

淡水魚類の雌性化技術開発

染色体工学手法によるアユの雌性発生-IV

高橋昭夫

魚類の染色体の倍数性を利用する育種技術として卵の染色体を操作し、雌性発生を誘発することを目的として、アユの第2極体放出阻止による雌性発生二倍体魚の作出と、第1卵割阻害による雌性発生二倍体魚の作出に関する試験を実施した。

材料と方法

用いたアユ親魚は当場で人工採苗し親魚まで養成したもので、精子は成熟した雄魚から、卵は成熟排卵した雌魚からそれぞれ搾出法により採取した。

極体放出阻止による雌性発生二倍体魚の加圧処理

搾出した精液を希釈液 (NaCl:7.5g、KCl:1.8g、DW:1ℓ) で100倍に希釈し、希釈精液 3 ccを直径 9 cmのシャーレに入れて紫外線で照射 (7000ergs/m²) し、この希釈精液を搾出した卵に媒精し、受精後に受精卵をスライドグラスに付着させてから加圧器を用いて卵の染色体を倍数化した。

圧力処理は、適正な処理時間と処理圧力を見出すため、受精 5 分後の卵を 650kg/cm² で 3 分間から 1 分間隔に 8 分間まで処理する区と、受精 5 分後の卵を 6 分間、400, 500, 600, 650, 700kg/cm² の圧力で処理する区を設けて行った。なお、対照区として低温処理区 (0℃、30分間)、不活化した精子と受精させた卵を倍数化処理しない区及び通常発生二倍体魚区を設けた。

卵割阻害による雌性発生二倍体魚の加圧処理

精子の不活化及び加圧処理の方法は、極体放出阻止による雌性発生二倍体魚の作出と同じに行い、加圧処理時間を検討するため、650kg/cm² と 700kg/cm² の圧力で受精後 60 分から 10 分間隔で 110 分まで 6 分間の処理を行った。対照区としては、倍数化処理を行わない区と通常発生二倍体魚区を設けた。

卵の大量加圧処理

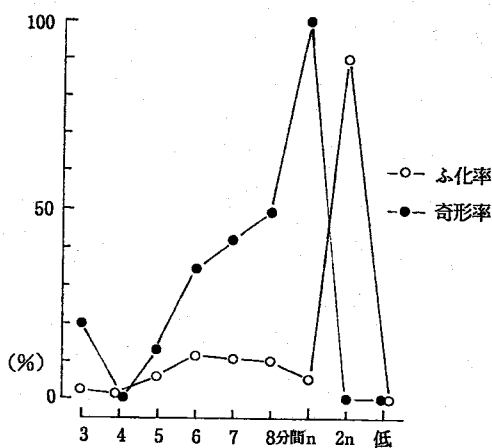
実用化のためには大量の卵を加圧処理する必要があることから、10万粒の卵を不活化精子と受精させた後に、透析膜の中に水と受精卵を一緒に入れて上下を密封し、水とともに加圧器に入れて極体放出阻止による雌性発生二倍体魚の作出に必要な倍数化処理 (650kg/cm², 5 分後、5 分間) を行い、処理後にシュロ製の魚巢に処理卵を付着した。

媒精時の不活化精子の量は、卵 10 万粒当たり 9 cc 使用した。

結果と考察

極体放出阻止による雌性発生二倍体魚の加圧処理

染色体を倍数化するため受精の 5 分後に 650kg/cm² の水圧で 3 分間から 1 分間隔で 8 分間まで処理時間を変えて行った結果を第 1 表と第 1 図に示した。



第 1 図 加圧処理時間と極体放出阻止による雌性発生二倍体魚作出率 (ふ化率、奇形率) との関係及び対照区の作出率 (ふ化率、奇形率)
n: 対照区 (倍数化処理しない区)
2n: 対照区 (通常発生二倍体魚区)
低: 対照区 (低温処理区)

第1表 加圧処理時間と極体放出阻止による雌性発生二倍体魚作出率との関係

卵数粒	発眼率 %	ふ化率 %	奇形率 %	処 理			備 考
				圧 力	時 期	時 間	
307	1.6	1.6	20.0	650kg/cm ²	5分後	3分間	
383	0.3	0.3	0	"	"	4	
401	14.2	5.7	13.0	"	"	5	
393	19.3	11.2	34.1	"	"	6	
447	25.5	10.7	41.7	"	"	7	
295	23.4	10.5	49.7	"	"	8	
318	36.5	5.3	100	—	—	—	対照 (n)
470	95.3	89.6	0.2	—	—	—	対照 (2n)
796	0	—	—	0℃	5分後	30分間	対照 (低温処理)

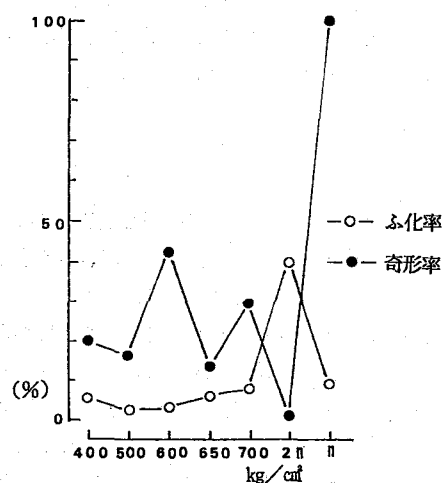
n: 対照区 (倍数化処理しない区)
 2n: " (通常発生二倍体魚区)
 低: " (低温処理区)

処理時間は6～8分間のふ化率は10～11%と5分間の5.7%及び3～4分間の1.6%以下より高かった。ふ化仔魚の奇形率は4分間が0%と最低で、処理時間の増加と共に高くなり8分間では49.7%であった。また、処理時間が3分間の場合、処理時間が短くても奇形率は20%と高かった。

加圧処理を行わなかった半数体魚のふ化率が5.3%でその奇形率が100%であったことから、精子は完全に不活化されていたといえる。

通常二倍体魚のふ化率が89.6%でその奇形率が0.2% (1尾) であったことから、試験に用いた卵の卵質は悪いものではなかったと言える。なお、低温処理ではふ化率は0%であった。

染色体を倍数化するため受精の5分後に6分間400、



第2図 処理圧力と極体放出阻止による雌性発生二倍体魚作出率 (ふ化率、奇形率) との関係および対照区の作出率 (ふ化率、奇形率)

n: 対照区 (倍数化処理しない区)
 2n: " (通常発生二倍体魚区)

第2表 加圧処理圧力と極体放出阻止による雌性発生二倍体魚作出率との関係

卵数粒	発眼率 %	ふ化率 %	奇形率 %	処 理			備 考
				圧 力	時 期	時 間	
276	15.9	5.4	20.0	400kg/cm ²	5分後	6分間	
259	4.2	2.3	16.7	500	"	"	
297	2.7	2.4	42.9	600	"	"	
307	14.2	5.7	13.0	650	"	"	
350	19.4	7.7	29.6	700	"	"	
337	49.3	39.5	0.8	—	—	—	対照 (2n)
279	42.3	9.3	100	—	—	—	対照 (n)

n: 対照区 (倍数化処理しない区)
 2n: " (通常発生二倍体魚区)

500、600、700kg/cm²の水圧で処理した結果を第2表と第2図に示した。

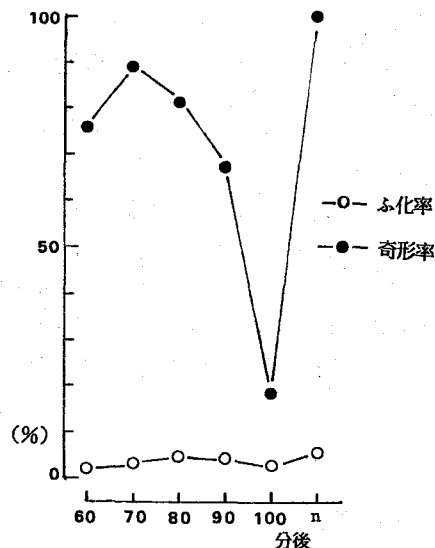
処理圧力400kg/cm²のふ化率は5.4%を示した。500kg/cm²では2.3%に下がったが、600kg/cm²以上では処理圧力が高い程ふ化率も高くなり、700kg/cm²では7.7%になった。一方、ふ化仔魚の奇形率は処理圧力600、700kg/cm²で高く、400、500、650kgで低かった。

加圧処理を行わなかった半数体魚のふ化率は9.3%でその奇形率は100%であったことから、精子は完全に不活化されていたと言える。

通常二倍体魚のふ化率が89.6%、その奇形率が0.2%（1尾）であったことから、試験に用いた卵の卵質はそれ程悪いものではなかったと推察される。

加圧処理による雌性発生二倍体魚の作出は沢田¹⁾および谷口²⁾によると、受精5分後より500~750kg/cm²の圧力を5~7分間加えることにより作出出来るとしているが、今回の試験でも類似の結果が得られた。

卵割阻害による雌性発生二倍体魚の加圧処理



第3図 加圧処理時期と卵割阻害による雌性発生二倍体魚作出率（ふ化率、奇形率）との関係及び対照区の作出率（ふ化率、奇形率）
n：対照区（倍数化処理しない区）

第3表 加圧処理時期と卵割阻害による雌性発生二倍体魚作出率との関係

卵数粒	発眼率 %	ふ化率 %	奇形率 %	処 理				備 考
				圧 力	時 期	時 間	処理までの水温	
366	26.0	2.2	75.0	650kg/cm ²	60分後	6分間	16.6℃	
288	33.3	3.1	88.9	"	70	"	"	
354	31.1	4.5	81.3	"	80	"	"	
307	24.1	3.9	66.7	"	90	"	"	
399	14.5	2.8	18.2	"	100	"	"	
318	36.5	5.3	100	—	—	—		対照 (n)

n：対照区（倍数化処理しない区）

圧力650kg/cm²で6分間受精60分後から10分間隔で100分後まで処理した結果を第3表と第3図に示した。

ふ化率は各処理時間とも低かった。60分後が2.2%で、その後は処理時間が遅くなるにつれて少しずつ高く、80分後には4.5%になり、さらにその後は、処理時期が遅くなるにつれて少しずつ低下した。

ふ化仔魚の奇形率は各処理時期とも高いが、処理時期が遅くなるにつれて少しずつ低下し、100分後には18.2%となった。

圧力処理を行わなかった対照区が100%奇形になったことから、精子は不活化されていたと言える。

圧力を700kg/cm²で6分間受精60分後から10分間隔で110分まで処理した結果を第4表と第4図に示した。

この圧力でもふ化率は低く、60分後の処理が0.7%で、その後は処理時期が遅くなるにつれて少しずつ高く、100分後には6.1%と一番高くなり、110分後にはまた低下した。

ふ化仔魚の奇形率は各処理時期とも高いが、圧力が650kg/cm²の時と同じに100分後の処理が4.2%と極端に低くなっている。

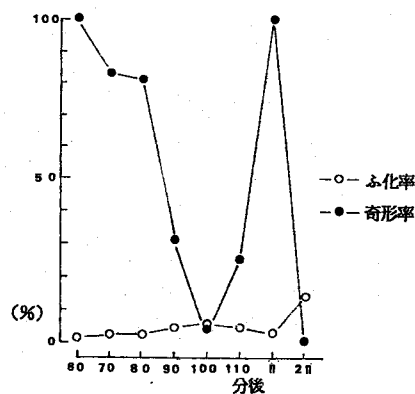
圧力処理を行わなかった対照区が、100%奇形になっ

たことから精子は不活化されていたと言える。また、通常二倍体魚のふ化率が13.8%と低かったことから、卵質に少し問題があったことが考えられる。

卵割を阻害して雌性発生二倍体魚の作出について谷口他²⁾は、水温19℃の時、受精70～80分後に600～700 kg/cm²の圧力で6分間処理することが有効であるとしている。今回は受精100分後に、700kg/cm²の圧力でも6分間処理した場合最も有効であった。この有効な処理時期の遅れは、今回水温が16.5～16.6℃と低かったことから、これによる発生の遅れによる可能性が考えられる。

卵の大量加圧処理

結果を第5表に示す。



第4図 加圧処理時期と卵割阻害による雌性発生二倍体魚作出率(ふ化率、奇形率)との関係及び対照区の作出率(ふ化率、奇形率)
n: 対照区(低数化処理しない区)
2n: " (通常発生二倍体魚区)

第4表 加圧処理時期と卵割阻害による雌性発生二倍体魚作出率との関係

卵数粒	発眼率 %	ふ化率 %	奇形率 %	処 理				備 考
				圧 力	時 期	時 間	処理までの水温	
409	6.8	0.7	100	700kg/cm ²	60分後	6分間	16.5℃	
628	9.2	1.9	83.3	"	70	"	"	
481	4.6	2.3	81.8	"	80	"	"	
475	8.6	4.0	31.6	"	90	"	"	
391	7.9	6.1	4.2	"	100	"	"	
485	6.6	4.1	25.0	"	110	"	"	
409	7.6	2.7	100	—	—	—		対照 (n)
326	15.6	13.8	0	—	—	—		対照 (2n)

n: 対照区(低数化処理しない区)
2n: " (通常発生二倍体魚区)

10万粒の卵を一度に加圧処理したところふ化率は20.2%で、ふ化仔魚の奇形率は8.3%であった。

加圧処理するために透析膜を用いて行った。処理後の卵は低温処理の時²⁾に用いたポリエチレン袋と同じに、卵と卵が多少付着するものも見られたが、処理後の魚巣への付着については問題がなかった。

要 約

1. アユの第2極体放出阻止と第1卵割阻害により雌性発生二倍体魚の作出試験を、圧力処理により実施した。
2. 第2極体放出阻止による雌性発生二倍体魚の作出には、受精5分後に650kg/cm²の圧力を5～7分間

第5表 極体放出阻止による雌性発生二倍体魚の大量作出

卵数千粒	発眼率 %	ふ化率 %	ふ化尾数千尾	奇形率 %	処 理			備 考
					圧 力	時 期	時 間	
100	39.0	20.2	20	8.3	650kg/cm ²	5分後	5分間	

加えることが有効であった。

3. 第1卵割阻害による雌性発生2倍体魚の作出には、水温が16.5～16.6℃の時受精100分後に700kg/cm²の圧力を6分間加えると、奇形率も低く有効であった。
4. 第2極体放出阻止による雌性発生2倍体魚を加圧処理により大量に作出する方法は、受精卵を透析膜に入れて行うことが有効であった。

文 献

- 1) 沢田守伸・糟谷浩一・野沢貢(1989): アユ雌性発生技術開発試験、栃木県水産試験場業務報告 31、28～30
- 2) 谷口順彦・関伸吾・深井淳二(1988): 高圧ショックによるアユの第2極体放出阻止型および第1卵割阻止型雌性発生二倍体の誘導と確認、日本水産学会誌、54(9) 1483～1491
- 3) 高橋昭夫(1988): 染色体工学手法によるアユの雌性発生-Ⅱ, 淡水魚類の雌性化技術開発、神奈川県淡水魚増殖試験場報告、24、4～6