

## 低温処理によるカワハギ類の異質倍数化（予報）

薄 浩則・岡本 亮・松永浩昌・船江克美

### Allotriploidization of Filefishes by Cold Treatment (Preliminary Note)

Hironori USUKI, Ryo OKAMOTO, Hiroaki MATSUNAGA and Katsumi FUNAE

#### Abstract

Some conditions about allotriploidization of filefishes (*Stephanolepis cirrhifer* ♀ × *Navodon modestus* ♂) by cold treatment were estimated qualitatively. An effective treatment at 5°C or 10°C was considered to need a start within 10min after insemination and more than 5min exposure. Some larvae from lots under these conditions showed more normal morphological characteristics than from non-treated lots.

近年、魚類の新しい育種技術として染色体の人為倍数化が注目されている。成熟の抑制により個体の大型化をねらう3倍体作出技術は、サケ・マス類を中心にほぼ実用的段階にまで到達している。しかし、一般の海産魚では着手の遅れその他から倍数化に関する知見が乏しい現状にある。魚類染色体の人為的倍数化技術において、異質倍数化技術は異種親魚からの優良形質導入による新形質作出手法としてもその技術的確立が期待されている。こうしたことから、われわれは低温処理によるカワハギ類の異質倍数化試験を行い、2、3の知見を得たので報告する。

#### 材料及び方法

カワハギ *Stephanolepis cirrhifer* (TENMINCK & SCHLEGEL) の卵とウマヅラハギ *Navodon modestus* (GÜNTHER) の精子の組み合わせ (S × N と表記。以下同様) を用い、低温処理による受精卵の倍数化について適正な温度、時期、時間を吟味するため、5°C と 10°C の処理温度において媒精後処理開始までの時間及び処理時間にいくつかの段階を設定し、胚体の倍数化状況を比較した。

親魚は昭和60年5月と61年4月に愛媛県宇和海より入手したカワハギ（養成3歳）及び昭和61年5月に山口県下松漁協、広島県阿多田島より入手したウマヅラハギ（天然3～4歳、養成3歳）を用いた。魚種毎に1トン水槽に雌雄とりまぜて5～11尾収容してカキ、アミエビ、ムラサキイガイ、イカナゴ等を与えて飼育した。カワハギについてはウマヅラハギと同時成熟をさせるために加温した。

採卵は海産魚用生理食塩水 (MFPS) を3分の2ほど満たしたシャーレ中に行い、その際卵が一箇所に固まることのないよう 5 ml のスポイトでピペティングを行って分散させた。なお、

本実験において MFPS を用いたのは、海水中への採卵では、採卵後、時間の経過とともに受精率が急激に低下したからである。

精液はパスツールピペット中に吸入し、卵が空气中に露出しない程度に MFPS を捨てたシャーレ中に直接注ぎこみ、軽くゆすって媒精し、これを海水で洗浄した後低温処理に供した。

1回の採卵ごとに処理条件を変えた2~3の処理区とS×N無処理区、S×S無処理区の対照区を設けて、これを1実験区とした。全部で12実験区(5℃が9区、10℃が3区)を設けた。

低温処理は低温恒温器に入れた冷海水中で行い、処理直後シャーレに常温海水を注ぎ孵化水槽へ移し替えた。

倍数化の確認は各処理区及びS×N無処理区について行った。授精後19時間以上経った卵から、注射器を用い、透明で比較的発生状態の良い胚体を1処理区あたり4~15個体取り出し、コルセミドを用いた直接法により胚体毎の染色体標本を作成した。各魚種の核型については MUROFUSHI and YOSIDA (1979), MUROFUSHI and OIKAWA et al (1980) によった。

## 結 果

### 1. 倍数化個体出現状況

Table 1. に各処理区ごとの倍数化個体出現状況を示した。

Table 1. Inducement appearances of S×N-allotriploidy

5℃(4.9—5.6℃)							10℃(9.7—10.5℃)			
Exposing time (min)	After insemination (min)						Exposing time (min)	After insemination (min)		
	2	5	10	15	20	30		2	10	30
5	⊙⊙⊙	⊙	—	—	—	—	3	×	○	—
10	⊙⊙	⊙	—	—	—	—	5	⊙	—	—
15	⊙⊙⊙	⊙⊙	⊙⊙⊙	×	×	×	10	⊙	—	—
30	⊙	—	—	—	—	—	30	⊙	⊙	×

⊙……Allotriploidy only    ×……Diploidy only    ○……Both of them

Each character (⊙, ○, ×) is correspond to a observational result about preparats made from one treated lot. All chromosomal preparation from S×N-non-treated lots showed diploid.

カワハギの染色体数は雄が $2n=33$  (1M, 32A), 雌が $2n=34$  (34A) であり, ウマヅラハギは雌雄とも $2n=40$  (40A) なのでS×Nの異質3倍体は雌雄にかかわらず54本 (54A) の染色体を有することになる (Plate 1.)。なお, 対照区であるS×N無処理区についてはどの実験区とも倍数化個体の出現は認められなかった。

### 2. 孵化仔魚

S×N無処理区からの孵化仔魚は脊椎湾曲, 色素欠乏, 尾部萎縮など全てが奇型 (Plate 2.) であり仔魚の浮上はみられなかったが, 胚体の倍数化を確認できた処理区では運動性は鈍いものの正常に近い形態を示す孵化仔魚 (Plate 3.) の浮上のみられた。媒精2分後に5℃で15分間処

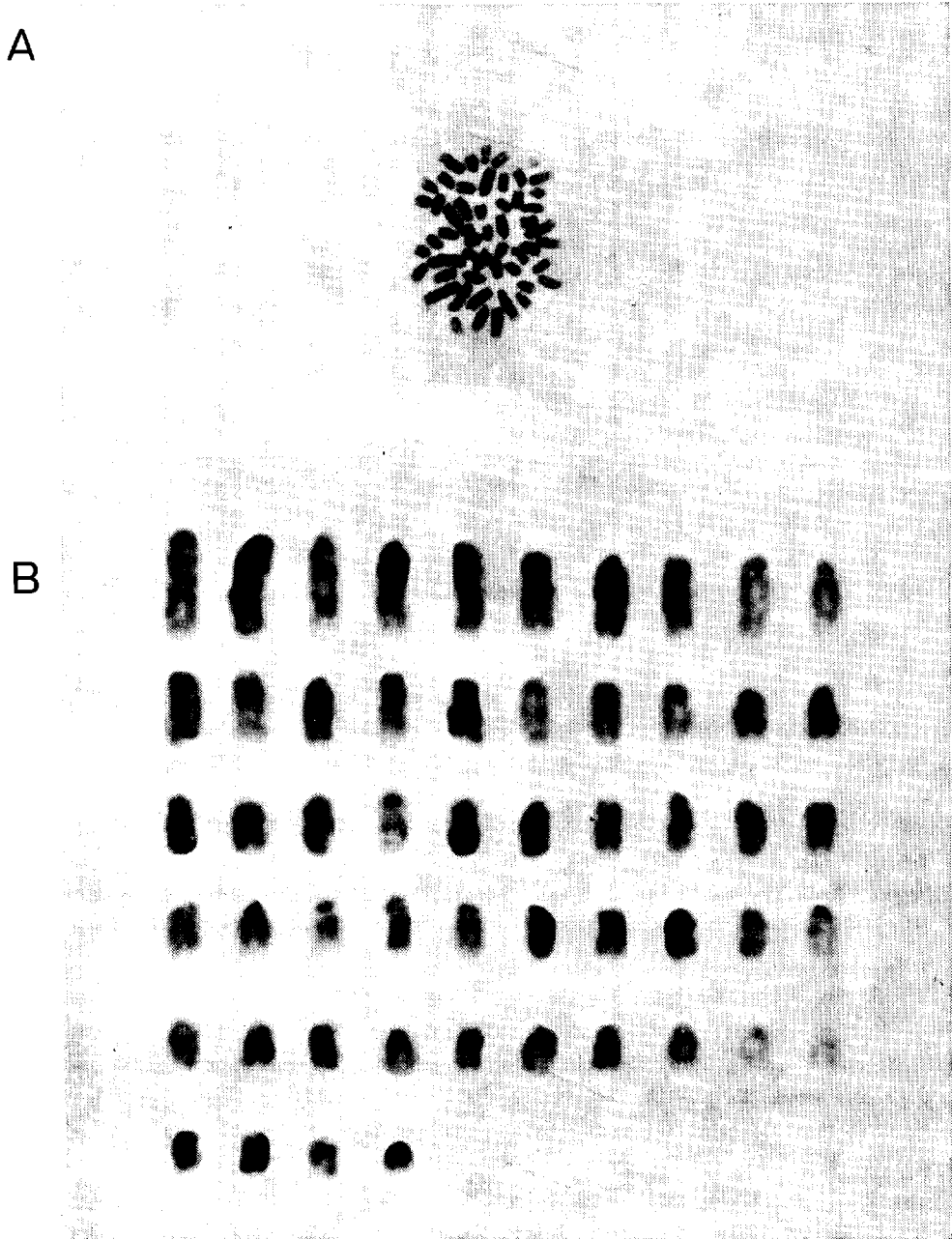
理した卵から得た孵化仔魚約 100 尾をクロレラ海水中でワムシを投与して飼育したが、減耗が激しく、孵化後 6 日目には全ての仔魚が削減した。なお、同じ方法で飼育した S × S 無処理卵から得た孵化仔魚は順調に育った。

## 考 察

原田ら (1984) はマダイの卵を授精 5 分後に 0.2~0.4℃ の海水中で 5~60 分処理することにより、上野ら (1986) は *Tilapia nilotica* の卵を授精 5 分後に 15℃ の水中で 45 分間処理することにより同質 3 倍体を得ている。また、荒井 (1986) はサケの卵にカワマスの精子を媒精して 15 分後に 650kg/cm<sup>2</sup> の水圧を 7 分間加えることにより孵化仔魚の致死性を回復させている。本実験では定性的な結果にとどまったが、低温処理による S × N 受精卵の異質倍数化は可能であり、10℃ で 3 分間という比較的高い処理温度、短い処理時間でも倍数個体の出現が認められた。しかし、5℃ 及び 10℃ の処理温度において倍数化個体を高率で得るためには、授精後 10 分以内に開始、5 分間以上の処理が必要であると思われる。また、交雑種に現われる初期の発生異常が異質倍数化によって回復する傾向のあることが示唆された点は興味深い。今後は水圧処理も含めた処理条件と倍数化個体出現率・孵化仔魚生存性の関係を検討し、最適処理条件を決定していく必要がある。

## 文 献

- 荒井克俊, 1986: サケ雌とカワマス雄による異質三倍体化の発生に対する影響(英文), 日本誌, 52(5), 823-829.
- 藤田矢郎, 1955: カワハギの卵発生と仔魚前期, 九大農学部学藝雑誌, 15(2), 229-234.
- 原田輝雄・宮下 盛・村田 修・上野紘一, 1984: マダイの人為 3 倍体の生産, 昭和 59 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 146.
- MUROFUSHI, M. and T. H. YOSIDA, 1979: Cytogenetical studies on fishes, I. Karyotypes of four file fishes., Japan J. Genet., 54(3), 191-195.
- MUROFUSHI, M., OIKAWA, S., NISHIKAWA, S., and YOSHIDA, T. H., 1980: Cytogenetical studies on fishes, III. Multiple sex chromosome mechanism in the filefish, *Stephanolepis cirrhifer*, Japan J. Genet., 55(2)127-132.
- 小野里 担, 1983: 魚類の人為倍数化とその利用, 水産育種, 8, 17-29.
- , 1985: バイオテクノロジーと水産業, 水産振興, 208, 1-56.
- OJIMA, Y. and UEDA, T., 1976: Fish chromosome methodology from embryos., Kwansei gakuin univ. ann. stud., 25, 121-124.
- PURDOM C. E. 1983: Genetic engineering by the manipulation of chromosomes, Aquaculture, 33, 287-300.
- 生物学ハンドブック (本城市次郎編), 1953, p.19, 岩波書店, 東京
- 塚島康生・北島 力, 1981: カワハギ仔稚魚の飼育と形態の変化について, 長崎水試研報, 7, 39-46.
- 塚島康生・吉田範秋・荒川敏久, 1985: カワハギの種苗生産試験, 昭和 58 年度長崎水試事報, 251-252.
- 上野紘一・長瀬彰良・矢田敏晃, 1986: 魚類の人為倍数化に関する研究—XII 3 倍体 *Tilapia nilotica* の不妊性と生殖行動, 昭和 61 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 119.
- 山崎文雄・小野里 担・荒井克俊, 1981: 魚胚による染色体永久標本作成法 (小刻法), 日本誌, 47(7), 963.



**Plate 1.** The metaphase figure (A) and the karyotype (B) of a S×N-allotriploid embryo exposed for 5min to 10°C, 2min after insemination.



Plate 2. Hatched larvae developed from a S x N-non-treated lot.

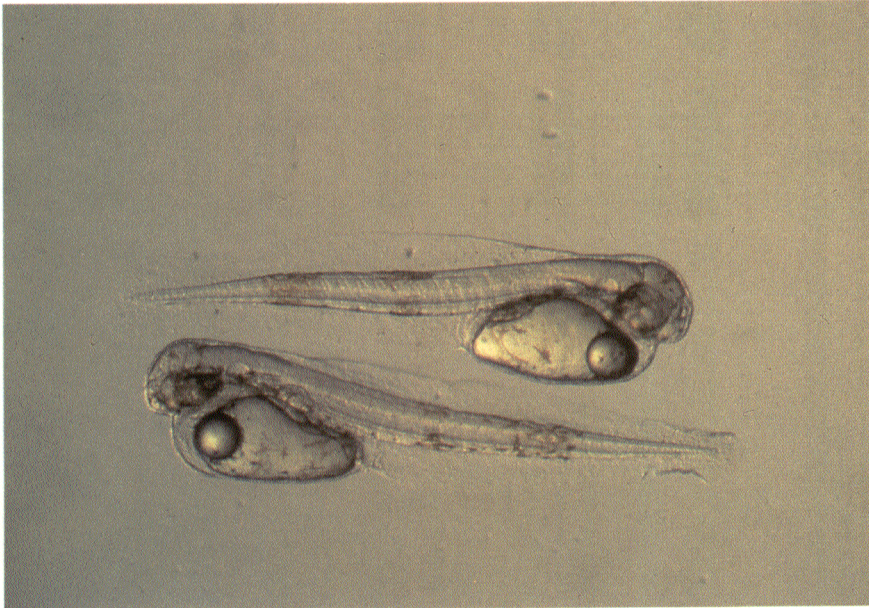


Plate 3. Hatched larvae developed from a S x N-treated lot (exposed for 10min to 5°C, 5 min after insemination).