

「とくしまの農林水産物」魅力アップ開発事業

成長が良く病気に強い養殖アユ種苗の開発

湯浅明彦・杉本善彦

県下のアユ養殖業者が望むアユの種苗（養殖用の稚魚）の特徴の上位は、成長が良く飼育しやすく病気にかかりにくいことである。アユ種苗を生産している(財)徳島県水産振興公害対策基金加島事業場（以下、加島事業場とする）では、要望に応えるために魚体のサイズにバラツキが少なく成長が良いアユ種苗を生産する選抜育種を10世代以上継続してきた。しかしこうした継代育種の過程で、魚病に対する抗病性が低下することが問題になった。問題の魚病は冷水病と呼ばれる細菌性の感染症で、飼育魚の50%以上が死亡することがある。加島事業場で行われてきた、成熟時期が同じ個体の中で魚体サイズの大きなものを親魚に用いる選抜法が、冷水病耐性の低下という負の効果を伴っていたのである。

二つ以上の遺伝的形質を目的とした個体の選抜は困難であることから、成長が良く病気にかかりにくい二つの形質を同時に選抜するためには遺伝子標識の開発が必要である。しかし、アユの冷水病耐性と関連する遺伝子標識は現在開発されていない。養殖業者が望むアユ種苗を作出するために、上述の選抜育種を冷水病耐性が低下する直前で中止し、それ以降はその状態の遺伝的組成を維持する技術を開発する。

そのためには、冷水病耐性が低下する継代数を明らかにする必要がある。本年度は創始集団が異なる3系統のアユ種苗について、継代による冷水病耐性の変化を比較した。また、次世代の遺伝的多様性を維持するためには、500尾以上の親魚から採卵・受精することが必要である。できるだけ多数のアユ親魚を用いることで耐病性の低下を防ぎ、遺伝的組成を維持する可能性を検討した。

材料と方法

継代による冷水病耐性の低下と系統による差異

加島事業場では、2005年に吉野川の河口から14km上流の第十堰及び第十樋門で採捕した稚魚と（系統Aとする）、2007年と2010年に海部郡美波町日和佐地先の海面で採捕した稚魚（それぞれ系統B、Cとする）を養成した親魚をそれぞれ創始集団とする3系統がある。継代飼育による2010年海産系統を除く各系統の各世代の親魚数は、雄魚が雌魚より1.4～4.8倍多くなっている（表1）。平成22年秋期に採卵した各系統のF6、F4、F1種苗及び平成23年秋

期に採卵したF7、F5、F2種苗を水産研究所で飼育して供試魚とした。加島事業場で淡水馴致したそれぞれの種苗を適宜水産研究所に輸送し、循環濾過水槽でアユ用配合飼料を魚体重の1.5～3.0%を与えて飼育した。飼育水は15に加温し、自然水温が15に達した以降は温度調整をしなかった。

表1. 初代親魚が異なる3系統の各世代の親魚数。系統BのF4は雄親魚数が異なる2群を作出した。系統Aは2005年河川遡上魚、系統Bは2007年海産魚、系統Cは2010年海産魚をそれぞれ表す。

系統	性別	各世代の親魚数						
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	
A	雄	67	56	45	-	95	62	140
	雌	68	40	31	-	56	36	29
B	雄	60	83	55	409	139	120	-
	雌	31	34	21	37	38	34	-
C	雄	123	120	-	-	-	-	-
	雌	32	30	-	-	-	-	-

スキムミルクを保存剤として-80で凍結保存した冷水病原因菌PH0424株を、三角フラスコを用いて50%CGY液体培地で振とう培養した。17で約25時間培養した菌液を10分間、5,000rpmで遠心分離することで、菌体と培養上清を分離した。培養上清を除去後、滅菌水道水で10倍希釈菌液を作成した。各濃度の菌液を供試魚の背鰭基部に20μLずつ皮下接種した。F6、F4、F1では1尾当たりの接種菌量を $1.3 \times 10^5 \sim 10^8$ CFU、F7、F5、F2では $2.2 \times 10^5 \sim 10^8$ CFUの4種類の試験区と滅菌水道水を接種した対照区をそれぞれ設けた。接種後の供試魚は、飼育水温17、無給餌で2週間飼育した。

各菌濃度区の生残率から半数致死接種菌量（LD₅₀）をプロビット法で求めた。また、同じ接種菌量の試験区の結果からカプラン・マイヤー法により平均生存日数を算出し、系統間で比較した。また生存日数の差の二乗値に基づくログランク検定を実施した。

親魚数が異なる種苗の冷水病耐性の比較

系統BのF3を加島事業場で親魚に養成し、雄魚139尾、雌魚38尾から採卵、受精した系統（F4Lとする）と、雄魚409尾、雌魚37尾を親魚とした系統（F4Hとする）を作出

した。F4Hの親魚数は、雄魚がF4Lより約2.9倍多いが雌魚は1尾少ない(表1)。

両系統の冷水病耐性を、前述の4段階濃度の菌液を皮下接種する方法で比較した。また両系統と系統AのF6で、接種菌量が最も多い試験区(1.3×10⁸CFU)の平均生存日数についてログランク検定を実施した。

結果と考察

継代による冷水病耐性の低下と系統による差異

系統AのF6, F7は、LD₅₀が10⁵および10⁴ CFUであることから冷水病耐性が低下している(表2)。系統CのF1, F2のLD₅₀はいずれも10⁷ CFUであり、冷水病耐性が維持されていた。系統BのF4はプロビット値が有意な直線性を示さず、適切なLD₅₀値がえられなかった。同系統のF5はLD₅₀が10⁶ CFUを示し、前述のF7より70倍以上大きいことから冷水病耐性が維持されていると考えられる。

表2. 冷水病原因菌皮下接種による各系統と世代の半数致死接種菌量(LD₅₀)。系統の記号は表1と同じ。

系統	世代	LD ₅₀ (CFU)
A	F6	3.8×10 ⁵
C	F1	6.0×10 ⁷
A	F7	6.2×10 ⁴
B	F5	4.5×10 ⁶
C	F2	2.0×10 ⁷

系統Aと系統BのF1からF4までの親魚数に大きな差はないが(表1)、系統AのF4では冷水病耐性の低下が認められた。同世代の冷水病耐性の差は、両系統の創始集団の遺伝的組成の違いが原因であると考えられる。なお系統BのF4の親魚数の異なる2群間では、冷水病耐性に差がなかった(次項参照)。

カプラン・マイヤー法で求めた1.3×10⁸CFUを接種したF1とF4の平均生存日数は、8.8と8.6ではほぼ等しい(図1)。F6の平均生存日数4.9は、F1とF4Hとの間でそれぞれ有意な差が認められた(表3)。2.2×10⁷CFUを接種したF2, F5, F7はそれぞれ異なる平均生存日数を示した(図2)。同接種菌量ではF2と他の2系統の間で有意な差が認められるが(表4左下)、菌量が10分の1ではF7と他の2系統の間で有意な差が認められた(表4右上)。F5は接種菌量が多いと生存率が低下することから、冷水病耐性が低下する傾向を示していると考えられる。

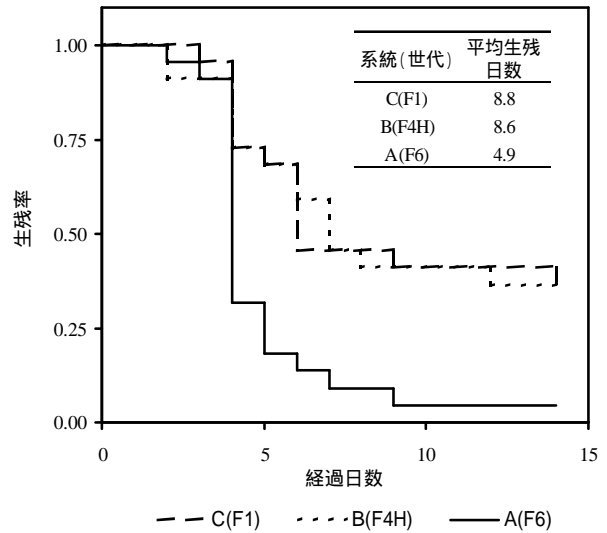


図1. 系統が異なるアユの継代種苗の冷水病原因菌による皮下接種攻撃後の生存率の推移とカプラン・マイヤー法による平均生存日数

表3. 各系統間の平均生存日数の差のログランク検定の結果

	C(F1)	B(F4H)	A(F6)
C(F1)		ND	ND
B(F4H)	0.9981		ND
A(F6)	0.0082**	0.0098**	

**は危険率1%で有意差が認められた

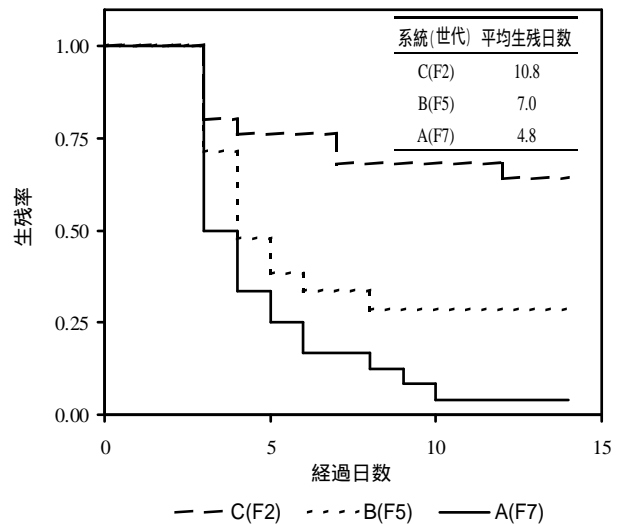


図2. 系統が異なるアユの継代種苗の冷水病原因菌による皮下接種攻撃後の生存率の推移とカプラン・マイヤー法による平均生存日数

表4. 各系統間の平均生残日数の差のログランク検定の結果

	C(F2)	B(F5)	A(F7)
C(F2)		0.9471	0.0054**
B(F5)	0.0265*		0.0054**
A(F7)	0.0001**	0.1025	

*は危険率5% , **は危険率1%で有意差が認められた

親魚数が異なる種苗の冷水病耐性の比較

1.3 × 10⁸CFUを接種した系統BのF4HとF4Lの平均生残日数は8.6と8.5であり、いずれも冷水病耐性を維持していた(図3)。親魚数による冷水病耐性の差は認められないことから、遺伝的多様性および遺伝的な組成の違いについて現在分析を進めている。F4HとF4Lと系統AのF6の間では有意な差が認められたが、F4Lの養成親魚を選抜したF5世代では冷水病耐性が低下する傾向が認められた。F5以降の継代では、親魚数を増やすとともに親魚の選抜法を検討する必要があると考えられる。

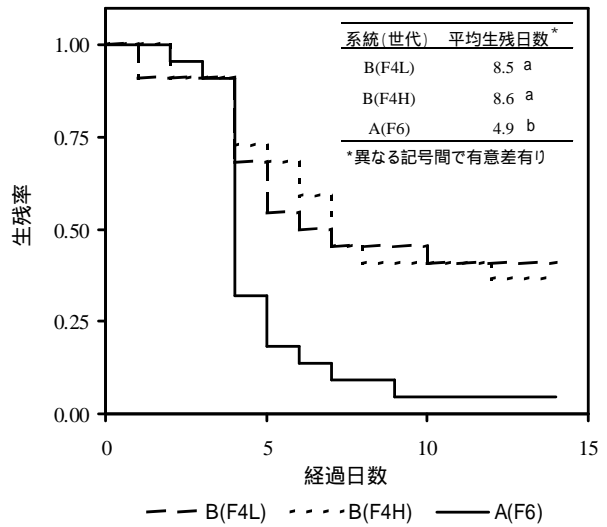


図3. 系統が異なるアユの継代種苗の冷水病原菌による皮下接種攻撃後の生残率の推移と Kaplan-Meier 法による平均生残日数。平均生残日数の有意差はログランク検定による