

3倍体ヒラメ作出試験 - II *

木村 創 ・ 狭間弘学

前年度に作出した3倍体ヒラメを飼育し、受精卵冷却時間の差による3倍体誘起率を主に田畑ら¹⁾が用いた電気泳動法により確認するとともに、3倍体ヒラメの成長について検討した。

材料および方法

供試魚 : 1988年3月10日に人工受精をし、受精卵に何も処理をしなかった区を2n区、20分の冷却処理をした区を3n 20分区、35分の冷却処理をした区を3n 35分区とした。処理方法は前報²⁾によった。その後100ℓパンライトにて飼育を続け5月12日に一度生残率を求め、その後常法により飼育を続けた。

3倍体の確認方法 : 孵化後160日目のヒラメの凍結肝臓をアイソザイム分析試料とした。電動泳動による酵素の検出にあたっては肝臓の解冻ドリップを粗酵素とした。供試数は2n区32個体、3n 20分区33個体、3n 35分区24個体である。アイソザイムは水平デンプンゲル電気泳動法³⁾によって検出した。電気泳動用緩衝液はクエン酸-アミノプロピルジュタノールアミン緩衝液(C-AEA Buffer pH 7.0)とクエン酸-アミノプロピルモルホリン(C-APM Buffer pH 6.0)を用いた。供試酵素はイソクエン酸脱水素酵素(IDH)、ホスフォグルコムターゼ(PGM)、6ホスフォグルコン酸脱水素酵素(6PGD)、グルコースリン酸イソメラーゼ(GPI)の4種類であり、染色は既報に準じた⁴⁾。なお電気泳動で泳動像のはっきりしなかった個体については尾部切断により血液塗抹標本を作成し、これにギムザ染色を施した後、赤血球の長径測定を行い2倍体との比較によって確認した。

成長比較 : 孵化後160日目のヒラメを各区から35尾ずつ任意に取り出し、体長・体重を測定した。

結果および考察

生残率 : 孵化後60日目の生残率は2n区で5.0%、3n 20分区で7.6%、3n 35分区で6.5%となり、3n 20分区で最も良い結果となった。2n区は孵化30日目に腸管白濁症が発生し、1週間斃死が続いたため生残率が低くなった。また、冷却時間の差による生残率は冷却時間が短いほどよく、これは冷却時間を短時間とすることにより卵に与える悪影響が少なかったためと考えられる。

3倍体の作出率 : 検出したアイソザイムは、IDH・PGM・6PGD・GPIの4種類であったが、多型性を示したのはIDHのみであった。3倍体および普通2倍体のアイソザイムパターンを図1に

* 新品種作出技術開発研究費による。

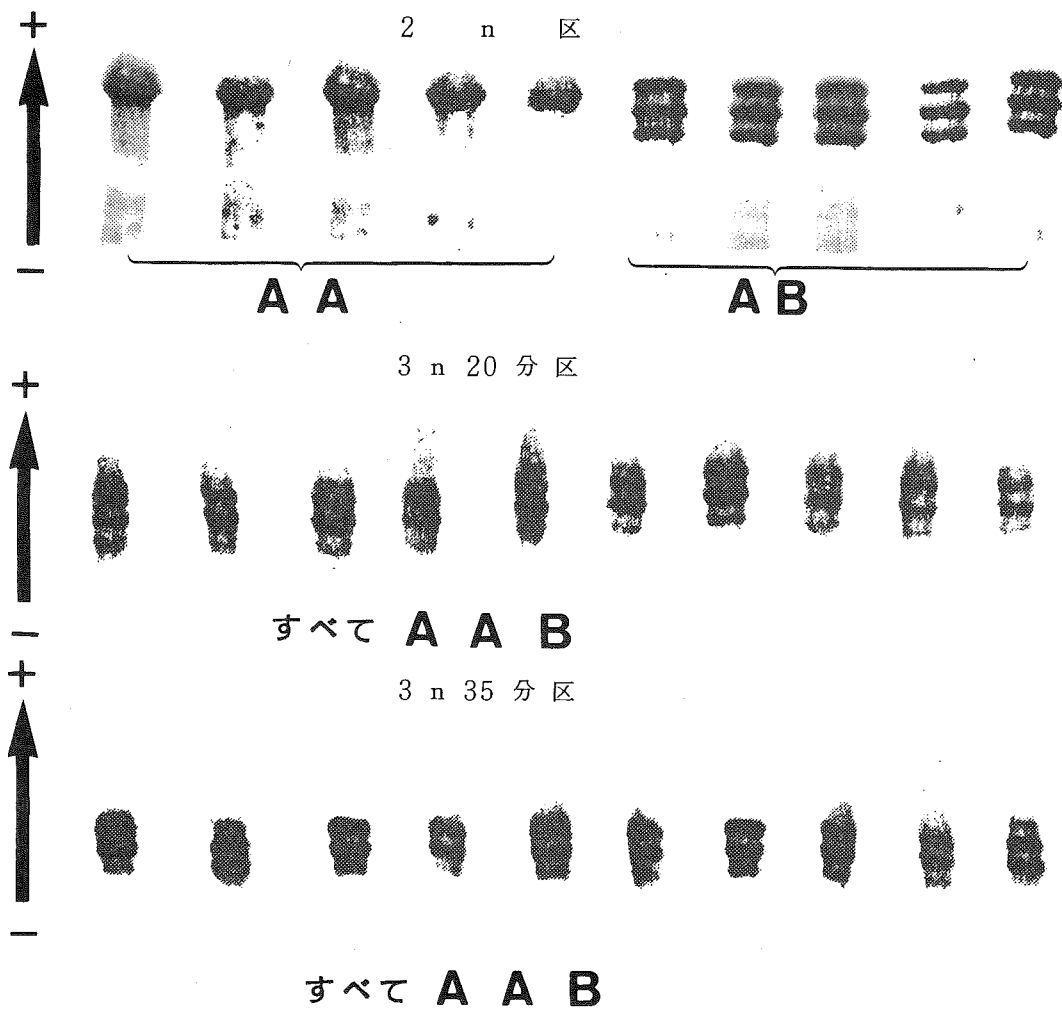


図1 各区のIDHアイソザイムパターン

示す。2 n区では移動度の異なる3本のバンドを持つヘテロ接合体 (AB型) と移動度の早い1本のバンドを持つホモ接合体 (AA型) の2種類のアイソザイムパターンが観察された。ヘテロ接合体の3本のバンドの濃度は、中間の移動度を示すバンドが濃く両側のバンドはそれよりも薄く、2量体型のアイソザイムパターンを示した。3 n 20分区や3 n 35分区では移動度の異なる3本のバンドを持つヘテロ接合体がほとんどの個体で認められた。しかし泳動像は2 n区のヘテロ型のバンドとは異なり、3本のバンドの濃度は移動度のもっとも遅いバンドが薄く、中間及び最も移動度の早いバンドが濃くなったことから、AAB型の遺伝子型を持っていた。このように3倍体誘導区においてIDHは2量体酵素として働き、独特の濃度比を示すことは、アユの3倍体においても観察されており⁵⁾、ヒラメについても電気泳動法は3倍体誘導の成否を確認するための一つの手法となることは明らかである。なかには2 n倍体のヘテロのバンドを持ったものが3 n 20分区で2尾、3 n 35分区で1尾認められた。この3個体は3倍体にならず普通発生をした2 n倍体の個体と考えられる。表1に2 n区、3 n 20分区、3 n 35分区の遺伝子型の出現頻度を示す。このことから本試験に用いたヒラメ親魚のIDH遺伝子型は雄AA、雌ABと推定される。

次にアイソザイムパターンが不明の16個体について赤血球の長径を測定し、2 n区の魚と比較した。

その結果倍数不明の16個体の赤血球の平均長径は13.5 μm で、2倍体の平均値10.5 μm に比べて明らかに大きく、統計的にも危険率0.1%水準で有意差が認められた。

以上のことから3n20分区では94%が3n35分区では96%のヒラメが3倍体になっていることが確認され、受精卵の冷却時間を20分と短くしても3倍体は誘導され、冷却時間を短くすることにより生残率も高まることが明らかとなった。

成長の比較： 孵化後160日の各区ヒラメの平均全長、平均体重を表2に示す。2n区の平均全長は17.1cm、平均

体重は54.0g、3n20分区では平均全長18.7cm、平均体重59.1g、3n35分区では平均全長17.9cm、平均体重63.7gとなった。平均全長において2n区と3n20分区との間において統計的に5%の危険率で有意差は認められたが、他の項目については有意差は認められなかった。本試験では3n20分区のヒラメの体長のわりには体重が少なかったが、これは飼育密度が他の区よりも多かったことに原因していると考えられる。魚類の3倍体では血球などの細胞レベルでの大型化はいろいろな魚類で確認されているが、細胞の数が減少し、成長に関しては2倍体とほとんど差がないことが認められている⁶⁾。本報において飼育密度に差はあるものの3倍体と2倍体とでは成長差は認められなかった。

しかし、3倍体は成熟過程が正常に進まないで生殖腺が発達せず、産卵期になっても成長の遅延が起こらないため、最終的には2倍体より大きくなるとされている。今後、3倍体ヒラメにおいても2次性徴が認められずに成長が良くなるかどうかについて検討して行く。また、受精卵の冷却時間を今回は20分まで短縮しても高率で3倍体が誘導され、生残率が良かったことから、今後も3倍体誘導に冷却時間がどれだけ短縮可能かについて検討する。

終わりに本研究を遂行するに当たり、終始懇切なご指導を賜った高知大学農学部谷口順彦教授に深謝します。

表1 各区のIDH遺伝子型の出現頻度

区	観察尾数 (尾)	遺 伝 子 型		
		A A	A B	B B
2 n 区	32	16 (50)	16 (50)	0
3 n 20 分区	33	A A B 24 (72.7)	A B 2 (6.0)	不明 7 (21.3)
3 n 35 分区	24	14 (58.3)	1 (4.2)	9 (37.5)

()内は観察尾数を100%としたときの百分率

表2 ふ化後160日目におけるヒラメの成長

区	平均全長 (mm)	標準偏差	平均体重 (g)	標準偏差
2 n 区	※ 17.1	2.88	54.03	27.46
3 n 20 分区	※ 18.7	3.17	59.18	20.23
3 n 35 分区	17.9	2.54	63.73	27.98

※ 危険率5%水準で有意差の認められたもの

文 献

- 1) 田畑和男・五利江重昭・谷口順彦，1986：アイソザイムマーカー遺伝子によるヒラメ雌性発生2倍体および3倍体誘導の確認，水産育種，11，35-41.
- 2) 木村 創・狭間弘学，1987：3倍体ヒラメ作出試験－I，本誌20号，印刷中.
- 3) 谷口順彦・岡田容典，1980：マダイの生化学的多型に関する遺伝的研究，日水誌，46(4)，437-443.
- 4) 谷口順彦・関伸吾・稲田善和，1983：両側回遊型，陸封型及び人工採苗アユ集団の遺伝的変異保有量と集団間の分化について，日水誌，49(11)，1655-1663.
- 5) N. Taniguchi, S. Seki and K. Murakami, 1985: Induced triploidy in ayu *Plecoglossus altivelis*, *Bull. Jap. Soc. Sci.*, 51(3). 889-894.
- 6) 谷口順彦，1986：染色体化技術と魚類育種(下)，水産の研究，5(6)，36-40.