

## 6-ジメチルアミノプリンを用いた三倍体マガキの作出

植木 範行

Triploidization of Pacific Oyster *Crassostrea gigas* with 6-dimethylaminopurine

Noriyuki Ueki

キーワード：三倍体カキ，6-DMAP，処理適期

マガキ *Crassostrea gigas* の三倍体作出方法として、サイトカラシンB（以下CBとする）処理<sup>1)</sup>や、カフェイン処理<sup>2)</sup>が知られている。このうちCBでは三倍体の作出率は高く安定しており、最も有効な方法であるが、わが国では薬事法上制約があり、使用が困難である。このようなことから、薬事法上問題がなく高率に三倍体カキを作出できる方法としてカフェイン処理が開発されてきた。しかし、カフェイン処理の作出率はCBより低く不安定であるなど問題点も多い。

一方、Richardら<sup>3)</sup>は、6-ジメチルアミノプリン（以下6-DAMPとする）を用いてマガキなどの三倍体の作出を試み、有効であったと報告している。また、本剤はカフェインと同様に薬事法上問題ない。そこで、その再現性を確かめるためにマガキを用い、Richardらの方法にもとづいて6-DMAPによる三倍体の作出を試みた。

## 材料と方法

母貝として用いたマガキは広島産の2年貝である。雌4個体と雄3個体を切開し、卵と精子をそれぞれ均等に取出し混合した後、媒精した。

倍数化処理に用いた6-DMAPは濾過海水で希釈し、300mMの濃度とした。受精卵は、媒精15、20、25及び30分後にそれぞれ10分間、上記の6-DMAPの溶液に浸漬した後、濾過海水に戻した。これらと比較するためCBの濃度を0.5mg/lとした濾過海水に媒精25分後から10分間浸漬処理したCB区、及び無処理の対照区をおいた。処理時の水温は24.3~25.0℃であった。

処理後、受精卵を30l容量（水量25l）の円形黒色のポリエチレン水槽に移し、止水、無通気で発生させた。約24時間後に、浮上率と浮上幼生中のD型幼生の割合を調べた後、D型幼生が5個体/mlとなるように同じ水

槽に移して飼育を開始した。飼育用水は、約0.5μmのポアサイズのフィルターで濾過した海水とし、止水、微通気とした。餌料として *Chaetoceros* sp. を投与した。浮遊幼生期は全換水をほぼ2日に1回行った。付着直前になった時点で密度が高い場合は分槽した後、1連にホタテ貝の殻を5枚つけたものを7~11連/槽、垂下して稚貝を付着させた。

飼育期間（'94年6月8日~7月25日）中の水温は22.0~27.5℃であった。

三倍体の判定は、ふ化後150日令の殻高で約2cmに育った稚貝を用い、鰓細胞の核DNA量の相対値をDAPI染色による顕微蛍光測光で測定した。

## 結果と考察

倍数化処理と幼生の飼育結果を表1に示した。対照では浮上率が63.9%、D型化率が65.1%、D型幼生から付着稚貝までの生残率が20.1%となり、マガキの種苗生産としては比較的高い生残率となった。一方、CB処理では前報と同様に浮上率、及びD型化率は低下したが、その程度は軽いものであった。また、CB処理による三倍体カキの作出例としては、D型幼生から付着稚貝までの生残率は14.1%と高かった。

6-DMAPによる倍数化処理した受精卵のD型化率は、媒精15分後から処理した区では70.1%と高く対照区と同程度となったが、媒精20分後、25分後、及び30分後から処理した区は、それぞれ27.3%、59.6%、及び42.1%と低くなった。D型幼生から稚貝までの生残率は、9.6~25.7%とばらつきが大きかったが、対照区より生残率が高い区もみられ、三倍体作出の処理群によく認められる生残率の低下はなかった。

殻高20mm前後に成長した稚貝を用い、三倍体を確認した結果を表2に示した。また、測定した核DNA量の

表1 6-DMAPのサイトカラシンBによる三倍体の作出処理と養成飼育結果 ('94. 6. 8~7. 25)

試験区	処理時間 媒精分後	供試卵数 ×10 <sup>4</sup>	浮上率 %	D型化率* %	収容幼生数 D型幼生×10 <sup>4</sup>	付着稚貝	生残率 %
対 照		412	63.9	65.1	12.5	25,072	20.1
CB	25' - 35'	412	16.7	25.5	12.5	17,633	14.1
6-DMAP	15' - 25'			70.1	12.5	22,149	25.7
	20' - 30'	412	35.7	27.3	12.5	32,173	25.7
	25' - 35'	412	36.0	59.6	12.5	11,944	9.6
	30' - 40'			42.1	12.5	12,787	10.2

\* : 浮上幼生数に占めるD型幼生の割合

表2 三倍体の確認結果

試験区	処理時間 媒精分後	検査個体数	平均殻高±標準偏差 mm	三倍体カキ	
				個体数	割合 (%)
対 照		20	22.9±5.74	0	0
CB	25' - 35'	20	20.6±5.63	18	90
6-DMAP	15' - 25'	20	21.3±5.91	1	5
	20' - 30'	20	20.6±5.81	4	20
	25' - 35'	19	26.3±5.99	4	21
	30' - 40'	20	19.7±5.23	5	25

相対値を付表に示した。CB処理区では20検体中18検体(90%)が三倍体と確認され、CB処理が安定して高率に三倍体カキを作出できることが再確認された。これらに対し、6-DMAPで処理したものにおいて、媒精15分後、20分後、25分後、及び30分後から処理した区は、それぞれ5%、20%、21%、及び25%の三倍体作出率となった。この結果から6-DMAP300mMの海水中に媒精20~30分後から10分間マガキの受精卵を浸漬することで三倍体作出できることが明らかとなり、Richardらの結果が再確認された。しかし、CB処理にくらべると三倍体カキの作出率はかなり低く、実用化に当たっては作出率を上げる必要があると考えられた。ただ、処理の開始時期が媒精20~30分後の比較的広い範囲で有効であったことは、三倍体作出の処理においてCBやカフェインのように処理時期を短期間に限定する必要がなく、比較的容易に三倍体が作出できる可能性も示唆している。従って、加温の併用など処理方法をさらに改良することでより高い作出率を得ることが可能ではないかと考えられた。

## 要 約

1. 6-DMAPを濾過海水で希釈し、300mMの濃度とした中に、媒精15、20、25及び30分後にそれぞれ10分間、浸漬して三倍体カキの作出を試みた。
2. 6-DMAPによる倍数化処理の結果、媒精15分後、20分後、25分後、及び30分後から処理した区は、それぞれ5%、20%、21%、及び25%の三倍体作出率となった。
3. この結果から6-DMAP300mMの海水中に媒精20~30分後から10分間マガキの受精卵を浸漬することで三倍体作出できることが明らかとなり、Richardらの結果が再確認された。
4. しかし、同時に行ったCB処理の三倍体カキの作出率(90%)にくらべると三倍体の作出率はかなり低く、実用化に当たっては作出率を上げる必要があると考えられた。

## 文 献

- 1) J. G. Stanley, S. K. Allen Jr. and H. Hidu, 1981 : Polyploidy Induced in the American Oyster *Crassostrea virginia* with Cytochalasine B, aquaculture, 23, 1-10
- 2) S. Yamamoto, Y. Sugawara, T. Nomura and A. Oshino, 1988 : Induced Triploidy in Pacific Oyster

- Crassostrea gigas*, and performance of Triploid Larvae, Tohoku J. Agric. Res., 39, 47-59
- 3) R. R. Desrosiers, A. Gerard, J-M. Peignon, Y. Naciri, L. Dufresne, J. morasse, C. Ledu, P. Phelipot, P. Guerrier and F. Dube, 1993 : A Novel Method to Produce Triploids in Bivalve Molluscs by the use of 6-Dimethylaminopurine, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 170, 29-43

付表 顕微蛍光測光によるカキの細胞核のDNA量の相対値による倍数性の判定結果

処理方法と時間	プレートNo.	検体の測光値と(倍数性*)			
		1	2	3	4
CB 25' - 35'	1	128.5 (C)	184.0 (1.46)	132.7 (1.06)	186.9 (1.49)
	2	120.1 (C)	192.3 (1.53)	191.5 (1.52)	186.0 (1.48)
	3	128.8 (C)	194.9 (1.55)	193.0 (1.54)	196.1 (1.56)
	4	124.2 (C)	186.9 (1.49)	132.8 (1.06)	185.7 (1.48)
	5	175.3 (1.40)	174.9 (1.39)	176.7 (1.41)	182.8 (1.48)
	6	187.2 (1.49)	191.6 (1.52)	190.3 (1.51)	202.6 (1.61)
6-DMAP 15' - 25'	1	122.2 (C)	121.5 (1.00)	125.9 (1.03)	124.8 (1.02)
	2	122.3 (C)	129.8 (1.06)	128.6 (1.05)	137.3 (1.13)
	3	122.6 (C)	128.3 (1.05)	122.6 (1.01)	132.1 (1.08)
	4	120.5 (C)	119.0 (0.98)	117.8 (0.97)	191.8 (1.57)
	5	121.4 (1.00)	123.2 (1.01)	122.8 (1.01)	122.4 (1.00)
	6	118.1 (0.97)	117.4 (0.96)	115.7 (0.95)	121.3 (0.99)
6-DMAP 20' - 30'	1	113.9 (C)	111.0 (1.04)	178.0 (1.66)	120.1 (1.12)
	2	107.9 (C)	113.0 (1.05)	107.5 (1.00)	163.2 (1.52)
	3	105.7 (C)	108.3 (1.01)	105.4 (0.98)	161.6 (1.51)
	4	100.6 (C)	104.8 (0.98)	106.1 (0.99)	107.6 (1.00)
	5	92.7 (0.87)	158.1 (1.48)	112.8 (1.05)	107.9 (1.01)
	6	115.0 (1.07)	114.7 (1.07)	114.8 (1.07)	113.6 (1.06)
6-DMAP 25' - 35'	1	112.2 (C)	111.3 (1.02)	120.3 (1.11)	120.6 (1.11)
	2	104.5 (C)	105.0 (0.97)	166.8 (1.53)	164.1 (1.51)
	3	110.5 (C)	104.3 (0.96)	108.7 (1.00)	112.3 (1.03)
	4	107.5 (C)	105.3 (0.97)	103.5 (0.95)	109.6 (1.01)
	5	116.7 (1.07)	112.5 (1.04)	114.4 (1.05)	113.7 (1.05)
	6	178.6 (1.64)	126.9 (1.17)	181.6 (1.67)	
6-DMAP 30' - 40'	1	105.8 (C)	167.5 (1.53)	113.2 (1.04)	165.8 (1.52)
	2	107.6 (C)	110.2 (1.01)	162.0 (1.48)	167.9 (1.54)
	3	112.6 (C)	112.6 (1.03)	109.5 (1.00)	112.6 (1.03)
	4	113.2 (C)	113.9 (1.04)	162.1 (1.48)	113.5 (1.04)
	5	103.4 (0.95)	107.7 (0.99)	109.7 (1.00)	116.1 (1.06)
	6	112.0 (1.03)	99.3 (0.91)	99.0 (0.91)	98.2 (0.90)

(C) : 無処理対照区のカキの測光値

\* : 各測定群ごとに対照の二倍体カキの測光値の平均で割って求めた。