

三倍体マガキ配偶子の生殖能力と得られた稚貝の特性

植木 範行

Fecundation and Progeny of the Gamete from
Triploid Pacific Oyster *Crassostrea gigas*

Noriyuki UEKI

キーワード：三倍体マガキ，交配，染色体数

三倍体マガキ *Crassostrea gigas* は配偶子形成と産卵の抑制により、産卵期でも身入りした状態が維持され、食用も可能であり、特に通常のカキ養殖における出荷初期の10月に高品質のカキを生産できることなどの有益な特性が認められている^{1, 2)}。しかし、三倍体マガキは配偶子形成の抑制が不完全であり、一部の個体は成熟した卵や精子を形成し、それらは切開による交配で受精発生することが知られている³⁻⁵⁾。このことは、三倍体マガキをカキ養殖漁場に導入する上で大きな障害となっており、三倍体カキを実用化するには、これらの生殖能力が生態系に悪影響を与えないような方向で進める必要がある。

そこで、交配試験により三倍体マガキの配偶子の生殖能力について明らかにするとともに、三倍体マガキをカキ漁場に導入した場合、三倍体マガキの配偶子がカキ漁場の環境、とりわけカキの天然採苗に与える影響について検討するための基礎研究として実施した。

材料と方法

交配試験は1991年から'93年の3年間にわたって行った。

'91年の試験では、'90年7月にサイトカラシンB処理により作出した三倍体カキ1年貝²⁾を用いた。これらは前もって個体別に体液を取り出し、スライドグラスに塗抹しメタノールで固定した後、DAPI染色を施して顕微蛍光測光法により核DNA量の相対値を測定し、三倍体であることを確認した。その後、個体別にパールネットに収容して牛窓町鹿忍の岡山水試前の海面の筏に垂下養成しながら適宜取り上げて交配試験に供した。また、対照の二倍体として邑久町地先で'92年の夏に採苗したマガキを同様に養成した。

交配はすべて切開により行った。'91年6月12日に三倍体マガキと二倍体マガキを取り上げ、殻を除いて生殖巣の一部をとりだして顕微鏡下で雌雄を確認した後、卵と精子を取り出して、 $2n♀ \times 2n♂$ 、 $2n♀ \times 3n♂$ 、 $3n♀ \times 2n♂$ 、 $3n♀ \times 3n♂$ の4種類の組合せの交配を行った。その後、30 l容量の黒色ポリエチレン水槽に浮上したD型養成を収容し、水量を25 lとして飼育を開始した。

浮遊幼生期の餌料として *Chaetoceros* sp. を単独で投与した。飼育期間中の水温は20~25℃の範囲で、一日の水温変化をできるだけ抑えるために海水をかけ流しにした浅い水槽に飼育容器を漬け込んで飼育した。飼育水は精密濾過海水を用い、2~3日に1回全換水した。付着期以降は付着基質としてホタテガイの殻でできたコレクターを同じ容器に垂下した。コレクター投入後は2~3日に1回、1/3換水した。通気はガラス管を用い、微量とした。

このようにして付着稚貝まで養成した後、天然の海域においてマガキ幼生がほとんど見えなくなる10月まで室内で養成した後、岡山水試前の筏で垂下養成して殻長が1~2 cmに成長した稚貝を用いて、鰓の細胞核のDNA量の相対値と染色体数を測定し、その倍数性を個体別に検査した。すなわち、稚貝を一晩0.005~0.01%コルヒチン海水中においた後、軟体部を取り出してカルノア液で固定した試料を用い、鰓細胞の核DNA量の相対値を顕微蛍光測光法で測定するとともに、ギムザ染色を施した塗抹標本で染色体数を確認した。なお、染色体数は鮮明な核板の分裂像において3個以上確実に計数できた場合をその個体の染色体数とした。

'92年の交配試験に用いた母貝は、'91年に使用したものと同一群を引き続き岡山水試前の筏で垂下養成した三

倍体カキ2年貝を用いた。これらは前述の方法で交配前に個体別に三倍体であることを確認した。

交配は2回行った。1回目は5月19日に個体別の産卵誘発⁷⁾によって三倍体の雄が僅かに放精したため、同時に放卵した二倍体の卵を二等分して二倍体と三倍体の精子でそれぞれ媒精した後前述の方法で稚貝まで飼育した。2回目は6月11日に切開によって得られた卵や精子を用いて'91年の試験と同様の組み合わせで三倍体と二倍体の交配試験を行った。生残した稚貝は殻高1~2cmまで養成した後、鰓細胞の核DNA量を測定して個体別に倍数性を判定した。

'93年の試験では、'91、'92、'93年に作出した、3年貝、2年貝および1年貝の三倍体カキ⁷⁾を用い、7月7日に三倍体雌6個体と二倍体雄2個体を切開により媒

表1 三倍体カキと二倍体カキの切開による採卵数の比較

採卵年月日	三倍体		二倍体	
	全重量 g	採卵数	全重量 g	採卵数
'91. 7. 8	37.8	$1.3 \times 10^{5*}$	55.3	$150 \times 10^{5*2}$
'91. 7. 18	48.4	8.3×10^5	15.3	133.5×10^5
	46.7	11.6×10^5	31.4	465×10^5
	43.6	3.8×10^5		

* 十分に切開採卵した6個体の平均値

* 2 軽く切開採卵した2個体の平均値

精して稚貝まで養成し、前述の方法で倍数性を判定した。

結 果

1. '91年の交配試験 三倍体と二倍体の切開による採卵数の比較を表1に示した。但し、交配時には採卵計数できないので、試験に用いた群から適宜標本を抽出して切開による作出可能な採卵数を調べた。その結果、二倍体は三倍体のほぼ100倍程度の採卵数であった。また、三倍体の卵を用いた交配では浮上率が極めて悪い例が多かった。

交配試験において、採卵数が少ない上に受精率及びD型幼生への変態率が二倍体の半分程度であったため、飼育に用いる三倍体カキの幼生数はわずかであった。しかし、 $3n \text{♀} \times 2n \text{♂}$ で推定250個体、 $3n \text{♀} \times 3n \text{♂}$ で推定500個体のD型幼生が得られたので、稚貝までの養成を試みた。その結果を表2に示した。付着稚貝まで生残した個体は12及び7個体ときわめて少なかった。その後6ヶ月後の殻高1から2cmの稚貝までは殆ど死亡しなかったため、これらの倍数性を調査した結果、表3に示したように全て二倍体と判定された。

2. '92年の交配試験 産卵誘発時に放精した三倍体マガキの精子を二倍体マガキの卵に媒精したものの飼育結果を表4に示した。幼生の浮上率は、対照の二倍体間

表2 切開による三倍体と二倍体の交配試験 ('91. 6. 12)

交配型	受精率 %	D型化率 %	収容幼生数 ($\times 10^4$)	生残稚貝数	生残率 %
$2n \text{♀} \times 2n \text{♂}$	54.5	100	34.3	7,200	2.1
$2n \text{♀} \times 3n \text{♂}$	11.4	94.1	26.7	2,400	0.9
$3n \text{♀} \times 2n \text{♂}$	34.0	33.3	0.025	12	4.8
$3n \text{♀} \times 3n \text{♂}$	33.3	50.0	0.05	7	1.4

表3 三倍カキと二倍カキの交配により得られた稚貝の鰓細胞核のDNA量の相対値

交配型	No.	対照 (2n)	t-1	t-2	t-3
$2n \text{♀} \times 3n \text{♂}$	1	$32.8 \pm 0.67^*$	32.4 ± 1.20	28.5 ± 1.09	31.8 ± 0.97
		$2n = 20$	$0.99^{*2}, 2n = 20^{*3}$	0.87, $2n = 20$	0.97, $2n$
	2	31.8 ± 0.93	33.1 ± 0.71	30.7 ± 1.14	30.3 ± 0.78
		$2n = 20$	1.04, $2n = 20$	0.97, $2n = 20$	0.95, $2n = 20$
$3n \text{♀} \times 2n \text{♂}$	1	29.3 ± 0.51	33.8 ± 0.58	32.6 ± 0.46	31.0 ± 0.85
		$2n = 20$	1.15, $2n$	1.11, $2n = 20$	1.06, $2n = 20$
	2	30.3 ± 0.54	31.6 ± 0.65	31.3 ± 0.88	30.8 ± 0.40
		$2n = 20$	1.04, $2n = 20$	1.03, $2n = 20$	1.02, $2n = 20$
$3n \text{♀} \times 3n \text{♂}$	1	32.0 ± 1.22	29.2 ± 1.07	31.9 ± 0.49	30.8 ± 0.47
		$2n = 20$	0.91, $2n$	1.00, $2n = 20$	0.96, $2n = 20$
	2	31.6 ± 0.79	32.8 ± 0.67	31.6 ± 0.53	
		$2n = 20$	1.04, $2n$	1.00, $2n = 20$	

* \pm 平均値の95%信頼区間

* 2 対照 (2n) を1としたときの係数

* 3 倍数性と確認した染色体数

の交配と同程度であった。しかし、幼生飼育を開始して5～10日目における減耗が著しく、38日目に133個体の付着稚貝が得られたのみで、稚貝までの生残率は0.009%であった。これらの付着稚貝を7か月間養成して生残した4個体はすべて二倍体であった。

切開による交配試験において、付着稚貝までの飼育結果を表5に示した。三倍体の卵を用いた交配では浮上幼生数が少ない上に、'91年に比べてD型化率が低かった。

3N♀×2N♂及び3N♀×3N♂の交配で得られた稚貝の12月まで生残したものについて、個体別に倍数性を調べた結果を表6に示した。生残率は約1割であった。3N♀×2N♂の交配群では8個体中1個体、3N♀×3N♂の交配群では7個体中1個体に三倍体が出現した。しかし、2N♀×3N♂の交配で得られた稚貝のうち、検査した20個体はすべて二倍体であった。また、3N♀×2N♂の交配群で三倍体と二倍体の中間のDNA相対値を示す個体が1個体出現したが、その染色体数は

確認できなかった。なお、その他の染色体数も標本の状態が悪く、分裂像が少なかつたため確認できなかった。

3. '93年の交配試験 交配試験に用いた母貝及び交配飼育結果を表7に示した。三倍体カキは十分に切開してできるだけ多くの卵を採集した。総採卵数は272万粒であった。浮上幼生の割合は5.1%と低かったが、D型幼生への変態率は73%と高く、飼育開始時の幼生数も過去2年間に比べて多かつた。しかし、D型幼生からの生残率は0.026%と低かつた。また、'94年1月20日に生残した6か月齢の稚貝の倍数性の検査結果を表8に示した。14個体中3個体が三倍体と判定された。さらに、三倍体と二倍体の交配によって得られた稚貝の鰓細胞の染色体数を調べた結果、図1及び2に示したように正常な染色体数の他に、二倍体で21本、三倍体で29本の異数体と考えられる個体が多く出現した。

3年間の交配試験における生残稚貝の三倍体の出現状況をまとめて表9に示した。二倍体の卵と三倍体の精子

表4 自然放精3n精子を用いた交配試験('92. 5. 19, 誘発交配)

交配型	浮上率 %	収容幼生数 (×10 ⁴)	生残稚貝数	生残率 %	稚貝の倍数性			計
					2n	3n	その他	
2n♀×2n♂	28.1	14.0	17,000	12.2	7	0	0	7
2n♀×3n♂	26.6	13.8	13	0.009	4	0	0	4

表5 切開による三倍体と二倍体の交配試験('92. 6. 11)

交配型	浮上幼生数 (×10 ⁴)	D型化率 %	収容幼生数 (×10 ⁴)	生残稚貝数	生残率 %	稚貝の倍数性			計
						2n	3n	その他	
2n♀×2n♂	96.0	96	12.5	6,200	5.0	8	0	0	8
2n♀×3n♂	52.7	96	12.5	4,700	3.8	20	0	0	20
3n♀×2n♂	1.35	8	1.35	82	0.6	6	1	1(1,27)	8
3n♀×3n♂	2.25	5	2.25	84	0.4	6	1	0	7

表6 三倍体卵の交配により得られた稚貝の鰓細胞核のDNA量の相対値

交配型	No.	対照(2n)	t-1	t-2	t-3
3n♀×2n♂	1	96.1±15.99*	98.2±12.95 1.02* ² , 2n* ³	157.4±15.37 1.64, 3n	113.2±11.76 1.18, 2n
	2	99.5±8.66	108.3±7.38 1.09, 2n	106.6±11.48 1.07, 2n	125.9±8.54 1.27, 不明
	3	113.5±6.14	112.0±8.86 0.99, 2n	110.7±7.00 0.98, 2n	
3n♀×3n♂	1	98.7±4.98	145.7±14.75 1.48, 3n	95.2±21.27 0.96, 2n	
	2	97.0±5.26	95.3±6.07 0.98, 2n	105.4±8.94 1.09, 2n	
	3	109.1±6.883	109.8±6.24 1.01, 2n	105.6±4.35 0.97, 2n	111.4±3.55 1.02, 2n

* ±標準偏差

* 2 対照(2n)を1としたときの係数

* 3 判定した倍数性

表7 切開採卵による三倍体カキ卵の交配試験結果

採卵月日 交配母貝	'93. 7. 7				
	年 齢	殻高 (cm)	全重量 (g)	殻高 (cm)	全重量 (g)
	1	8.1	33.4		
	1	9.1	52.1		
	1	5.9	18.1		
	2	8.4	66.8	14.3	183.8
	2	9.3	89.6		
	3	11.3	191.7	11.4	125.6
採卵数	272 × 10 ⁴ 粒 (切開)				
浮上率	5.1%				
D型化率	73%				
飼育開始時のD型幼生数	10 × 10 ⁴				
生残稚貝数	26個体				
生残率	0.026% (D型幼生数からの生残率)				
稚貝の倍数性 2n=11, 3n=3 ('94. 1. 25に殻高1~2cmの稚貝の鰓細胞核のDNA量を測定)					

表8 三倍体カキ卵の交配により獲られた稚貝の鰓細胞核のDNA量の相対値と染色体数

No.	対照 (2n)	t-1	t-2	t-3
1	53.9 ± 3.52*	56.7 ± 2.13 1.05* ² , 2n=21* ³	58.7 ± 2.48 1.09, 2n=21	59.9 ± 1.88 1.11, 2n=21
2		55.0 ± 1.59 1.02, 2n=20	54.5 ± 3.07 1.01, 2n=20	75.1 ± 1.36 1.39, 3n=29
3		57.1 ± 2.01 1.06, 2n=21	55.1 ± 2.76 1.02, 2n=21	69.7 ± 3.06 1.29, 3n=29
4		57.4 ± 2.93 1.06, 2n=21	53.7 ± 3.14 1.00, 2n=20	56.8 ± 3.24 1.05, 2n=21
5		75.4 ± 2.04 1.40, 3n=30	53.3 ± 2.26 0.99, 2n=20	

* 平均値の95%信頼区間

* 2 対照 (2n) を1としたときの係数

* 3 倍数性と確認した染色体数

を掛け合わせたものでは55個体全て二倍体のみであったが、三倍体の卵と二倍体の精子と掛け合わせたもので22個体中4個体、三倍体の精子と掛け合わせたもので12個体中1個体の三倍体が出現した。

考 察

以上の結果から、三倍体マガキの配偶子は生殖能力を有しており、二倍体や三倍体同士の配偶子と交配することで受精発生して稚貝まで育つことが明らかになった。しかし、稚貝まで生残する個体は僅かであった。

三倍体マガキの卵を、二倍体または三倍体の精子と媒精して得られた稚貝に二倍体と三倍体が生じることは、他にも報告例があり、二枚貝の三倍体の特性の一つと考えられる。赤繁ら⁵⁾は三倍体マガキを用いて同様の交配試験を行い、浮遊幼生期には異数体と考えられるもの

が多くみられるが、付着稚貝までに死滅するものと推察している。

しかし、今回の結果において、出現した三倍体マガキは少なくとも生後6~7か月の殻長で1~2cmまでは成長生残することが明らかになったことは、今後三倍体を実用化していくうえで、大きな問題といえる。このような例はアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* においても、古丸ら⁷⁾が同様の交配試験を行い、3N♀ × 2N♂の組合せ交配を行ったところ、幼生期には異数体が多く出現するが、4か月齢ではそれらはすべて死亡して二倍体と一部三倍体のがのこり、20個体中4個体が三倍体であったと報告している。

このように、切開による交配において、自然界では存在しないと考えられる三倍体が生残して稚貝まで育つこと、さらに、染色体数が通常と異なる異数体と思われる

表9 三倍体カキの交配試験における三倍体の出現割合の3年間のまとめ(顕微蛍光側光法で判定)

実施年度/ 実配型	三倍体個体数/検査個体数			計
	'91	'92	'93	
$2n^{\circ} \times 2n^{\sigma}$	0/15	0/15	-	0/30
$2n^{\circ} \times 3n^{\sigma}$	0/31	0/24	-	0/55
$3n^{\circ} \times 2n^{\sigma}$	0/6	1/7	3/14	4/25
$3n^{\circ} \times 3n^{\sigma}$	0/5	1/7	-	1/12
染色体数と (確認個体数)	2n=20 (12)		2n=20 (4)	
	" (24)		2n=21 (7)	
	" (5)		3n=29 (2)	
	" (3)		3n=30 (1)	

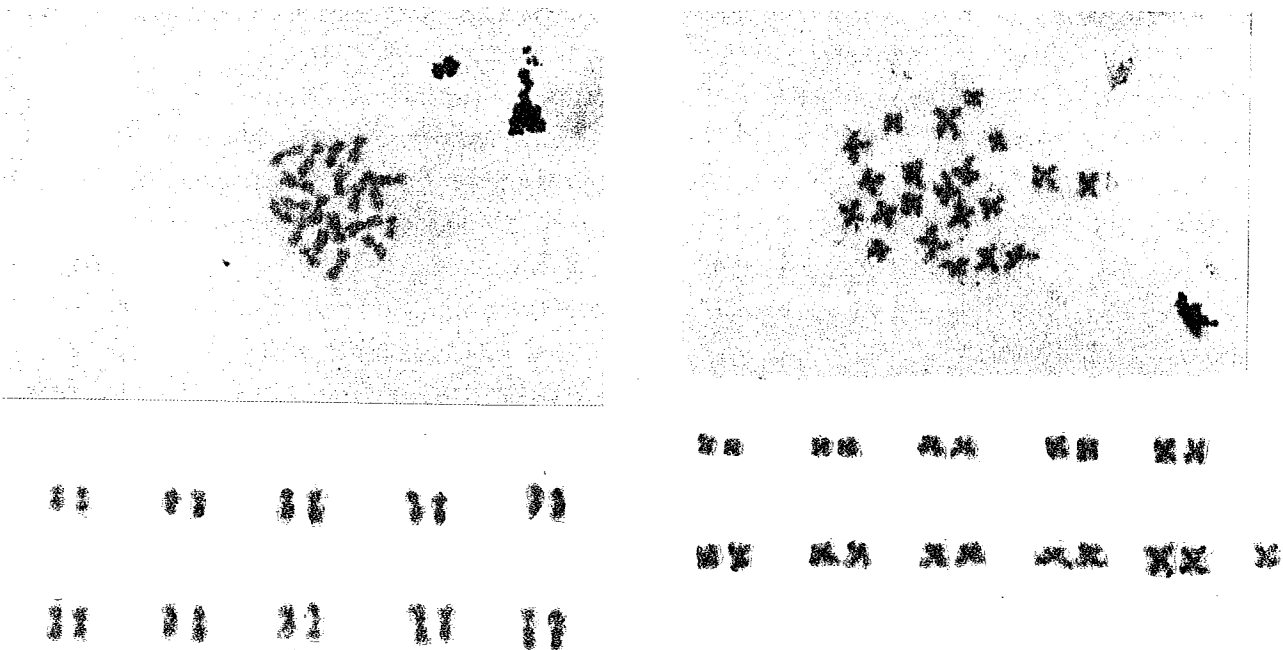


図1 マガキの染色体像(2n=20本)

個体が出現したことから、今後、マガキの三倍体を実用化するに当たってはこれらの出現機構について十分に研究を進めると共に、生態系に悪い影響を与えないよう慎重な配慮が必要と考えられる。

要 約

1. 1991年から'93年の3年間にわたり、三倍体マガキの配偶子の交配試験を行い、三倍体マガキの配偶子の生殖能力について明らかにするとともに、三倍体マガキをカキ漁場に導入した場合、三倍体マガキの配偶子がカキ漁場の環境、とりわけカキの天然採苗に与える影響について検討した。
2. 三倍体マガキの配偶子は生殖能力を有しており、二倍体や三倍体同士の配偶子と交配することで受精発生

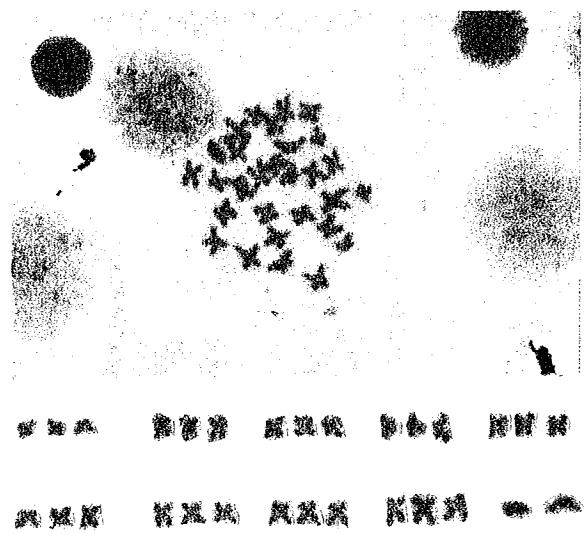


図2 三倍体カキの卵と二倍体カキの精子の交配により出現した異数体と考えられる稚貝の染色体像
(写真; 上, 2n=21本, 写真下; 3n=29本)

して稚貝まで育つことが明らかになった。しかし、稚貝まで生残する個体は僅かであった。

3. 三倍体の卵と二倍体または三倍体の精子で交配した場合、生残した殻高1から2cmの稚貝の一部に三倍体が出現することが明かとなった。
4. '93年の結果において、三倍体と二倍体の交配によって得られた稚貝の鰾細胞の染色体数を調べた結果、二倍体で21本、三倍体で29本の異数体と考えられる個体が多く出現した。
5. 切開による交配において、自然界では存在しないと考えられる三倍体が生残して稚貝まで育つこと、さらに、染色体数が通常と異なる異数体と思われる個体が出現したことから、今後、マガキの三倍体を実用化するに当たっては、これらがカキ漁場の生態系に悪い影響を与えないよう慎重な配慮が必要と考えられる。

文 献

- 1) 赤繁 悟・伏見 徹, 1992: 広島県海域における三倍体マガキの成長, 生残とグリコーゲン含量, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1063-1071.
- 2) 植木範行・池田善平, 1991: 三倍体マガキの成長と成熟について, *岡山水試報*, 6, 72-75.
- 3) S. Akashige, 1990: Growth and reproduction of triploid Japanese oyster in Hiroshima bay, in "Advance in invertebrate reproduction 5" (Proc. 5th Intnatl. Congress Invertebrate Reproduction July 23-28, 1989, Nagoya), *Elisvier Science Publisher B. V.*, Amsterdam, 461-468.
- 4) S. K. Allen, Jr., and S. L. Downing, 1990: Performance of triploid pacific oysters, *Crassostera gigas*: Gametogenesis, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 1213-1222.
- 5) 赤繁 悟, 1992: マガキを中心とした貝類三倍体の作出と特性, *水産育種*, 17, 5-18.
- 6) A. Komaru and K. T. Wada, 1994: Meiotic maturation and progeny of oocytes from triploid Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) fertilized with spermatozoa from diploids, *Aquaculture*, 120, 61-70.
- 7) 植木範行, 1995: 三倍体マガキの産卵誘発試験, *岡山水試報*, 10, 104-108.