

低温及びサイトカラシン B によるサルボウの三倍体誘起について

植木 範行・池田 善平・片山 勝介

Triploidization of Ark-shell *Scapharca subcrenata*
with Lower Temperature and Cytochalasin B

Noriyuki Ueki, Zenpei Ikeda, and Katsusuke Katayama

岡山県西部海域では、1950年頃からサルボウ *Scapharca subcrenata* の養殖が盛んに行われてきたが、'75年以來、夏から秋季にかけて大量へい死が連続し、ほとんど生産できない状態となっている。この原因について様々な面から検討され、未だ確定的な原因究明には至っていないが、夏季の成熟とそれに続く産卵がへい死要因の一つとして想定されている。そこで、一般に生殖巣を形成しない三倍体を作成し、その成長やへい死などの側面から検討する目的で、まず本年はその作出技術の研究を始めた。

貝類の三倍体誘起に関しては、マガキ^{1, 2)} *Crassostrea gigas*, アコヤガイ³⁾ *Pinctada fucata martensii*, エゾアワビ⁴⁾ *Nordotis discus*, ヒオウギガイ⁵⁾ *Chlamys nobilis* で、低温や高圧、サイトカラシン B (以下 CB とする) などの処理により試みられている。ここではサルボウを対象に低温と CB による三倍体誘起条件の検討を行い、二、三の知見を得たので報告する。

材料と方法

産卵誘発 親貝として有明海産天然の2年貝を用い、4月に採取後、岡山県水産試験場沖で飼育したのち供試した。親貝を個体別に2 l のポリビーカーに収容し、弱く通気しながら、飼育水温を30-60分間で5°C上昇させ、更に冷凍精子を4~5 ml / 回加える方法で⁶⁾で誘発し、産卵させた。

倍数化処理 個体別に放精、放卵したものをを用い、直ちに媒精した。媒精後、開口径10 μm ネットを底に張った径5 cm の円筒型の容器に移し、底にわずかに水が残る程度に水切りした。その後、2~6°C の低温、及びジメチルスルホオキシド (以下、DMSO とする。) に溶解した CB が、0.1~1.0 mg / l になるように調整した海水中に、一定時間浸漬し、三倍体の誘起を試みた。処理後は発生用の別の水槽にネット容器ごとつけ込んで、担

輪子幼生に発生するまでおいた。

極体観察 まず、染色体の倍数化率を推定するため、第1および第2極体の有無を観察した。すなわち、媒精後一定間隔で発生途中の卵を取り出し、約5%の中性ホルマリンで固定した後、約100粒の卵を検鏡し、図1に示したように第1及び第2極体の認められた割合を極体放出率として示した。

染色体観察 媒精5、6時間後の担輪子幼生を用い、以下の方法でプレパラートを作製し、1つの核板と判断できるもの50個の染色体数を計数し、倍数化率を求めた。倍数体の判定は、染色体が38本以下のものを二倍体(2

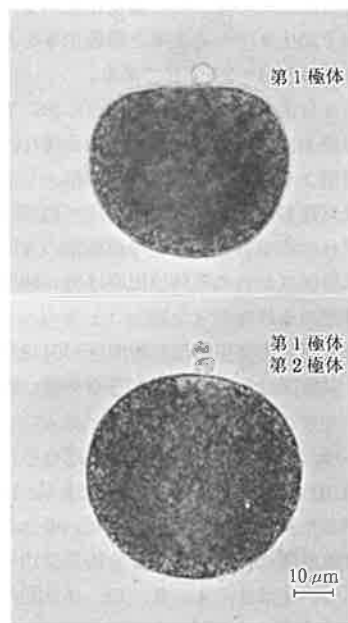
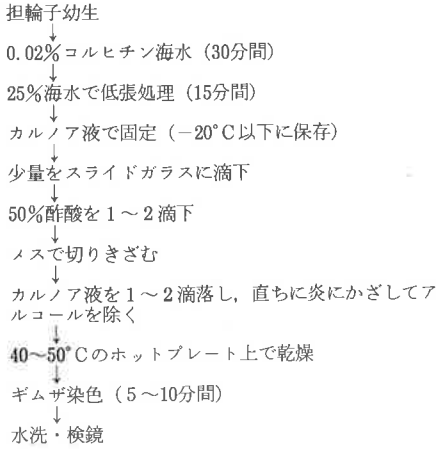


図1 極体を放出した受精卵

n), 40~57本を三倍体 (3n), それ以上を四倍体以上 (4n ≤) としたが, 重なりが多く, 正確に38及び57本と計数出来るものはわずかであった。

(プレパラート作製方法)



結果と考察

低温処理による倍数化

試験1, 媒精後の処理開始時間を2分後から2分間きざみで12分後までとし, 2.0~2.9°Cが各5分間処理した場合の処理後20分間の極体放出の変化を図2に示した。また, 担輪子幼生までの発生率と倍数化率を表1に示した。発生水温は28.1~29.7°Cである。

媒精2, 4分後に処理を開始した区において極体の放出が対照の第1極体放出期より10~12分遅れ, 対照の第2極体放出期よりさらに2~4分遅れた。しかし, 媒精6分後以降処理した区では, 対照に比べ処理時間の5分間に近い遅れのみで第1及び2の両極体の放出が確認できた。全試験区において極体放出率は31~80%で, 余り大きな差は認められなかった。

担輪子幼生までの発生率は, 対照区が94.8%であったのに対し, 試験区は78.1~94.2%とやや低い傾向が認められた。

倍数化率は, 極体放出の抑制効果が認められた試験区1, 2で12.0, 22.4%, 三倍体化率は12.0, 10.2%といずれも低かったが, 他の試験区より高い場合が多かった。

試験2, 処理開始時間を媒精2分後及び10分後とし, 処理時間については2, 4, 8, 12, 16分間の5段階で, 2.8~3.2°Cで処理した場合の結果を図3に, さらに, 担輪子幼生までの発生率と倍数化率を表2に示した。また, 追試として, 媒精2分後についてはさらに長時間, 低温

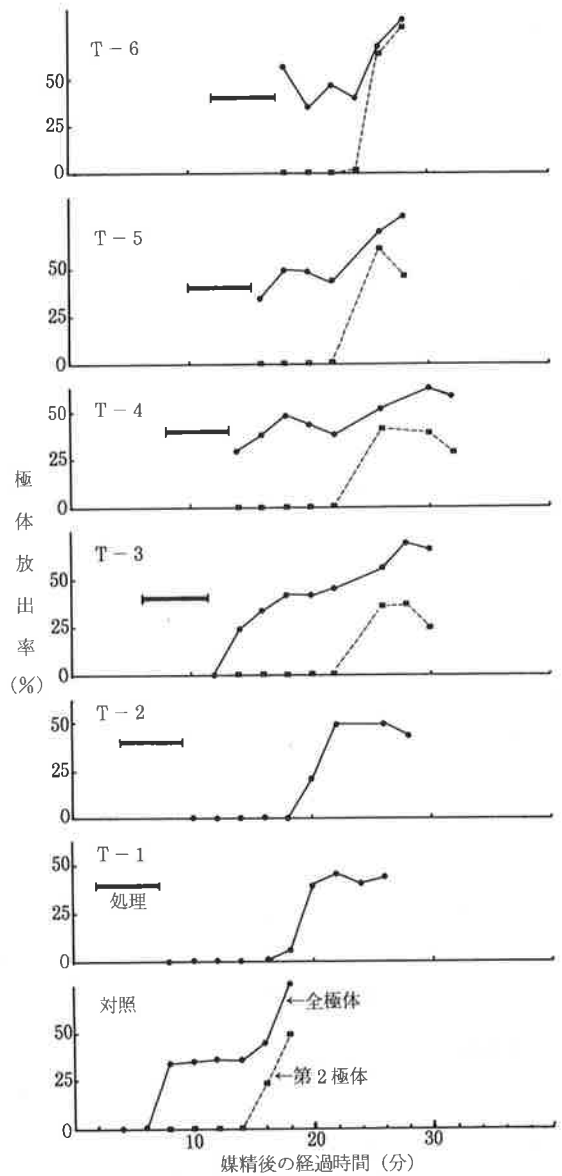


図2 媒精後の処理開始時間と極体放出

処理した場合も試験し, その結果を図4に示した。

媒精2分後より処理した区では, 試験1と同様に第1極体の放出は遅れたが, 試験1の観察期間より更に長く続けて観察すると, それから8~10分遅れて第2極体の放出がみられ, しかも対照と同程度の放出率であった。これは, 処理時間を25分間と長くしても同様で, 処理時間に相当する時間だけ遅れて第1, 2極体の放出が認められ, 極体の放出を阻止することはできなかった。

表1 低温処理開始時間と倍数化率

試験区	媒精後の 処理時間 (分)	担輪子幼生 発生率 (%)	倍数化率 (%)		計
			3 n.	4 n ≤	
1	2-7	81.3	12.0	0	12.0
2	4-9	86.9	10.2	12.2	22.4
3	6-11	78.1	8.0	10.0	18.0
4	8-13	88.4	2.0	2.0	4.0
5	10-15	89.6	10.2	4.1	14.3
6	12-17	94.2	6.0	2.0	8.0
対 照	-	94.8	2.0	0	2.0

注) 処理水温2.0~2.9℃, 発生水温28.1~29.7℃

表2 低温処理時間と倍数化率

試験区	媒精後の 処理時間 (分)	担輪子幼生 発生率 (%)	倍数化率 (%)		計
			3 n.	4 n ≤	
1	2.5-4.5	47.8	0	4.0	4.0
2	2.5-6.5	39.8	4.0	2.0	6.0
3	2.5-10.5	44.7	13.3	6.7	20.0
4	2.5-14.5	37.0	18.0	10.0	28.0
5	2.5-18.5	33.8	20.0	13.3	33.3
6	10-12	82.8	4.2	4.2	8.4
7	10-14	71.5	6.1	6.1	12.2
8	10-18	52.6	18.0	4.0	22.0
9	10-22	56.8	13.3	13.3	26.6
10	10-26	61.2	13.3	11.1	24.4
対 照	-	76.8	0	0	0

注) 処理水温2.8~3.2℃, 発生水温約27℃

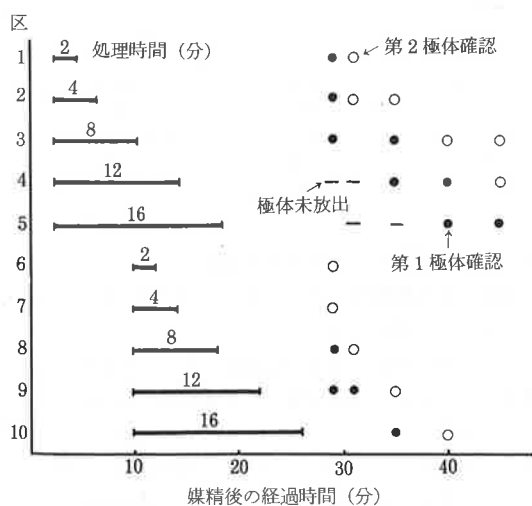


図3 低温処理時間と極体放出
(発生水温, 約27℃)

担輪子幼生までの発生率は、媒精2分後からの低温処理において、処理時間が長くなるにつれて低下する傾向が認められ、33.8~47.9%と対照区の76.8%より著しく低下した。また媒精10分後の低温処理区でも、発生率の低下したものが認められたが、前者ほど著しくなかった。しかし、この結果は、試験1と比べて大きな低下となった。この原因として、対照区の発生率が76.8%と試験区1の94.8%に比べて低いことがあげられる。すなわち卵自体に問題があり、低温処理がその後の発生に微妙に悪影響を与えたことが推察された。

倍数化率は、担輪子幼生への発生率と逆に、処理時間が長くなるにつれて高くなった。しかし、処理時間が16分間の区でも三倍体と思える核板は最高20.0%にすぎなかった。

低温処理した群を稚貝まで飼育した例を表3に示した。担輪子幼生では三倍体と思われる核板は約3割であったが、稚貝で各区5個体の鰓の核板を調べた結果、三倍体

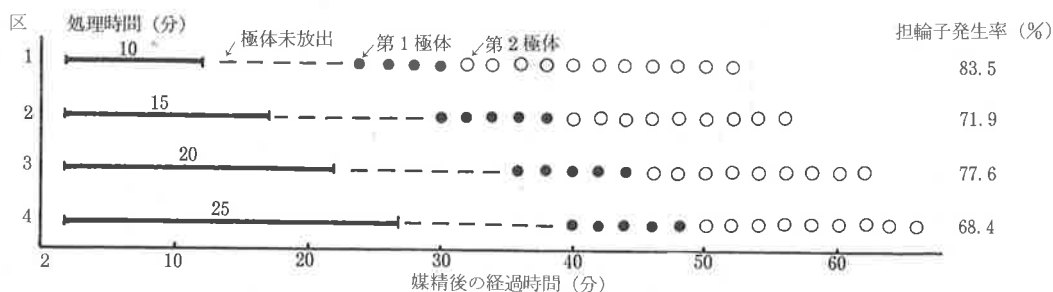


図4 低温処理時間と極体放出(追試)
(発生水温29.7~30℃)

表3 低水温処理群の飼育結果

水温℃	誘起条件 媒精後の処理時間(分)	担輪子幼生		稚貝の 三倍体数*
		発生率(%)	3n(%)	
3.6-4.3	5-15	96.4	30.0	0/5
5.7-6.3	5-15	97.1	28.6	0/5
3.2	15-25	97.4	6.3	0/5
対照		94.1	0	0/9

* 殻長, 7-8 mm, 鰓細胞のDNA量(蛍光測光)で判定(0/5は5個体内, 三倍体0を示す)

表4 サイトカラシンBによる倍数化率

試験区	媒精後の 処理時間(分)	担輪子幼生 濃度(mg/l)	発生率(%)	倍数化率(%)		計
				3n	4n ≤	
1	2-12	0.05%DMSO	37.6	-	-	-
2	"	0.1	16.5	-	-	-
3	"	0.5	16.2	-	-	-
4	"	1.0	11.9	-	-	-
5	11-21	0.05%DMSO	73.0	7.7	0	7.7
6	"	0.1	52.8	6.4	0	6.4
7	"	0.5	73.1	76	8	84
8	"	1.0	72.3	66	8	74
対照	無処理	-	71.3	2.5	0	2.5

は確認できなかった。

以上3例の試験結果より, 媒精後, 第1極体放出までの発生初期に低温処理を行うことは, その後の卵発生を遅らせる効果はあるものの, 第1極体放出の阻止には働かないことが, これらの倍数化率が低いことから明らかとなった。その他, 第2極体の放出もほとんど阻止できなかったことなどから, 低温処理により極体放出を阻止し, 三倍体を誘起することは, かなり困難であると考えられた。しかし, エゾアワビ⁴⁾, マガキ²⁾では低温処理により高率に三倍体を誘起できた報告もあり, 今後検

討の余地は残されているものと思える。

CBによる倍数化 次に, 他の貝類でも報告のあるCBについて検討した。

CBの濃度を0.1, 0.5, 1.0mg/lとした海水中に媒精2, 11分後にそれぞれ第1, 2極体の放出を阻止する目的で10分間の浸漬を行った。その後DMSOによる洗浄は行わなかった。対照として, 同一時間0.05%DMSOのみに浸漬する区と無処理区を設けた。処理後の担輪子幼生までの発生率と倍数化率を表4に, 極体放出率の変化を図5に示した。

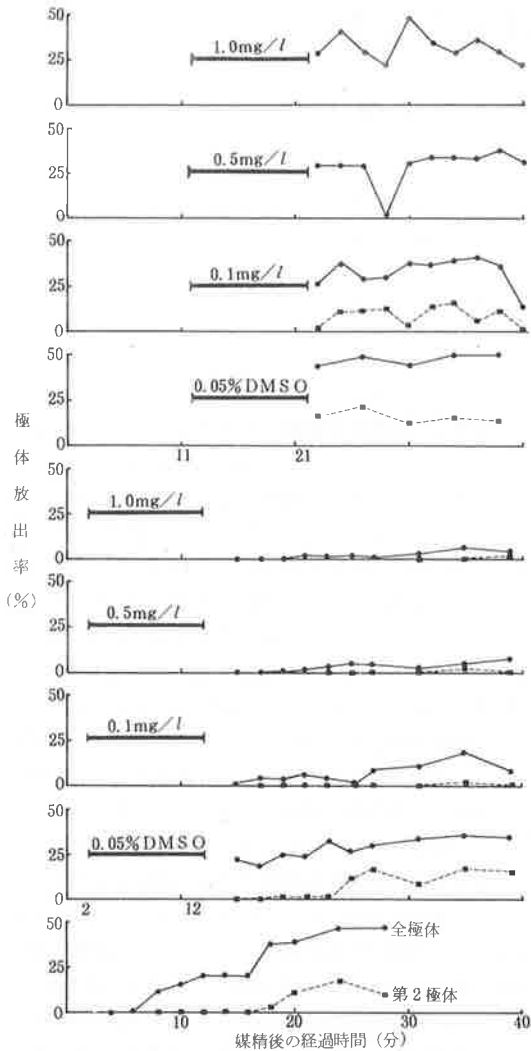


図5 サイトカラシンB処理と極体放出

媒精11分後に0.5, 1.0mg/lの濃度で処理した区で、第2極体放出阻止が確認され、担輪子幼生での三倍体化率も76と66%と高率であった。しかし、媒精2分後の処理区では、いずれも極体放出率はきわめて低く、さらに担輪子幼生への発生率も11.9~16.5%と低かった。さらに0.05% DMSOだけで処理した場合、媒精2分後の区の担輪子幼生への発生率が37.6%と、媒精11分後の73.0%に比べ著しく低かった。これらの結果より、低温処理

の場合に述べたように、媒精2~3分後に卵に刺激を与えることは、その後の卵発生に悪影響を与えることが再確認された。

以上の結果より、CBで第2極体を阻止することにより高率に三倍体を作成できる見通しを得た。しかし、第1極体放出阻止は、今回の試験ではできなかった。また、三倍体化率も100%近くまで上げなければ実用的とはいえないと思える。今後、CBについては、処理開始時、及び処理時間を更に詳細に検討する必要がある。

要 約

1. 2~6°Cの低温処理による三倍体誘起について検討したが、極体放出を十分阻止することができず、担輪子幼生での三倍体化率も30%以下と低かった。

2. それらの一部を稚貝まで養成したが、三倍体の個体は確認できなかった。

3. サイトカラシンBの0.5または1.0mg/lの濃度の海水に、媒精11分後から10分間浸漬することで、第2極体の放出が阻止され、担輪子幼生での三倍体化率も76, 66%と高率であった。

文 献

- 1) J. G. STANLEY, S. K. ALLEN Jr., and H. H. LIU 1981: Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 23, 1-10.
- 2) 山本 敏・菅原義雄・野村 止・押野明夫, 1987: マガキにおける人為倍数体の作出, 昭和62年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 54
- 3) 内山祐之・古丸 明・和田克彦・家山博史・山本 勝・古田弘文, 1987: アコヤガイ人為3倍体幼生核DNA量の顕微蛍光測定法による比較, 水産育種12, 57-70
- 4) K. ARAI, F. NAITO, and K. FUJINO, 1986: Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatment, *Bull. Japan, Soc. Sci. Fish.* 52, 417-422.
- 5) 古丸 明・和田克彦, 1987: 二枚貝の3倍体に関する研究-I, 3倍体誘起条件の検討, 昭和62年度日本水産学会講演要旨集, 56.
- 6) 池田善平・片山勝介, 1986: サルボウの産卵誘発と初期発生について, 岡山水試報, 1, 76-79.