

低温処理法によるマダイおよびクロダイの 3倍体誘導条件の検討

荒川 敏久・高屋 雅生・井上 潔
高見 生雄*・山下 金義

An Examination of the Condition for Triploid Induction
by Cold Shock in Red and Black Sea Breams

Toshihisa ARAKAWA, Masao TAKAYA, Kiyoshi INOUE,
Ikuro TAKAMI*, and Kaneyoshi YAMASHITA

Conditions for cold shock treatment were examined for the production of triploids of red sea bream *Pagrus major* and black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. Eggs of the two species were subjected to 5-25 minute cold treatment at 2-3 °C 1.5-5 minutes after insemination, and their hatching rates were determined. The eggs thus obtained were reared to juveniles in 1 m³ tanks and their growth and survival rates were compared with those of non-treated eggs.

The highest hatching rate of red sea bream eggs (more than 70 %) was found for 5-15 minute treatment 3 minute after insemination. The following conditions gave the highest hatching rates (more than 50 %) for black sea bream; 5-25 minutes treatment 1.5 minute after insemination, 5-10 minute treatment 3 minute after insemination, and 5 minute treatment 5 minute after insemination.

Growth rate in TL of the treated red sea bream was lower than non-treated fish till 20 days after hatching, but became higher thereafter, while growth rate of the treated black sea bream remained lower than non-treated fish throughout the trial period.

Survival rates of the treated fish were 40.8 % for red sea bream and 1.3 % for black sea bream, which were lower than the rates of non-treated fish (74.2 % and 16.8 % for red and black sea breams, respectively). Triploid induction rates were 100 % for red sea bream and 90 % for black sea bream.

マダイ *Pagrus major* やクロダイ *Acanthopagrus schlegeli* は重要な養殖対象魚であるが、マダイでは商品サイズに達する前に500 g程度で70%以上が、800 gでは殆ど全てが成熟し¹⁾、クロダイでは250 g程度から成熟が始まる²⁾。これらの成熟個体は成長が遅滞し、飼料効率が低下するため、不妊魚の養殖による成長の促進や飼料効率の向上が期待されている。

そこで、両種について、一般に不妊と考えられ、成熟期における成長の促進と飼料効率の向上に効果が期待される3倍体魚^{3, 4)}の作出条件の検討を行ったので報告する。

材料と方法

低温処理条件の検討 受精卵の低温処理による3倍体魚作出の試験条件を決定するため、低温処

* 長崎大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Nagasaki University)

理開始時間、低温処理時間がふ化率に及ぼす影響を調査した。

親魚には、ふ化から4年間長崎県水産試験場増殖研究所で養成した平均体重約1.2kgのマダイと、ふ化から3年間養成した平均体重約400gのクロダイを用いた。採卵、採精は海面の親魚養成筏上で搾出法により行い、卵は乾いたボール中に、精液は乾いた注射筒中に、体液が混入しないよう十分注意して採取した。卵と精液は直ちに実験室に持ち帰り、人工受精を行った。人工受精はシャーレに卵を收容し、十分量の精液(卵1gに対し約0.2ml)で媒精し、30秒後に少量の海水を加え、再び30秒後に洗卵を行う方法を用いた。この操作は後述の低温処理開始時間毎に3回行ったが、採卵から最後の媒精までを20分以内に終了した。洗卵が終了した受精卵は媒精1分30秒、3分および5分後に、それぞれ0分(無処理)、5分、10分、15分、20分および25分間低温海水に浸漬した。採卵水温はマダイでは約21°C、クロダイでは約23°Cであり、低温処理には0.5°Cの海水を準備したが、受精卵を收容後は2~3°Cに上昇し、処理時間中この水温を保った。低温処理が終了した受精卵は直ちに21~23°Cの海水に收容し、その内から浮上卵300粒をそれぞれ計数し、海水を満した100mlビーカーに收容した。これらの卵は20°Cの恒温室中に

おき、2日後にふ化率を求めた。ふ化仔魚の一部は小刻法⁵⁾による染色体数調査に供した。これら人工受精、低温処理の操作手順は図1にイラストで示した。

低温処理仔稚の飼育 低温処理を行った受精卵をふ化後稚魚まで飼育し、その成長、生残を無処理魚と比較した。

受精卵の低温処理条件はマダイでは媒精3分後15分間、クロダイでは媒精1分30秒後25分間とした。仔稚魚の飼育には1m²ポリカーボネイト水槽を用い、マダイでは卵15,000粒を、クロダイでは卵40,000粒をそれぞれ收容した。餌料にはクロレラと油脂酵母で栄養強化したシオミズツボワムシ、乳化油脂(商品名エスター85)で油脂強化した天津産アルテミアのノウブリウス、微粒子飼料(微粒子協和AタイプとBタイプ)を用いた。試験飼育期間はマダイでは32日間、クロダイでは41日間としたが、両魚種共この後網生簀中で全長約50mmまで飼育し3倍体誘導率の調査に供した。仔稚魚の成長は、ふ化当日から5日毎に抽出した30尾の全長を万能投影機下で測定して求めた。仔稚魚の計数はふ化当日には柱状サンプリング法で、終了時には全数計数で行い、生残率を求めた。

稚魚の染色体数は、それぞれ3尾ずつの鰭を組織培養した後、培養細胞をコルヒチン処理⁶⁾して計数した。また、同時に同一個体の尾部から採血した血液の塗抹標本⁷⁾を作製し、染色体の3倍化により赤血球長径が大きくなることを確認した。低温処理魚の3倍体誘導率は、幼魚それぞれ20尾について上述の方法で求めた赤血球長径を用いて判定した。

結果と考察

受精卵の低温処理がふ化率に及ぼす影響 低温処理によるマダイ受精卵のふ化率の変化を図2に示した。無処理卵のふ化率はいずれも90%以上であった。媒精1分30秒後から処理を行った卵のふ化率は5分間の低温処理で60%になり、その後25分間の36%まで緩やかに低下した。媒精3分後からでは5~15分間の処理で69~77%になり、その後20分間で33%、25分間で3%と急激に低下した。媒精5分後からでは5分間で60%、10分間で23%

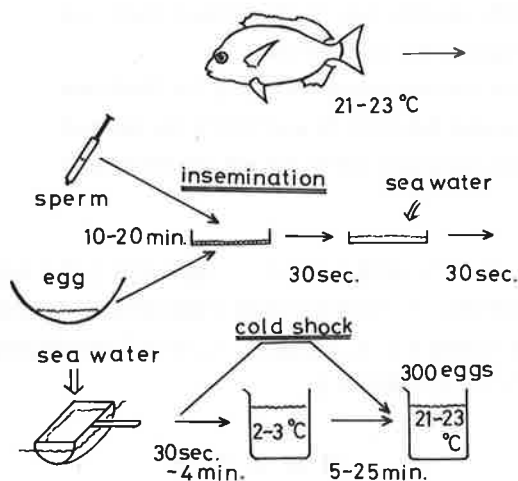


図1 人工受精および低温処理の方法
Fig.1. Method of insemination and cold shock treatment.

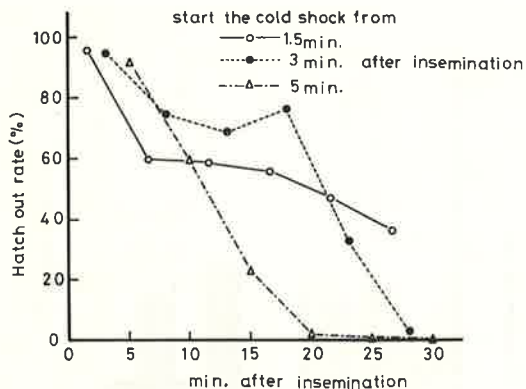


図2 低温処理によるマダイ受精卵のふ化率の変化

Fig. 2. Relationship between hatch out rate and cold shock period in red sea bream.

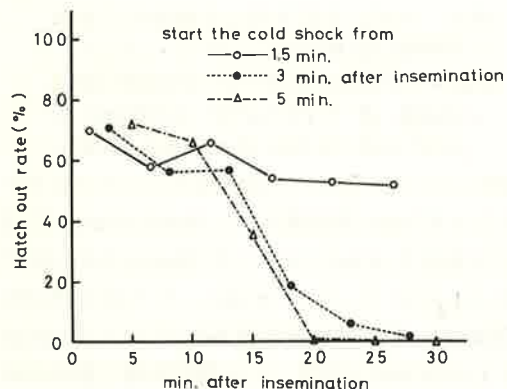


図3 低温処理によるクロダイ受精卵のふ化率の変化

Fig. 3. Relationship between hatch out rate and cold shock period in black sea bream.

に低下し、15分以上の処理では殆どふ化しなかった。

低温処理によるクロダイ受精卵のふ化率の変化を図3に示した。無処理卵のふ化率はいずれも70%以上であった。媒精1分30秒後から処理を行った卵のふ化率は5~25分間の低温処理で66~52%に緩やかに低下した。媒精3分後からでは5~10分間の処理で57%になった後、15分間で19%、20分間で6%、25分間で2%と急激に低下した。媒精5分後からでは5分間で67%、10分間で36%に低下し、15分以上の処理では殆どふ化

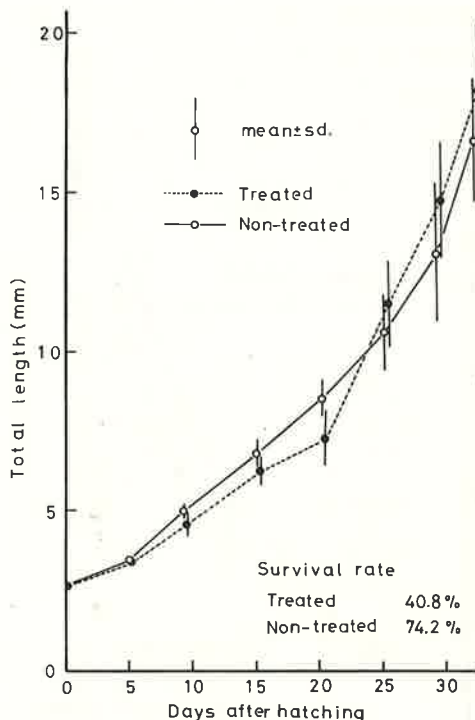


図4 マダイ2倍体魚と3倍体魚仔稚の成長と生残の比較

Fig. 4. Comparison of growth and survival rates between treated and non-treated red sea bream.

しなかった。

このように、今回検討した条件内では、ふ化率は両魚種共、媒精後時間が経過するに従い短時間の処理で低下し、処理開始時間が同じ場合には処理時間が長くなるに従い低下した。しかしながら、処理時間が短い場合には染色体倍数化が不完全になることが考えられたため、比較的良いふ化率(マダイでは70%、クロダイでは50%以上)を示した条件の内、最も長い処理時間のものを3倍体誘導条件の候補とし、ふ化仔魚の染色体数を計数した。その結果、以上の条件に適合する媒精3分後15分間処理のマダイと媒精1分30秒後25分間処理のクロダイの染色体数は共に72で3倍化されていることが確認されたため、これらを3倍体魚作出のための低温処理条件として選定した。

低温処理仔稚の飼育 前項で求めた条件(媒精3分後15分間)で低温処理を行ったマダイ仔稚魚

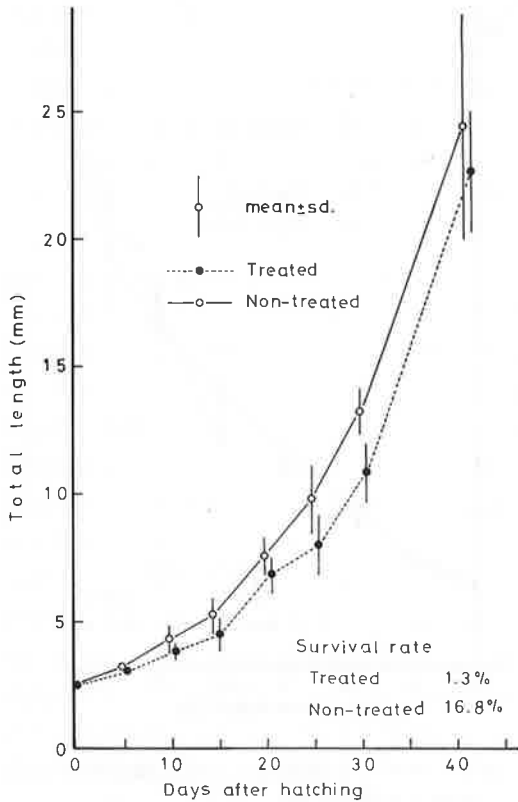


図5 クロダイ2倍体魚と3倍体魚仔稚の成長と生残の比較

Fig. 5. Comparison of growth and survival rates between treated and non-treated black sea bream.

の成長と生残を図4に示した。ふ化率は低温処理魚76.3%，無処理魚94.3%であった。低温処理魚の全長は日令0で2.68±0.13*mm（無処理魚：2.73±0.06mm），日令10で4.59±0.38mm（5.02±0.25mm），日令20で7.28±0.87mm（8.56±0.60mm），日令32で18.2±2.11mm（16.6±1.92mm）と推移した。このように処理魚の成長は，日令20までは無処理魚より劣っていたが，日令20～25の稚魚への変態後期に処理魚の小型個体の大部分がへい死したため，その後の両者の成長は逆転した。また，低温処理魚の生残率は，ふ化仔魚から40.8%で無処理魚の74.2%に比べて劣った。

前項で求めた条件（媒精1分30秒後25分間）で低温処理を行ったクロダイ仔稚魚の成長と生残を図5に示した。ふ化率は低温処理魚75.7%，無処

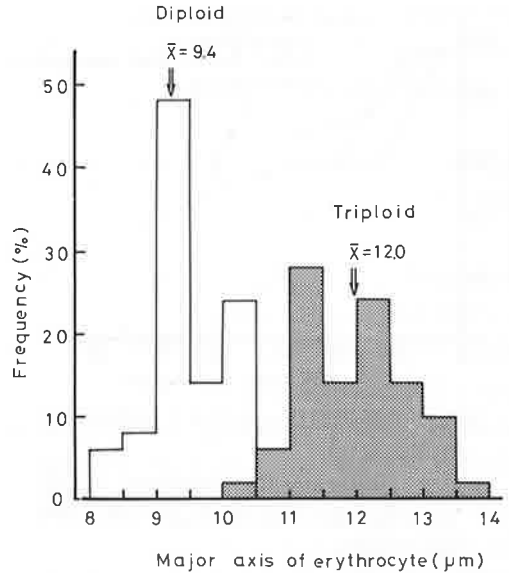


図6 マダイ2倍体魚と3倍体魚の赤血球長径の比較

Fig. 6. Comparison of major axis length of erythrocyte between diploid and triploid of red sea bream.

理魚85.3%であった。低温処理魚の全長は日令0で2.51±0.04mm（無処理魚：2.56±0.07mm），日令11で3.86±0.41mm（4.31±0.71mm），日令20で6.85±0.77mm（7.57±0.80mm），日令30で10.9±1.25mm（13.3±0.96mm），日令41で22.6±2.44mm（24.4±4.41mm）と推移し，全期間を通じ無処理魚より劣った。また，低温処理魚の生残率は，飼育初期に大量に出現した小型個体の大部分が日令15～25の間にへい死したため，ふ化仔魚から1.3%と無処理魚の16.8%に比べて非常に劣った。

稚魚の3倍体誘導率 マダイ稚魚の2倍体魚（染色体数：2n=48）と3倍体魚（3n=72）それぞれ3尾から得た赤血球長径のヒストグラムを図6に，またクロダイ（2n=48，3n=72）について図7に示した。

マダイ3倍体魚の平均赤血球長径**は13.1μm（11.1～15.2μm）で2倍体魚の10.2μm（9.3～11.3μm）の約1.3倍であり，明らかな差がみられた。そこで，これを基準として3倍体誘導の判定を試みたところ，低温処理マダイ20尾の平均赤血球長径***は12.8～14.0μmの範囲にあり，

* 平均±標準偏差

** 赤血球150個の平均

*** 赤血球20個の平均

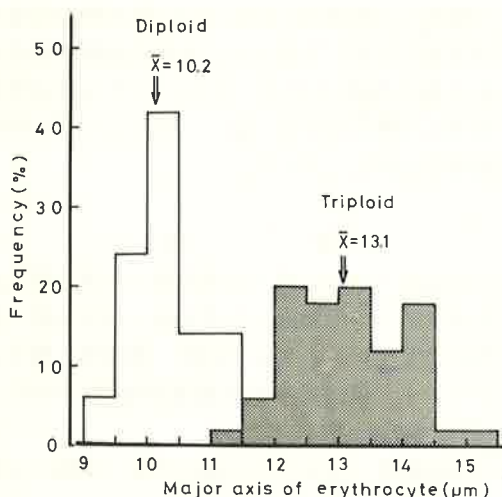


図7 クロダイ2倍体魚と3倍体魚の赤血球長径の比較

Fig. 7. Comparison of major axis length of erythrocyte between diploid and triploid of black sea bream.

表1 赤血球長径による3倍体誘導の判定
Table 1 Judgement of ploidy based on major axis length of erythrocyte

No.	Red sea bream		Black sea bream	
	Axis length	Judgement	Axis length	Judgement
1	12.7±0.72 μ m	3n**	9.1±0.42 μ m	2n
2	12.9±1.01	3n	9.3±0.59	2n
3	13.1±0.69	3n	11.2±0.86	3n
4	13.2±0.46	3n	11.3±0.72	3n
5	13.2±1.40	3n	11.6±0.58	3n
6	13.3±0.69	3n	11.7±0.80	3n
7	13.3±0.84	3n	11.9±0.84	3n
8	13.3±0.87	3n	11.9±0.89	3n
9	13.4±0.79	3n	12.0±0.68	3n
10	13.4±0.88	3n	12.0±0.85	3n
11	13.4±0.95	3n	12.0±0.86	3n
12	13.4±1.00	3n	12.1±0.72	3n
13	13.5±0.87	3n	12.2±0.73	3n
14	13.6±0.72	3n	12.3±0.76	3n
15	13.7±0.96	3n	12.3±1.13	3n
16	13.8±0.73	3n	12.5±0.68	3n
17	13.9±0.81	3n	12.5±0.70	3n
18	13.9±0.90	3n	12.6±0.68	3n
19	14.0±0.91	3n	12.6±0.89	3n
20	14.0±1.10	3n	12.7±0.77	3n

* \bar{X} ±S. D. (n=20)

** 2n; diploid, 3n; triploid.

全個体が3倍体であると判定された(表1)。すなわち、本条件における3倍体誘導率は100%であった。

また、クロダイ3倍体魚の平均赤血球長径*は12.0 μ m (10.3~13.9 μ m)で2倍体魚の9.4 μ m (8.3~10.3 μ m)の約1.3倍であり、明らかな差がみられた。そこで、マダイと同様に3倍体誘導の判定を試みたところ、低温処理クロダイは20個体中18個体では平均赤血球長径**が11.2~12.7 μ mの範囲にあり3倍体であると判定されたが、2個体については9.3と9.8 μ mで2倍体と考えられた(表1)。すなわち、本条件における3倍体誘導率は90%であった。

3倍体稚魚の生産率 3倍体稚魚の生産結果を表2に示した。マダイでは媒精3分後15分間の低温処理で、ふ化率76.3%、3倍体誘導率100%、3倍体稚魚の生産率***31.1%の結果を得た。この生産率は無処理稚魚(70.0%)の約40%であるが、比較的高率で量産に耐え得る値であると考えられる。

表2 マダイおよびクロダイにおける3倍体稚魚の生産性

Table 2 Production rate of triploid (3n) fry of red sea bream and black sea bream

	Hatch out rate (A)	Survival rate (B)	Percentage of 3n (C)	Production rate of 3n fry (A)×(B)×(C)
Red sea bream				
Treated	76.3%	40.8%	100.0%	31.1%
Non-treated	94.3	74.2	0	(70.0)*
Black sea bream				
Treated	75.7	1.3	90.0	0.9
Non-treated	85.3	16.8	0	(14.3)

* Figures in parentheses indicate the production rate of diploid fry.

一方、クロダイでは媒精1分30秒後25分間の低温処理で、ふ化率は75.7%、3倍体誘導率は90%と高率であったものの、生残率が1.3%と低かったため、3倍体稚魚の生産率は0.9%と非常に低い値になった。この生産率は無処理魚(14.3%)の僅か6.2%にすぎず、今回の低温処理条件では、ふ化

* 赤血球150個の平均

** 赤血球20個の平均

*** (ふ化率)×(生残率)×(3倍体誘導率)

はするものの、仔稚魚の飼育が困難であることが明らかになった。今後クロダイにおいては低温処理条件の改善が必要であると考ええる。

以上の結果により、マダイでは媒精3分後15分間、クロダイでは媒精1分30秒後25分間の低温処理で3倍体魚が作出されることが明らかになった。しかしながら、両魚種共3倍体稚魚の生産率は2倍体魚に比べて低く、特にクロダイでは量産化に向けて改善が必要なことから、今後3倍体を誘導する低温処理条件の範囲を求めると共に、稚魚の生産に最も適した処理条件の解明に努力する必要があると考える。

要 約

マダイおよびクロダイの3倍体魚作出条件を解明するため、受精卵の低温処理がふ化率に及ぼす影響、および低温処理仔稚魚の成長、生残、3倍体誘導率について検討し、以下の結果を得た。

- ① マダイでは媒精3分後5～15分の低温処理で70%以上の高いふ化率を得た。
- ② クロダイでは媒精1分30秒後5～25分、3分後5～10分、5分後5分の低温処理で50%以上の高いふ化率を得た。
- ③ 媒精3分後15分間低温処理をしたマダイ稚魚の生残率(日令32)は40.8%で無処理魚の74.2%より劣った。全長は日令20までは無処理魚より劣ったが、その後逆転し日令32には平均18.2mm(無処理魚16.6mm)に成長した。3倍体誘導率は100%であった。
- ④ 媒精1分30秒後25分間低温処理をしたクロダ

イ稚魚の生残率(日令41)は1.3%で無処理魚の16.8%より著しく劣った。全長は試験期間を通じて無処理魚より劣ったが、日令41には平均22.6mm(無処理魚24.4mm)に成長した。3倍体誘導率は90%であった。

文 献

- 1) 北島力・山下金義・福所邦彦・与賀田稔久・山本博敬・吉田満彦・市来忠彦・藤田矢郎：昭和47年度マダイ人工採苗試験，増養殖に関する研究—I（長崎県水産試験場増養殖研究所），1974，pp 1～7.
- 2) 山田梅芳：クロダイ，東シナ海・黄海のさかな（水産庁西海区水産研究所），1986，pp240～241.
- 3) 小野里坦：魚類の人為倍数化とその利用，水産育種，(8)，17—29，(1983).
- 4) Ryo SUZUKI, Teruyuki NAKANISHI, and Takashi OSHIRO: Survival, growth and sterility of induced triploids in cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*, Bull. Jap. Sci. Soc. Fish., **51** (6), 889-894, (1985).
- 5) Fumio YAMAZAKI, Hiroshi ONOZATO and Katsutoshi ARAI: The chopping method for obtaining permanent chromosome preparation from embryos of teleost fishes, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, **47** (7), 963 (1981).
- 6) 小島吉雄：魚類細胞遺伝学（水交社），東京，1983，pp103～112.
- 7) 田中克己・浜清：顕微鏡標本の作り方，第17版（裳華房），東京，1977，pp248～250.