

21. バイオテクノロジー導入試験

バイオテクノロジー導入試験

増殖科 小 松 章 博

I 事業目的

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、養殖用種苗として優れた形質を持つ品種の確立を図る。

II 事業項目

1. 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体第 2 世代の遺伝特性解明試験
2. 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体の性コントロール技術開発試験
3. 卵割阻止型雌性発生 2 倍体の作出条件解明試験
4. 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体と 3 倍体の成長比較試験

III 事業概要

1. 極体放出阻止型雌性発生 2 倍体第 2 世代の遺伝特性解明試験

1) 材料及び方法

(1) 採卵親魚

高知県栽培漁業センターで育成中の通常 2 倍体雌（以下 Nor 2N と言う）から平成元年 5 月に低温処理法¹⁾（媒精 3 分後に 0℃の海水に 10～15 分間浸漬）で作出したのち当場の海面小割で飼育を継続し、平成 4 年 3 月 17 日に海面小割から陸上 30 トン採卵用水槽に移して飼育をした極体放出阻止型雌性発生 2 倍体第 1 世代（以下 GA(1) と言う）を採卵用親魚として用いた。これらの GA(1) は 3 家系より作出し海面小割で混合飼育していたもので、試験用に陸揚げしたものはこれらのうちから比較的成長のよい個体を選別した。陸揚げ数は 92 尾でこのうち雌と判断した 50 尾の平均尾叉長 (FL) は 32.0 (± 3.0) cm, 平均体重 (BW) は 858.6 (± 234.5) g であった。また、これらのなかで最小個体は FL 26.3 cm, BW 430 g で、最大個体は FL 37.8 cm, BW 1,350 g であった。

(2) 採卵及び作出方法

極体放出阻止型雌性発生 2 倍体第 2 世代（以下 GA(2) と言う）の作出は、平成 4 年 4 月 28 日に 7 尾の GA(1) から行った。採卵は 1 尾ごとに搾卵してそれぞれを紫外線照射により不活性化 (3,500～4,000 erg/mm², 40～50 sec) したクロダイまたはマダイの精子で媒精し低温処理法により GA(2) を作出した。処理した卵は、30 ℓ パンライト水槽に移し静置して孵化させた。搾卵した親魚は、即殺してアイソザイム分析により親魚区分を行い（家系は I II III とした）、これを基に孵化した仔魚を区分して試験魚区を設定した。なお、孵化率、作出率についてはビーカー試験で求めた。また、当該試験魚の対照区として、Nor 2N 及び GA(1) の雌 (GA(1)⁺) と同第 1 世代の性転換した雄 (偽

雄GA(1)⁺間の人工採卵交配群の作出・飼育及び自然交配群(以下GA(2)⁺⁻mpと言う)の採卵飼育を行った。GA(2)の孵化率, 親魚区分は表-1に示し実験魚の飼育区分は表-2に示した。

表-1 極体放出阻止型雌性発生第2代目のふ化試験結果(H4.4.28実施)

作出親魚	尾叉長 cm	体 重 g	試験区分 注1)	正常体 ふ化率 (%)	アイソザイムによる 親魚区分	
					EST 注2)	家 系
GA(1)♀1	39.4	1,178	GA(2) ⁺⁻ GA(2) UV. CONT	67.9 0.1 3.7	F	I
GA(1)♀2	33.0	593	GA(2) ⁺⁻ GA(2) UV. CONT	18.2 0.3 1.8	D G	II
GA(1)♀3	32.9	612	GA(2) ⁺⁻ GA(2) UV. CONT	88.2 32.5 0.0	D E	III
GA(1)♀4	32.4	566	GA(2) ⁺⁻ GA(2) UV. CONT	83.1 0.0 0.0	D G	II
GA(1)♀5	32.5	574	GA(2) ⁺⁻ GA(2) UV. CONT	40.0 3.0 0.0	E F	I
GA(1)♀6	29.2	534	GA(2) ⁺⁻ GA(2) UV. CONT	59.3 29.6 1.9	E	I or III
GA(1)♀7	31.7	756	GA(2) ⁺⁻ GA(2) UV. CONT	8.7 0.5 0.0	E	I or III
Nor 2N. CONT				64.0		

注1: GA(2)⁺⁻(GA(1)⁺とGA(1)⁻の交配魚, GA(1)⁻のEST型はFで親魚系統は(I)),
UV. CONT(Nor 2Nの発生率)

注2: エステラーゼ酵素

表-2 試験魚の混合飼育区分

飼育区	作出仔魚	家系区分	アイソザイム区分	備 考
1 区	GA(2) ⁺⁻ ♀3 GA(2) ⁺⁻ ♀5	III I	C E E F	800ℓ水槽飼育
2 区	GA(2) ⁺⁻ ♀4 GA(2) ⁺⁻ ♀6	II I or III	D G E	800ℓ水槽飼育
3 区	GA(2)♀3 GA(2)♀4 GA(2)♀5	III II I	C E D G E F	1,000ℓ水槽飼育
4 区	GA(2) ⁺⁻ mp			500ℓ水槽飼育
5 区	Nor 2N			500ℓ水槽飼育

(3) 成長比較試験

GA(2)とNor 2Nとの成長特性を比較するため、孵化後90日目から飼育密度を変えた混養試験区(60尾区, 120尾区, 180尾区)を設定して飼育を実施した。飼育は1,000ℓの陸上水槽に800ℓ注水して4週間行った。試験魚には, Nor2N, GA(2)⁺⁻mp 及びGA(2)を用いた。なお, GA(2)は親魚♀3, 4, 5を混合したままで試験に供した(以下GA(2)♀345と言う)。各飼育試験区の試験魚は鱗抜き(Nor 2Nは右鱗抜き, GA(2)⁺⁻mpは左鱗抜き)により区別を行った。試験区は表-3に示した。

(4) 組織移植適合性試験

GA(2)の遺伝子的近縁度を見るためにGA(2)の間で組織移植試験を実施した。移植組織は鰓蓋片を用い, 移植部位は各個体の背部とした。それぞれの試験区は4尾を1セットとし, 1個体に他の3個体の移植片と自己の移植片を併せて4片移植した。移植処理した供試魚数は, Nor2N, GA(2)⁺⁻mp, GA(2)⁺⁻♀35, ♀46がそれぞれ24尾(6セット), GA(2)が54尾(14セット)とした。また, GA(2)の親魚(GA(1))の近縁度を見るためにこれらについても同様の方法で移植試験を実施した。GA(1)は1個体に自己移植片も含めて10個の鰓蓋片を移植した。供試尾数は30尾とした(10尾を1セットとして3セット)。組織適合性の判定は10日ごとに40日まで実施し, 受容の可否は移植した鰓蓋片の色素胞が破壊または脱落したときとした。なお, 組織移植はアユで用いられている手法²⁾³⁾によった。また, 家系判別は試験終了後アイソザイム分析により行った。試験区の設定については表-4に示した。

2) 結 果

(1) 成長比較試験

試験期間が短期間であったため試験区間で顕著な成長差が見られなかったが, 飼育密度が高くなるに従って全試験区で成長率が低下する傾向が見られ, 中でもGA(1)⁺⁻mpの成長率の低下がやや大きかった。また, GA(2)では体長・体重ともに他の区に比較して変動係数がやや小さい値を示した。結果は表-3に示した。

表-3 成長比較試験結果

試験区			成 長		平 均 尾 叉 長		平 均 体 重		日間成長量	
			開始時	終 了 時	開始時	終 了 時	開始時	終 了 時	FL	BW
			cm	cm	g	g	mm	g		
60 尾 区	20	Nor2N・cont	7.3±0.7	10.1±0.7(7.2)	8.9±2.2	23.6±5.3(22.6)	0.10	0.53		
	20	GA(2) ⁺⁻ mp	7.4±0.7	9.8±0.7(7.5)	9.3±2.5	21.4±4.8(22.4)	0.10	0.43		
	20	GA(2) ⁺⁻	6.7±0.6	9.6±0.6(6.5)	7.4±1.9	19.6±3.9(19.9)	0.10	0.44		
120 尾 区	40	Nor2N・cont	7.3±0.7	9.5±0.8(8.3)	8.9±2.2	19.3±4.8(24.8)	0.08	0.37		
	40	GA(2) ⁺⁻ mp	7.4±0.7	9.6±0.6(6.0)	9.3±2.5	20.0±3.6(17.9)	0.08	0.38		
	40	GA(2) ⁺⁻	6.7±0.6	8.9±0.6(6.7)	7.4±1.9	16.4±3.2(19.5)	0.08	0.32		

(表-3つづき)

試験区			成長		平均尾 叉 長		平 均 体 重		日間成長量	
			開始時	終 了 時	開始時	終 了 時	開始時	終 了 時	FL	BW
180 尾 区	尾 60	Nor2N・cont	7.3±0.7 ^{cm}	9.5±0.7 (6.8) ^{cm}	8.9±2.2 ^g	19.0±4.2 (22.1) ^g	0.08 ^{mm}	0.36 ^g		
	60	GA(2) ⁺⁻ mp	7.4±0.7	9.3±0.7 (7.5)	9.3±2.5	17.9±3.9 (21.7)	0.07	0.31		
	60	GA(2)	6.7±0.6	9.3±0.5 (4.9)	7.4±1.9	18.0±2.4 (13.4)	0.09	0.38		

注：() の数値は変動係数を示す。GA(2)は、3家系混合。

(2) 組織移植適合性試験

家系内移植では、GA(1)の家系ⅠとGA(2)の家系Ⅲで30日以内他の個体の移植組織を受容する個体が見られた。その他の家系内移植では20日以内に総てを拒絶した。家系間移植では、Nor2N, GA(2)⁺⁻mpともに20日以内に移植組織が拒絶されたが、GA(1)の家系Ⅰ・Ⅱの間で20日以上、GA(2)の家系Ⅰ・Ⅲの間で40日以上移植片の受容がみられた。家系内移植試験結果からGA(1)間の移植に比べてGA(2)間の移植が長期間移植片を受容する傾向がみられた。これらの経過については表-4に示した。

表-4 組織移植試験結果

	移植試験区 注1	10日目	20日目	30日目	40日目
GA(2)	Ⅰ - Ⅰ	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ⅱ - Ⅱ	—	—	—	—
	Ⅲ - Ⅲ	40.48	15.48	9.52	4.76
	Ⅰ - Ⅱ	100.00	50.00	0.00	0.00
	Ⅱ - Ⅲ	61.76	5.88	5.88	2.94
	Ⅲ - Ⅲ	25.00	0.00	0.00	0.00
注2 GA(1)	Ⅰ - Ⅰ	32.64	19.44	2.78	0.00
	Ⅱ - Ⅱ	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ⅲ - Ⅲ	—	—	—	—
	Ⅰ - Ⅱ	28.57	12.50	0.00	0.00
	Ⅰ - Ⅲ	27.78	22.22	5.56	0.00
	Ⅱ - Ⅲ	0.00	0.00	0.00	0.00
CONT	GA(2) ⁺⁻ mp 注3	4.35	0.00	0.00	—
	NOR * NOR 注4	19.44	0.00	0.00	—

注1：家系間の移植状況

注3：GA(2)⁺⁻mp間の移植

注2：1989年作出GA(1)でGA(2)の親魚グループ

注4：Nor2N間の移植

2) 考 察

成長比較試験では、飼育密度が高くなるに従い各試験区とも僅かではあるが成長率が低下する傾向が見られた。また、尾叉長、体重の変動係数は飼育密度が高くなるほど、GA(2)がNor2NやGA(1)よりも縮小する傾向が認められた。

まだい養殖業は高密度の放養を行うことから成長に伴い魚体の大きさにバラツキがでるため選別を頻繁に行っており多くの手間や経費を必要としているが、雌性発生魚を飼育するこ

とで成長差が少なくなるのであればこれらの経費の大幅な低減が図られる。組織移植試験では、GA(2)で家系内の他の個体の移植組織を長期間受容するものが見られたことはGA(2)の遺伝的な近縁度の上昇によるものと考えられ、このことは極体放出阻止型雌性発生魚であっても継代して作出を行うことにより形質が均質な種苗が得られる可能性が高く育種技術として有効な手法⁴⁾であると考えられる。また、家系間の移植でも長期間移植片を受容することが見られたことは、系統間であっても組織適合遺伝子が適合する場合には受容が見られるのではないかと⁵⁾と考えられる。

2. 極体放出阻止型雌性発生2倍体の性コントロール技術開発試験

マダイの性分化については、雌性先熟した後雌雄同体現象をへて雌雄に性分化する事が報告⁶⁾されている。飼育中のマダイGA(1)の性分化については、S63年度に作出したものの性比がほぼ1:1であり、その遺伝的性は雌であるが雄性の生殖腺を持ち精子を形成し、これら雌雄間で交配が可能であった⁷⁾。このことは雌の作出率の低下を招き育種を行ううえで効率が悪いいため性ホルモンによる性のコントロールの可能性を検討した。なお、性ホルモン処理経過については平成2年度に報告⁷⁾した。

1) 材料及び方法

(1) 供試魚及び作出方法

供試魚は、平成2年5月に高知県栽培漁業センターで育成したNor2N(♀3尾)から排卵後、低温処理法¹⁾により作出したGA(1)及び同センターの飼育魚が自然産卵した受精卵から種苗生産したNor2Nを用いた。ホルモン処理区は3家系のGA(1)を一腹ごとに飼育したのちそれらを混合して3区に分割して設定した。Nor2Nについても同様の処理を行った。

(2) 試験方法

試験区は、Nor2N区、GA(1)区ごとに雄性ホルモン処理区(*methyltestosterone*, MT区)、雌性ホルモン処理区(*estradiol-17β*, E2区)、対照区(無処理区)を設定した。ホルモン処理濃度は何れの区も $1.0\mu\text{g}/\ell$ とし、処理は浸漬法により行った。孵化後32日令で第1次のホルモン処理(止水)を14時間実施し、以後第2回次、第3回次の処理を短時間行った。ホルモン処理した後、60日令でNor2N区、GN(1)区とに分けて当場の海面小割へ沖出しし通常の方法により飼育を継続した。なお、処理魚の区別は鰭技法により行った。この性ホルモン処理経過については表-5に示した。平成4年3月には産卵行動を示す個体が出現したことから全数を取り上げて生殖腺を目視することにより雌雄の判定を実施した。

表-5 性ホルモン処理経過

処理数	ふ化後日令	平均体長・体重	処理時間	処理濃度
第1回	32日	無処理区 Nor2N 全長 11.3 mm, 体重 20 mg GA(1) 全長 12.8 mm, 体重 34 mg	6/11~6/12(14H) (17:30~7:30) (WT 22~23℃)	処理濃度は各区とも10 μ g/lとした。
第2回	46日	無処理区 Nor2N 尾叉長 19.5 mm, 体重 144 mg GA(1) 尾叉長 22.4 mm, 体重 201 mg	6/25(2H) (6:15~8:15) (WT 25.5℃)	
第3回	49日	無処理区 Nor2N 尾叉長 26.1 mm, 体重 435 mg GA(1) 尾叉長 25.6 mm, 体重 381 mg メチルテストステロン処理区 Nor2N 尾叉長 26.3 mm, 体重 411 mg GA(1) 尾叉長 26.1 mm, 体重 358 mg エストラジオール処理区 Nor2N 尾叉長 25.9 mm, 体重 405 mg GA(1) 尾叉長 26.0 mm, 体重 372 mg	6/28(2H) (6:20~8:20) (WT 25.0℃)	

注：第1回，第2回の魚体測定は，無処理区のみ実施した。

2) 結果

2年間の飼育結果を見ると成長はいずれの試験区でもNor2NがGA(1)よりも勝り，Nor2N，GA(1)の処理区内でも生殖腺を含めた重量であるがいずれの区とも雄が雌よりも尾叉長，体重ともに成長がよかった。生殖腺の分化はNor2Nの無処理区では♀：♂=1.24：1で若干雌の出現比率が高かったが，MT区では無処理区に比べて♀：♂=1.10：1と雌の比率が減少し，反対にE2区では♀：♂=1.36：1と雌の比率が増加した。また，GA(1)の無処理区では♀：♂=1.47：1，MT区では♀：♂=0.76：1，E2区は♀：♂=1.97：1であった。なお，これらの結果については，表-6，7及び図-1，2に示した。

表-6 通常2倍体の性ホルモン処理結果

処理区	性	項目	体長 (FL)	体重(g)	生殖腺重量 (g)		
					右	左	合計
無処理	雌	最小値	17.7	119.0	0.1	0.2	0.4
		最大値	28.5	515.0	27.9	14.7	30.8
		平均値	23.2	282.5	3.6	4.1	7.8
		標準偏差	1.9	68.5	3.2	3.0	5.5
	雄	最小値	19.6	157.0	0.4	1.0	1.5
		最大値	27.1	451.0	25.4	28.6	51.0
		平均値	23.8	299.8	10.0	10.5	20.1
		標準偏差	1.5	56.2	5.3	5.1	8.5
	雌雄合計数 294						
	性比(♀：♂) ♀：♂=163：131=1.24：1(55.4：44.6)						

処理区	性	項 目	体 長 (FL)	体 重 (g)	生 殖 腺 重 量 (g)		
					右	左	合 計
雄性ホルモン処理 (メチルテストステロン)	雌	最 小 値	17.8	113.0	0.1	0.2	0.6
		最 大 値	27.2	431.0	15.5	14.8	30.0
		平 均 値	23.5	290.1	4.5	4.9	9.5
		標 準 偏 差	1.8	66.6	3.3	3.4	6.6
	雄	最 小 値	19.6	152.0	0.2	0.2	4.3
		最 大 値	27.5	472.0	19.5	23.2	40.4
		平 均 値	23.9	304.4	9.4	11.1	20.7
		標 準 偏 差	1.4	51.8	4.0	4.4	7.2
	雌雄合計数 206 性比(♀:♂) ♀:♂=108:98=1.10:1(52.4:47.6)						
	雌	最 小 値	16.7	86.0	0.2	0.1	0.5
		最 大 値	27.5	452.0	19.2	20.8	40.0
		平 均 値	23.8	303.0	4.5	5.2	10.1
		標 準 偏 差	2.1	76.0	3.8	4.1	8.0
	雄	最 小 値	21.4	214.0	0.2	0.2	0.8
		最 大 値	28.0	486.0	26.7	23.2	39.4
		平 均 値	24.2	315.1	10.1	11.2	20.4
		標 準 偏 差	1.2	54.0	5.4	4.9	7.7
	雌雄合計数 184 性比(♀:♂) ♀:♂=106:78=1.36:1(57.6:42.4)						

表-7 雌性発生2倍体の性ホルモン処理結果

処理区	性	項 目	体 長 (FL)	体 重 (g)	生 殖 腺 重 量 (g)		
					右	左	合 計
無 処 理	雌	最 小 値	15.2	72.0	0.1	0.1	0.2
		最 大 値	26.5	423.0	4.9	7.4	10.9
		平 均 値	21.7	225.6	1.1	1.8	2.8
		標 準 偏 差	2.4	69.5	1.0	1.5	2.5
	雄	最 小 値	18.5	120.0	0.1	0.1	0.7
		最 大 値	27.0	445.0	13.3	15.0	28.1
		平 均 値	22.6	249.2	2.9	4.4	7.2
		標 準 偏 差	1.9	65.5	3.0	3.7	5.2
	雌雄合計数 92 性比(♀:♂) ♀:♂=106:72=1.47:1.00(59.6:40.4)						

(表-7のつづき)

処理区	性	項 目	体 長 (FL)	体 重 (g)	生 殖 腺 重 量 (g)		
					右	左	合 計
雄性ホルモン処理 (メチルテストステロン)	雌	最 小 値	17.3	94.0	0.1	0.1	0.3
		最 大 値	26.0	378.0	4.5	7.7	8.5
		平 均 値	22.3	234.8	1.0	1.9	2.9
		標 準 偏 差	2.2	67.3	1.0	1.6	2.2
	雄	最 小 値	17.9	106.0	0.1	0.1	0.3
		最 大 値	26.2	378.0	10.5	16.2	21.2
		平 均 値	23.0	256.3	3.2	4.8	7.9
		標 準 偏 差	1.5	47.1	2.8	4.0	5.5
	雌雄合計数 102						
	性比(♀:♂) ♀:♂=44:58=0.76:1.00(43.1:56.9)						
	雌	最 小 値	16.7	86.0	0.1	0.1	0.2
		最 大 値	26.8	389.0	4.7	9.6	13.8
		平 均 値	22.5	247.0	1.5	2.3	3.7
		標 準 偏 差	2.3	71.8	1.2	2.0	2.6
雌性ホルモン処理 (エストラジオール)	雄	最 小 値	19.7	178.0	0.1	0.1	0.8
		最 大 値	26.2	407.0	16.8	13.9	21.3
		平 均 値	23.3	270.8	4.3	4.9	9.2
		標 準 偏 差	1.7	58.0	4.2	3.7	5.7
	雌雄合計数 92						
	性比(♀:♂) ♀:♂=61:31=1.97:1.00(66.3:33.7)						

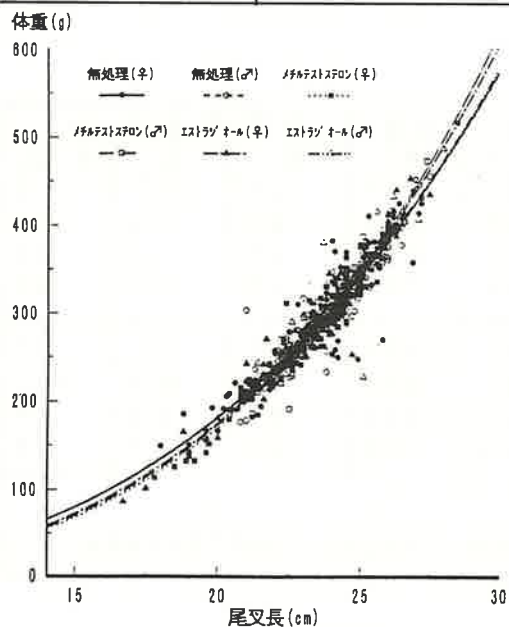


図-1 通常2倍体の体長体重関係

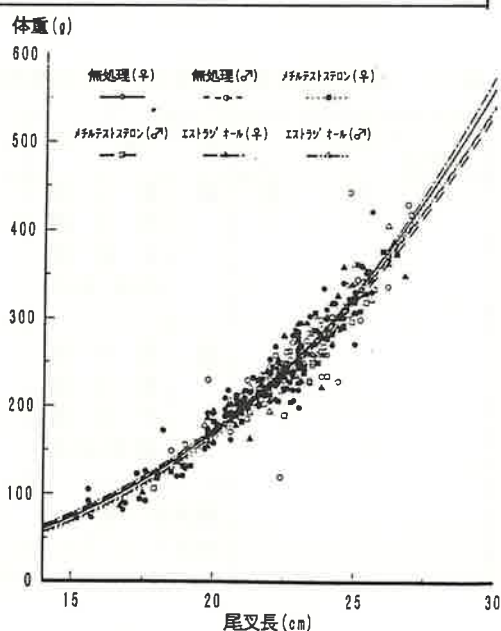


図-2 雌性発生2倍体の体長体重関係

3) 考 察

本試験はホルモン処理時にビブリオ病が発生し十分な処理が実施できなかったためかGA(1)のMT処理区のみが有意であるとの結果となった。また、GA(1)は、遺伝的性が全て雌であると考えれば無処理区で雌、偽雄の性比が1.5 : 1.0であったことは表現的性分化が不安定であることを示している。Nor2Nでは、無処理区の性比が♀ : ♂ = 1.24 : 1.0 となったことから若干雌の比率が高かったが、今回の実験では雌性及び雄性ホルモン処理による性コントロールには到らなかったものと考えられる。なお、GA(1)を効率的に雄化するのには雄性ホルモンを使用することが有効であることは確認されたが、全雌にするためには雌性ホルモンの効率的な投与方法などの検討が必要である。マダイの性は、雌性先熟したのち雌雄同体現象を経て雌雄に分化すること及びこの性分化は若齢魚時の環境要因にも左右されることを中園⁶⁾が報告している。また、雌性発生魚の性分化が不安定であることは平成2年度に報告⁷⁾したところである。このように雌性発生法を用いたマダイの育種ではその性が不安定であることは、偽雄が比較的容易に確保される反面育種効率の低下を招くため、性ホルモン処理法等による性のコントロール技術を確立しておく必要がある。

3. 卵割阻止型雌性発生2倍体の作出条件解明

マダイの品種を確立する手法として極体放出阻止型雌性発生法が挙げられるが、この方法では品種を固定するのに数世代に渡る処理が必要であると見られることから、品種の固定法としてすでに数種類の魚種で技術開発⁸⁾がなされている卵割阻止型雌性発生2倍体(以下GBと述べる)の作出条件の検討を実施した。

1) 材料及び方法

(1) 採卵親魚及び作出方法

採卵親魚は、高知県栽培漁業センターで育成中のNor2N及び平成元年に作出して当海面小割で飼育したGA(1)を用い、これらの親魚からの採卵は搾出法により行った。卵割阻止型雌性発生2倍体の作出は、紫外線照射で不活性化したクロダイまたはマダイの精子で媒精した卵を水温18.0℃で発生させたのち高水圧法により試みた。処理条件については、平成2年度、3年度の試験結果を基に加圧力を700 kg/cm²に固定して受精後の処理開始時間、加圧時間を変化させて作出条件検討を行った。処理開始時間については、Nor2Nの受精卵を水温18℃に保ちながら卵発生させ、経時的に生物顕微鏡と位相差顕微鏡で確認して卵割開始時刻を測定して設定した。作出にあたっては、Nor2Nの受精卵及び精子の不活性化を確認するために対照区を設定した。なお、本年度は作出処理条件の精度を向上し、高水圧処理を効率的に行うために昇圧時間、加圧力を設定すれば自動制御が可能な電動式加圧機を県内の工作機器メーカーで製作して試験を実施した。

2) 結 果

1ℓビーカーで行った孵化試験結果では媒精後18.0℃で発生させた場合には、処理開始時間は45～50分、圧力は700 kg/cm²前後、加圧時間は3～6分の範囲で正常に発生した

個体が得られたが、加圧時間が3分以下の場合には半数体発生率が上昇し、また、加圧を7分以上行った場合には半数が死滅した。孵化率とともに正常体発生率が最も高かったのは、媒精45分後に700 kg/cm²の圧力で5分30秒間処理する場合であった。これらの作出条件及び結果については表-8に示した。

3) 考 察

本年度に実施した加圧力を一定に保ちながら処理開始時間、加圧時間を変化させる試験結果から、媒精後の発生温度を18℃で行った場合の作出条件は、処理開始時間は45～50分、圧力は700 kg/cm²前後、加圧時間は3～6分であろうと考えられた。特に媒精45分後に700 kg/cm²の圧力で5分30秒間処理を行った場合がGBの作出に有効であることが示された。なお、本年度に誘導した正常に発生したふ化仔魚は、混合して飼育していたのが個体間の成長差が大きく飼育中に共食いやその他原因不明の斃死が続き、全長20～30 mmまでで生残したのは数尾でGBの作出証明に到らなかった。

表-8 卵割阻止型雌性発生2倍体の作出処理結果

* 1992年4月24日実施G2NB作出条件試験結果判定表(判定4/25～4/28, ビーカー試験結果)

親魚番号	受精後処理 開始時間	処理圧力 (kg/cm ²)	加圧時間 (min)	処理卵数 (粒)	死 卵 数 (粒)	半数体 発生数	正常体 発生数	生残率 (%) n+2n/全卵	正常生残率 2n/全卵 (%)
♀ 1	UV CONT			31	31	0	0	0.00	0.00
♀ 2	46:00	700	3:00	3,008	3,008	0	0	0.00	0.00
	46:00	"	6:00	2,757	2,757	0	0	0.00	0.00
	UV CONT			200	200	0	0	0.00	0.00
	NOR, CONT			231	226	0	5	2.16	2.16
♀ 3	35:00	700	3:00	0	0	0	0		
	45:00	"	"	893	459	383	10	44.57	1.12
	55:00	"	"	1,926	1,926	0	0	0.00	0.00
	35:00	"	6:00	6,756	6,756	0	0	0.00	0.00
	45:00	"	"	3,154	3,039	0	115	3.65	3.65
	55:00	"	"	4,887	4,887	0	0	0.00	0.00
	UV CONT			313	216	97	0	30.99	0.00
	NOR, CONT			509	509	0	0	0.00	0.00
	40:00	700	3:00	37	37	0	0	0.00	0.00
♀ 4	50:00	"	"	472	472	0	0	0.00	0.00
	60:00	"	"	573	573	0	0	0.00	0.00
	40:00	"	6:00	393	393	0	0	0.00	0.00
	50:00	"	"	2,112	2,112	0	0	0.00	0.00
	60:00	"	"	0	0	0	0		
	UV CONT			153	153	0	0	0.00	0.00
	NOR, CONT			313	250	0	63	20.13	20.13
	35:00	700	5:00	694	694	0	0	0.00	0.00
♀ 5	45:00	"	"	2,370	2,370	0	0	0.00	0.00
	55:00	"	"	1,246	1,246	0	0	0.00	0.00
	35:00	"	7:00	37,809	27,806	3	0	0.01	0.00
	45:00	"	"	2,914	2,914	0	0	0.00	0.00
	66:00	"	"	1,344	1,344	0	0	0.00	0.00
	UV CONT			84	65	8	11	22.62	13.10
	NOR, CONT			597	588	0	9	1.51	1.51
	40:00	700	5:00	11,516	11,516	0	0	0.00	0.00
♀ 6	50:00	"	"	322	322	0	0	0.00	0.00
	60:00	"	"	4,783	4,783	0	0	0.00	0.00
	40:00	"	7:00	2,416	2,416	0	0	0.00	0.00
	50:00	"	"	11,950	11,950	0	0	0.00	0.00
	60:00	"	"	5,083	5,083	0	0	0.00	0.00
	UV CONT			213	167	46	0	21.60	0.00
	NOR, CONT			247	52	0	195	78.95	78.95

＊ 1992年5月2日実施G2NB作出条件試験結果判定表（判定5/3～5/5，ビーカー試験）

親魚番号	受精後処理 開始番号	処理圧力 (kg/cm ²)	圧力時間 (min)	処理卵数 (粒)	死卵数 (粒)	半数体 発生数	正常体 発生数	生残率(%) n+2n/全卵	正常生残率 2n/全卵(%)
♀ 1	NOR, CONT			333	243	0	90	27.03	27.03
	UV CONT			968	960	0	0	0.83	0.00
	45:00	700	5:30	441	439	0	2	0.45	0.45
♀ 2	NOR, CONT			371	135	0	236	63.61	63.61
	UV CONT			691	496	195	0	28.22	0.00
	45:00	700	5:30	684	684	0	0	0.00	0.00
♀ 3	NOR, CONT			288	11	0	277	96.18	96.18
	UV CONT			106	95	10	1	10.38	0.94
	45:00	700	5:30	728	705	10	5	2.08	0.69
♀ 4	NOR, CONT			188	161	0	27	14.36	14.36
	UV CONT			309	217	92	0	29.77	0.00
	45:00	700	5:30	385	360	25	0	6.49	0.00
♀ 5	NOR, CONT			386	318	0	68	17.62	17.62
	UV CONT			1,437	1,289	145	3	10.30	0.21
	45:00	700	6:00	582	579	0	3	0.52	0.52
♀ 6	NOR, CONT			281	155	0	126	44.84	44.84
	UV CONT			391	397	0	0	0.00	0.00
	45:00	700	6:00	411	411	0	0	0.00	0.00
♀ 7	NOR, CONT			108	67	0	41	37.96	37.96
	UV CONT			1,459	1,459	0	0	0.00	0.00
	45:00	700	6:00	765	765	0	0	0.00	0.00

＊ 1992年5月8日実施G2NB作出条件試験結果判定表（判定5/9～5/10，ビーカー試験）

親魚番号	受精後処理 開始時間	処理圧力 (kg/cm ²)	加圧時間 (min)	処理卵数 (粒)	死卵数 (粒)	半数体(n) 発生数(尾)	正常体(2n) 発生数(尾)	ふ化率(%) n+2n/全卵	正常ふ化率 2n/全卵(%)
♀ 1	NOR, CONT			142	57	0	85	59.86	59.86
	UV CONT			217	111	102	4	48.85	1.84
	45:00	700	3:30	217	210	2	5	3.23	2.30
♀ 2	NOR, CONT			255	196	0	59	23.14	23.14
	UV CONT			235	200	31	4	14.89	1.70
	45:00	700	3:30	54	43	9	2	20.37	3.70
♀ 3	NOR, CONT			55	28	0	27	49.09	49.09
	UV CONT			110	104	6	0	5.45	0.09
	45:00	700	3:30	253	221	29	3	12.65	1.19

4. 極体放出阻止型雌性発生2倍体と3倍体の成長比較試験

平成元年5月に作出して飼育試験を実施していたGA(1)と3倍体（以下3Nと言う）及びNor2Nの成長比較試験を行い養殖用種苗としての可能性を検討した。

1) 材料及び方法

(1) 成長比較試験

供試魚は、平成元年5月に高知県栽培漁業センターで育成した3尾のアイソザイムマーカの異なった雌親魚（Nor2N）から低温処理法により作出した3N，GA(1)及び同親魚から種苗生産したNor2Nを用いた。これらの試験魚は作出に供した3家系を混合して1区とし、それぞれ3N区，GA(1)区，Nor2N区として当场海面小割で通常の方法で密度を調整しながら飼育を実施した。これら3家系の判別は、アイソザイムマーカにより行いそれぞれGA(1)区をGA(12)・GA(13)・GA(14)，3N区を3N(1)・3N(2)・3N(3)としたが、Nor2N区については明確な家系判別が出来なかったため3家系を一括して扱

った。サンプリングによる測定を実施したときには同様にアイソザイムマーカーによって家系判別を行った。飼育に用いた餌料は、海面小割に沖だし後平成2年8月までマアジの切り身に総合ビタミン剤を添加して与え同年9月以降最終測定まで当场でモイストペレットを作成して投餌した。投餌回数は周年を通して週3回としほぼ飽食給餌とした。飼育期間中の魚体測定は、通常は3家系を混合した状態で麻酔剤（エチレングリコールモノフェニルエーテル）を用いて実施した。

(2) 3倍体の精子の確認

3Nは一般的に不稔性であると言われているが平成4年4月には、雄の婚姻色を示す個体が確認されたことから、これらより搾精を行い生物顕微鏡で精子の形態等を確認した後、湿導法により未受精卵に媒精した。受精の確認は受精卵を水温18℃で静置して1～2時間後に卵割を確認する方法で行った。

2) 結 果

(1) 成長比較試験

3年間の飼育結果では、3Nは飼育期間中を通してNor2NやGA(1)に比べて成長が悪く、平成4年5月にはGA(1)に比較して尾叉長で3.4cm、体重で220g小さく、同年12月の最終測定時には尾叉長で2.9cm、体重で243gの差が生じた。また、12月に同時に測定したNor2Nと比べると尾叉長で3.7cm、体重で277gの成長差が生じた。GA(1)の3家系内での成長比較では飼育初期よりGA(13)とGA(12)、GA(14)間に成長差が認められた。飼育期間中にGA(12)とGA(14)間では成長率の逆転が見られたがGA(13)との逆転は見られなかった。このGA(13)の家系は体長、体重ともNor2Nよりも成長が優れていた。この結果は表-9に示した。

表-9 3倍体・雌性発生2倍体・通常2倍体の魚体測定結果

測定月	試験区	資料数	尾 叉 長 (cm)		体 重 (g)	
			平 均 値	標 準 偏 差	平 均 値	標 準 偏 差
H2.5	3N	20	16.8	0.9	98.3	14.4
	GA(1)	20	17.0	1.3	109.0	24.9
	NOR・2N	20	17.1	1.8	109.0	29.1
H2.9	3N	30	18.7	1.3	141.7	33.2
	GA(1)	30	19.3	1.4	164.3	37.3
	NOR・2N	30	20.6	1.8	197.0	47.2
H2.11	GA(1)	50	20.5	2.0	185.6	52.4
H3.3 ¹⁾	GA(12)	63	20.6	2.0	200.0	59.7
	GA(13)	66	22.5	2.3	254.9	63.7
	GA(14)	20	21.4	2.2	212.1	71.0
	GA(1)	130	21.6	2.4	228.9	68.4

測定月	試験区	資料数	尾 叉 長 (cm)		体 重 (g)	
			平 均 値	標 準 偏 差	平 均 値	標 準 偏 差
H 3. 3 2)	3 N	30	21. 6	1. 5	212. 7	43. 2
	GA (1)	30	22. 2	1. 8	249. 5	51. 5
	NOR・2 N	30	23. 5	2. 3	310. 2	90. 4
H 4. 5	GA (12)	7	29. 7	2. 2	555. 1	42. 8
	GA (13)	22	30. 7	2. 9	677. 7	185. 0
	GA (14)	2	29. 6	3. 4	510. 8	100. 8
	GA (1)	31	30. 4	...	693. 2	...
	3 N (1)	1	30. 3	0	524. 9	0
	3 N (2)	9	26. 4	1. 8	401. 0	81. 3
	3 N (3)	5	27. 4	1. 0	432. 1	30. 1
	3 N	15	27. 0	...	419. 6	...
	GA (12)	18	31. 3	2. 2	701. 5	140. 0
	GA (13)	28	36. 7	3. 0	1,039. 8	272. 2
H 4. 12	GA (14)	9	32. 9	2. 4	725. 5	138. 1
	GA (1)	55	34. 3	3. 6	865. 8	261. 3
	3 N (1)	20	32. 2	2. 8	660. 5	185. 0
	3 N (2)	18	30. 9	2. 8	617. 2	172. 7
	3 N (3)	16	31. 1	2. 4	567. 8	159. 7
	3 N	54	31. 4	2. 8	622. 4	174. 3
	Nor 2 N	31	35. 1	2. 3	899. 8	189. 2

1):平成3年3月7日 2):平成3年3月18日

(2) 3倍体の精子

婚姻色を出す3Nのうちで搾精が可能な個体は非常に少なく、また、搾精が可能であった個体でも精子の量はごく微量(0~0.5ml/個体)であった。精子の形態は頭部に核が複数個(2~3個)見られ、尾部に鞭毛が複数本(2~5本)確認された。3N精子の核は、Nor2Nの精子のものより大きく、また、複数個の核が頭部に見られることから頭部がNor2Nのものより大型であった。3N精子の媒精試験では、卵の発生が見られなかった。

3) 考 察

(1) 成長比較試験

3倍体は、一般に不妊性を示すことから水産分野においても研究開発が推進されており、

多くの魚種で量産が可能となっている⁸⁾。Nor2Nのマダイは養殖期間中に生殖行動を行うため成長が停滞し経済的損失が大きい。これらの解決策として不稔化した3Nを養殖用種苗として用いることを目的として熊本県や長崎県で先進的な研究が成されてきた。本県においても平成元年5月に低温処理法により第2極体放出阻止型3倍体⁹⁾を作出して長期間の飼育試験を実施した。3年間の飼育結果は、3NがNor2NやGA(1)に比べて成長が劣り不妊性に伴う成長の向上は確認できなかった。成長が劣った原因は、3Nは一般的にNor2NやGA(1)と比較してその摂餌行動が緩慢なことや赤潮発生や船舶などの航行に伴う衝撃などの環境変化に敏感でこの様なときには摂餌しないことなどによるものと考えられる。なお、今回飼育した3NはNor2Nに比べて赤血球数は0.67倍で赤血球容積は1.34倍¹⁰⁾であったことから当場の海面小割を施設してある浦の内湾が初夏から初冬にかけて溶存酸素量が低下することによる影響も大きいものと考えられる。今回の試験から3Nの作出に使用した親魚の選び方や飼育環境による影響が大きいとしても第1代目の3Nを養殖用種苗として用いることは有用ではないかと考えられる。これらのことから、養殖用種苗としての3Nの活用法はその形質等が把握された育種の進んだ系統を用いて不妊化する全雌3倍体の利用にあらうと思われる。

(2) 3倍体の精子

3Nは雄の精子を受精させた後に低温処理して第2極体の放出阻止を行い作出するが、精子は雄と雌の性染色体を持っていると考えられることから作出された3Nには遺伝的な性が雌と雄の個体が存在する。前述したように3Nは不妊化し生殖行動をしないため養殖用種苗としての有用性が高いと考えられたが、平成4年4月には3N雄の婚姻色が確認され生殖機能を発現する事が明らかとなった。精子の受精能力については採精し未受精卵への媒精を試みたが発生は見られなかった。3Nの生殖行動は3N雄雌間では観察出来なかったが、隣接した小割で飼育していたNor2Nの産卵行動時に3N雄が落ち着かない行動を示したことから産卵を行う雌が存在する場合には生殖行動に参加すると見られる。このことは、3N雄が小割等の飼育環境から自然環境へ逃亡や放流を実施した場合には天然のNor2Nの産卵行動に参加し産卵された卵が無駄になると考えられるので、今後、一般漁業者が3Nの飼育を行うに当たってはこのような知見を十分に普及する事や施設管理に万全を期す必要があるものと考えられる。

IV 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の共同研究であり事業推進に当たって、谷口教授、関講師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。

V 文 献

- 1) 鍋島 浩(1990): マダイの雌性発生2倍体作出試験 昭和63年度高知水試事報
- 2) 日本水産資源保護協会: 雌性発生法によるアユの有用形質の識別・評価に関する研究, 水産

- 物有用形質評価手法開発事業報告書，平成2年度，135～144
- 3) *Hyon-Sob Han, Nobuhiko Taniguchi, and Akio Tsujimura : Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 (5), 825-832 (1991)
- 4) 谷口順彦(1989)：染色体操作の遺伝学的意義 水産学シリーズ. 75. 水産増養殖と染色体操作 日本水産学会監修104～116. 厚生社厚生閣 東京
- 5) 滝川由宇登(1993)：マダイの量的形質における家系内及び家系間の変異に関する研究，高知大学農学部栽培漁業学科卒業論文
- 6) 中園明信(1987)：日本産タイ科魚類の性転換とその水産増殖へ応用に関する研究，昭和59～61年度科学研究費補助金(一般研究C)研究成果報告書
- 7) 小松章博(1992)：平成2年度バイオテクノロジー導入試験，平成2年度高知水産事報
- 8) 水産庁(1993)：水産分野におけるバイオテクノロジー研究の現状 平成5年4月 水産庁研究部研究課
- 9) 鍋島 浩(1991)：マダイの雌性発生2倍体及び3倍体作出試験，平成元年度 高知水試事報
- 10) 森 勇人(1993)：染色体操作マダイの遺伝変異に関する研究，高知大学大学院農学研究科修士論文

