

平成4年度地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業報告書

サクラマス全雌3倍体
大量作出技術に関する検討

平成5年3月

石川県内水面水産試験場

目 次

I 研究の背景及び目的	2
II 研究計画	2
III 研究内容	3
大量作出技術開発試験	3
(1) 倍数化処理条件の検討	3
ア 大量作出試験	3
イ 処理条件に関する検討	4
(2) 4倍体作出条件に関する検討	8
ア 平成4年度作出魚について	8
イ 平成3年度作出魚の倍数性について	11
IV 要 約	12
V 次年度の計画	12
VI 文 献	13

【協力機関名】

石 川 県 増 殖 試 験 場

【担当機関及び担当者】

石 川 県 内 水 面 水 産 試 験 場

場 長 伊 藤 勝 昭

増殖研究専門員 高 門 光太郎

技 師 増 田 泰 隆

サクラマス全雌3倍体大量作出技術に関する開発研究

I 研究の背景及び目的

サケ・マス類は経済価値の高い魚種である。そのため、沿岸漁業不振の打開策として各地で増養殖事業が展開されている。

また、海中養殖については我が県でもギンザケやサクラマスを主体として行われてきた。

このような中で、本県においてはサケ・マス類の中でも経済価値が高いとされるサクラマスに着目した。ところが、本県の海面環境は冷水性魚類であるサクラマスにとって夏期の海水温が適温をはるかに越えるため養殖期間は11月～5月の約半年に限定される。

このため海水飼育開始時の大きさが大型でかつ高成長な種苗が求められている。

これに対応して全雌3倍体化したサクラマスを用いて高成長時の初年度成熟を回避することにより大型種苗を生産し、成熟の回避による肉質の向上と併せて通常魚との差について検討する。

また、全雌3倍体魚の作出法について従来からの第2極体放出阻止法による直接的作出と第1卵割阻止法により一旦4倍体魚を作出する間接的方法について検討を行う。

本年度は第2極体放出阻止法による3倍体魚の作出と第1卵割阻止法による4倍体魚の作出およびホルモンによる偽雄の作出について検討し、このうち3倍体魚の作出と4倍体魚の作出について報告する。

なお、ホルモンによる偽雄魚の作出については供試魚が成熟する来年度以降の報告とする。

II 研究計画

項 目	研究の趣旨	3年度	4年度	5年度	6年度	7年度
【大量作出技術開発試験】 ・処理条件の検討	加温、加圧および収容容器などの処理条件に関する検討を行なう。	○	○	○		
・4倍体作出技術に関する検討	加温、加圧等により4倍体サクラマスの作出について検討する。	○	○	○		
【性転換技術開発試験】 ・ホルモン処理条件の検討	ホルモン処理の開始時期と濃度に関する検討。	○	○			
【全雌3倍体サクラマス飼育試験】 ・種苗大型化試験	早期採卵、および飼育環境の改善により全雌3倍体種苗の大型化を図る。		○	○	○	○
・海水飼育試験	全雌3倍体魚の生物特性の究明と効率的な飼育技術の開発を図る。			○	○	○

Ⅲ 研究内容

大量作出技術開発試験

(1) 倍数化処理条件の検討

ア 大量作出試験

a. 材料と方法

倍数化処理を行うに当たって卵を収容する容器について検討した。

- ・供試親魚：北海道立水産孵化場森支場で育成されたサクラマスより継代した池産系サクラマス親魚群（以下森系）より雌8尾、平成2年度に作出した全雌サクラマスにメチルテストステロン処理を施した性転換処理群から雄3尾を取り出した。
- ・媒精方法：雌魚8尾から等張洗卵法により搾出した卵を混合した後雄3尾の精子を搾出し羽根を用いて混合したものに飼育水を注水し受精させた。
- ・収容容器：ネット型（容積約30ℓ）
- ・収容卵数：1区あたり3,000～10,000粒
- ・処理条件：媒精後10℃で10分間吸水し28℃で20分間浸漬した。

b. 結果及び考察

表-1に結果を示す。

表-1 大量作出試験実施結果

試験区	発眼率 (%)	孵化率 (%)	倍数化率 (%)
9月30日実施	53.0 (1603/ 3026)	43.1 (1304/ 3026)	93.3(28/ 30)
9月30日対照	77.8 (402/ 517)	73.7 (381/ 517)	
10月5日実施	42.2 (1635/ 3871)	38.5 (1489/ 3871)	93.3(28/ 30)
10月5日対照	47.8 (243/ 508)	44.9 (228/ 508)	
10月7日実施1	66.4 (3644/ 5487)	59.7 (3278/ 5487)	100.0(30/ 30)
10月7日1対照	85.3 (452/ 530)	80.9 (429/ 530)	
10月7日実施2	54.8 (5903/10769)	51.8 (5574/10769)	100.0(30/ 30)
10月7日2対照	78.5 (215/ 274)	76.6 (210/ 274)	

ここに示す処理区及び対照区の発生率はかなり低かった。

これは受精後16時間の時点での観察の結果未受精卵が多かったことから性転換雄魚の精子に何らかの問題があったものと考えられる。

一方対照区に対する試験区の発眼、孵化率はそれほど低率ではないため処理そのものによる減耗は少なかったものと思われる。

また、倍数化率については各区とも高い倍数化率を示したが特に10月7日に行った試験区についてはサンプルとして抽出した各30尾がすべて3倍体であった。

これらのことから第2極体の放出を阻止するにあたり28℃20分間の温水処理を用いることは300～500粒の卵に対する場合と1500～5000粒の卵に対する場合において大きな差のないことが示唆された。

イ 処理条件に関する検討

a. 材料と方法

温水処理による倍数化処理について、より効果的な条件について検討する。

- ・供試親魚：森系サクラマス親魚群より雌30尾、平成2年度に作出した全雌サクラマスにメチルテストステロン処理を施した性転換処理群から雄3尾を取り出した。

- ・媒精方法：各処理温度区において雌魚5尾から搾出した卵を混合し、雄3尾より搾出した精子と羽根を用いて卵と混合した後、飼育水を注水し受精させた。受精後5分間静置した後籠型容器に収容し、更に受精後10分後まで環境水中で吸水させた。

このとき環境水の水温は12.2℃であった。

- ・処理条件：受精後10分間吸水させた卵を25℃、26℃、27℃、28℃、29℃の各温度について表-2に示す時間だけ浸漬した後環境水中に戻した。

試験区の設定及び実施結果を表-2に発眼率、孵化率、倍数化率を図-1-1～3に示す。

b. 結果および考察

この試験でも性転換雄魚の精子が不良であったため対照区の受精率で70%程度の場合が多く結果発生率も低かった。今回の試験において良好な発生率を示したのは25～26℃で処理した場合であり、これらの低い温度では処理時間の延長に対して発生率の落ち込みも少なかった。

一方、倍数化率について25℃においては60%程度の倍数化率しか得られなかったが26℃においては35、40分の処理時間において90%台の倍数化率に達した。

また、27、29℃では生残魚が少なかったため明瞭な傾向が得られなかったが28℃では20、25分で倍数化率が100%に達した。

26℃と28℃では倍数化率は28℃の方が良好であったが生残率では26℃の方が上回り倍数化魚を獲得する効率では26℃で40分間の処理を行うもののがもっとも優れていた。

ただし作業時間の短縮と倍数化魚の確実な作出という点では28℃台で最適条件を見つける方が好ましいものと考えられる。これらについて昨年度の試験に用いた山形系サクラマスのもとの比較してみると今回供試魚として用いた森系サクラマスは25、26℃の処理区での倍数化率は山形系の90%台に対して低めだがそれ以上の温度では山形系より高い倍数化率を示した。このことは倍数化処理時間の短縮が可能であることを示すものと考えられ、森系のほうが山形系よりも採卵時期が早いこととあわせて森系が山形系よりも全雌3倍体魚の大量作出について有用であることを示すものと考えられる。

表一 2 試験区の設定および実施結果

	処理時間 (分)	発眼率 (%)	孵化率 (%)	倍数化率 (%)
25℃	2 0	41.9 (101/ 241)	33.6 (81/ 241)	33.3 (10/ 30)
	2 5	50.2 (130/ 259)	40.9 (106/ 259)	42.9 (12/ 28)
	3 0	44.6 (148/ 332)	39.5 (131/ 332)	53.8 (14/ 26)
	3 5	43.0 (89/ 207)	34.8 (72/ 207)	46.7 (14/ 30)
	4 0	49.7 (148/ 298)	41.9 (125/ 298)	61.5 (16/ 26)
	対照区	47.7 (53/ 111)	36.9 (41/ 111)	
26℃	2 0	0.0 (0/ 222)	(/)	(/)
	2 5	4.3 (11/ 258)	3.1 (8/ 258)	80.0 (4/ 5)
	3 0	2.7 (7/ 316)	1.9 (6/ 316)	66.7 (4/ 6)
	3 5	0.0 (0/ 345)	(/)	(/)
	4 0	8.7 (12/ 138)	5.1 (7/ 138)	71.4 (5/ 7)
	対照区	16.8 (28/ 167)	16.2 (27/ 167)	
27℃	1 5	10.0 (99/ 992)	6.4 (63/ 992)	66.7 (20/ 30)
	2 0	25.1 (60/ 239)	10.9 (26/ 239)	86.7 (13/ 15)
	2 5	8.6 (23/ 269)	3.7 (10/ 269)	80.0 (8/ 10)

	処理時間 (分)	発眼率 (%)	孵化率 (%)	倍数化率 (%)
27℃	3 0	20.1 (52/ 259)	10.4 (27/ 259)	0.0 (0/ 2)
	対照区	47.2 (59/ 125)	17.6 (22/ 125)	
28℃	1 5	39.4 (126/ 320)	32.2 (103/ 320)	90.9 (20/ 22)
	2 0	31.3 (104/ 332)	23.5 (78/ 332)	100.0 (30/ 30)
	2 5	32.0 (87/ 272)	23.2 (63/ 272)	100.0 (30/ 30)
	3 0	24.9 (86/ 346)	11.8 (41/ 346)	86.7 (26/ 30)
	対照区	69.5 (139/ 200)	61.0 (122/ 200)	
29℃	5	8.2 (27/ 331)	6.3 (21/ 331)	100.0 (20/ 20)
	1 0	0.0 (0/ 323)	(/)	(/)
	1 5	0.0 (0/ 352)	(/)	(/)
	2 0	0.0 (0/ 169)	(/)	(/)
	対照区	56.3 (103/ 183)	50.3 (92/ 183)	
25℃ -2	2 0	16.7 (66/ 396)	13.4 (53/ 396)	36.7 (11/ 30)
	2 5	19.5 (103/ 527)	16.1 (85/ 527)	50.0 (15/ 30)
	3 0	7.4 (34/ 458)	5.7 (26/ 458)	40.0 (6/ 15)
	3 5	57.9 (226/ 390)	53.3 (208/ 390)	38.5 (10/ 26)
	4 0	8.2 (34/ 413)	7.3 (30/ 413)	56.7 (17/ 30)
	対照区	69.1 (386/ 559)	61.5 (344/ 559)	
26℃ -2	2 0	67.0 (448/ 669)	64.3 (430/ 669)	80.0 (24/ 30)
	2 5	59.3 (408/ 688)	57.0 (392/ 688)	86.7 (26/ 30)
	3 0	23.7 (133/ 562)	20.6 (116/ 562)	86.7 (26/ 30)
	3 5	59.8 (332/ 555)	54.6 (303/ 555)	90.0 (27/ 30)
	4 0	58.0 (393/ 678)	54.7 (371/ 678)	92.9 (26/ 28)
	対照区	35.7 (163/ 456)	33.6 (153/ 456)	

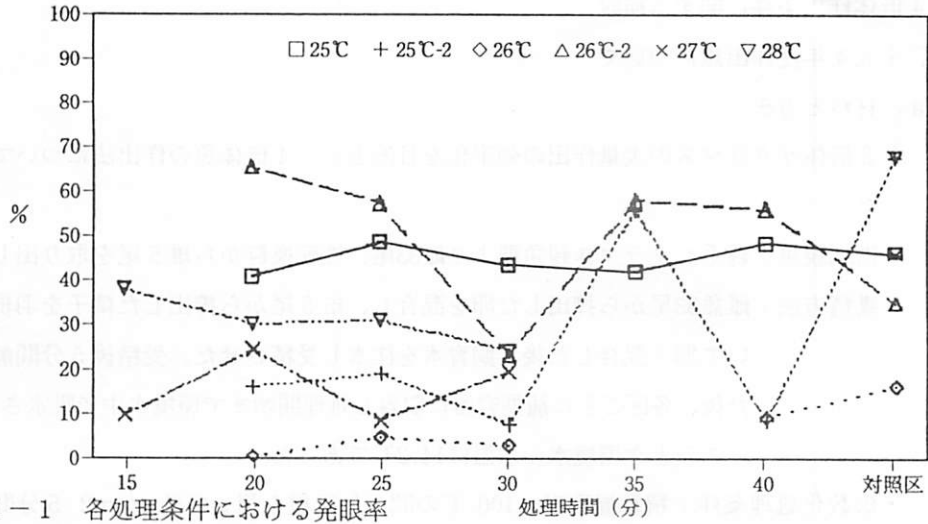


図-1-1 各処理条件における発眼率

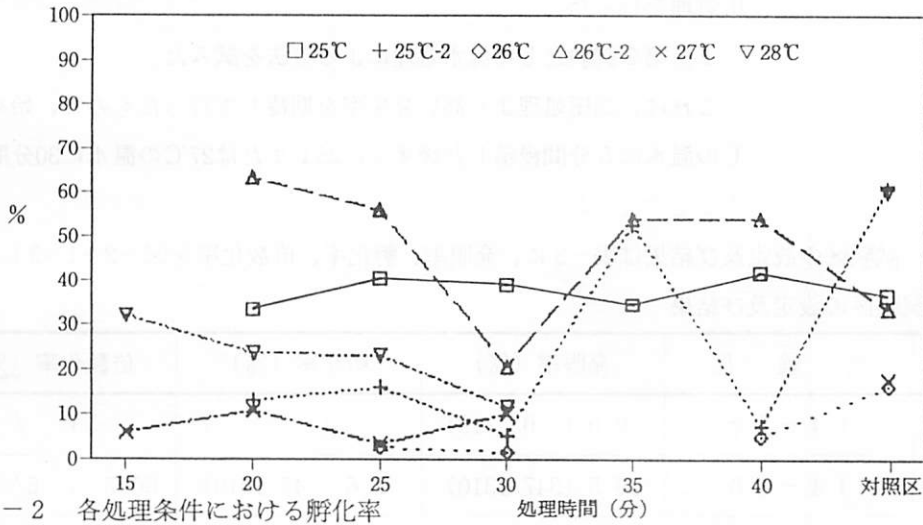


図-1-2 各処理条件における孵化率

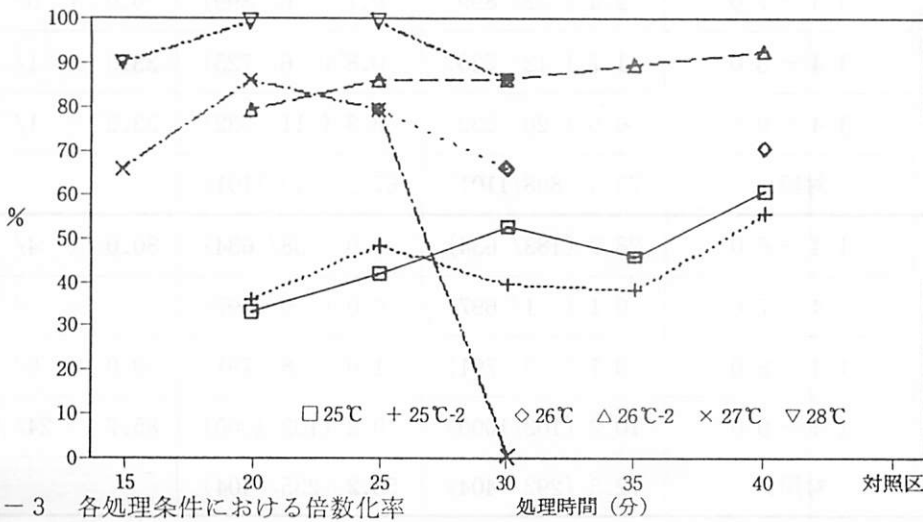


図-1-3 各処理条件における倍数化率

(2) 4倍体作出条件に関する検討

ア、平成4年度作出魚について

a. 材料と方法

3倍体サクラマス的大量作出の効率化を目的として4倍体魚の作出法について検討した。

- ・供試親魚：森系サクラマス親魚群より雌33尾、性転換群から雄5尾を取り出した。
- ・媒精方法：雌魚33尾から搾出した卵を混合し、雄5尾から搾出した精子を羽根を用いて卵と混合した後、飼育水を注水し受精させた。受精後5分間静置した後、各区ごとに籠型容器に収容し処理開始まで環境水中で吸水させた。このとき環境水の水温は14.2℃であった。
- ・倍数化処理条件：積算温度50～100℃の間で加圧機を用い650kg/cm² 5分間の加圧処理を行った。

また第2試験として温水処理による方法を試みた。

これは、加圧処理より高い発生率を期待して行ったもので、始めに20℃の温水に5分間浸漬した後すぐに25℃または27℃の温水に30分間浸漬するものとした。

試験区の設定及び結果は表-3に、発眼率、孵化率、倍数化率を図-2-1～3に示す。

表-3 試験区の設定及び結果

	試験区	発眼率 (%)	孵化率 (%)	倍数化率 (%)
加圧処理 第一試験	14-50	0.0 (0/ 719)	(/)	(/)
	14-60	26.5 (347/1310)	3.6 (47/1310)	66.7 (6/ 9)
	14-70	2.4 (22/ 899)	0.7 (6/ 899)	0.0 (0/ 3)
	14-80	1.7 (12/ 725)	0.8 (6/ 725)	33.3 (1/ 3)
	14-90	6.0 (20/ 332)	3.3 (11/ 332)	33.3 (1/ 3)
	対照区	73.4 (808/1101)	67.2 (740/1101)	
加圧処理 第二試験	14-60	28.9 (183/ 634)	6.0 (38/ 634)	80.0 (4/ 5)
	14-70	0.1 (1/ 697)	0.0 (0/ 697)	(/)
	14-80	0.1 (9/ 791)	1.0 (8/ 791)	0.0 (0/ 2)
	14-90	10.2 (102/1000)	10.2 (102/1000)	85.7 (24/ 28)
	対照区	72.3 (292/ 404)	58.2 (235/ 404)	

	試 験 区	発眼率 (%)	孵化率 (%)	倍数化率 (%)
温水処理 第一試験	25-50	33.3 (188/ 564)	28.0 (158/ 564)	0.0 (0/ 30)
	25-60	31.8 (194/ 611)	24.1 (147/ 611)	0.0 (0/ 30)
	25-70	35.5 (142/ 400)	32.8 (131/ 400)	0.0 (0/ 30)
	25-80	20.9 (83/ 397)	14.4 (57/ 397)	7.1 (2/ 28)
	25-90	9.8 (41/ 418)	6.2 (26/ 418)	0.0 (0/ 26)
	対照区	58.5 (169/ 289)	45.7 (132/ 289)	
温水処理 第二試験	27-50	27.5 (118/ 429)	21.0 (90/ 429)	20.0 (4/ 20)
	27-60	2.2 (8/ 360)	1.4 (5/ 360)	0.0 (0/ 5)
	27-70	32.0 (132/ 412)	25.7 (106/ 412)	26.7 (8/ 30)
	27-80	24.7 (64/ 259)	15.8 (41/ 259)	6.6 (2/ 30)
	27-90	0.0 (0/ 347)	(/)	(/)
	対照区	58.5 (169/ 289)	45.7 (132/ 289)	

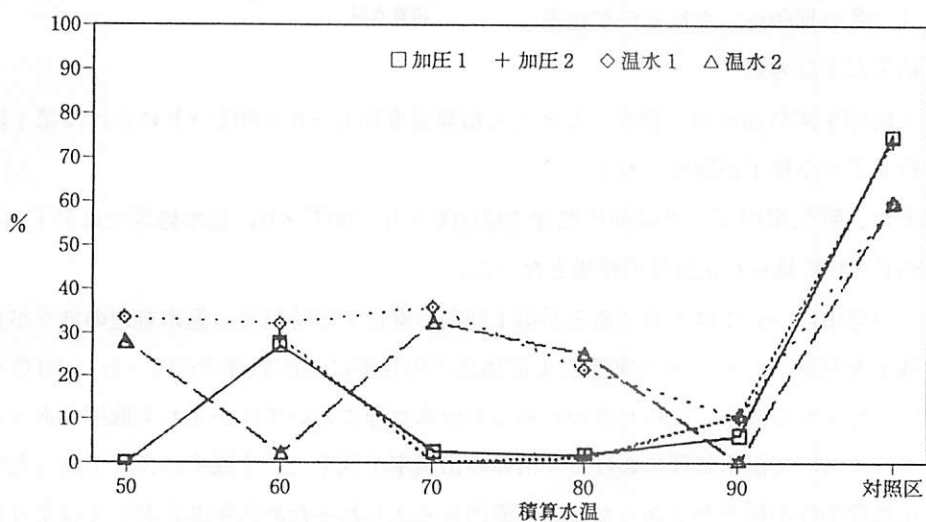


図-2-1 各処理条件における発眼率

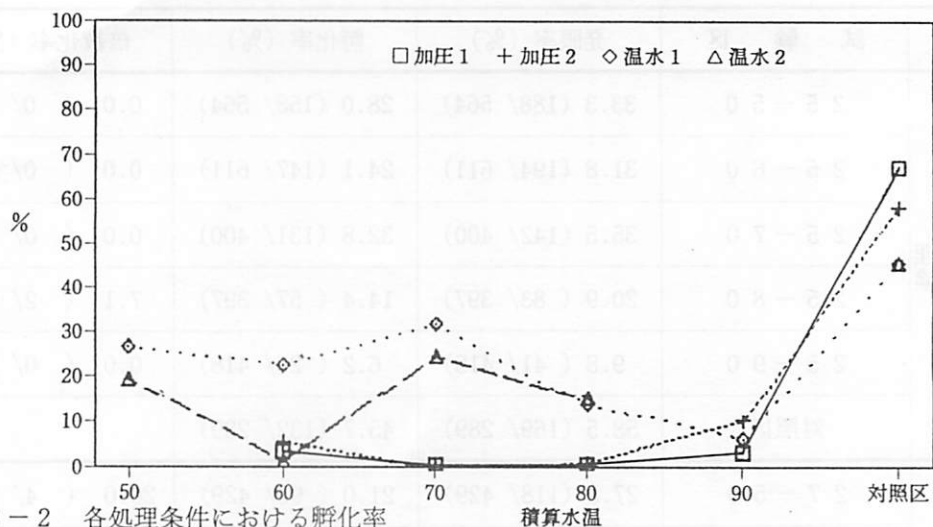


図-2-2 各処理条件における孵化率

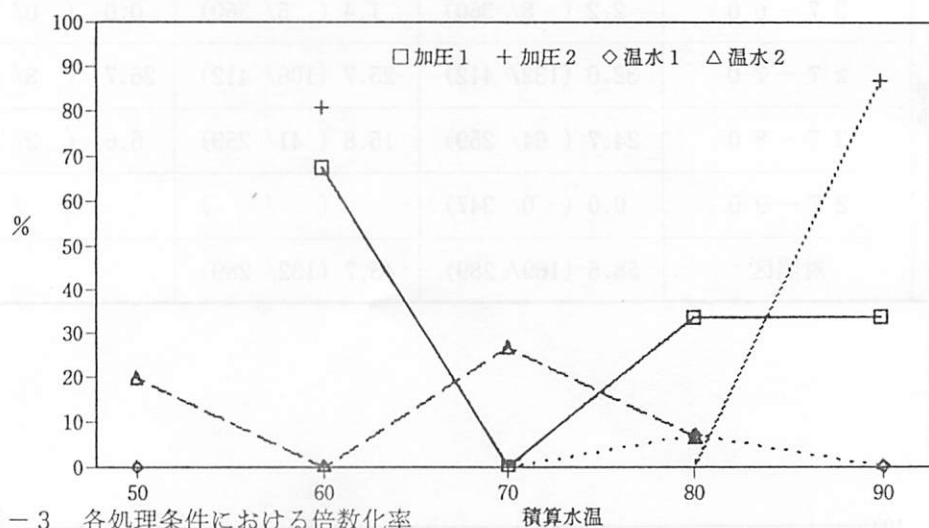


図-2-3 各処理条件における倍数化率

b. 結果および考察

受精卵を実体顕微鏡で観察したところ積算温度70°C・h～80°C・hにかけて第1卵割が進行完了する様子が観察された。

また、孵化率のピークは加圧処理では60°C・hと90°C・h、温水処理では50°C・h、70～80°C・hに見られ正反対の結果となった。

この理由については不明であるが第1卵割の進行する時刻では温水処理のほうが良好な生残率を見せている一方で実際の4倍体魚の出現率は加圧処理の60°C・hと90°C・hにおいてかなりの高率で見られるのに対して温水処理においてはいずれも低率であった。

ここにおいて温水処理における4倍体の出現率が低率で、生残率が良好であったのは倍数化処理条件が穏やかであったことが原因と考えられるため次年度においてはより高い温度での処理について検討する必要があると感じられた。

なお、倍数性の確認については今回の作出魚を4倍体からの3倍体生産試験に利用するため採血および染色体標本などをさけ、核小体の観察による確認に止めた。

イ、4倍体作出条件に関する検討（平成3年度実施試験）

前回小型のため倍数性について検討できず報告できなかった平成3年度実施の4倍体作出試験について報告する。

作出法は媒精温度を10℃と設定し積算温度50～100℃の間で650kg/cm² 5分間の加圧処理を行った。

試験区の設定及び結果は表-3に示す。

表-4 4倍体作出条件の検討に関する試験区及び途中経過

第一試験

試験区	発眼率 (%)	孵化率 (%)	倍数化率 (%)
12-10	26.1 (120/ 459)	29.0 (133/ 459)	0.0 (0/ 30)
12-20	10.1 (53/ 525)	2.9 (15/ 525)	0.0 (0/ 1)
12-30	30.1 (184/ 611)	24.1 (147/ 611)	0.0 (0/ 30)
12-40	2.4 (10/ 413)	0.3 (1/ 413)	0.0 (0/ 1)
12-50	8.0 (24/ 299)	18.1 (54/ 299)	0.0 (0/ 30)
12-60	8.0 (32/ 399)	0.3 (1/ 399)	0.0 (0/ 1)
12-70	0.9 (4/ 431)	1.9 (8/ 431)	0.0 (0/ 2)
12-80	1.6 (9/ 556)	0.9 (5/ 556)	(/)
12-90	38.8 (174/ 449)	33.0 (148/ 449)	0.0 (0/ 30)
12-100	0.8 (4/ 526)	0.2 (1/ 526)	0.0 (0/ 1)
対照区	75.3 (213/ 283)	66.1 (187/ 283)	

第二試験

試験区	発眼率 (%)	孵化率 (%)	倍数化率 (%)
12-15	69.0 (359/ 520)	63.7 (331/ 520)	0.0 (0/ 30)
12-25	16.5 (78/ 472)	0.6 (3/ 472)	(/)
12-35	1.0 (5/ 490)	0.4 (2/ 490)	0.0 (0/ 2)
12-45	0.0 (0/ 485)	(/)	(/)
12-55	5.9 (32/ 542)	0.4 (2/ 542)	0.0 (0/ 2)
12-65	2.6 (18/ 697)	0.1 (1/ 697)	(/)
12-75	0.5 (5/1087)	0.5 (5/1087)	(/)
12-85	0.4 (4/ 985)	0.2 (2/ 985)	(/)
12-95	14.6 (129/ 883)	0.8 (7/ 883)	0.0 (0/ 1)
対照区	91.1 (623/ 684)	84.5 (578/ 684)	

作出魚の中に4倍体魚は見られなかった。この理由としてはこの試験に用いた山形系サクラマスと4年度に用いた森系サクラマスとの間に3倍体の作出において見られるような最適処理条件の相違があることが考えられる。

IV 要 約

大量作出技術開発試験

(1) 倍数化処理条件の検討

ア 大量作出試験

性転換雄魚の精子が不良であったため対照区を含めて全体に発生率は低かった。

第2極体の放出を阻止するにあたり28℃20分間の温水処理を用いることは300～500粒の卵に対する場合と1500～5000粒の卵に対する場合とにおいて大きな差のないことが示唆された。

イ 処理条件に関する検討

性転換雄魚の精子が不良であったため対照区を含めて全体に発生率は低かった。

試験区のうち28℃の20、25分において倍数化率が100%に達した。

26と28では倍数化率は28の方が良好であったが生残率では26の方が上回り、倍数化魚を獲得する効率では26で40分処理する方法が最も優れていた。

また、昨年度用いた山形系サクラマスに比べて今年度用いた森系サクラマスは高水温で短時間の処理で倍数化される傾向にあり採卵時期が半月ほど早い点も合わせて全雌3倍体の大量作出に有用であるものと考えられた。

(2) 4倍体作出条件に関する検討

孵化率のピークは加圧処理では60℃・hと90℃・h、温水処理では50℃・h、70～80℃・hに見られ正反対の結果となった。

第1卵割の進行する時刻では温水処理のほうが良好な生残率を見せている一方で実際の4倍体魚の出現率は加圧処理の60℃・hと90℃・hにおいてかなりの高率で見られるのに対して温水処理においてはいずれも低率であった。

ここにおいて温水処理における4倍体の出現率が低率で、生残率が良好であったのは倍数化処理条件が穏やかであったことが原因と考えられた。

V 次年度の計画

1. 大量生産技術の検討

4年度の結果を基に、加温などの処理条件に関して28℃近辺に絞って行い、系統による適性と合わせて検討する。

また、処理量を1万粒程度とした検討も行う。

また4倍体を用いた大量生産技術についても平成3年度に作出したもので今秋成熟するものについて4倍体からの3倍体の生産、4倍体の継代について検討する予定である。

2. 性転換技術に関する検討

性転換に要する最適な処理条件について検討するため、ホルモン処理開始時期と投与濃度に関する検討を行い、効率的な偽雄の生産方法を明らかにする。

平成3年度に作出した性転換雄魚のうち今秋成熟するものを全雌3倍体魚の作出に用い各ホルモン処理条件ごとの性転換率およびその精子を用いた試験区の発生率等について比較ホルモン処理条件の適否について検討する。

3. 全雌3倍体サクラマス飼育特性の把握

採卵時期の早期化や孵化稚魚の飼育条件について検討し、全雌3倍体種苗の1⁺時期の大型化を図る。

平成3年度に作出した1⁺の2倍体と3倍体を海水で飼育し生残、成長などについて餌料条件も変えながら比較試験を実施し、効率的な飼育技術の開発を図る。

VI 文 献

- 1) 石川県水産試験場(1991):染色体操作による不稔化ヒメマスの作出に関する研究
平成元年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書
- 2) 石川県水産試験場(1989):染色体操作による不稔化ヒメマスの作出に関する研究.
昭和63年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書
- 3) 石川県水産試験場(1988):染色体操作による不稔化ヒメマスの作出に関する研究.
昭和62年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書
- 4) TORGAARD.G.H.,M.E.JAZWIN and A.R.STIRER(1981):Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout,Trans.Am.Fish.Soc.,110,546~550.
- 5) LOU.Y.D. and PURDOM .C.E.(1984):Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout,salmo gairdneri RICHARDSON,J.Fish.Biol.,25,345~351.
- 6) D.CHOURROUT(1982):Tetraploid induced by heat shocks in the rainbow trout (salmo gairdneri RICHARDSON).Replod.Nutr.Develop.,22,569~574
- 7) F.TAKASIMA,R.PATINO,and M.NOMURA(1980):Histological studies on the sex differentiaion in rainbow trout (salmo gairdneri RICHARDSON).Nippon Suisan Gakkaisi,46,1317~1322

- 8) S.KITAMURA,H.OGATA, and H.ONOZATO(1991):Triploid male masu salmon *Oncorhynchus masou* shows normal courtship behavior,Nippon Suisan Gakkaisi, 57,2157
- 9) K.ARAI,K.MATSUBARA,and R.SUZAKI(1991):Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*, Nippon Suisan Gakkaisi,57,2167~2172
- 10) K.ARAI,K.MATSUBARA,and R.SUZAKI(1991):Chromosomes and developmenta potential of progeny of spontaneous tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* Nippon Suisan Gakkaisi,57,2173~2178
- 11) T.OSIRO(1987):Cytological Studies on Diploid Gynogenesis Induced in the Loach *Misgurnus anguillicaudatus*,Nippon Suisan Gakkaisi,53(6),933~939

発行日 平成5年3月31日
発行所 石川県内水面水産試験場
石川県江沼郡山中町荒谷町口100
電話 07617-8-3312
〒922-01
印刷所 まつだ印刷
石川県小松市上小松町丙116-1