

染色体操作による有用魚種の品種改善研究—VI

ニジマスの卵割阻止最適処理方法について

桑田知宣・臼田 博*・熊崎隆夫・都竹仁一

Studies on Improvement Usefull Fishes by Chromosome Manipulation

Most Available Treatment for Suppression of the Cleavage in
Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Tomonori KUWADA・Hiroshi USUDA*・Takao KUMAZAKI・Niichi TUZUKU

卵割阻止型の雌性発生魚は完全ホモ型となり、雌性発生を繰り返すと次世代はクローン集団となるため、このクローン作出法は新しい育種法として期待されている。

また、通常受精の卵を卵割阻止することによって四倍体が作出できる¹⁾。四倍体を親魚に使うと二倍体との通常受精で三倍体を作出できることから^{2)~5)}、三倍体の量産技術として四倍体の利用が期待されている。このように卵割阻止法は応用範囲の広い有用な技術である。ニジマスの卵割阻止法に関しては多くの報告がある^{6)~10)}。

しかし、報告ごとに処理方法・最適処理時期・作出成績が異っている。本試験では、ニジマス卵割阻止の最適処理方法を明らかにすることを目的に、温度処理および水圧処理法における卵割阻止の最適処理開始時期について検討した。

材料および方法

試験は水圧処理（実験1）・温度処理（実験2）について行った。

* 現在 岐阜県農政部水産振興課

実験 1 は1990年1月18日に行った。卵は当場で飼育している晚期産卵系ニジマスの4年魚2尾から採卵し、混合して供試した。精子は、晚期産卵系ニジマスの雄より採取し、人工精漿で100倍に希釈した後、直径9cmのガラスシャーレに3ml注入して均一に伸ばし、その後振盪しながら3,600 ergs/mm²の紫外線を照射して遺伝的に不活性化し供試した。媒精は等張洗卵液中で行い、1分間の媒精後、飼育水(6.2°C)中に収容した。水圧処理(650kg/cm²・6分間)は吸水後7時間30分から12時間まで30分毎に行い、処理後卵を堅型孵化水槽に収容し管理した。倍数化を判断するために、倍数化処理を行わなかつた卵を収容し Gynogenetic Control(以下G・Cとする)とした。検卵は53日後(積算水温320°C)を行い、半数体様奇形発眼卵と正常発眼卵を分けて集計した。浮上状況の調査は92日後(積算水温610°C)を行い、生残魚すべてを浮上魚として計数した。肉眼観察により脊椎骨のわん曲を指標に正常浮上魚・奇形魚を分けて集計した。

実験 2 は1990年1月20日に行った。採卵、精子の不活性化、媒精、卵の収容等の操作は実験1と同様とした。温度処理(30°C・5分)は吸水後5時間30分から12時間まで30分毎に行い、処理後卵を堅型孵化水槽に収容し、実験1と同様の方法でG・Cを設け、48日後(積算水温290°C)に検卵、90日後(積算水温600°C)に浮上状況の調査を行った。

結果および考察

実験 1

検卵結果および92日後の生残状況を第1表に、卵収容から処理開始までの時間と水温の積(以下処理開始水温°C・hとする)と発眼率・正常発眼卵の発眼卵に対する割合(以下正常発眼率とする。)・正常浮上魚の処理卵数に対する割合(以下正常魚出現率とする)との関係を第1図に示した。

G・Cは正常発眼率が0%であり、紫外線照射による精子の遺伝的不活性化は完全であったと考えられる。処理開始水温が46.5~71.3°C・hの区で正常魚の浮上が認められた。正常魚出現率は単峰性を示し、発眼率・正常発眼率・正常魚出現率は処理開始水温が55.8°C・hの時に最高となり、それぞれ51.8%・83.5%・39.5%であった。浮上魚中の奇形魚の出現率(以下奇形率とする)は処理開始水温が55.8°C・h前後のとき低くなる傾向を示した。

以上のことよりニジマスの水圧処理による第一卵割阻止最適処理開始時期は処理開始水温55.8°C・h近辺であると考えられ、小林¹⁰⁾、田原⁹⁾らの報告よりやや早めの結果となった。

G・Cにおいて正常発眼卵が観察されないことより、試験区の正常発眼卵は倍数化が起きた個体と推察され、正常発眼率は倍数化の起こり易さを示すと考えられる。発眼率は処理を行った各時期の受精卵の水圧処理に対する耐性を示すと考えられ、発眼率が最も高い区で正常発眼率が高かったことより、卵が水圧処理に対して

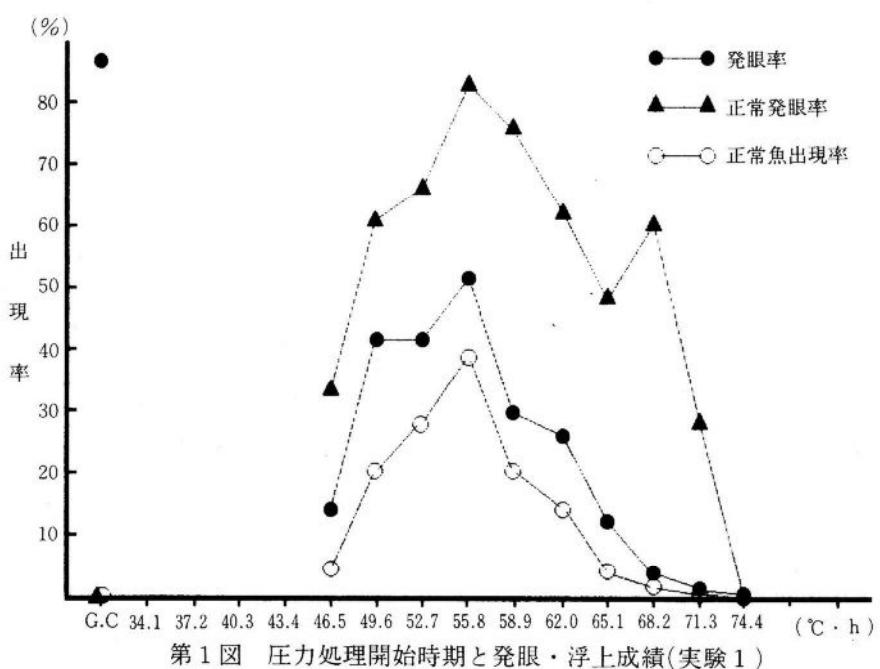
第1表 水圧処理時期と発眼成績及び浮上成績

処理開始水温 h・°C	処理卵数	発眼率 ^{*1} %	正常発眼率 ^{*2} %	正常魚出現率 ^{*1} %	奇形率 ^{*3} %
46.5	1126	14.6	43.9	4.3	15.8
49.6	755	42.0	71.6	20.4	11.5
52.7	1734	41.9	76.9	28.2	6.0
55.8	1872	51.8	83.5	39.5	3.7
58.9	1674	30.2	76.6	20.3	4.8
62	1962	26.6	62.8	14.6	4.3
65.1	1616	12.3	49.2	4.5	7.6
68.2	1504	4.1	60.7	1.9	14.7
71.3	1119	1.3	28.6	0.3	0
74.4	345	0.3	0	0	—
G·C	547	87.0	0	0	—

*1 発眼率・正常魚出現率は処理卵数に対する割合

*2 正常発眼率は発眼卵数に対する割合

*3 奇形率は浮上魚中の奇形魚の割合



第1図 圧力処理開始時期と発眼・浮上成績(実験1)

第2表 温度処理時期と発眼成績及び浮上成績

処理開始水温 h・°C	処理卵数	発眼率*1 %	正常発眼率*2 %	正常魚出現率*1 %	奇形率*3 %
34.1	1056	70.8	9.6	4.5	23.0
37.2	1097	75.4	25.3	10.1	32.7
40.3	1030	68.7	33.5	12.0	34.7
43.4	963	65.9	34.3	10.5	30.8
46.5	1001	64.4	27.8	9.9	33.1
49.6	1102	61.0	18.2	6.3	43.4
52.7	1101	60.9	18.0	4.7	36.6
55.8	1073	30.7	11.2	2.1	23.3
58.9	974	15.9	8.4	1.2	0
62	1035	0.5	0	0	—
65.1	969	13.0	0	0	—
68.2	963	39.5	11.3	1.9	50.0
71.3	902	59.9	27.6	7.9	37.7
74.4	994	65.9	32.1	11.6	35.4
G・C	211	66.4	2.9	1.9	0

※1 発眼率・正常魚出現率は処理卵数に対する割合

※2 正常発眼率は発眼卵数に対する割合

※3 奇形率は浮上魚中の奇形魚の割合

最も耐性のある時期とこの方法による倍数化の最適時期は一致することが考えられた。

正常魚出現率の処理開始水温の違いに伴った変化は急激であり、水圧処理の有効な処理開始時期は非常に短いと考えられる。

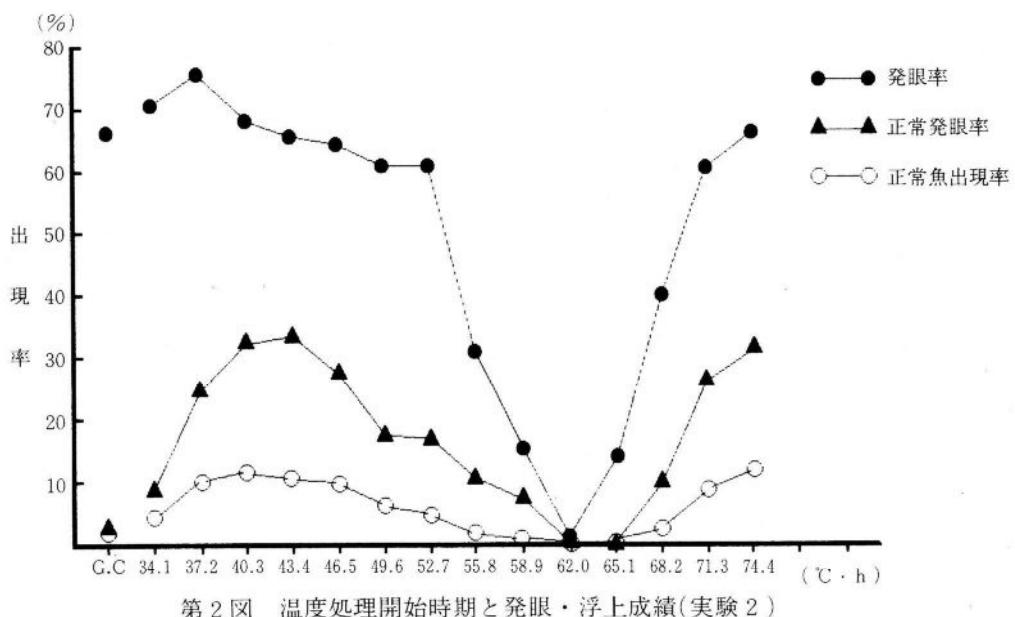
奇形率は最適処理開始時期において3.7%と低く、最適処理開始時期からはずれた区ほど高くなる傾向が認められた。今回の結果より、水圧処理によって卵割阻止を行う場合、最適処理時期に処理を行うことによって、処理の影響に

よる奇形胚の発生を最小限にすることが出来ると考えられる。

実験2

検卵結果および90日後の浮上状況を第2表に、処理開始水温と発眼率・正常発眼率・正常魚出現率との関係を第2図に示した。

G・Cにおいて正常魚の浮上が認められ、正常魚出現率は1.9%であった。今回の試験は、通常、精子の遺伝的不活性化を確認するために用いるアルビノの雄を使用しなかったため、こ



第2図 溫度処理開始時期と発眼・浮上成績(実験2)

の浮上魚が精子の遺伝的不活性化が不十分であったため出現した個体であるか、自然倍数化した個体であるかは不明である。処理開始水温が34.1～58.9°C · hと68.2～74.4°C · hの区において正常魚が浮上し、正常魚出現率は二峰性を示した。発眼率は処理開始水温が37.2°C · hの時に最高となり75.4%であった。正常発眼率は処理開始水温が43.4°C · hの時に最高となり34.3%であった。正常魚出現率は処理開始水温が40.3°C · hの時に最高となり12.0%であった。奇形率には一定の傾向は認められず、その値のほとんどは30～40%であった。

処理開始水温が40.3°C · hの時に正常魚出現率が最も高かったことより晚期産卵系ニジマスの温度処理による第一卵割阻止最適処理開始時期は処理開始水温40.3°C · h付近であると考えられ、高橋⁷⁾の報告と一致していた。

正常魚出現率は処理開始水温が40.3°C · hの時に最高となった後、徐々に低下し、処理開始

水温が62～65.1°C · hでは0%であった。しかしその後上昇し、処理開始水温が74.4°C · hでは11.6%であった。名古屋ら¹¹⁾はキンギョにおいて第2および第3分裂の前期もしくは前中期にあたる時期に高温処理を行うと第2、第3卵割が阻止されたと考えられる個体が得られることを報告している。また、田原ら⁹⁾はニジマスにおいて、卵の発生速度から積算水温88.3°C · hに水圧処理によって作出された個体は第2卵割阻止型であることを推察している。これらの報告を考え合わせると今回の試験において処理開始水温が68.2°C · h以後に出現した正常個体は第2卵割阻止型であると推察される。

第一卵割阻止と第二卵割阻止で最も正常魚出現率の高かった区の正常魚出現率・正常発眼率・奇形率は、第二卵割阻止(処理開始水温74.4°C · h)の場合それぞれ11.6%・27.2%・35.4%，第一卵割阻止(処理開始水温40.3°C · h)の場合それぞれ12.0%・26.8%・34.7%であり、

第二卵割阻止のそれらの値は第一卵割阻止のそれらの値に比べて遜色のないものであった。したがって、第2卵割阻止も完全ホモ型魚および四倍体作出のための有効な手段であると考えられる。

正常魚出現率の処理開始水温に伴った変化は比較的緩やかであり、最適処理時期の前後の区においても、最適処理時期に処理をした場合とほぼ同様の結果であった。温度処理の有効な処理開始水温は比較的長いと考えられる。

発眼率の最も高かった時期（処理開始水温 $37.2^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$ ）と正常発眼率が最も高かった時期（処理開始水温 $43.4^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$ ）が一致しないことより、卵の温度処理に対する耐性とそれによる倍数化の最適時期は一致しないと考えられる。最適処理開始時期は両者の間にあると考えられ、処理開始水温 $40.3^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$ において正常魚出現率が最高となった。

総合考察

以上実験1・2の結果より、晚期産卵系ニジマスの第一卵割最適処理時期は水圧処理の場合 $55.8^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$ 付近、温度処理の場合 $40.3^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$ 付近と考えられ、処理方法によって最適処理時期は異なっていた。

優秀なクローンを作出し育種に応用するためには、より多くの親魚から作出了多くの完全ホモ型魚の中から優秀なものを選び、それを親魚にクローンを作出することが望ましいと考える。

えられる。しかし、水圧処理は卵の処理能力に限界があるため大量処理には適していない。一方、温度処理は卵を大量に処理することが可能であり、有効な処理開始水温も比較的長いため大量処理に適している。今後、温度処理の倍数化率・作出率を向上させるため、処理条件等について検討する必要があると思われる。

要 約

1. 当場で飼育している晚期産卵系ニジマスの卵割阻止の最適処理開始方法を明らかにするため、圧力処理と温度処理について最適処理開始時期を検討した。
2. 水圧処理（ $650 \text{ kg/cm}^2 \cdot 6 \text{ 分間}$ ）では吸水後処理開始水温 $55.8^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$ の時に処理した区が最も正常魚出現率が高かった。
3. 温度処理（ $30^{\circ}\text{C} \cdot 5 \text{ 分間}$ ）では吸水処理開始水温 $40.3^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$ の時に処理した区が最も正常魚出現率が高かった。
4. 温度処理では正常魚出現率が二峰性を示し、それぞれ第一卵割と第二卵割を阻止したものと考えられた。なお、それらの正常魚浮上率・正常発眼率・奇形率には大きな差はなかった。

文 献

- 1) 高橋一孝, 1987; マス類の染色体操作によ

- る育種試験—XI 温度処理による
4倍体魚作出、昭和62年度山梨県
魚苗センター事報、16—19.
- 2) Chourrout,D.,B.Chevassus,F.Krieg,A.
Happe,G.Burger and P.Renard,
1986; Production of second
generation triploid and tetra-
ploid Rainbow trout by mating
tetraploid males and diploid
females potential of tetra-
ploid fish. *Theor.Appl .Genet.*
, 72, 193—206.
- 3) 田原偉成・細江 昭, 1987; ニジマス4倍
体を用いた3倍体の作出 昭和62
年度長野水試事報, 5
- 4) 田原偉成・細江 昭, 1988; ニジマス4倍
体を用いた3倍体の作出—I 昭和
63年度長野水試事報, 3
- 5) 田原偉成・細江 昭・山本 総, 1989; ニ
ジマス4倍体を用いた3倍体の作
出—I 平成元年度長野水試事報, 5
- 6) 小野里坦, 1987; ニジマスおよびサクラマ
スの第一卵割阻止による雌性発法
2倍体 昭和62年度日本水産学
会春季大会要旨, 61
- 7) 高橋一孝, 1986; マス類の染色体操作によ
る育種試験—VII 温度処理による第
一卵割阻止の開始時期と時間, 昭
和61年度山梨魚苗センター事報,
34—38.
- 8) 田原偉成・細江 昭, 1988; ニジマス第一
卵割阻止条件 昭和63年度長野水
試事報, 6
- 9) 田原偉成・細江 昭・山本 総, 1989; ニ
ジマス第一卵割阻止条件の検討
平成元年度長野水試事報, 8
- 10) 小林 徹・伏木省三・八木久則・木村忠亮,
1987; マス類の人為倍数体利用によ
る育種による育種に関する研究, ニ
ジマスの雌性発生における倍数化処
理時期の検討 昭和62年度滋賀醒
井鱒業報.
- 11) 名古屋博之・木本 巧・小野里坦, 1990
; 第2または第3卵割阻止による雌
性発生キンギョ *Carassius aura-
tus*, の作出 養殖研報 No. 18.
1—6