

種 苗 生 産 技 術 開 発 試 験

増 殖 科 池 卓 也

I. クエ種苗生産技術開発試験

目 的

クエ採卵用親魚を養成し、種苗生産技術を開発する。

材料及び方法

採卵用親魚は当场で海面小割網（3.5×3.5×3.5m）に収容し養成中の天然魚42尾（平均体重3.0kg、0.2～13.2kg）から12尾（平均体重5.5kg、3.2～13.2kg）を選別し使用した（表－1）。

これらの親魚は5月26日に雄1尾、雌5尾ずつを海面小割網から取り上げ陸上90kℓ円形水槽及び40kℓ円形水槽に収容し、それぞれ1区、2区とした。

1区の餌料はマッシュ1、冷凍魚0.2、冷凍イカ0.4及び冷凍オキアミ0.4に外割でフィードオイル5.0%、総合ビタミン剤2.0%、ビタミンEオイル0.4%、

表－1 魚体測定結果

親魚区分	全長 (cm)	体重 (kg)	備考
1	84.2	13.2	雄
	72.2	6.0	雌
	68.6	5.2	〃
	66.0	5.1	〃
	66.4	4.5	〃
	66.0	4.3	〃
2	72.0	8.3	雄
	65.4	4.7	雌
	63.0	3.9	〃
	62.0	3.6	〃
	61.0	3.7	〃
	57.0	3.2	〃
雄性化試験		9.5	H5購入
		8.9	〃
		7.6	
		4.6	

表－2 モイスペレットの組成

種類	配合割合
マッシュ	1
冷凍魚*	0.2
冷凍イカ	0.4
冷凍オキアミ	0.4
フィードオイル	上記量の5.0%
総合ビタミン剤	〃 2.0
ビタミンEオイル	〃 0.4
ビタミンC	〃 0.1
レシチン	〃 1.0

*:イワシ、アジ、サバ、イカナゴを適宜使用

ビタミンC0.1%及びレシチン1.0%を添加したモイストペレット（表－2）とし、2区の餌料は生餌（冷凍サバ、冷凍マアジ、冷凍イカ）とし、週2～3回飽食量与えた。

これらの水槽にはシュルターを収容尾数と同数設置した。

人工採卵は1区は7月6日及び7月8日の2回、2区は7月14日の1回行った。ホルモン剤は魚体重1kgあたりゴナトロピン500IUとシロザケ脳下垂体7mgを併用し、48時間後に採卵を試みた。

雄魚の確保を目的としたメチルテストステロン処理による雄性化試験は当场で養成中の個体2尾と平成5年11月に入手した個体2尾の計4尾（4.6～9.5kg、平均体重7.7kg）を使用した。メチルテストステロンは1日あたり1mg/kgをカプセルに詰めモイストペレットに挿入して投与した。

結果及び考察

5月27日～7月5日（水温22.1～27.2℃）の陸上水槽収容中に産卵は確認されなかった。また人工採卵では1、2区とも精子は得られたが、卵が得られなかった。卵が得られなかった原因としては、低水温期から産卵期間にかけて摂餌状態が非常に不安定であり、産卵期に腹部の肥大した個体が見られなかったことから、雌が成熟していなかったものと考えられる。今後は低水温期に加温を行い摂餌を促進させ、雌の成熟促進に努めることが課題である。

雄性化試験は3月25日からメチルテストステロン投与を開始し35、53、70日後に腹部を圧迫し採精を試みたが精子は得られなかった。供試魚は十分なサイズであると考えられることから¹⁾²⁾、雄性化個体が見られなかった原因として、供試魚のうちの2尾が

平成5年11月に購入した個体でありモイストペレットに十分慣れておらず、また夏期の高水温、赤潮による影響で試験区全体の摂餌状態が悪くホルモン剤の摂取量が少なかったためと考えられる。今後はモイストペレットに慣れた個体を使用し試験を行う必要がある。

文 献

- 1) 塚島康生・北島 力（1983）メチルテストステロン経口投与によるマハタの雄性化促進 長崎県水試研報、9, 55-57
- 2) 塚島康生・吉田範秋（1984）メチルテストステロン経口投与によるクエの雄性化促進 長崎県水試研報、10, 101-102

Ⅱ．バイオテクノロジー導入試験

1. 目 的

海面養殖業の主要魚種であるマダイに染色体操作技術を応用して育種を行い、優れた形質を持つ品種を確立する。

2. 平成6年度事業内容

- 1) 第二極体放出阻止型雌性発生二倍体第三世代の作出試験
- 2) 第一卵割阻止型雌性発生二倍体の作出条件解明試験

3. 事業の概要

- 1) 第二極体放出阻止型雌性発生二倍体第三世代（以下 GA3）の作出試験

材料及び方法

採卵用親魚は平成3年4月に低水温処理法により作出し養成中の第二極体放出阻止型雌性発生二倍体の第二世代¹⁾（以下 GA2）を用いた。自然条件下では成熟・産卵が見られなかったため、ホルモン接種（ゴナトロピン500IU/kg）を行い、採卵は48時間後に搾出法により行った。得られた卵は紫外線照

射により不活性化（3,500erg/mm²、40～45sec）したクロダイ精子で媒精した後、低水温処理法（媒精3分後に0℃の海水に12分間浸漬）により作出を試みた。また、対照区として通常二倍体及び平成元年作出²⁾のGA1を親魚としたGA2を設定した。GA2の採卵についてもGA3と同様にホルモン接種により行った。

結果及び考察

採卵の結果2尾から卵が得られ、1尾から受精卵が得られた。処理卵は500ℓ陸上水槽中に設置した孵化ネットで管理を行った。孵化仔魚は500ℓの陸上水槽で60日令まで飼育し、以後は海面小割網で飼育した。陸上水槽での飼育中の減耗はあまり見られなかったが、海面小割での飼育中にイリドウィルス感染症が発生し3～4割が斃死した。

DNAフィンガープリント法（制限酵素Hinf I, プローブYNZ22, M13）による分析で遺伝的類似度（BSI*）はプローブYNZ22で通常二倍体が0.386、GA2は0.910、GA3は1.000であり、プローブM13で通常二倍体が0.309、GA2は0.936、GA3は1.000であった。この結果からGA3は変異が極めて少なく、

遺伝的に均質な個体群となっていることが推定された³⁾。

$$* : BSI = 2 N_{AB} / (N_A + N_B)$$

N_{AB} は共有する断片数、 N_A 、 N_B はA、B個体に見られた断片数

2) 第一卵割阻止型雌性発生二倍体の作出条件解明試験

材料及び方法

採卵用親魚は、高知県栽培漁業センター及び高知県水産試験場で養成中の通常二倍体を用い、採卵は搾出法により行った。得られた卵は紫外線照射により不活性化(3,500erg/mm²、40～45sec)したマダイ精子あるいはクロダイ精子で媒精し、低水温処理(0℃)、高水温処理(35℃)及び高水圧処理(700kg/cm²)の組み合わせにより試験区を設定した。卵は処理後GA3と同様に500ℓ陸上水槽で飼育管理を行った。各試験区について孵化率、二倍体孵化率及び半数体孵化率をビーカー試験により求めた。また、対照区としてマダイ精子で受精した通常二倍体区を設定した。

結果及び考察

低水温処理による試験結果を表-1に示した。媒精後の発生水温を18℃とし35、40、45分後に低水温処理を5～30分の範囲で行った試験区ではすべての試験区で孵化が認められ、7.2～88.9%の孵化率が得られたが二倍体の発生率は低くほとんどが半数体であった。

低水温処理と高水温処理の組み合わせによる作出試験結果は表-2に示した。媒精後の発生水温を18℃とし45分後に高水温処理2.5分と低水温処理5分を組み合わせた試験区では、低水温処理・高水温処理・低水温処理の試験区で2.9%及び100%の二倍体発生率が得られたが孵化率は3.8%及び3.4%と低い値であった。他の試験区ではわずかに孵化が認められたがすべて半数体であった。

低水温処理と高水温処理を組み合わせた試験結果は表-3・4・5に示した。媒精後の発生水温を18℃とし、31、36、40分後に低水温処理5分と高水圧処理5分を行った試験区で孵化は認められなかった。

媒精後の発生水温を16℃とし、45～72.5分の範囲で処理開始時間を変え低水温処理5分、高水圧処理5分を行った試験区では処理開始時間が50～60分の範囲に孵化が認められ、二倍体発生率も72.7～100%と高い値であった。しかし、孵化率は0.1～1.5%と極めて低い値であった。

媒精後の発生水温を16℃とし、55分後に低水温処理・高水圧処理の組み合わせた試験区では、低水温処理5分、高水圧処理5分の試験区で最大48%の孵化率が得られ、また低水温処理5分、高水温処理5分の後に再度低水温処理を2、3、5、10、15分行った試験区では最大で19.7%の孵化率が得られた。この両試験区では孵化が認められない試験区もあったが、孵化仔魚が得られた試験区での二倍体発生率は33～100%と高い値を示した。

低水温処理・高水温処理を2回行った試験区では孵化は認められなかった

各試験区における通常二倍体の孵化率は2.9～98.2%の範囲にあり、平均で57.8%であった。

これらの試験で得られた孵化仔魚は継続して飼育したが、原因不明の斃死が多く、数尾のみの生産にとどまり第一卵割阻止型雌性発生魚の作出証明には至らなかった。

卵割阻止型雌性発生二倍体の作出条件検討では、高水圧処理法が有効であると考えられ⁴⁾⁵⁾、平成5年度は比較的高い孵化率及び二倍体発生率が得られた⁶⁾。しかし、安定かつ大量に生産できる処理条件が見いだせず、また孵化後の生残率が非常に悪いことから、染色体の倍数化が高水圧処理では不完全ではないかと考えられ、今年度は低水温処理及び高水温処理による条件検討も行ったが、低・高水温処理のみでは孵化仔魚は得られるものの二倍体の発生率が低い場合が多く高水圧処理を上回る条件は見出せなかった。

本年度の試験結果では、昨年までと同様に低水温処理5分、高水圧処理5分、または低水温処理5分、高水圧処理5分の後再度低水温処理5分間の条件下で高い二倍体発生率が得られたが同一条件下におい

ても孵化率にばらつきがあり、今後は安定した作出 条件を解明する必要がある。

表-1 低水温処理による作出試験結果

処理開始時間 (発生水温)	処理方法	処理時間 (分)	孵化率 (%)	補正孵化率 (%)	二倍体*1 発生率(%)	半数体*2 発生率(%)	二倍体*3 発生率(%)
35:00 (18°C)	c	5	57.5	67.4	0.0	100.0	0.0
		10	88.9	104.3	6.3	93.8	5.6
		15	31.6	37.0	0.0	100.0	0.0
		20	36.2	42.5	8.0	92.0	2.9
		21	27.1	31.8	0.0	100.0	0.0
		22	28.1	32.9	0.0	100.0	0.0
		23	36.1	42.3	0.0	100.0	0.0
		24	29.1	34.1	0.0	100.0	0.0
		25	29.6	34.7	0.0	100.0	0.0
		26	28.1	32.9	0.0	100.0	0.0
		27	30.3	35.6	0.0	100.0	0.0
		28	35.9	42.1	0.0	100.0	0.0
		29	15.6	18.2	0.0	100.0	0.0
		30	19.0	22.2	0.0	100.0	0.0
40:00 (18°C)	c	5	22.2	26.1	3.3	96.7	0.7
		10	21.6	25.3	0.0	100.0	0.0
		15	24.8	29.1	1.2	98.8	0.3
		20	24.0	28.1	4.3	95.7	1.0
		21	14.7	17.3	0.0	100.0	0.0
		22	14.0	16.4	0.0	100.0	0.0
		23	29.6	34.8	0.0	100.0	0.0
		24	21.1	24.7	0.0	100.0	0.0
		25	16.7	19.6	16.7	83.3	2.8
		26	10.6	12.5	0.0	100.0	0.0
		27	8.7	10.2	0.0	100.0	0.0
		28	22.0	25.8	0.0	100.0	0.0
		29	8.6	10.1	14.3	85.7	1.2
		30	18.6	21.8	0.0	100.0	0.0
45:00 (18°C)	c	5	24.1	28.2	1.4	98.6	0.3
		10	23.5	27.6	0.0	100.0	0.0
		15	28.2	33.0	0.0	100.0	0.0
		20	34.1	40.0	0.0	100.0	0.0
		21	20.6	24.2	0.0	100.0	0.0
		22	19.8	23.2	1.2	98.8	0.2
		23	22.4	26.3	2.3	97.7	0.5
		24	40.5	47.5	4.3	95.7	1.8
		25	42.4	49.7	0.0	100.0	0.0
		26	36.3	42.5	3.7	96.3	1.4
		27	33.7	39.5	0.0	100.0	0.0
		28	7.2	8.4	0.0	100.0	0.0
		29	35.1	41.1	5.2	94.8	1.8
		30	29.9	35.1	11.5	88.5	3.4

c: 低水温処理(0°C)

*1: $2n / (2n+n) \times 100$

*2: $n / (2n+n) \times 100$

*3: $2n / \text{総卵数} \times 100$

表-2 低水温・高水压処理による作出試験結果

処理開始時間 (発生水温)	処理方法	処理時間 (分)	孵化率 (%)	補正孵化率 (%)	二倍体*1 発生率(%)	半数体*2 発生率(%)	二倍体*3 発生率(%)
45:00 (18°C)	h-c	2.5,5	0.0	0.0			0.0
	h-c-h	2.5,5,2.5	0.0	0.0			0.0
	h-c-h-c	2.5,5,2.5,5	0.0	0.0			0.0
	c-h	5,2.5	1.1	1.2	0.0	100.0	0.0
	c-h-c	5,2.5,5	3.8	4.1	100.0	0.0	3.8
	c-h-c-h	5,2.5,5,2.5	0.0	0.0			0.0
	c-h-c-h-c	5,2.5,5,2.5	0.0	0.0			0.0
	c-h	5,2.5	5.7	5.8	0.0	100.0	0.0
	c-h-c	5,2.5,5	3.4	3.4	2.9	97.1	0.1
	c-h-c-h	5,2.5,5,2.5	0.0	0.0			0.0
	c-h-c-h-c	5,2.5,5,2.5	0.2	0.3	0.0	100.0	0.0

h: 高水温処理(35°C)

c: 低水温処理(0°C)

*1: $2n/(2n+n) \times 100$ *2: $n/(2n+n) \times 100$ *3: $2n/\text{総卵数} \times 100$

表-3 低水温・高水压処理による作出試験結果

処理開始時間 (発生水温)	処理方法	処理時間 (分)	孵化率 (%)	補正孵化率 (%)	二倍体*1 発生率(%)	半数体*2 発生率(%)	二倍体*3 発生率(%)
31:00 (18°C)	c-p	5,5	0.0				
	c-p-c	5,5,5	0.0				
	c-p	5,5	0.0				
	c-p-c	5,5,5	0.0				
36:00 (18°C)	c-p	5,5	0.0				
	c-p-c	5,5,5	0.0				
	c-p	5,5	0.0				
	c-p-c	5,5,5	0.0				
40:00 (18°C)	c-p	5,5	0.0				
	c-p-c	5,5,5	0.0				

p: 高水压処理(700kg/cm²)

c: 低水温処理(0°C)

*1: $2n/(2n+n) \times 100$ *2: $n/(2n+n) \times 100$ *3: $2n/\text{総卵数} \times 100$

表-4 低水温・高水压処理による作出試験結果

処理開始時間 (発生水温)	処理方法	処理時間 (分)	孵化率 (%)	補正孵化率 (%)	二倍体*1 発生率(%)	半数体*2 発生率(%)	二倍体*3 発生率(%)
45:00(16°C)	c-p-c	5,5,5	0.0	0.0			0.0
47:30			0.0	0.0			0.0
50:00			0.5	0.7	72.7	27.3	0.3
52:30			0.7	0.9	100.0	0.0	0.7
55:00			0.9	1.3	75.0	25.0	0.7
57:30			0.7	1.0	100.0	0.0	0.7
60:00			0.1	0.2	100.0	0.0	0.1
62:30			0.0	0.0			0.0
65:00			0.0	0.0			0.0
67:30			0.0	0.0			0.0
70:00			0.0	0.0			0.0
72:30			0.0	0.0			0.0

p: 高水压処理(700kg/cm²)

c: 低水温処理(0°C)

*1: $2n/(2n+n) \times 100$ *2: $n/(2n+n) \times 100$ *3: $2n/\text{総卵数} \times 100$

表-5 低水温・高水压処理による作出試験結果

処理開始時間 (発生水温)	処理方法	処理時間 (分)	孵化率 (%)	補正孵化率 (%)	二倍体*1 発生率(%)	半数体*2 発生率(%)	二倍体*3 発生率(%)
55:00 (16°C)	p	5	15.3	16.6	54.5	45.5	8.3
	p-c	5,5	13.5	14.7	69.2	30.8	9.4
	c-p	5,5	21.5	30.2	84.4	15.6	18.1
		5,5	1.3	3.0	100.0	0.0	1.3
		5,5	0.0	0.0			0.0
		5,5	1.6	19.4	100.0	0.0	1.6
		5,5	0.7	25.3	33.3	66.7	0.2
		5,5	4.9	5.3	100.0	0.0	4.9
		5,5	0.0	0.0			0.0
		5,5	5.3	16.6	90.0	10.0	4.8
		5,5	0.0	0.0			0.0
		5,5	0.9	1.3	50.0	50.0	0.5
		5,5	0.0	0.0			0.0
		5,5	48.4	98.6	86.7	13.3	41.9
		5,5	7.6	12.0	84.1	15.9	6.4
		5,5	1.2	1.3	100.0	0.0	1.2
		5,5	2.7	3.1	100.0	0.0	2.7
		5,5	5.2	9.5	92.9	7.1	4.8
		5,5	1.4	2.2	66.7	33.3	0.9
		5,5	8.1	11.5	100.0	0.0	8.1
		5,5	3.5	6.8	92.9	7.1	3.3
		5,5	1.9	10.2	100.0	0.0	1.9
		5,5	0.0	0.0			0.0
	c-p-c	5,5,2	0.0	0.0			0.0
		5,5,3	4.1	25.4	50.0	50.0	2.1
		5,5,3	0.0	0.0			0.0
		5,5,5	19.7	27.7	79.1	20.9	15.6
		5,5,5	1.9	62.0	100.0	0.0	1.9
		5,5,5	2.9	3.1	100.0	0.0	2.9
		5,5,5	5.3	5.7	100.0	0.0	5.3
		5,5,5	2.9	18.0	100.0	0.0	2.9
		5,5,5	0.0	0.0			0.0
		5,5,5	17.4	35.5	81.8	18.2	14.2
		5,5,5	2.0	3.1	100.0	0.0	2.0
		5,5,5	0.7	0.8	100.0	0.0	0.7
		5,5,5	0.0	0.0			0.0
		5,5,5	4.7	8.7	78.1	21.9	3.7
		5,5,5	3.0	4.8	42.9	57.1	1.3
		5,5,5	1.5	2.9	100.0	0.0	1.5
		5,5,10	6.0	17.9	100.0	0.0	6.0
		5,5,10	0.0	0.0			0.0
		5,5,15	0.0	0.0			0.0
	c-p-c-p	5,5,2,2	0.0	0.0			0.0
		5,5,2,3	0.0	0.0			0.0
		5,5,2,5	0.0	0.0			0.0
		5,5,3,1	0.0	0.0			0.0
		5,5,3,5	0.0	0.0			0.0
		5,5,8,2.5	0.0	0.0			0.0

p: 高水压処理(700kg/c m²)

c: 低水温処理(0°C)

*1: $2n / (2n+n) \times 100$ *2: $n / (2n+n) \times 100$ *3: $2n / \text{総卵数} \times 100$

4. 謝 辞

本試験は高知大学農学部栽培漁業学科谷口順彦教授と共同研究であり、事業推進に当たって谷口教授、関助教授以下水族生態学教室の皆様方に多くのご協力を頂いたことに深く感謝します。

文 献

- 1) 小松章博(1993) : バイオテクノロジー導入試験、平成3年度高知水試事報
- 2) 鍋島 浩(1991) : バイオテクノロジー導入試験、平成元年度高知水試事報
- 3) 曾我部五郎・幹田和彦・関伸吾・谷口順彦・池

卓也(1995) : 継代雌性発生発生マダイにおける遺伝変異の減少について、平成7年度日本水産学会春季大会要旨集

- 4) 瀧川由宇登・森勇人・関伸吾・小松章博・谷口順彦(1994) : マダイにおける第一卵割阻止型雌性発生二倍体の誘導条件の検討、水産増殖、42(3), 477-483
- 5) 小松章博(1994) : バイオテクノロジー導入試験、平成4年度高知水試事報
- 6) 小松章博(1995) : バイオテクノロジー導入試験、平成5年度高知水試事報