

3倍体ヒラメ作出試験 - I*

木村 創・狭間 弘学

ここ数年来、バイオテクノロジーを応用して魚の品種改良をしようという考えがサケ・マス類を中心に盛んに行われるようになってきた。図1に現在、魚類に実施されている染色体操作方法を示す。ヒラメは雌の成長が雄より優れていることから¹⁾ 現在、各地の研究所で図1に示す2の手法(雌性発生)によって全雌生産技術の開発が行われている。しかし、雌性発生のヒラメがすべて雌にならないことも報告されており²⁾、現在の段階ではまだまだ問題が多いと思われる。

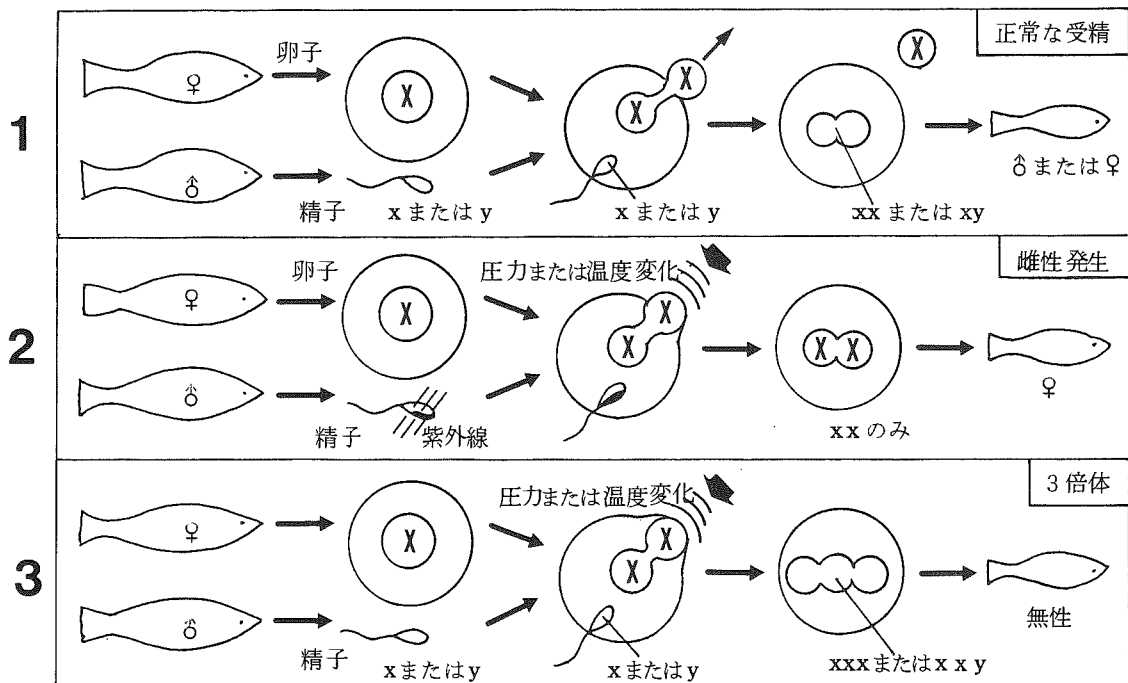


図1 魚の染色体操作 (Newton 別冊, バイオテクノロジー総集編, 1987.5 より)

そこで当场では一般的に成熟が阻害され、ひとつひとつの細胞が大きくなり、成長の促進が可能だとされている図で示す3の手法すなわち3倍体の作出方法について検討した。3倍体は通常の受精後、受精卵から第2極体が放出される前に低温ショックを与えることにより、第2極体を卵内に封じ込めて作出する。この操作で問題となるのは媒精後から低温ショックまでの時間と低温の温度、並びに低温ショックの継続時間である。この中で低温の継続時間が長すぎると、孵化仔魚に悪影響を与えることが考えられる。今までの報告では冷却継続時間は30~60分が適正とされている³⁾が、本報では冷却継続時間を20分まで短縮し、浮上卵率・発生率・胚体形成率並びに孵化率について調

* 新品種作出技術開発研究費による

べるとともに、3倍体が誘導されているかどうかについても検討した。

材料および方法

供試魚：雌は南部町漁業協同組合の市場に水揚げされた活魚のなかから十分に成熟した個体を選び出し試験に供した。雄は当场で親魚として飼育を続けていたヒラメを用いた。

採卵及び低温処理：採卵は十分に成熟した雌の卵を搾出法によりボールに採卵し、10mlずつを3本の試験管へ分けた。卵数は1mlの卵を計数することにより求めた。今回の1ml当りの卵数は1,825個であった。採精は健康な雄の生殖孔に10mlのスピッツ管をあて、腹部を圧迫して採精した。受精は卵10ml当り精子0.5mlずつを入れ乾導法による受精を行った。次に受精卵を熱帯魚用のタモ網に移し、2~3回清浄な海水で洗浄した。3つのうち1つはそのまま30ℓパンライトに収容し2n区とした。あとの2つは受精5分後に0.5~1.0℃に調整した低温海水の入ったビーカーにいれ、うち1つは20分後に常温海水に戻し3n20分区、もう1つは30分後に常温海水に戻し3n35分区とした。実験に用いた卵量、精子の量及び実験の経過時間を表1に示す。以上の作業は昭和63年3月10日に実施し、その後3月13日に各区の浮上卵を100ℓパンライトに入れ、以後常法により飼育を続けた。仔魚の孵化は3月14日であった。

表1 精子・卵の量並びに経過時間

	精子 (ml)	卵 (粒)	受精時刻	低温処理時刻	
				開始	終了
2n区	0.5	18,250	時 分 秒 12:51:20		
3n20分区	0.5	18,250	12:51:20	時 分 秒 12:56:20	時 分 秒 13:16:20
3n35分区	0.5	18,250	12:51:20	12:56:20	13:31:20

浮上卵数並びに沈下卵数：沈下卵の計数は30ℓパンライトに卵を収容した後、エアーレーションを止め、水槽中央に沈下した卵をサイフォンにより集め、希釈計数法により行った。浮上卵については沈下卵を除去した残りの卵をエアーレーションでよく攪拌しながら希釈倍数法で計数した。

発生率：発生率は受精4時間後の卵をランダムに各試験区から100個前後をピペットで採取し、万能投影機で調べた。

胚体形成率：受精4時間後に発生認められた卵をランダムに100個前後採取し、万能投影機により受精30時間後に胚体の形成された卵の比率を求めた。

孵化率：孵化率は胚体形成卵をランダムに120個前後ビーカーにとり、孵化が完了した時に、正常仔魚と死卵数を計数し、孵化率を求めた。

3倍体確認法：染色体標本を孵化7日目の仔魚を用いて小刻法⁴⁾により実施した。

結果および考察

浮上卵数・発生率・胚体形成率・孵化率：受精後の時間を追っての浮上卵数は表2に示す。沈下卵は受精6～21時間後にかけて発生することが多くどの区においても約半分の卵が沈下している。受精48時間後、浮上卵率は2n区で34.2%，3n 20分区で33.5%，3n 35分区で13.4%となり、3n 35分区の結果が他の区の1/3と低かった。

表2 経過時間に伴う浮上卵数と沈下卵数

	2 n 区		3 n 20 分区		3 n 35 分区	
	浮上卵数	沈下卵数	浮上卵数	沈下卵数	浮上卵数	沈下卵数
2 時間後	15,950	2,300	15,250	3,000	14,450	3,800
6 時間後	15,050	900	14,350	900	13,450	1,000
21 時間後	7,650	7,400	7,120	7,230	3,950	9,500
24 時間後	6,350	1,300	6,220	900	2,550	1,400
44 時間後	6,250	100	6,120	100	2,450	100
48 時間後の 浮上卵率	34.2%		33.5%		13.4%	

発生率・胚体形成率・孵化率については表3に示す。胚体形成率は各区とも80%前後となったが、発生率・孵化率は3n 20分区、2n区、3n 35分区の順となり、やはり3n 35分区は低い結果となった。3n 20分区の結果が2n区より良い結果となった原因は明らかではないが、冷却時間が20分の場合には通常の発生と変わらなかった。

表3 各試験区における正常発生率・胚体形成率・孵化率

	正常発生率(%)	胚体形成率(%)	孵化率(%)
2 n 区	36.75	78.0	32.84
3 n 20 分区	43.14	82.4	43.26
3 n 35 分区	35.92	82.5	22.48

3倍体確認：小刻法により染色体の確認を行った結果、3n 20分区、3n 35分区ともに2n区と比較すると明らかに染色体数の多いことが確認できた(Plate 1, Plate 2, Plate 3)。しかし、3倍体の染色体は2倍体の染色体と比較すると数は多いものの、1つの染色体がかなり小型化していた。

以上の結果から3倍体を作り出すための卵の冷却時間は40～60分とされていたが、20分でも3倍体の作出が可能であり、なおかつ冷却による弊害も少ないことが明らかとなった。以後の3倍体の生長や3倍体の作出率については次報で報告する。

文 献

- 1) 中本幸一・小野山弘, 1985: 飼育ヒラメにおける雄・雌の成長差について, 兵庫水試研報, 23, 57-61.
- 2) 田畑和男, 1987: バイテク応用技術(6)ヒラメの染色体操作, 養殖, 24(10), 71-75.
- 3) 田畑和男・五利江重昭・中村一彦, 1986: 紫外線によるヒラメの雌性発生2倍体の誘起条件, 日本誌, 52(11), 1901-1904.
- 4) Yamazaki F., H. Onozato and K. Arai(1981): The chopping method for obtaining permanent chromosome preparation from embryos of teleost fishes. *Bull., Jap., Soc., Sci., Fish.*, 47(7), 963.

Plateの説明

Plate 1: 2n区におけるヒラメの染色体($\times 1,000$ 倍)。

Plate 2: 3n 20分区におけるヒラメの染色体($\times 1,000$ 倍)。

Plate 3: 3n 35分区におけるヒラメの染色体($\times 1,000$ 倍)。

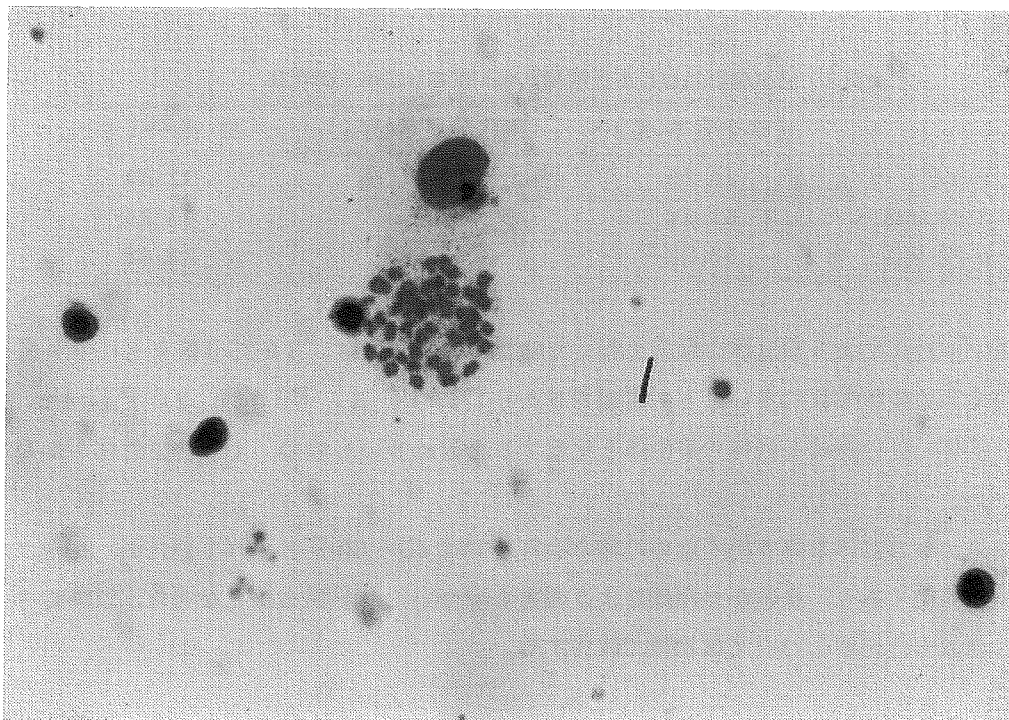


Plate 1

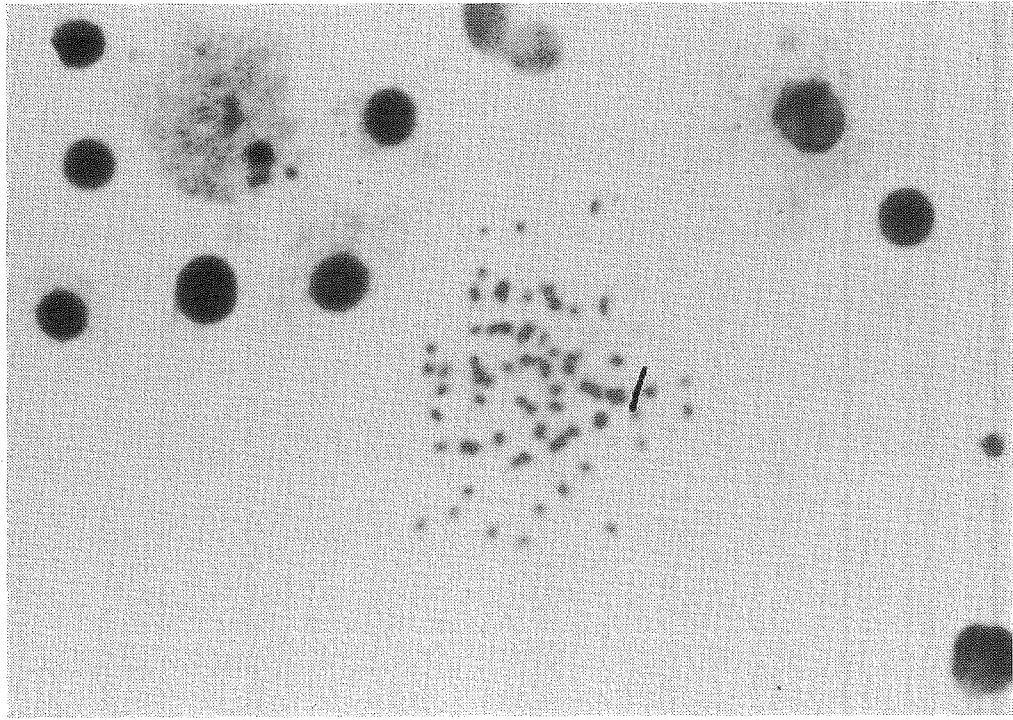


Plate 2

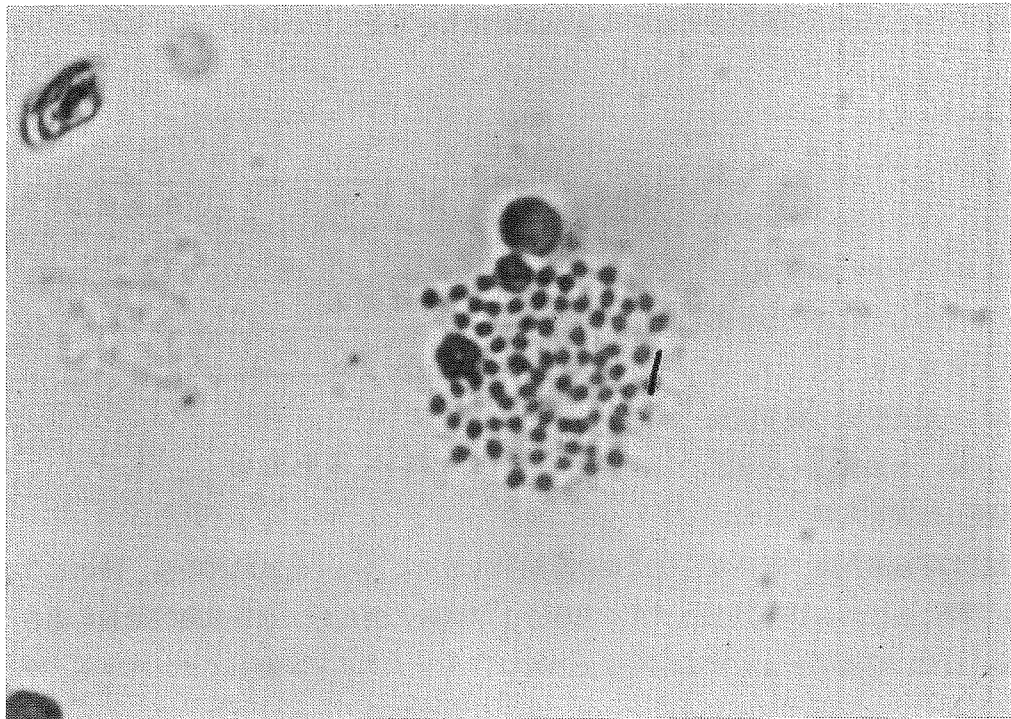


Plate 3