

ニジマス四倍体魚の作出について

高橋一孝

ニジマス四倍体魚は、第一卵割阻止によって作出され、作出効率は低いことが知られている^{1,2)}。また、長野県では、本種とブラウントラウトの性転換雄魚との交配により、簡単に全雌異質三倍体魚が作出されている³⁾。当所では、2007年からニジマスとマスノスケの異質三倍体魚の作出に取り組んでおり、第一段階として2種の交配後、水温によるヒートショックで三倍体魚を作出しているが⁴⁾、将来的には作業効率の面から前述の方法が望ましいと考えている。

そこで、当所においても効果的な四倍体魚の作出方法について検討したので、その結果を報告する。

材料及び方法

実験1 雌雄混合型四倍体魚の作出

2007 (H19) 年 7 月 13 日に当所産ニジマス雌 1 尾 (排卵後 2 日以内) と雄 2 尾で受精させた卵 (採卵数 5,885 粒) を用い、受精 4~5 時間後に 650 気圧 6 分間の圧力処理を 10 分間隔で 6 回実施した。処理後順次ふ化槽に収容した。検卵日は 7 月 30 日、ふ化日は 8 月 6 日、餌付け開始日は 8 月 22 日であった。10 月 31 日に取り上げ、魚体測定を行った。受精卵は発眼期までパイセスで消毒し、ふ化後は対照区と試験区に分け、プラスチック水槽 (26×40×16cm, 16.6L) 2 槽で飼育した。給餌は市販の配合飼料をフードタイマーで 1 日 6 回適量与えた。飼育は周年 12℃の地下水を掛け流す流水式とした。2010 年 4 月 8 日 (2 年魚) に実験 2 の群と合わせて 2 群とし、屋内のコンクリート池 (1.5×4.8×有効水深 0.43m) 1 面で混合飼育した。生残した魚は 2010 年 11 月 15 日 (3 年魚) から、常法により赤血球径による倍数性の判定を行いながら、採卵・受精を行った。一部の卵は極体放出阻止型の雌性発生と MT の経口投与による性転換雄魚の作出を図った。なお、二倍体と判定された成魚は実験から取り除き、四倍体魚のみ飼育を継続している。

実験2 全雌型四倍体魚の作出

2007 (H19) 年 11 月 5 日に当所産ニジマス雌複数尾 (排卵後 1 週間以内) と性転換雄魚で受精させた卵 (12,158 粒) を用い、受精 4 時間~5 時間 27 分後までの間に、実験 1 と同様に 11 回加圧処理した。検卵日は 11 月 27 日、ふ化日は 12 月 10 日、餌付け開始日は 12 月 17 日であった。2008 年 12 月 23 日に 1 年魚の魚体測定 (体長、体重、性別) を行った。2010 年 4 月 8 日 (2 年魚) に油鱗を切断して標識し、実験 1 の群と合わせて 2 群とし、屋内のコンクリート池で混合飼育した。飼育、採卵・受精、倍数性の判定方法は実験 1 とほぼ同じである。

実験3 雌雄混合型四倍体魚の作出

2008 年 (H20) 年 11 月 12 日に当所産ニジマス雌 (排卵後 1 週間以内) と性転換雄魚 (後で通常の雄魚であることが判明) で受精させた卵 (1 腹仔卵 4,331 粒: 8A 区, プール卵 7,194 粒: 8B 区) を用い、受精 4~5 時間後までの間に処理した。処理方法は 650 気圧 6 分間の圧力処理 (8A 区, 8B 区), 26℃20 分間の水温処理 (8B 区) を行った。検卵日は 11 月 26 日、ふ化日は 12 月 26 日、餌付け開始日は 12 月 26 日であった。稚魚の飼育は、8A 区は対照区と試験区の 2 群に分けて、8B 区は対照区と、試験区はさらに前期水温処理区、後期水温処理区、加圧処理区の 3 群に分けて、プラスチック水槽 (64×44×23cm, 65L) 3 槽でそれぞれ飼育した。飼育、倍数性の判定方法は実験 1 とほぼ同じである。

結果及び考察

実験1

ふ化成績を表1に示す。対照区の発眼率、正常ふ化率は2回とも90%以上となっており、卵質はかなり良好と判断された。排卵後2日以内の卵を使用した結果と考えられた。試験区の発眼率は17.6~45.7% (平均29.8)、正常ふ化率は3.2~15.2% (平均8.3) であった。試験区の回次を区別するための番号札が途中で混じり、倍数化に適正な時間は明らかにすることはできなかった。このため、試験区のふ化稚魚 (合計434尾) は一括して飼育することにした。

表1 ふ化成績 (実験1)

No	受精後処理 開始時間	供試卵数 (粒)	発眼卵数 (粒)	発眼率 (%)	正常 ふ化数 (尾)	正常 ふ化率 (%)
1		1,159	358	30.9	143	12.3
2		399	98	24.6	11	2.8
3		937	165	17.6	30	3.2
4	4:00~4:52	921	205	22.3	43	4.7
5		901	412	45.7	137	15.2
6		937	326	34.8	70	7.5
7	cont	198	188	94.9	184	92.9
8	cont	433	406	93.8	399	92.1
合計		5,885	2,158		1,017	

※ 正常ふ化率は供試卵数に対する割合を示す

実験2

ふ化成績を表2に示す。対照区の発眼率は62.7%、正常ふ化率は62.0%と実験1より低かったが、通常採卵群とほぼ同じであったため、卵質は概ね良好と判断された。試験区の発眼率は3.2~19.6% (平均9.6)、正常ふ化率は0.6~5.0% (平均2.2) と、実験1より低かった。発眼率、正常ふ化率とも受精4時間33分後 (積算水温56.9°C・h) に処理を開始した区で成績が最も良かった。正常ふ化率の変化は単峰性を示した (図1)。今回は飼育水槽の関係で個別飼育することができなかつたため、実験1と同様倍数化に適正な時間は明らかにすることはできなかった。試験区のふ化稚魚 (合計242尾) は一括して飼育することにした。

表2 ふ化成績 (実験2)

No	受精後処理 開始時間	供試卵数 (粒)	発眼卵数 (粒)	発眼率 (%)	正常 ふ化数 (尾)	正常 ふ化率 (%)
1	4:00	997	54	5.4	6	0.6
2	4:07	834	91	10.9	17	2.0
3	4:16	990	94	9.5	23	2.3
4	4:25	924	125	13.5	38	4.1
5	4:33	1,111	218	19.6	56	5.0
6	4:42	932	98	10.5	31	3.3
7	4:53	1,154	91	7.9	20	1.7
8	4:59	915	130	14.2	21	2.3
9	5:08	1,141	76	6.7	14	1.2
10	5:18	928	30	3.2	6	0.6
11	5:27	1,057	50	4.7	10	0.9
12	cont	1,175	737	62.7	729	62.0
合計		12,158	1,794		971	

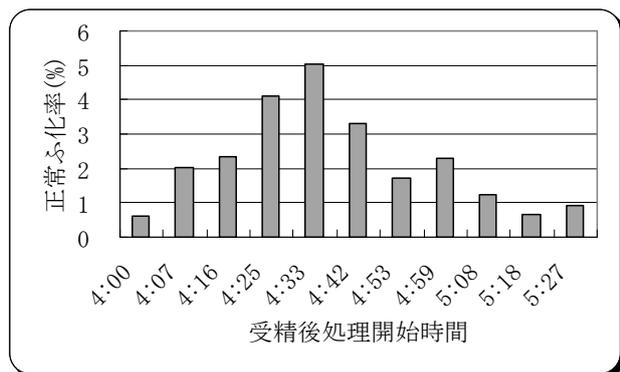


図1 正常ふ化率の変化 (実験2)

実験3

8A区及び8B区のみ化成績を表3,4に示す。8A区対照区の発眼率は95.5%, 正常ふ化率は93.0%とかなり高く, 卵質は良好と判断された。試験区の発眼率は9.9~84.3% (平均47.3), 正常ふ化率は1.4~11.4% (平均6.1)と, 実験1と同様に高かった。発眼率, 正常ふ化率とも受精4時間10分後(積算水温52.1°C・h)に処理を開始した区で成績が最も良かった(図2)。実験1,2と同様, 飼育水槽の関係で, 倍数化に適正な時間は明らかにすることはできなかった。試験区のみ化稚魚(合計254尾)は一括して飼育することにした。

一方, 8B区対照区の発眼率は90.0%, 正常ふ化率は85.7%とかなり高く, 卵質は良好と判断された。試験区の発眼率は12.8~59.9% (平均34.9), 正常ふ化率は1.2~55.2% (平均28.5)であった。水温処理区の正常ふ化率は単峰性を示さず, 受精5時間10分後(積算水温64.6°C・h)に処理を開始した区で成績が最も良かった。適正な受精処理後の時間に違いが見られたのは, 倍数化の処理方法の差によるものと考えられる。加圧処理区と水温処理区との比較では, 加圧処理区の方が発眼率, 正常ふ化率とも低く, 従来の知見と一致した²⁾。試験区のみ化稚魚は, 前期水温処理区(No.1~3), 後期水温処理区(No.4,5), 加圧処理区(No.6,7)の3区分し, それぞれ803尾, 938尾, 26尾ずつ水槽に収容した。

表3 ふ化成績 (実験3: 8A区)

No	受精後処理開始時間	供試卵数 (粒)	発眼卵数 (粒)	発眼率 (%)	正常ふ化数 (尾)	正常ふ化率 (%)
1	4:00	710	482	67.9	65	9.2
2	4:10	702	592	84.3	80	11.4
3	4:20	694	515	74.2	69	9.9
4	4:30	729	213	29.2	21	2.9
5	4:40	728	94	12.9	10	1.4
6	4:50	568	56	9.9	9	1.6
7	cont	200	191	95.5	186	93.0
合計		4,331	2,143		440	

表4 ふ化成績 (実験3: 8B区)

No	受精後処理開始時間	供試卵数 (粒)	発眼卵数 (粒)	発眼率 (%)	正常ふ化数 (尾)	正常ふ化率 (%)
1	4:10	1,000	424	42.4	387	38.7
2	4:25	1,000	223	22.3	191	19.1
3	4:40	1,000	254	25.4	225	22.5
4	4:55	1,000	435	43.5	386	38.6
5	5:10	1,000	599	59.9	552	55.2
6	4:40	600	149	24.8	19	3.2
7	5:00	600	77	12.8	7	1.2
8	cont	994	895	90.0	852	85.7
合計		7,194	3,056		2,619	

No1~5: 水温処理、No6,7: 加圧処理

ふ化後、対照区、No1,2,3区、No4,5区、No6,7区に分ける

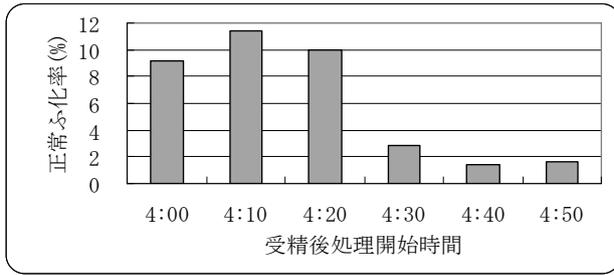


図2 正常ふ化率の変化 (実験 3-1)

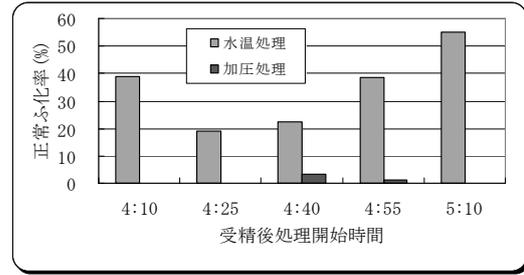


図3 正常ふ化率の変化 (実験 3-2)

倍数化率調査

2010年11月15日以降赤血球の大きさにより倍数化率を調査した結果について表5に示す。調査尾数は実験1, 2, 3の8A区は全数を、実験3の8B区は一部調査した。四倍体化率は加圧処理による方法(実験1, 2, 3の8A)では87%以上と高い率を示したのに対し、水温処理(実験3の8B)では0%であった。このことにより、加圧処理が四倍体魚の作出には有効であることが判明し、従来の知見と一致した²⁾。奇形率は2.6~9.8%と高く、処理方法の違いによる差は見られなかった。

表5 倍数化率調査

区分	実験1	実験2	実験3 (8A)	実験3 (8B)	
				前期水温処理	後期水温処理
調査尾数 (尾)	88	70	38	60	60
四倍体魚数 (尾)	86	61	33	0	0
二倍体魚数 (尾)	2	9	5	60	60
四倍体化率 (%)	97.7	87.1	86.8	0.0	0.0
奇形率 (%)	9.1	7.1	2.6	6.1	9.8

取り上げ及び採卵・ふ化成績

2010年11月の取り上げ成績を表6に示す。生残率は80%以上であった。四倍体魚は二倍体魚よりも酸欠や麻酔の覚醒に弱い傾向があり、測定時に斃死する場合が多数見られた。成熟率は年齢の高い実験1が62.5%と最も高かった。供試魚は通常の3年魚では殆ど成熟するため、実験1, 2では成長の遅れの影響が大きかったものと推察された。四倍体魚と二倍体魚の成熟状況をそれぞれ表7, 8に示す。

表6 取り上げ成績

区分	実験1	実験2	実験3 (8A)
年令	3+	3	2
収容尾数 (尾)	96	88	38
成熟雌魚	32	8	1
成熟雄魚	23	1	9
未熟魚	33	61	28
計 (尾)	88	70	38
生残率 (%)	91.7	79.5	100.0
成熟率 (%)	62.5	12.9	30.0

※収容尾数は2010年8月28日現在を示す

表7 四倍体魚

区分	実験1	実験2	実験3 (8A)
成熟雌魚	31	5	1
成熟雄魚	22	0	9
未熟魚	33	56	23
計 (尾)	86	61	33
成熟率 (%)	61.6	8.2	30.3

表8 二倍体魚

区分	実験1	実験2	実験3 (8A)
成熟雌魚	1	3	0
成熟雄魚	1	1	0
未熟魚	0	5	5
計 (尾)	2	9	5
成熟率 (%)	100	44.4	0

魚体測定結果を表9に示す。四倍体魚, 二倍体魚とも実験1より実験2の方が有意に大きかった(t検定, $p < 0.01$)。採卵時期の遅かった実験2の方が大きかった理由は, 飼育環境の違い(主に給餌条件)によるものと考えられる。採卵成績を表10に示す。採卵尾数は35尾で, 採卵親魚率は94.6%であった。50%採卵到達日は12月7日で, 通常魚のそれは11月10日頃であったので, 1ヶ月遅かった。成熟の遅れた原因については, 四倍体魚の特性なのか, 成長の遅れによるものかも含めて, 現時点では不明である。

単交配した四倍体魚の個体別ふ化成績を表11に示す。四倍体魚の卵は図4のとおり通常魚より1.6~1.7倍大きく(t検定, $p < 0.01$), その分だけ1尾採卵数が少なかった(t検定, $p < 0.05$)。発眼率は四倍体魚の方が劣る傾向にあった。雌親魚の場合, 赤血球の大きさをその都度調べなくとも, 採卵時の卵の大きさで, ある程度倍数性を推定できるものと判断された。但し雄親魚の場合は今のところ簡単な倍数性判断の指標となるものがないので, その都度赤血球で確認する必要がある。

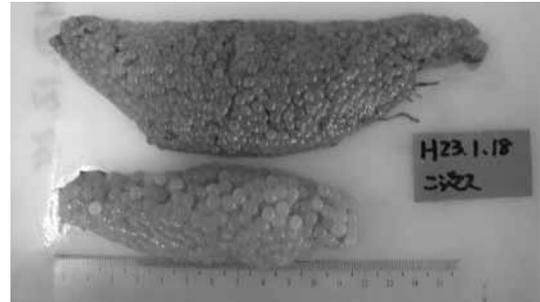


図4 四倍体魚卵(2011.1.18採卵, 上は二倍体魚卵)

小原は四倍体魚の発眼率は平均23~24%と報告しているが⁵⁾, 若干上回る結果となった。

次に, 四倍体魚の個体別雌性発生のふ化成績を表12, 13に示す。対照区では黄色(アルビノ)のふ化稚魚が出現したのに対し, 雌性発生区では黒色(通常魚)の仔魚しか見られず, 雌性発生が成功したことが示唆された。四倍体対照区の発眼率, 正常ふ化率はそれぞれ0~60.2%(平均36.9), 0~52.0%(平均31.9)であったのに対し, 雌性発生区のそれは0~4.6%(平均1.3%), 0~3.3%(平均0.8%)であった。二倍体は実験例が1例と少ないが, 四倍体区の雌性発生より高い正常ふ化率(10.6%)が得られた。67尾のふ化仔魚は2011年3月10日現在42尾生残し(62.7%), MT投与による性転換処理を行い, 飼育を継続している。

表9 魚体測定

区分	項目	実験1	実験2	実験1	実験2
		体長 (cm)		体重 (g)	
四倍体魚	平均	28.6	31.0	491	575
	最大値	34.7	44.3	805	1978
	最小値	19.4	21.7	193	149
	標準偏差	3.2	3.9	139	247
	測定数	86	61	86	61
二倍体魚	平均	29.8	35.5	593	951
	最大値	38.2	44.8	993	1,692
	最小値	21.2	24.8	192	384
	標準偏差		7.2		513
	測定数	2	9	2	9

表10 採卵成績

区分	11月15日	11月26日	11月30日	12月7日	12月15日	12月21日	12月28日	1月5日	1月12日	合計	生残尾数
採卵尾数(尾)											
実験1 四倍体魚 (油鱗) 二倍体魚	4	4	4	5	2	3	3		2	27	1
実験2 四倍体魚 (無印) 二倍体魚	1		1		1	1	1			5	1
合計	6	5	5	6	3	4	4	0	2	35	2
積算尾数(尾)	6	11	16	22	25	29	33	33	35	35	
採卵親魚率(%)	16.2	29.7	43.2	59.5	67.6	78.4	89.2	89.2	94.6	94.6	

表11 個体別ふ化成績 (単交配)

実験	区分	測定数	1尾採卵数 (粒)	発眼率 (%)	ふ化率 (%)	1粒卵重 (mg)
1	四倍体魚	19	901	34.3	20.0	135.3
2	四倍体魚	3	1,710	34.3	28.2	121.6
2	二倍体魚	3	2,852	43.8	36.5	76.6

表12 個体別雌性発生のふ化成績

No.	区分	供試卵数(粒)		発眼卵数(粒)		発眼率(%)		正常ふ化数(尾)		正常ふ化率(%)	
		cont	G-2N	cont	G-2N	cont	G-2N	cont	G-2N	cont	G-2N
1		106	769	36	27	34.0	3.5	29	23	27.4	3.0
2		115	842	44	13	38.3	1.5	42	6	36.5	0.7
3		106	678	0	0	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0
4		123	731	53	5	43.1	0.7	42	0	34.1	0.0
5	四倍体魚	136	932	63	4	46.3	0.4	58	2	42.6	0.2
6		98	918	59	42	60.2	4.6	51	30	52.0	3.3
7		113	869	17	3	15.0	0.3	15	1	13.3	0.1
8		100	620	40	7	40.0	1.1	35	2	35.0	0.3
9		110	903	50	1	45.5	0.1	49	1	44.5	0.1
10		119	740	55	2	46.2	0.3	40	2	33.6	0.3
11	二倍体魚	166	2,926	153	337	92.2	11.5	144	310	86.7	10.6

表13 四倍体魚の集計表

	発眼率(%)		正常ふ化率(%)	
	cont	G-2N	cont	G-2N
平均	36.9	1.3	31.9	0.8
最大値	60.2	4.6	52.0	3.3
最小値	0.0	0.0	0.0	0.0
標準偏差	17.3	1.6	15.3	1.2
測定数	10	10	10	10



図5 三倍体魚 (アルビノ色が発現)

四倍体魚等の飼育成績と倍数化率調査結果をそれぞれ表14,15に示す。二倍体雌×四倍体雄の交配(NO.18)では、正常ふ化率は22.2%、三倍体化率は96.7%で、逆交配よりもふ化率が低く、過去の知見と一致した²⁾。四倍体同士の交配(NO.23,25)では、ふ化率が13.8%、35.0%、四倍体化率は96.9%、80.6%で、一部二倍体が混じっていた。小原は四倍体魚の継代で0~7.2%の二倍体魚の出現を報告しており⁶⁾、後者はやや高い数字となった。四倍体魚の雌性発生魚(NO.15,4)では、ふ化率0.8%、0.9%と低く、得られた42尾の稚魚はMT処理し飼育を続けている。四倍体雌×アルビノ二倍体雄の交配(NO.16,17)では、ふ化率は29.2%、35.2%、三倍体化率は100%、100%であった。体色はアルビノ色が発現した。四倍体雌×二倍体性転換雄の交配(NO.5,7)では、ふ化率は35.9%、14.1%、三倍体化率は96.8%、100%であった。四倍体魚の中から出現した二倍体魚の雌性発生魚(NO.11)では、ふ化率10.6%、二倍体魚が90%で、一部四倍体魚が10%混じっていた。一方、水温処理しなかった区(NO.12)では、ふ化率86.7%、二倍体魚が80%で、一部三倍体魚が20%混じっていた。体色はアルビノ色が殆どであったが、うち2尾クロ(通常魚)が混じっていた(図5)。

表14 四倍体魚等の飼育成績

水槽NO.	試験区	採卵日	備考	ふ化尾数 (尾)	ふ化率 (%)	取上数 (尾)	平均体重 (g)	生残率 (%)
18	三倍体	11月15日	交配(1組)、♀2n×♂4n	796	22.2	724	1.38	91.0
23	四倍体	11月15日	交配(5組)、♀4n×♂4n	793	13.8	497	1.10	62.7
15	四倍体	11月30日	♀4nの雌性発生後MT処理	31	0.8	24	0.82	77.4
16	三倍体	11月30日	交配、♀4n×♂2nアルビノ	171	29.2	164	1.05	95.9
4	四倍体	12月7日	♀4nの雌性発生後MT処理	36	0.9	18	1.00	50.0
11	二倍体	12月7日	♀2nの雌性発生(35G)	310	10.6	284	0.82	91.6
12	三倍体	12月7日	交配(35C)、♀2n×♂アルビノ	144	86.7	143	1.18	99.3
17	三倍体	12月7日	交配、♀4n×♂アルビノ	190	35.2	185	0.54	97.4
25	四倍体	12月15日	交配(3組)、♀4n×♂4n	1,449	35.0	1,322	0.48	91.2
5	全雌三倍体	12月21日	交配(4尾)、♀4n×♂2n(性転換雄魚)	941	35.9	911	0.36	96.8
7	全雌三倍体	12月28日	交配(2尾)、♀4n×♂2n(性転換雄魚)	609	14.1	570	0.40	93.6

※3月10日取上

表15 倍数化率調査

水槽NO.	調査尾数 (尾)	二倍体魚 (尾)	三倍体魚 数(尾)	三倍体化 率(%)	四倍体魚 数(尾)	四倍体化 率(%)	奇形魚数 (尾)	奇形率 (%)	体色
18	30	1	29	96.7			0	0	クロ
23	32	1			31	96.9	3	9.4	クロ
15	未調査								クロ
16	30	0	30	100			0	0	黄
4	未調査								クロ
11	10	9			1	10	0	0	クロ
12	10	8	2	20			0	0	黄(クロ)
17	30	0	30	100			0	0	黄
25	31	6			25	80.6	0	0	クロ
5	31	1	30	96.8			0	0	クロ
7	31	0	31	100			2	6.5	クロ

※3月15日調査

要約

1. 自然交配によるニジマスとマスノスケの異質三倍体魚作出のため、ニジマス四倍体の作出方法等について検討した。
2. 卵割阻止による加圧処理法では合計 930 尾のふ化稚魚が得られ、ふ化率は最高 15.2% (実験 1)、5.0% (実験 2)、6.1% (実験 3) を示した。
3. 赤血球の大きさにより 3 年魚の倍数性を調査したところ、実験 1 では 97.7%、実験 2 では 87.1%、実験 3 では 86.8% の四倍体化率であった。
4. 成熟した四倍体魚を用いて 11 月 15 日から 1 月 12 日までの間に採卵を行った。四倍体魚の卵は二倍体魚の卵より大きく、かつ 1 尾採卵数は少なかった。
5. 四倍体魚同士の交配では合計 1,076 尾のふ化稚魚が得られ、四倍体化率は 80.6%、96.9% で二倍体魚が混じっていた。
6. ニジマス性転換雄魚との交配では合計 1,550 尾のふ化稚魚が得られ、三倍体化率は 96.8%、100% であった。
7. 二倍体卵と四倍体精子の交配では 796 尾のふ化稚魚が得られたが、ふ化率は逆の交配より低く、三倍体化率は 96.7% であった。
8. 極体放出阻止による水温処理では合計 67 尾のふ化稚魚が得られ、現在 MT 投与行い四倍体魚の性転換雄魚の作出を図っている。
9. なお、水温処理による卵割阻止型倍数化で得られた稚魚は加圧法より高い生残率を示したが、すべて二倍体魚で、四倍体魚を作出することはできなかった。

文献

- 1) 高橋一孝(1988): マス類の染色体操作による育種試験—X I ~温度処理によるニジマス 4 倍体魚作出~。昭和 62 年度山梨県魚苗センター事業報告書, 第 16 号, 16-18.
- 2) 全国養鱒技術協議会育種バイオテクノロジー研究部会 (2007): 育種バイオテクノロジー研究部会報告書 (平成 8~17 年度とりまとめ), 1-61.
- 3) 小原昌和・傳田郁夫 (2008): 染色体操作による異質三倍体品種「信州サーモン」の開発. 水産育種, 37, 61-65.
- 4) 高橋一孝 (2009): サケ科魚類の新しい養殖対象種について~ニジノスケ・サクラヒメ異質三倍体の作出~。山梨県水産技術センター事業報告書, 第 36 号, 1-5.
- 5) 小原昌和 (2009): ニジマス四倍体 3 系統の親魚から作出した信州サーモンのふ化成績. 長野県水産試験場事業報告書, 11.
- 6) 小原昌和・傳田郁夫 (2008): ニジマス四倍体の交配から生まれる二倍体. 長野県水産試験場事業報告書, 31.