒。产卵数低于此量表明不成熟，营养不良或不健康。

9 受精

对照组产卵繁殖配对的受精卵百分比通常在 90%左右甚至更高。受精率低于 75%时表明个体不健康或培养条件不理想。

附录 D

（资料性附录）

青鳉多代繁殖试验暴露和测量终点指标的时间安排

青鳉多代繁殖试验暴露和测量终点指标的时间安排见表 D.1，包括 F₂ 全代的暴露时间、F₀ 代成鱼暴露 4 周，F₁ 代暴露 15 周及 F₂ 代的两种类型暴露期即到孵化（受精后 2 周）和成鱼繁殖期（受精后 15 周）。

表 D.1 青鳉多代繁殖试验暴露和测量终点指标的时间表

暴露时间表																													
世代和发育期	F ₀	1	2	3	4																								
	F ₁			1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	#	#	15												
	F ₂																1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	#	#
暴露时间	主要期(a)	<																											
	可选期(b)	<																											
试验周		1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	#	#	#	#	#	18	19	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#

终点时间表																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
繁殖		F ₀														F ₁																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				</

附录 E

（资料性附录）

饲喂计划案例

为保证试验用鱼良好的生长和发育，确保其繁殖精力，制定了表 E. 1 饲喂计划案例。饲喂计划的偏离也是可接受的，但推荐开展试验以证实所观察到的生长和繁殖是可接受的。为实施该计划，试验开始应前测定每体积丰年虾浆中丰年虾的干重。将一定体积的丰年虾浆置于预先称重的盘子中在 60℃ 温度下烘 24 h，然后称量。为了计算丰年虾浆中盐的重量，同样体积的、与丰年虾浆中一样的盐溶液也进行烘干、称重，并从丰年虾干重中扣除。或者丰年虾在烘干前先过滤然后用蒸馏水淋洗，以此来排除“盐空白”重量的测量。这一数据用于换算表中每鱼饲喂的单位体积丰年虾浆的丰年虾干重。另外，建议每周对等分丰年虾浆进行称重以证实所喂丰年虾干重量正确。

饲喂计划示例见表 E. 1。

表 E. 1 饲喂计划示例

时间（孵化后）	丰年虾（mg 干重/鱼/天）
1 天	0.5
2 天	0.5
3 天	0.6
4 天	0.7
5 天	0.8
6 天	1.0
7 天	1.3
8 天	1.7
9 天	2.2
10 天	2.8
11 天	3.5
12 天	4.2
13 天	4.5
14 天	4.8
15 天	5.2
16-24 天	5.6
4 周	7.7
5 周	9.0
6 周	11.0
7 周	13.5
8 周-牺牲	22.5

附录 F
(资料性附录)
卵孵化器示例

1. 示例 A



图 F. 1 示例 A 孵化器细部图

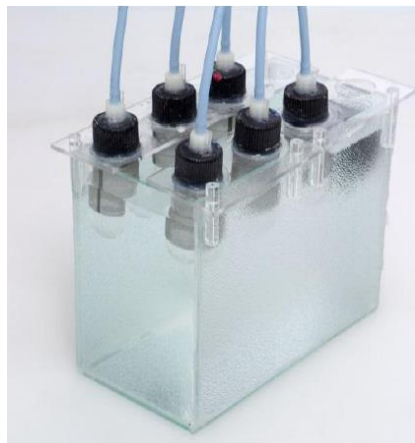


图 F. 2 示例 A 孵化器装置图

图 F. 1 和图 F. 2 所示的孵化器由横切的玻璃离心管组成，使用不锈钢套筒连接并使螺旋盖帽处于合适位置。一根小玻璃管或不锈钢管伸出帽子，置于圆形底部附近，轻轻地通气以悬浮卵和减少卵间腐生真菌感染的传递，同时也促进化学物质在孵化器与存储器之间的交换。

2. 示例 B

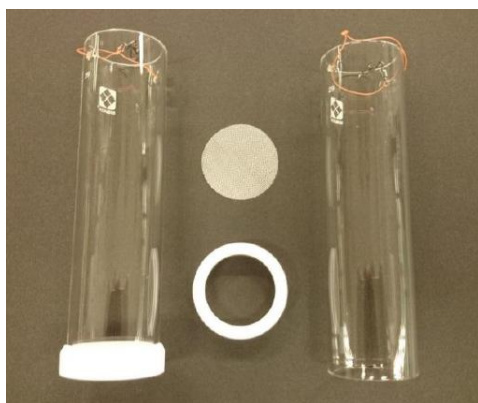


图 F. 3 示例 B 孵化器细部图



图 F. 4 示例 B 孵化器装置图

图 F. 3 和图 F. 4 所示的孵化器由玻璃圆柱体组成（直径 5 cm，高 10 cm）和不锈钢丝网（0.25 ϕ 和 32 目）组成，不锈钢丝网用 PTFE 环粘在圆柱体底部。孵化器用提升杆悬浮在容器中并以适宜周期（约 4 s 一次）垂直摇摆（约 5 cm 振幅）。

附录 G
(资料性附录)

试验期间试验鱼及容器设置原理图

1 整个试验过程中试验鱼和鱼缸设置示意图见图 G. 1。

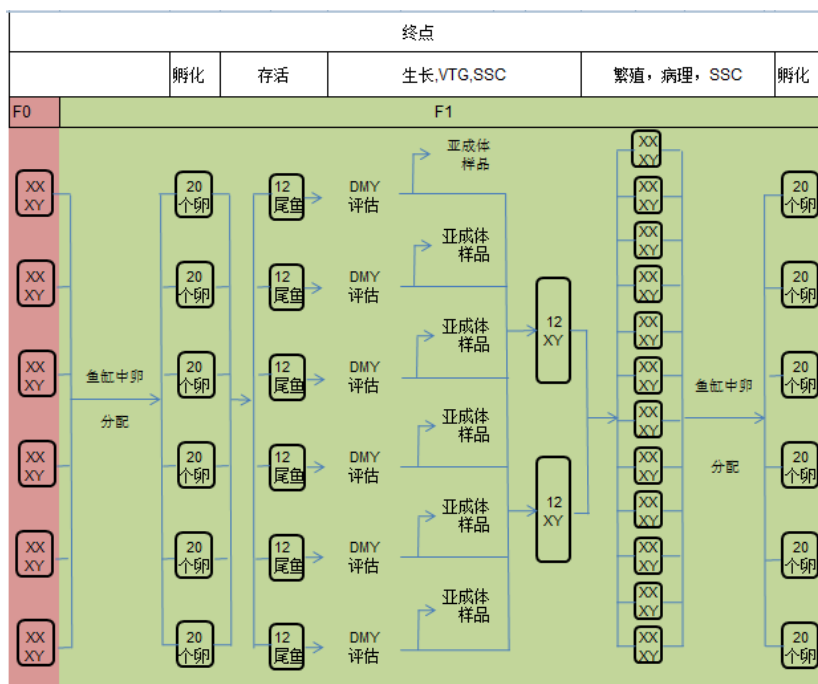


图 G. 1 整个试验过程中试验鱼和鱼缸设置示意图

图形代表一个处理或对照的一半处理。如果 F2 代维持到繁殖（未显示），其父代只能识别到 F1 代。由于整个试验过程中试验用鱼混合后安排鱼缸，因此亲本识别不能连续。注意“卵”这个术语，它是指能成活的、受精的卵（等同于胚胎）。

附录 H
(资料性附录)
臀鳍突起计数

1 主要材料和试剂

解剖显微镜（带可选摄像装置）；

固定剂（如 Davidson 固定剂，不推荐使用 Bouin 固定剂），若能从鱼体图像中直接计数可不用固定剂。

2 程序

为便于臀鳍突起计数，应对臀鳍进行拍照。当采用拍照后调查方法时，臀鳍可用 Davidson 固定剂或其它合适固定剂固定约 1 min。固定时保持臀鳍水平以利于突起计数。带臀鳍的鱼体可存放在 Davidson 固定剂或其它合适固定剂中直至使用。计数带乳突的连接板数量（见图 H.1），乳突从连接板后部边缘伸出。

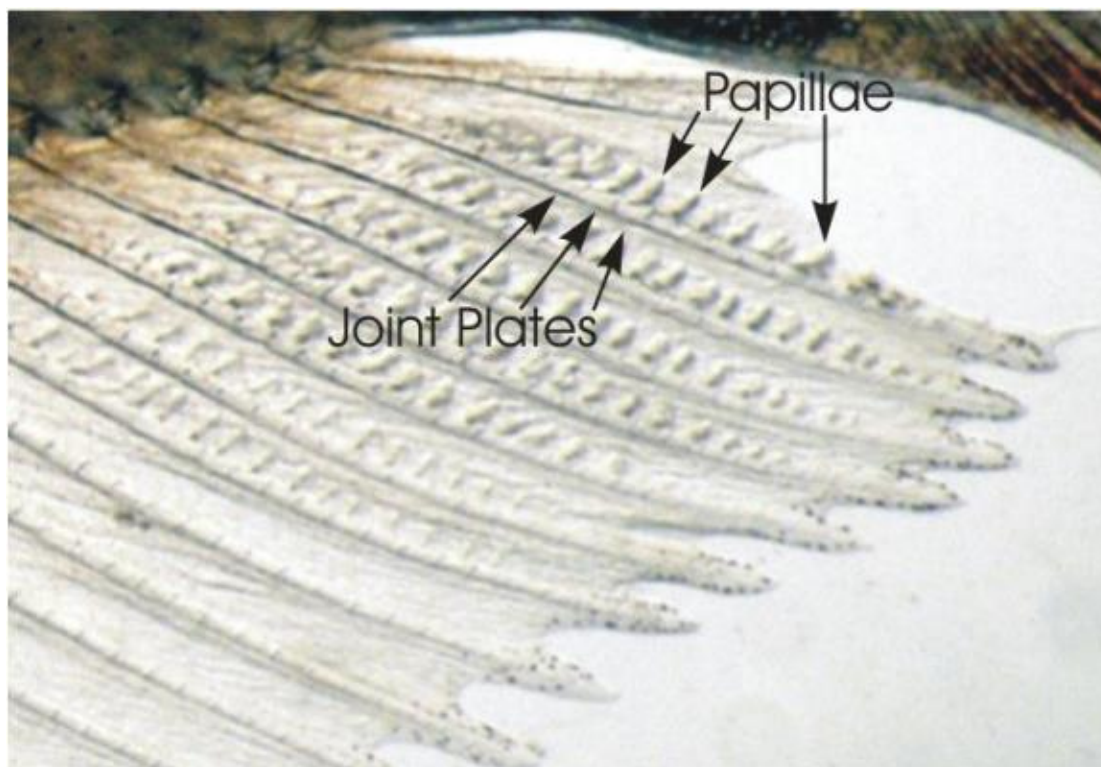


图 H.1 臀鳍突起

附录 I

（资料性附录）

统计分析

1. 概述

除病理学数据外，青鳉多代繁殖试验产生的生物学数据 *fenxi* 并不是唯一的，已经开发了許多统计方法用于准确分析相似数据的特征，如正态分布，方差齐次，以明确试验设计是否适用于假设试验、回归分析、参数与非参数检验等。一般原则，建议采用 OECD 生态毒性数据推荐的统计分析方法（OECD 2006）和参照 MMT 数据分析决策流程图（图 I.1）。

假设大多数情况下数据组表现为单调反应。此外，应考虑进行单尾统计检验和双尾统计检验比较。建议使用单尾检验，除非有生物学原因表明单尾检验不合适。以下部分内容推荐相关的统计检验方法，若针对 MMT 中产生的特别数据开发了更合适的统计方法，这些统计学检验方法的优点可用于补充现有方法。

青鳉多代繁殖试验数据应按照各遗传性别分别进行分析。

1 组织病理学数据

在报告中组织病理学数据以“严重度评分”体现，“严重度评分”可通过最新开发的统计程序 Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices（RSCABS）进行评价。Rao-Scott 保留试验重复信息；*by Slices* 程序包含生物学预期即倾向于随浓度增加而增加“严重度评分”。对于每个结论，RSCABS 输出结果说明与对照比哪个处理有较高的病理学症状表现及其对应的“严重度评分”。

2 产卵力数据

应在原始数据中记录每天每重复产卵力，并在研究报告中汇报。应计算原始记录的重复平均值，然后进行平方根转换。需对转换后重复平均值进行 Dunnett 对比与单因素方差分析。

3 其它生物学数据

统计分析是基于以下假设，即在适当的剂量选择下数据是单调的。因此，数据被假设为单调的，且用线性和二次对比来正式评价单调性。如果数据是单调的，推荐使用 Jonckheere-Terpstra 来统计重复中位数趋势检验（OECD 2006 建议）。如果二次对比有意义而线性对比无时，可考虑数据为非单调的。

如果数据非单调，尤其是由于最高 1-2 个处理反应减少，应考虑审查数据组以便分析时不包括那些处理。下这个决定时需结合专业判断和所有所得数据进行，尤其是数据表明在那些处理水平有明显毒性时。

对于重量和长度，虽然偶有需要但不推荐转换。推荐卵黄蛋白原数据用 log 转换；臀鳍突起（SSC）数据用平方根转换；孵化率、存活率和受精率数据用反正弦平方根转换。

成鱼样品的生物学数据包括每重复测量值，即每重复容器有一 XX 鱼和一 XY 鱼。因此，推荐单因素方差分析用于重复平均值比较。如果方差分析假设满足（正态和方差齐性分别用 Shapiro-Wilks 检验和 Levene's 检验来评价方差分析残值），Dunnett 对比可应用于判断处理与对照是否不同。另一方面，如果方差分析假设不满足，Dunn's 检验应用于判断处理与对照是否

不同。类似程序推荐用于百分比数据（受精率，孵化率和存活率）。

亚成鱼样品的生物学数据每重复有 1 到 8 个测量值，即每遗传性别可能有不同个体数量用于重复平均值。因此，如果正态和方差齐性假设满足（方差分析混合效应残值），建议按照 Dunnett 对比使用混合效应方差分析模型。如果不满足，Dunn's 检验应用于判断处理与对照是否不同。

青鳉多代繁殖试验数据分析推荐统计程序流程图见图 I. 1。

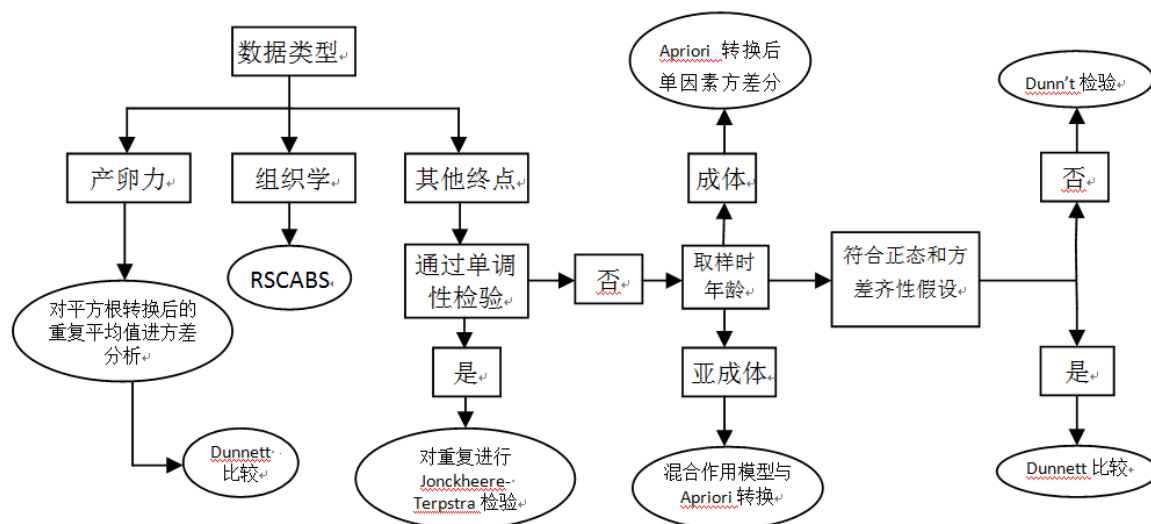


图 I 1 MMT 数据分析推荐统计程序流程图

参 考 文 献

- [1] Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan M. 2012. A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- [2] Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. 1982. A continuous-flow mini-diluter system for toxicity testing. *Water Research* 16: 457-464.
- [3] Denny JS, Spehar RL, Mead KE, Yousuff SC. 1991. Guidelines for culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- [4] Gormley K, Teather K. 2003. Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka in response to short-term exposure to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- [5] Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33:1108-1116.
- [6] Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M, Tatarazako N. 2006a. Feminization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol: effect of exposure period on spawning performance in sex-transformed females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.
- [7] Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M, Tatarazako N. 2006b. Feminization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17-estradiol: formation of testis-ova and sex-transformation during early-ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- [8] Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ, Pickford DB. 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology* 76:69-92.
- [9] Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H, Honjo T. 2002. Effects of 17-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47:71-80.
- [10] Kinoshita M, Murata K, Naruse K, Tanaka M. 2009. *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley-Blackwell.
- [11] Koger CS, Teh SJ, Hinton DE. 1999. Variations of light and temperature regimes and resulting effects on reproductive parameters in medaka (*Oryzias latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- [12] McLachlan, JA. 2001. Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews* 22, no. 3: 319-341.
- [13] Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T, Tatarazako N. 2014. Fish multigeneration test with preliminary short-term reproduction assay for estrone using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Applied Toxicology* (in press).
- [14] Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M, Scharlt M. 2003. Common spontaneous sex-reversed XX males of the medaka *Oryzias latipes*. *Genetics* 163: 245-251.
- [15] OECD. 1998. *Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 212. OECD, Paris.
- [16] OECD. 2000. *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and*

- Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on testing and assessment No. 23. OECD, Paris.
- [17] OECD. 2006. Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on testing and assessment No.54. OECD, Paris.
- [18] OECD. 2009. 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 230. OECD, Paris.
- [19] OECD. 2010. Guidance document on the diagnosis of endocrine-related histopathology in fish gonads. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on testing and assessment No.123. OECD, Paris.
- [20] OECD. 2011. Fish Sexual Development Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 234. OECD, Paris.
- [21] OECD. 2012a. Fish Toxicity Testing Framework, OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on testing and assessment No. 171. OECD, Paris.
- [22] OECD. 2012b. Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on testing and assessment No. 150. OECD, Paris.
- [23] OECD. 2012c. Fish Short Term Reproduction Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 229. OECD, Paris.
- [24] OECD. 2013. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 210. OECD, Paris.
- [25] Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K, Au DWT, 2009. Use of medaka in toxicity testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- [26] Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K. 2002. Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- [27] Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K. 2003. Fish full life-cycle testing for the weak estrogen 4-*tert*-pentylphenol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- [28] Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2004, Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations, *Zoological Science* 21: 613-619. Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M, Iguchi T. 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- [29] U.S. Environmental Protection Agency, 2013. Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated summary report.
- [30] U.S. Environmental Protection Agency, in preparation. Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines. OCSPP 890.XXXX.
- [31] Wheeler JR, Panter GH, Weltje L, Thorpe KL. 2014. Test concentration setting for fish in vivo

endocrine screening assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

- [32] Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T, Kobayashi K. 2000. Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.
 - [33] Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.
-