

**農林水産業競争力アップ技術開発事業**  
**「磯根漁場の生産力強化技術の開発」(マナマコの種苗生産技術の開発)**

白石智孝 (増養殖部)

**1 目 的**

本県の漁業経営が燃料費の高騰・資源の減少・漁業者の高齢化を背景に厳しい状況にある中、マナマコは地先で容易に漁獲でき、収益性にも優れた磯根資源として注目されている。水産試験場では、昨年度までに和歌山県産マナマコの種苗量産技術および放流技術を確立した。これまでの研究では、熊野灘産マナマコのみを用いて技術開発を実施してきたことから、今年度は、本技術が県内の他海域のマナマコにも適用可能かを実証するため、田辺産のマナマコを用いて種苗生産を行った。

近年、外部標識方法が確立されていないマナマコに対して、DNA分析による親子鑑定を用いて、漁獲物に含まれる放流個体を識別する方法が報告されている(酒井 2011)。そこで、和歌山県産マナマコに対するDNA分析による親子鑑定方法を検証した。

**2 方 法**

1) 田辺産マナマコを用いた種苗生産

2015年4月10日に田辺産のマナマコ8尾(雌雄未判別)にクビフリンを注射したところ、3尾が産卵、5尾が放精した。5尾分の精子を混合して媒精し、雌毎に受精卵を得た。4月11-12日に正常ふ化した幼生を500Lアルテミア水槽または1t FRP水槽に収容した。幼生飼育は、500L水槽で4.33個体/mlの密度、1t水槽で4.33個体/mlと6.67個体/mlの密度で開始し、室内での自然採光・無調温・止水の条件下で、3-5日に1回換水(換水率100%/日で緩やかに注水)した。餌料は、珪藻 *Chaetoceros neogracile* を幼生1個体あたり10,000 cells/mlを維持するよう適宜添加した。ふ化後3週間で波板を投入し、着底した稚マナマコの飼育は、幼生飼育と同条件で行った。体長が3mmに達する個体を確認後に、餌料を配合飼料(海參 Growth; 日本農産工業株式会社)に切り替え、水槽あたり1-10g/日 給餌した。8月27日に各水槽の稚マナマコの計数を行い、生産尾数を算出した。

2) 稚マナマコの餌料試験

稚マナマコ用の餌料として市販されている配合飼料は少なく、開発途上にある。そこで、稚マナマコ飼育に適した餌料を探索するため、表1のとおり、市販されている5種類の餌料を用いて飼育試験を行い、稚マナマコの成長・生残を比較した。

30Lパンライト水槽6基にろ過海水を20Lずつ注水し、エアレーションを行った。上述の田辺産稚マナマコを選別し、20尾ずつ収容(平均体長8.75mm)した。試験区は、表1に示す5種類の餌料給餌区と無給餌区とした。試験は、2015年12月11日に開始し、2,3日に1回全量換水し、餌料給餌区では換水後に餌料を1g給餌した。12月20日、1月25日、2月23日に稚マナマコの計数、体長測定を行った。

3) 和歌山県産マナマコへの親子鑑定方法の検証

2015年4月10日に、1)の試験で種苗生産に用いた親マナマコ8尾の触手を切り取り、個体毎に99.5%エタノールで固定した。2016年3月15日に、1)の試験で3尾の雌親から生産された種苗を混合した後に30尾取り上げ、湿重量を測定した後に、個体毎に99.5%エタノールに収容して固定した。さらに、2014年度に1)の試験と異なる親マナマコを用いて生産され、99.5%エタノールで固定されていた種苗15尾をネガティブコントロールとした。

親マナマコの触手切片8サンプル、種苗30サンプル、ネガティブコントロール15サンプルからDNAを抽出し、ミトコンドリアDNA分析およびマイクロサテライト分析を行った。ミトコンドリアDNA分析においては、酒井(2011)の方法に従い、16SrRNAとCOIの部分領域を解析し、ハプロタイプを決定した。マイクロサテライト分析におい

表1 試験に用いた餌料

試験区	餌料の種類 (用途)
無給餌区	なし
配合A区	配合A (稚マナマコ用)
配合B区	配合B (畜産・水産用海藻飼料)
配合C区	配合C (アワビ初期稚貝用)
配合D区	配合D (二枚貝育成用)
塩蔵ワカメ区*	塩蔵ワカメ (アワビ用)

※ミキサーで粉碎してから給餌

ては、表 2 に示す 8 座のマーカー (Kanno et al. 2005, 酒井 2011) を用い、フラグメントサイズの計測およびフラグメントサイズの分布より遺伝型を決定した。得られたハプロタイプおよび遺伝型を比較し、親ナマコと種苗との親子関係を判定した。

表 2 マイクロサテライト分析に用いた 8 座のマーカー

マーカー名	プライマー名	蛍光色素	塩基配列	プライマー名	塩基配列
Psj1828	Psj1828F	PET	CAAACGCATACAATTACACA	Psj1828R	CGATCGATAGTCTCAATC
Psj2172	Psj2172F	VIC	TTAGAATATGATGCAACAGAA	Psj2172R	GATACCGTGATAATTGGTTT
Psj2463	Psj2463F	NED	GCTGAAGGCAAAAGGAATCT	Psj2463R	GTAGCAAATGTGGCAAGGAT
Psj2575	Psj2575F	6FAM	GCCTCGAGAGCTTATTCAATG	Psj2575R	GCTCGCTTGGAGAGTAAACAC
Psj2844	Psj2844F	PET	CAAAACGATAGGACCACCTA	Psj2844R	TTAACATTTCTGCCACTTC
Psj2889	Psj2889F	VIC	CGAGACGTTTACTTCCACTG	Psj2889R	AGAGGTGCTGGCTTTACTC
Psj2969	Psj2969F	6FAM	TTCCTGCCCTTACAAAATAG	Psj2969R	GCAGCAGAATGATGAGTGTG
Psj3088	Psj3088F	NED	CGTATTACAAAGCCCAACA	Psj3088R	GGCGTAGAAAGCAAGGGAAG

### 3 結果及び考察

#### 1) 田辺産マナマコを用いた種苗生産

種苗生産結果を表 3

表 3 種苗生産結果

に示す。3 尾の雌から計 1,500 万粒の受精卵が得られ、正常ふ化率は 73.8-98.4 % と良好であった。これまで 500 L 以下の水槽のみで種苗生産を実施してきたが、1 t 水槽でも種苗生産が可能であり、

雌親	受精卵数 (粒)	正常ふ化率 (%)	水槽	幼生収容密度 (個体/ml)	ふ化4ヶ月後稚ナマコ数 (個体)
♀①	4,400,000	98.4	1 t FRP水槽	4.33	5,500 <sup>*</sup>
♀②	2,934,000	73.8	500 Lアルテミア水槽	4.33	2,836
♀③	7,666,000	87.0	1 t FRP水槽	6.67	0

<sup>\*</sup>波板および水槽壁面・底面の一定面積に存在する稚ナマコを計数し、全体面積に換算

煩雑さや不便な点はなかった。幼生の収容密度が 6.67 個体/ml で飼育した場合には全滅し、4.33 個体/ml で飼育した場合には種苗を量産できた。8月27日に、♀②の水槽では 2,836 尾が生残 (生残率 0.13 %) しており、サイズは 2-36 mm で、ほとんどが 10 mm 以下であった。♀①の水槽では、波板および水槽壁面・底面の一定面積に着底している稚ナマコを計数し、全体面積に換算したところ、種苗数は 5,500 尾 (生残率 0.13 %) となり、1 t 水槽でも 500 L 水槽と同様の生残率であった。本試験により、開発された種苗生産技術が田辺産マナマコにも適用でき、種苗の量産が可能であることを実証した。

#### 2) 稚ナマコの餌料試験

餌料ごとの生残率の推移を図 1 に、成長を図 2 に示す。配合 C 区および配合 D 区では、試験開始 9 日目には稚ナマコが全滅していた。両区では、水槽底面にバイオフィームが形成され、カビも発生していたことから、他の餌料に比べて水質を悪化させやすいことが明らかになった。一方、配合 A 区では飼育水の濁りや水槽底面のバイオフィームの形成は全く確認されなかった。74 日間の試験期間中、稚ナマコ用として開発された配合 A 区が最も生残率が高く、他の餌料給餌区では最終的に 60 % を下回った (図 1)。

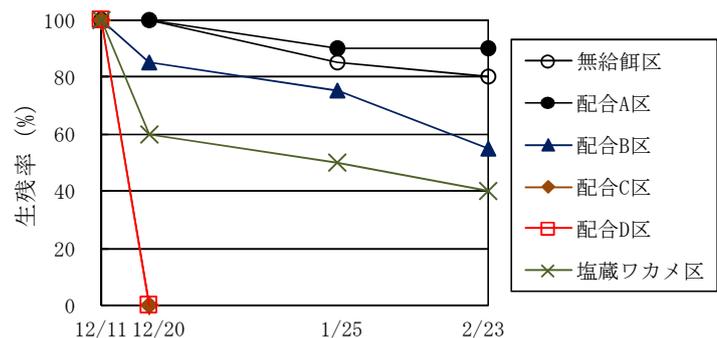


図 1 稚ナマコの生残率の推移

74 日後まで生残した稚ナマコの平均体長を比較すると、配合 A 区では 24.4 mm、配合 B 区では 21.0 mm、塩蔵ワカメ区では 15.5 mm に成長した (図 2)。無給餌区では、生残率は 80 % であったものの、ほとんど成長しなかった。以上の結果から、本試験で対象とした餌料の中では、配合 A が生残率・成長の両面で優れ、その他の餌料は生残率低下のリスクがあることが明らかになった。

本事業で開発した種苗生産技術は、高度な技術や設備を必要とせず、漁業者自らが取り組める内容となっている。その中で、最も注意すべきことは、稚ナマコを食害する小型甲殻類 (シオダマリミンジンコ等) の飼育水への混入を防ぐことであり、特に換水時に注意する必要がある。配合 A は、生残率が高いだけでなく、水質が悪化

しにくいことから、換水頻度を抑えることができ、小型甲殻類の混入リスクを低減できるメリットがある。簡易な設備で省力的に飼育を行う場合、稚ナマコの嗜好性や成長のみならず、水質への影響も考慮して稚ナマコ用の配合飼料を選択する必要がある。

### 3) 和歌山県産マナマコへの親子鑑定方法の検証

DNA 分析に供した種苗 30 尾の湿重量は、平均 0.107 g (最大 0.912 g, 最小 0.011 g) であった。

母系遺伝であるミトコンドリア DNA を分析した結果、親ナマコ 8 サンプルから 8 種類のハプロタイプ、種苗 30 サンプルから 3 種類のハプロタイプ、

ネガティブコントロール 15 サンプルから 6 種類のハプロタイプが得られた。種苗 30 サンプルから得られた 3 種類のハプロタイプは、全て雌親 3 サンプルのハプロタイプのいずれかと一致(雌 3 尾とそれぞれ 20 個体, 9 個体, 1 個体が一致)した。一方、ネガティブコントロールのハプロタイプは、親 8 サンプルと種苗 30 サンプルのいずれのハプロタイプとも一致しなかった。

8 座のマーカーを用いてマイクロサテライト分析を試みたところ、マーカー P<sub>sj1828</sub> を用いたときに、1 回の PCR で増幅が確認されず、複数回分析を行うことで増幅が確認された。この増幅は、null アリルなどの PCR エラーによる非特異的なバンドと考えられた。そこで、マーカー P<sub>sj1828</sub> を除く 7 座のマーカーを用いてマイクロサテライト分析を試みたところ、全てのサンプルで遺伝型が決定されたものの、各種苗サンプルの親個体を特定することはできなかった。

全てのサンプルについて、ハプロタイプおよび遺伝型の決定が可能であったことから、最小で 0.011 g の稚ナマコからも DNA の抽出・分析が可能であることが示された。今回、ミトコンドリア DNA 分析による母子判定が可能で、マイクロサテライト分析による親子判定は不可能であった。北海道のマナマコにおいては、マイクロサテライト分析のみで親子を判定できると報告されており(酒井 2011)、今回の結果と異なる。和歌山県におけるマナマコの親子鑑定方法を確立するためには、さらに県産マナマコの DNA 情報を調査し、ハプロタイプや遺伝型の多様性を把握する必要がある。また、水産動物の DNA 標識においては、null アリルなどの PCR エラーによる誤判定の可能性が指摘されている(山本ら 2014) ことから、和歌山県産マナマコのマイクロサテライト分析を行う際には、予め null アリルなどの PCR エラーを引き起こすマーカーを検出し、エラーを引き起こさない複数のマーカーを用いる必要がある。

## 4 文 献

Kanno M, Li Q, Kijima A (2005) Isolation and Characterization of Twenty Microsatellite Loci in Japanese Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). Mar. Biotechnol., 7(3), 179-183.

酒井勇一 (2011) DNA 解析によるマナマコの放流効果推定技術の開発と系群構造の解明 (2. 重点領域研究推進費). 平成 21 年度北海道立栽培水産試験場事業報告書, 86-94.

山本昌幸・野口大毅・小畑泰弘・菅谷琢磨・高木基裕 (2014) 瀬戸内海東部における DNA マーカーによるクルマエビの放流効果推定. 水産増殖, 62(4), 393-405.

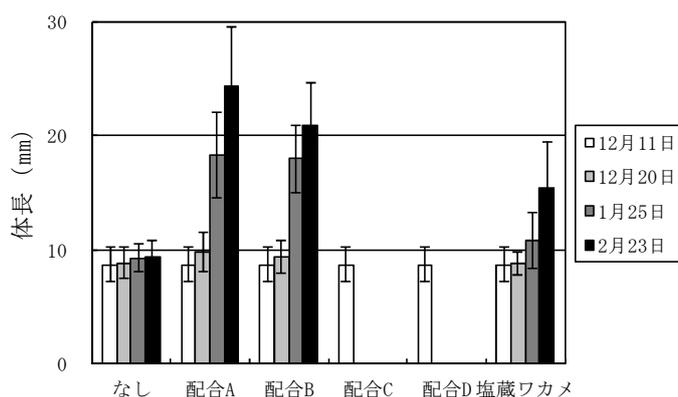


図 2 稚ナマコの体長の変化