

キンギョ精子を用いた低温処理第二極体放出阻止法による雌性発生誘起

木本 巧・ホセイン ラザニ*

雌性発生の成否判定が簡単であることから、ドジョウ精子を用いたキンギョの第二極体放出阻止による雌性発生の試みが報告されている¹⁾。しかし、ドジョウはキンギョとは成熟期がやや異なることや、採精が精巢からの切り出しによらねばならないなど技法的に問題がある。ドジョウではなく、キンギョ精子が利用できれば雌性発生の作業は大幅に簡便化できる。本報では、アカメリユウキンの特性である赤目形質が劣性である²⁾ことを利用して、アカメリユウキン卵とワキン精子を用いて、第二極体放出阻止による雌性発生を試み、また、その最適条件について検討したので報告する。

材料と方法

雌性発生は東京都水産試験場水元実験室において、1988年1月31日の早朝に行った。雌性発生の方法は概略図1に示したとおりで、希釈した精液に紫外線を照射し、媒精後、低温水で処理する方法をとった。卵と精液の採取から、低温処理までの作業は、22℃に調温した恒温室内で行った。

卵と精子 1月31日に排卵したアカメリユウキン(体重約150g)の卵と、同日、ワキンの雄魚(体重約200g)2尾から採取して均等量に混合した精液を実験に供した。

精液の希釈液 Yamamotoのメダカ用リングル液³⁾(1l中にNaCl 7.5g, KCl 0.2g, CaCl₂ 0.4gを含む水溶液)を作り、精液の希釈直前にNaHCO₃、および0.1NのHClでpH7に調整した。

紫外線照射方法 紫外線照射方法は小野里ら⁴⁾の方法に準じた。すなわち、GLランプ1灯を上部に取り付けた箱型の紫外線照射装置を作成し、精液は上記希釈液で100倍希釈した後、直径90mmのシャーレに2ml分注し、GLランプの下で紫外線が50erg/mm²/

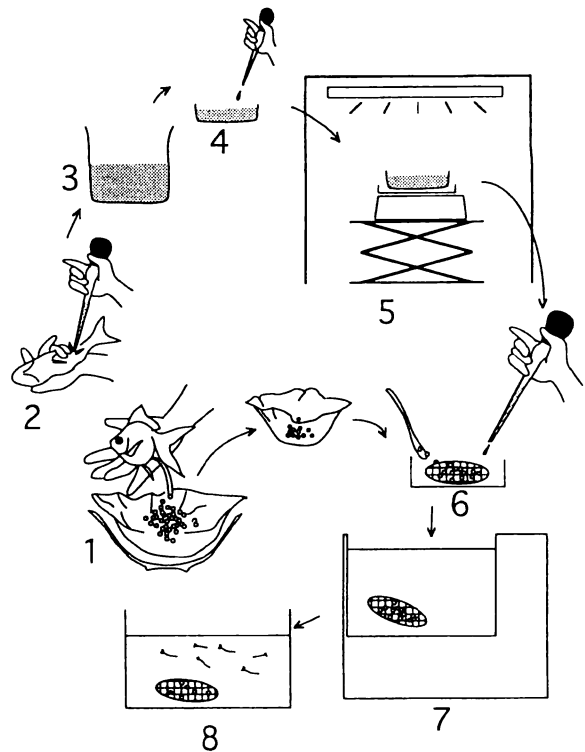


図1 キンギョの雌性発生操作概略

1: ラップフィルム上に卵を採る。2: 精液を採取する。3: 精液を希釈する。4: 希釈した精液をシャーレに入れる。5: 紫外線を照射する。6: 受精させる。7: 低温処理をする。8: 水槽内でふ化させる。

secとなる位置に置き、照射時間によって照射量を6000、または7000erg/mm²に調節した。なお紫外線照射量は、ニゴロブナに関する田中ら⁵⁾を参考にした。また、紫外線を照射している間はシャーレを振とう器で水平に振動させた。

受精方法 希釈精液2mlに対して6mlの水を加えた直後、卵に媒精した。

低温処理方法 低温処理のための冷却装置として東京理科機器株式会社製UA-130を、卵の冷却水には、一晩放置して脱塩素処理した水道水を用いた。また、卵は24メッシュのサランを直径90mmの円形に切り

*東京都水産試験場研修生

抜いたものに付着させた状態で低温処理を施した。低温処理開始時期は、ニゴロブナに関する田中ら⁵⁾の報告を参考にし、媒精6分後に低温水に入れる方法をとった。処理条件は、水温0, 1, 2℃の各区に対して10, 20, 30分間の処理を行った。また、紫外線照射処理および低温処理を行わない通常受精区を対照区とした。

ふ化仔魚の観察 処理終了後の卵は、13lの角型スチロール水槽に収容し、ふ化およびその後の成長を、顕微鏡下、または肉眼で観察することによって対照区との違いを検討した。また、ふ化仔魚は、正常な仔魚とほぼ同じ外見をしている個体を正常魚、体躯が曲がっていたり、正常な仔魚と比べて小型であったり、遊泳異常と認められる個体を異常魚とした。なお、正常魚出現数/供試卵数×100を正常ふ化率とした。

結 果

雌性発生区では、ふ化直後の仔魚は全て眼球が明るく、体部にメラノフォアがみられず、外見はアカメリユウキンと同じであった。これに対して、対照区の仔魚は全て、眼球が黒く、体部にメラノフォアがあり、ワキンと同じ外見をしていたため、両者の判別は容易

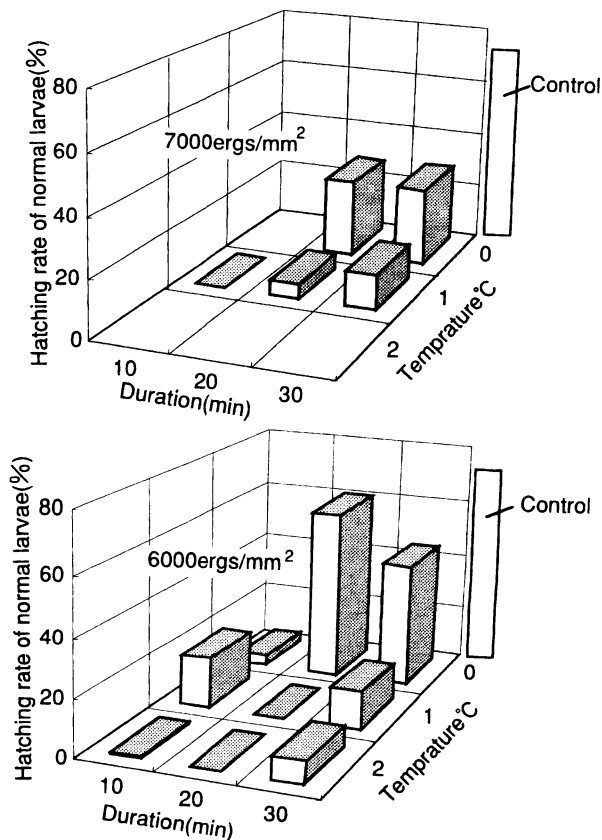


図2 低温処理時間および水温と正常ふ化率 (上図; 紫外線量 7000erg/mm², 下図; 6000erg/mm²)

表1 低温処理温度および時間とふ化率

紫外線照射量	温度 (°C)	時間 (分)	卵数	正常な仔魚数	異常な仔魚数	ふ化率 (%)	正常ふ化率 (%)
6000 erg/mm ²	0	10	127	5	3	6.3	3.9
		20	40	24	6	75.0	60.0
		30	43	19	8	62.0	44.2
	1	10	111	2	2	3.6	1.8
		20	49	0	0	0.0	0.0
		30	61	8	13	34.4	13.1
	2	10	151	1	0	0.7	0.6
		20	32	0	0	0.0	0.0
		30	27	2	0	7.4	7.4
7000 erg/mm ²	0	10	260	*	*	*	*
		20	103	28	10	36.9	27.2
		30	80	22	10	40.0	27.5
	1	10	820	3	0	0.4	0.4
		20	76	4	0	5.3	5.2
		30	41	5	3	19.5	12.2
	2	10	595	*	*	*	*
		20	60	*	*	*	*
		30	154	*	*	*	*
対照区			52	37	1	73.1	71.1
			268	209	0	78.0	78.0

*: 殆どふ化が見られなかったが、卵の凝集等によってふ化に悪影響があったと思われるため、空欄とした。

であった。また、精子に照射した紫外線量が6000, 7000erg/mm²の両区とも、正常ふ化率が最も高かった低温処理条件は、水温が0℃で、処理時間が20分間するときであった(表1, 図2)。

考 察

雌性発生区の仔魚は、全てアカメリユウキンと同じ外見であったことから、精子は紫外線照射量6000~7000erg/mm²で十分に不活化され、さらに、低温処理により極体放出が阻止され、雌性発生に成功したものと推察された。正常ふ化率で検討すると、低温処理条件は、0℃で20~30分間が適当と思われた。キンギョはドジョウに比べて扱いやすく、精液の採取も比較的容易である。従って今回のように、雌性発生区と対照区が、簡単に判別できる品種を雌雄親魚として選択すれば、雌性発生に関する作業が簡略化できることが判明した。

文 献

- 1) 石元伸一・石井吉夫・小寺和郎(1987) 雌性発生技術開発試験. 昭和62年度愛知水試業務報告. :25-27.
- 2) 木本巧(2000) キンギョ赤目形質の遺伝. 東京水試調査研報, (212):108-109.
- 3) Yamamoto, T. (1944) Physiological studies on fertilization and activation of fish egg-I. Response of the cortical layer of the eggs of *Oryzias latipes* to insemination and artificial stimulation. *Annot. Zool. Japan.*, 22: 109-125.
- 4) 小野里坦・山羽悦郎(1983) 紫外線照射によるサケ目魚類4種の雌性発生. 日本水産学会誌, 49(5):693-699.
- 5) 田中秀具・後藤富佐夫・中賢治・栗野圭一・太田豊三・澤田宣雄・遠藤誠(1987) ホンモロコ・ニゴロブナの雌性化技術開発に関する研究. 昭和61年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書.