

増養殖技術開発事業 (ヒラメの雌性発生)

藤川裕司・山田 正

本事業はヒラメ種苗の全雌化をめざし、平成元年度より5ヵ年計画で行っている。今年度は、雌性発生2倍体の作出および平成元年度に作出した雌性発生2倍体雄（偽雄）と正常雌とのかけ合わせによる次世代を作出し、これらの雌雄比について検討を行った。また、ふ化後ある一定の期間20℃で飼育することにより、雌性発生2倍体の雄化を抑制できると考えられていることより、その実験も一部行った。さらに、雌性発生2倍体の成長特性についても検討を行った。

方 法

1) 実験1

平成2年5月15日に、3歳の養成親魚より採精を行い、50～100倍に希釈後760 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の紫外線を照射して精子を遺伝的不活化にし、採卵した卵との間で媒精を行った。媒精2分後にフレンチプレスで加圧を行い、第2極体放出阻止型の雌性発生2倍体を作成した。作出方法は、平成元年度の島根県水産試験場事業報告に詳しく記載している。また、このとき正常雌とのかけ合わせによる正常発生群も作出した。作出された雌性発生2倍体は、着底前に雌性ホルモンの β -エストラジオール、雄性ホルモンの17-メチルテストステロンで処理する5実験区および無処理区へ分槽した。雌性ホルモンは、日齢33～110日に配合飼料への0.03 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ の添加、および1日当たり2時間の10 $\mu\text{g}/\ell$ の浸漬処理を行った。また、雄性ホルモンは日齢33～110日にかけて、1日当たり2時間の5 $\mu\text{g}/\ell$ の浸漬処理を行った。

2) 実験2

平成2年5月25日に、3歳の養成親魚より採精、採卵を行い、実験1と同様の方法で第2極体放出阻止型の雌性発生2倍体の作出を行った。また、このとき同一の雌親魚と正常雌とのかけ合わせによる正常発生群、および平成元年に作出した第2極体放出阻止型の雌性発生2倍体雄（偽雄）とのかけ合わせによる群を作成した。これらの作出した群は、着底前に分槽を行い、正常発生群および正常雌と偽雄をかけた群は日齢55～100日に水温20℃による飼育、雌性発生2倍体および正常雌と偽雄とをかけた群には、日齢33～110日にかけて雌性ホルモンの配合飼料への0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ の添加を行った。また、すべての作出群で無処理区を設けた。

実験1、実験2における受精卵の飼育は、当初は100 ℓ のポリカーボネイト水槽5個で行ったが、日齢89～92日で1トン水槽へ移した。飼育水は60 μ の濾過海水を紫外線照射装置を通して用いた。日齢5日までは止水としたが、日齢5～10日までは0.5～1回転/日、その後1～3回転/日とし、

さらに日齢30日以降は回転率を上げた。餌料系列はワムシーアルテミア配合餌料とした。ワムシはクロレラのみで生産したものをを用いた。アルテミアは乳化オイルで2次培養したものをを用いた。飼育魚の成育は全実験区とも順調で、共食いによるへい死以外の減耗は殆ど認められなかった。

3) 正常発生魚と雌性発生2倍体の成長比較

平成元年度に作出し、1 ton水槽で飼育していた、正常発生魚と第2極体放出阻止型雌性発生2倍体を、日齢216日に2 ton円形水槽2基にそれぞれ25尾ずつ収容し、日齢95日、216日、362日、419日、464日、611日に全長、体重の測定を行った。日齢741日には、開腹を行い雌雄の判定を行うとともに、全長、体重の測定を行った。なお、ここで用いた雌性発生2倍体は日齢31～110日にかけて雌性ホルモン処理を行い、雄化を抑制した群である。

結 果

1) 実験1

実験結果を表1に示した。

日齢224～225日にかけて、卵巢、精巣の有無により雌雄の判定を行った。正常発生では、雌の割合は13%であった。雌性発生2倍体では、無処理では雌の割合は13%、雌性ホルモン (E_2) を $0.03 \mu\text{g/g}$ 配合餌料に添加したものでは雌の割合は11%、 $0.1 \mu\text{g/g}$ では8%、 $0.5 \mu\text{g/g}$ では51%、 $10 \mu\text{g/l}$ の浸漬処理では97%であった。また、雄性ホルモン (Me) により $5 \mu\text{g/l}$ の浸漬処理したものは94%が雄となった。

2) 実験2

実験結果を表2に示した。

表1 実験1における作出魚の性比

(平成2年5月15日作出)

作出法	水槽No	処 理	処理の期間	雌:雄	雌:雄 (%)
正常発生	14	無処理	—————	4 28	13 87
雌性発生2倍体	1	無処理	—————	5 34	13 87
雌性発生2倍体	5	E_2 $0.03 \mu\text{g/g}$	日齢 33～110日	4 31	11 89
雌性発生2倍体	6	E_2 $0.1 \mu\text{g/g}$	日齢 33～110日	3 33	8 92
雌性発生2倍体	13	E_2 $0.5 \mu\text{g/g}$	日齢 33～110日	24 23	51 49
雌性発生2倍体	7	E_2 $10 \mu\text{g/l}$	日齢 33～110日	30 1	97 3
雌性発生2倍体	8	Me $5 \mu\text{g/l}$	日齢 33～110日	2 31	6 94

E_2 : β -エストラジオール

Me: 17-メチルテストステロン

表2 実験2における作出魚の性比

(平成2年5月25日作出)

作出法	水槽No	処 理	処理の期間	雌：雄	雌：雄 (%)
正常発生	9	無処理	—————	11 10	52 48
正常発生	2	20°C飼育	日齢 55~100日	16 31	34 66
雌性発生2倍体	12	無処理	—————	3 15	17 83
雌性発生2倍体	11	E ₂ 0.5 μg/g	日齢 33~100日	10 0	100 0
正常雌×偽雄	4	無処理	—————	11 17	39 61
正常雌×偽雄	3	20°C飼育	日齢 55~ 96日	9 10	47 53
正常雌×偽雄	10	E ₂ 0.5 μg/g	日齢 33~100日	22 15	59 41

20°C飼育：水温20°Cで飼育
E₂：β-エストラジオール

日齢215日に雌雄の判定を行った。正常発生は無処理では雌の割合は52%、20°C飼育では逆に低く34%であった。雌性発生2倍体は、無処理では雌の割合は17%、雌性ホルモン(E₂)を配合飼料に0.5 μg/g添加したものでは雌の割合は100%であった。偽雄とかけ合わせたものでは、無処理では雌が39%、20°C飼育では雌が47%、雌性ホルモン(E₂)を配合飼料に0.5 μg/g添加したものは雌が59%であった。

3) 正常発生魚と雌性発生2倍体の成長の比較

正常発生魚と第2極体放出阻止型の雌性発生2倍体の平均体重は、日齢419日までは差が認められないが、日齢464日以降は後者が大きくなり、日齢611日で146g、日齢741日では341gの成長差が認められた(図1)。日齢741日では、正常発生魚は供試魚24尾のうち、雌は11尾、雄は13尾で、平均全長は雌が42.3cm、雄が33.5cm、平均体重は雌が956g、雄は405gであり、雌雄の成長差は

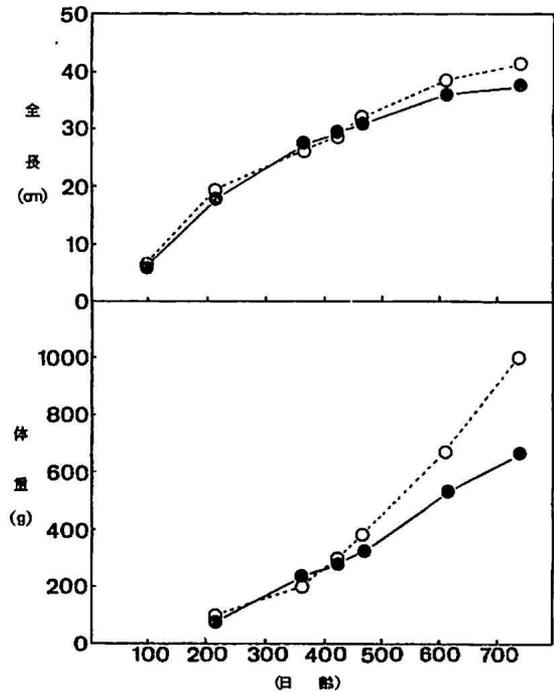


図1 正常発生魚と第2極体放出阻止型雌性発生2倍体魚の全長と体重の経日変化

黒まる：正常発生魚

白まる：第2極体放出阻止型雌性発生2倍体

全長では8.8cm、体重では551gであった(図2)。一方、雌性発生魚はすべて雌で、平均全長は41.2cm、平均体重は999gであった(図3)。これらのことより、第2極体放出阻止型の雌性発生2倍体雌は、正常発生の雌と同様の成長を示すことが認められた。

考 察

山本ら¹⁾によるとヒラメの性染色はXX-XY型であると考えられている。すなわち、雌はXX型、雄はXY型である。

遺伝的に雌の個体がすべて雌になれば正常発生魚は半数の個体が雌になるはずだし、第2極体放出阻止型の雌性発生2倍体は、すべての個体が雌にならなければならない。しかし、本実験では正常発生では雌の割合は13%であるし(表1)、雌性発生2倍体においても13%(表1)、17%(表2)と低いものであった。また、正常雌と雌性発生2倍体雌と

のかけ合わせにより作出した群も、雌の割合は39%と低いものであった。これらの現象は、遺伝的には雌だが飼育過程で性転換により表現形が雄となった個体が出現したために生じたものと考えられる。実験1では雌性ホルモンの $10\mu\text{g}/\ell$ の浸漬処理において雌の割合が97%となっているが、この程度の濃度では、遺伝的雌の個体を雌化することではなく、遺伝的雌の個体の雄化を抑制することのみ有効であるとされている²⁾ので、作出された雌性発生2倍体はすべて遺伝的に雌であるということになる。しかし、雌性ホルモンを $0.03\sim 0.5\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度で配合飼料へ添加することによっても、前述したと同様の効果があるとされている²⁾が、実験1、実験2とも雌性発生2倍体の雄化の抑制率は低かった。

山本ら²⁾によると、性の分化期にあたる日齢30~100日を 20°C 飼育することにより、遺伝的に雌の個体を雌化するのを抑制できるとされている。実験2において、正常雌と雌性発生2倍体雌とのかけ合わせにより作出した群を日齢55~96日に、 $19.6\sim 22.6^\circ\text{C}$ で飼育する実験を行ったが、雌の割合は47%と低いものであった。この原因は、 20°C 飼育の開始時期が日齢55日以降と遅れたこと、および、飼育水温が冷却装置の能力の関係で 20°C 以上に上昇することが、しばしば生じたことが考えられる。

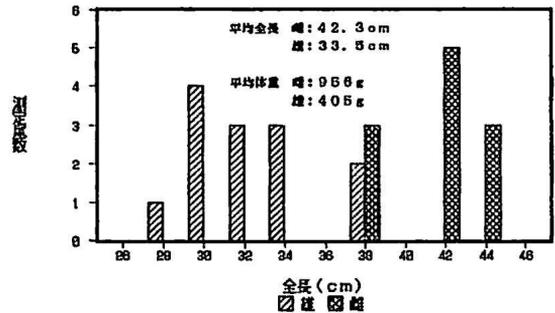


図2 日齢71日の正常発生魚の全長組成

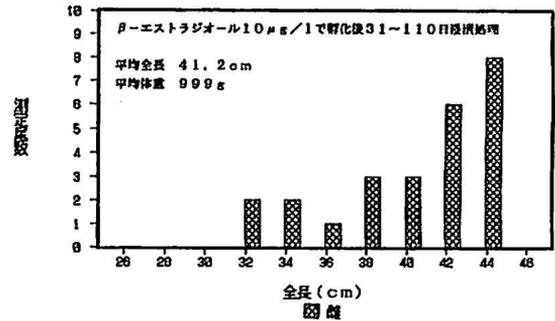


図3 日齢71日の第2極体放出阻止型の雌性発生2倍体の全長組成

来年度以降は、雌性発生2倍体の雄化を、飼育水温の制御により抑制する方法を確立する方向で試験を行う予定である。

文 献

- 1) 鳥取県栽培漁業試験場 1989: ヒラメの染色体操作技術等を応用した優良種苗生産に関する研究(昭和63年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書)。
- 2) 鳥取県水産試験場 1991: ヒラメの染色体操作技術等を応用した優良種苗生産に関する研究(平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書)。