

サイトカラシン Bによるサルボウの三倍体作出における 倍化处理適期について

植木 範行・池田 善平

Treatment time and Duration for Triploidization of Ark-shell
Scaphara subcrenata with Cytochalasin B

Noriyuki UEKI and Zenpei IKEDA

サルボウ *Scaphara subcrenata* やマガキ *Crassostrea gigas* の養殖では夏から秋に大量へい死することがしばしばある。この原因の一つとして夏期の成熟とそれに続く産卵による貝の衰弱が考えられている。そこで一般に生殖巣が発達しない三倍体を作成し、その成長やへい死について調べ、これらの問題を側面から検討する目的で本研究を始めた。

前報¹⁾ではサルボウを用い、倍化处理の方法について検討し、低温処理では倍化率は低いが、サイトカラシン B (以下 CB とする) で第 2 極体の放出を阻止する方法で高い倍化率が得られることを報告した。ここでは CB による倍化处理の時期について検討を加えたので報告する。

材料と方法

採卵用親貝は、岡山県寄島町青佐地先で有明海産の天然種苗を地時き養殖している 2 年貝を用いた。これを 8 月 5 日に取り上げ、約 25℃ に保った水槽に移し、キートセラス *Chaetoceros glacilis* を適量与えて飼育しながら採卵に供した。

産卵および放精の誘発は親貝を個体別に 2 l 容量のガラス製ビーカー (水量 1.75 l) に入れ、弱く通気しながら飼育水温を 25℃ から 30℃ に 30~60 分間かけて上げ、更に冷凍精子を 4~5 ml 加える方法²⁾ で誘発し産卵、放精させた。以下 3 回の試験に用いた卵はそれぞれ 1 個体の雌貝より得られたものである。なお、媒精には 2~3 個体の雄貝より得られた精子を混合して用いた。

媒精後、開口径 10 μm のネットを底に張った円筒型の容器に卵を移し、底にわずかに水が残る程度に水切りした後、倍化处理を行った。すなわち、CB の 0.5 mg/l 海水に一定時間卵を浸漬した後、引き続き CB に浸漬し

た時間と同時間 0.025% のジメチルスルホキシド (以下 DMSO とする) 海水に浸漬して、CB の洗浄を行い、元の飼育水に戻した。

このようにして倍化处理した受精卵を担輪子幼生まで発生させた後、カルノア固定して染色体を観察した。染色体の観察方法は前報¹⁾ のとおりである。1 試験区毎にまとめて 1 枚のスライドグラスに塗抹し、1 つの核板と判断できるものの染色体を 1 試験区当たり 25 細胞計数し、二倍性 (2n=38 本)、三倍性 (3n=57 本) 及び四倍性以上 (4n 以上 ≥ 72 本) の細胞に判別した。

試験 1 及び 2 では媒精後の処理開始時間について検討した。すなわち、CB への浸漬時間を 5 分間とし、試験 1 では媒精 2, 4, 6, 8, 10 及び 12 分後に試験 2 では 5, 10, 12, 14, 16, 18 及び 20 分後にそれぞれ倍化处理を開始し、三倍性細胞の出現率を比較した。対照として、試験 1 では媒精 2~12 分後まで 0.025% DMSO 海水に浸漬したが、試験 2 では無処理とした。対照区において 2 分毎にサンプリングして第 1 及び第 2 極体の放出時期を確認した。

試験 3 では、CB の浸漬時間について検討した。媒精 3 及び 12 分後より 2, 5, 10 及び 15 分間の処理を行い、三倍性細胞の出現率を比較した。対照は媒精 3~33 分後及び 12~42 分後まで DMSO に浸漬した。

結果と考察

試験 1, 2 及び 3 で供試した卵の媒精時及び倍化处理時の水温、さらに第 1 極体及び第 2 極体の放出時期を表 1 に示した。第 1 極体及び第 2 極体の放出はほぼ一斉に認められた。

試験 1 の担輪子幼生における二倍性、三倍性及び四倍性以上の細胞の割合を図 1 に示した。三倍性の細胞率は

表1 供試卵の媒精・発生水温と極体放出時期

	試験1	試験2	試験3
媒精時の水温 (°C)	29.1	30.1	29.8
倍化処理時の水温 (°C)	26.7-27.0	26.5-27.5	26.6-27.9
第1極体放出時期 (分)	8-10	6-8	6-8
第2極体放出時期 (分)	18-20	18-20	16-18

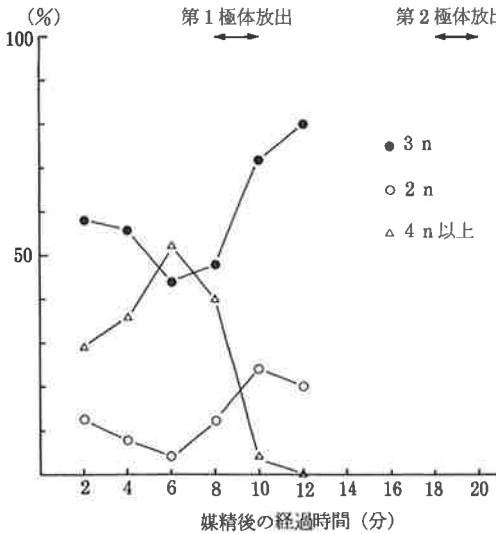


図1 媒精後の処理開始時間と倍数性 (試験1)

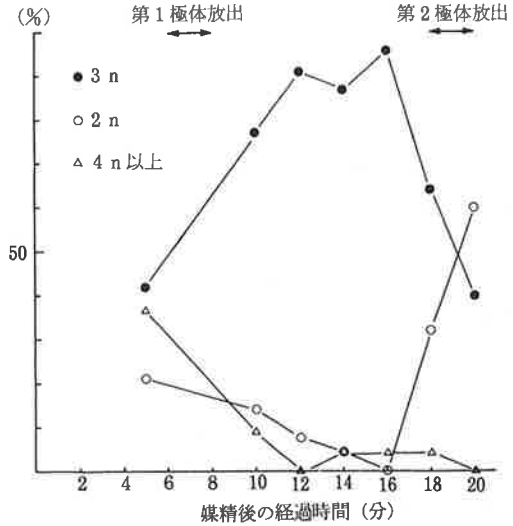


図2 媒精後の処理開始時間と倍数性 (試験2)

媒精2-8分後に処理した場合、44~58%で、その他の細胞はほとんどが四倍性以上であったが、第1極体を放出した直後の媒精10及び12分後から処理した場合は72及び82%と急に高くなった。なお、対照区の細胞はすべて二倍性の細胞であった。

試験2の担輪子幼生における染色体の観察結果を図2に示した。試験1と同様に第1極体放出前の媒精5分後に処理した場合、三倍性の細胞率は42%と低く、36.8%が四倍性以上の細胞であったが、第一極体放出後の10~16分後の処理では77~96%と三倍性の細胞率が高くなった。しかし、第2極体放出期の媒精18及び20分後の処理では三倍性の細胞は64及び40%と減少していき、逆に二倍性の細胞が32及び60%と増加した。

試験3の担輪子幼生における三倍性細胞の割合を図3に示した。試験1, 2と同様に第1極体放出前の媒精3分後から処理した場合、三倍性細胞の割合は5.9~32%と低く、その他の細胞はほとんどが四倍性以上であった。

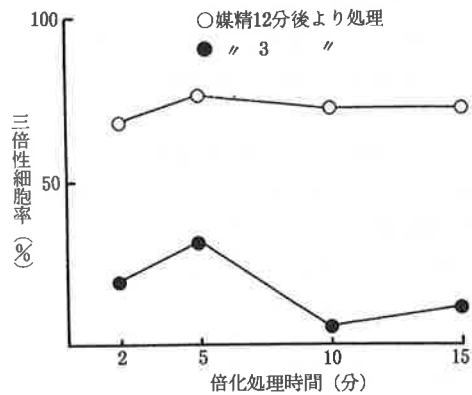


図3 倍化処理時間と倍化率

しかし、第1極体放出後の媒精12分後から処理したものは68~76%と高率に三倍性の細胞が出現した。また、処理時間は2分間ですでに高率に三倍性の細胞がみられ、15分間処理した場合との差は認められなかった。

以上の結果、第1極体放出直後から第二極体放出前に倍化処理を開始すれば第二極体の放出は阻止され、高率に三倍体が作出できると考えられた。しかし、第一極体の放出阻止を目的として第1極体放出前に倍化処理を行った場合、担輪子幼生での三倍性の細胞率は低く、その他の細胞は二倍性より四倍性以上のいわゆる異常発生したと考えられる染色体像が高率に出現した。このことは前報¹⁾でも述べたが、第1極体放出前の第一分裂途中に倍化処理のようなある種の刺激を与えることは、発生に異常をきたす程の影響を与えるものと考えられる。

また、試験3の結果より処理適期に倍化処理を行えば2分間という短い時間で十分に倍化できることがわかった。倍化処理を行う場合、受精卵に与える影響をできるだけ軽くして倍化できることが望ましいと考えられ、この処理時間についてはCBの濃度との関連もふまえて、さらに検討する必要がある。

要 約

1. 前年度染色体の倍化に有効であったサイトカラシンBによる倍化処理について、媒精後の処理開始時間と浸漬時間について検討した。

2. 倍数性の判定は担輪子幼生の染色体の計数によった。

3. 三倍体作出のための倍化処理の適期は、第1極体放出直後から第2極体放出前まで(水温26~28℃で媒精10~16分後)であり、0.5mg/lのサイトカラシンB濃度の海水中に2分間以上浸漬すれば第2極体の放出は阻止され、高率に三倍体を作出できると考えられた。

文 献

- 1) 植木範行・池田善平・片山勝介, 1987: 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, 岡山水試報, **2**, 85-89
- 2) 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