

淡水魚類の雌性化技術開発

染色体工学手法によるヤマメの雌性発生 - I

勝呂尚之・高橋昭夫

魚類の染色体の倍数体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、ヤマメの第1卵割阻止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

親魚 当場で継代飼育している系統で、人工採苗で養成したものをを用いた。精子は、成熟した2才魚の雄から、卵は成熟排卵した2才魚の雌から搾出法により採取した。

採卵した雌親魚は、実験1は1尾、実験2は2尾、実験3は4尾、実験4は4尾で、雄は各実験とも1尾ずつである。

精子の不活化 搾出した精液を希釈液 (NaCl 9.04g, KCl 3.00g, CaCl₂ 0.34g, NaHCO₃ 0.20g, DW 1ℓ) で100倍に希釈し、希釈精液3ccを直径9cmのシャーレーに入れて、紫外線照射 (3,500ergs/mm²) を行った。

加圧処理 不活化した希釈精液を、搾出した卵に媒精し、受精後に加圧機を用いて加圧処理を行った。処理圧力は、750kg/cm²で6分間行い、適正な加圧処理時期を見出すため、受精後3時間 (1区)、3時間30分 (2区)、4時間 (3区)、4時間30分 (4区) の4試験区で加圧処理を行った。また、対照区として、不活化を行わない通常の精子で、受精させた区と不活化した希釈精液で受精させ、倍数化処理を行わない区を設定した。

試験は、平成4年11月6日 (試験1)、11月9日 (試験2)、11月11日 (試験3)、11月18日 (試験4) の合計4回、同じ設定で行った。

結果と考察

第1卵割阻止による雌性発生二倍体魚の作出結果を第1表に示した。試験期間中の水温は、14.0~16.8℃であった。

試験1では、1区~3区 (積算水温49.5~66.0℃・h)

では、1尾もふ化しなかったが、4区 (積算水温74.3℃・h) で、2尾 (ふ化率3.1%) のふ化稚魚を得た。

試験2では、1~4区のすべてでふ化率は0%であった。しかし、1~3区 (積算水温49.5~66.0℃・h) では、発眼した卵はなかったが、4区 (積算水温74.3℃) では、発眼率3.6%であった。

試験3は、1~4区のすべてで発眼率、ふ化率ともに0%であった。対照区の通常発生の5区からもふ化稚魚を得ることができなかったため、卵質や試験環境等に問題があったと推定される。

試験4は、1~4区では、2区 (積算水温57.4℃) の発眼率が、最高の8.6%を示し、以下3区、4区、1区の順であった。しかし、各区ともにふ化には至らなかった。試験4でも、試験3と同様に対照区である通常受精 (2n) の5区も、ふ化率が0%であったため、卵質、試験環境等に問題があったと推定される。

今回、4回の作出試験を行ったが、加圧処理を行い雌性発生二倍体魚の作出に成功したのは、試験1の4区だけであった。4区の加圧処理時期は、受精後4時間30分であり、積算温度は74.3℃・hである。また、試験2では、ふ化には至らなかったが、試験1と同様4区において、最大の発眼率を得ている。

これらの結果から、ヤマメの第1卵割阻止による雌性発生二倍体の作出には、水温16℃前後の場合は、受精後、積算温度で70℃・h前後に加圧処理を行うのが有効であると考えられるが、今後、最適加圧力や加圧時間および加圧処理時期の詳細について、さらに検討が必要である。

今回の結果は、全国養鱒技術協議会¹⁾、東京都水産試験場²⁾、宮崎県水産試験場³⁾の試験結果による最適加圧時期とはほぼ一致した。

第1表 ヤマメの受精後の加圧時期と雌性発生二倍体の作出率

試験区	処 理 (圧力 750kg/cm ² 6分間)			卵 数 (粒)	発眼率 (%)	ふ化率 (%)	奇形率 (%)
	時 期	水 温 (℃)	積算水温 (℃・h)				
試験1	1 3時間後	16.5	49.5	78	0	—	—
	2 3時間30分後	〃	57.8	81	0	—	—
	3 4時間後	〃	66.0	91	0	—	—
	4 4時間30分後	〃	74.3	64	3.1	3.1	0
	5 通常受精(2n)	〃	—	80	88.2	87.9	0
	6 加圧処理なし(n)	〃	—	76	0	—	—
試験2	1 3時間後	16.5	49.5	130	0	—	—
	2 3時間30分後	〃	57.8	142	0	—	—
	3 4時間後	〃	66.0	129	0	—	—
	4 4時間30分後	〃	74.3	110	3.6	0	—
	5 通常受精(2n)	〃	—	153	44.6	44.6	0
	6 加圧処理なし(n)	〃	—	120	0.8	0	—
試験3	1 3時間後	16.5	49.5	328	0	—	—
	2 3時間30分後	〃	57.8	309	0	—	—
	3 4時間後	〃	66.0	227	0	—	—
	4 4時間30分後	〃	74.3	306	0	—	—
	5 通常受精(2n)	〃	—	320	65.3	0	—
	6 加圧処理なし(n)	〃	—	384	0	—	—
試験4	1 3時間後	16.4	49.2	130	5.3	0	—
	2 3時間30分後	〃	57.4	174	8.6	0	—
	3 4時間後	〃	65.6	298	7.7	0	—
	4 4時間30分後	〃	73.8	281	7.1	0	—
	5 通常受精(2n)	〃	—	176	16.5	0	—
	6 加圧処理なし(n)	〃	—	287	12.2	0	—

摘 要

- 1) ヤマメの第1卵割阻止による雌性発生二倍体の作出の最適加圧時期を見出すため、受精後3～4時間30分後に加圧処理を行い、発眼率とふ化率を検討した。
- 2) 試験1では、受精後4時間30分後の加圧処理（積算水温74.3℃・h）において、2尾（ふ化率3.1%）のふ化稚魚を得た。
- 3) 試験2では、ふ化稚魚を得ることができなかったが、受精後4時間30分後の加圧処理（積算水温74.3℃・h）において、最高の発眼率であった。
- 4) 試験3と試験4は、対照を含めたすべての試験区でふ化せず、卵質や試験環境等に問題があったと推定される。

文 献

- 1) 全国養鱒技術協議会(1991), 育種バイオテクノロジー研究部会報告, 第17回全国養鱒技術協議会, 36～44.
- 2) 東京都水産試験場(1992), 平成2年度事業報告, 60～64.
- 3) 稲野俊直・西田 司・鳥越正男・浜砂忠一(1993), 平成3年度宮崎県水産試験場事業報告書, 210～211.

魚類精液保存技術開発 - I

ヤマメ精液の凍結保存

高橋 昭夫

魚類精液保存に関する研究はサケ・マス類を中心に進められてきた。多くの研究者が唱えた魚類精液凍結保存の実用的意義あるいは目的を黒倉¹⁾は、①特定の形質を持った親魚の精液のより有効な利用を可能にする。②時間・空間的に離れた雌雄親魚間での交配を可能にする。③天然からの採捕によって親魚を入手する場合、雌雄親魚を同時に採捕する必要をなくす。④雌雄親魚の成熟期に違いのある魚種の種苗生産で行われている人工的な成熟制御・促進等の必要性をなくす。の4点に要約しており、種苗生産における必要性だけでなく育種技術の発展に重要な役割を果たすことを指摘している。最近は染色体を操作する育種技術が開発され、全雌生産に必要な性転換雄魚の作出が可能となったが、その精子を利用するためには凍結保存技術の開発が有効である。

今年度は、ヤマメを用いてペレット法により精液凍結保存技術の開発を目的に試験を行った。

材料及び方法

供試魚は当场で池中継代飼育しているヤマメ雌2尾、雄1尾を用いた。

精液の希釈には、第1表に示した Mounib's Solution¹⁾ と Mounib's Solution の改変液 - 1²⁾、2³⁾ 及び glucose 液³⁾ を用い、精液希釈率は4倍とした。凍結保護物質と

してジメチルスルフォキシド (以下、「DMSO」と呼ぶ。) を7.5%添加した。希釈液に DMSO を混合した液で精液を希釈してからの経過時間 (以下、「平衡時間」と呼ぶ。) の影響を調べるため、平衡時間を1分以内、5分、10分及び15分とした。

希釈精液の予備冷却は実施しなかった。

凍結方法はドライアイス上に直径5mmの穴 (深さ5mm) 開け、その穴に希釈精液0.1ccを滴下するペレット法で行い、凍結精液はドライアイス上に5分間放置し、その後、室温 (16℃) で解凍、シャーベット状になった時に解凍液として NaHCO₃ 120mM を0.5cc 添加し精子の運動活性を調べた。活性のある解凍精子については、受精試験に用いた。

結果と考察

希釈液の検討

希釈液に DMSO を添加した液で精液を4倍に希釈し、直ちに希釈精液の精子運動活性を調べた。結果は第2表に示したとおり、Mounib's Solution を除く各希釈液の精子はほぼ全部が活発な運動を示した。

今回の結果からヤマメ精液の希釈液としては、Mounib's Solution の改変液と glucose 液が適切と考えられた。

第1表 使用希釈液の種類

希 釈 液	組 成
Mounib's Solution	NaHCO ₃ 100mM, Sucrose 125mM, Glutathione 6.5mM
Mounib's Solution の改変-1	NaHCO ₃ 100mM, Sucrose 125mM, KCl 40mM, Glutathione 6.5mM
Mounib's Solution の改変-2	NaHCO ₃ 86mM, Sucrose 125mM, KCl 14mM, Glutathione 6.5mM
Glucose 液	Glucose 300mM