キンブナ雄との交配により生じた4倍体ギンブナの 仔魚と、その体染色について^{*1}

小林 弘・中野和枝・中村守純
(1976年7月5日受理)

On the Hybrids, 4n Ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*) × Kinbuna
(*C. auratus* subsp.), and their Chromosomes

Hiromu KOBAYASHI^{*2}, Kazue NAKANO^{*2}, and Morizumi NAKAMURA^{*3}

The ginbunas (*Carassius auratus langsdorfii*) captured in the Kantō district were exclusively females, and the majority of them showed the triploid chromosome number of 156. A few individuals, however, contained 206 instead of 156 chromosomes in the same district. In this connection, we re-examined the chromosomes of ginbunas collected from Chiba prefecture, using scale epithelial cell cultures and have been able to demonstrate a consistent karyotype in ginbunas with 206 chromosomes; they consisted of 22 pairs of metacentrics, 41 pairs of submetacentrics and 40 pairs of acrocentrics. Consequently, these female ginbunas appeared to represent the 4n lineage.

In order to find out the productive system of the 4n ginbuna, a cross breeding between a female ginbuna (4n) and a male kinbuna (2n) collected from Kasumigaura was made in a series of this study. The development of the cross-bred eggs was normal, and the larvae grew up normally. All the grown up offsprings were females and similar to the maternal ginbuna in their body shape. Chromosome preparations in the offsprings were made from short term lymphocyte cultures obtained from renal tissues. The results of chromosome counts in 6 offsprings examined revealed the modal chromosome number of 206. Comparing the karyotypes of the offsprings with that of the maternal 4n ginbuna, we could not find out any difference among their chromosome constitutions, so far as the morphological analysis is concerned.

Based on the present findings, the most likely explanation would be that the production of the 4n offsprings by a hybrid cross, 4n ginbuna × 2n kinbuna, might have arisen by gynogenesis, as has already been pointed out for the production of 3n ginbunas by the authors.

我国のギンブナ中に2倍体(2n)個体以外に3nと4n個体の存在する事実は、小林ら¹⁾により始めて報告された。その後3nギンブナの繁殖がgynogenesisによる事実は、媒精後の精核と卵核の行動(小林²⁾)や他種または他亜種の精子の媒精により生じた仔魚の形態観察(小林³⁾)により明確となり、さらに、小林・越智⁴⁾は、3nギンブナ卵をキンブナとドジョウの精子で媒精し、親魚と仔魚の核型の比較をおこない、この研究からもgynogenesisによつて仔魚ができることを突き止めた。このようにして3nのギンブナがgynogenesisにより繁殖する事実は次第に明らかとなつてきた。しかし、4nのフナについては、その後関谷・本間⁵⁾、小林ら⁶⁾により新潟地方のギンブナあるいはナガブナ中に4n個体が存在するとの報告が

^{*1} 本研究は昭和50年4月日本水産学会春季大会(東京)において講演発表した。

^{*2} 日本女子大学生物学教室 (Department of Biology, Japan Women's University).

^{*3} 国立科学博物館動物研究部 (Department of Zoology, National Science Museum).

あるだけで、外観上 4n 個体は 2n や 3n 個体と区別ができないことや、その出現率がきわめて低いことが障害となり、この魚の繁殖方を究明することはきわめて困難な事項として今日に至った。しかしながら、近年組織培養により鱗上皮細胞から、材料魚を殺すことなく染色体を観察できるようになった (OJIMA ら⁷⁾, 小林⁸⁾)。また筆者らは最近 4n 個体を比較的高率に含むギンブナの集団を千葉県で採集し、この中より生きた状態で 4n 雌 2 個体を選出することに成功した。そこで今回、この 4n ギンブナ雌とキンブナ雄の間で交雑をおこない、これらの交雑卵の発生経過、仔魚の成長状態と形態、親仔の核型の比較などにより 4n ギンブナの繁殖法を推測してみた。

材料および方法

材料として使用した親魚は、千葉県武郡九十九里町南川岸の通称飛行機池で 1974 年 1 月に捕獲され、染色体検査の結果、4n と確認されたギンブナ *Carassius auratus langsdorffii* の雌 2 個体中の 1 個体と、霞ヶ浦の茨城県稲敷郡美浦木原地区で 1974 年 4 月に捕獲されたキンブナ *C. auratus* subsp. の雄 1 個体であつた。1974 年 5 月初旬、予めドジョウの脳下垂体懸濁液を注射し、これにより放精と放卵を促した雄魚と雌魚とを室外の 350×300×47 cm のコンクリート池に放ち、ポリエチレン製の人工魚巢を入れて自然交配をまつた。放魚後 2 日目に約 2,000 個の卵が産卵され、その中から人工魚巢に産み付けられた 200 個前後の卵を室内の 70×40×10 cm の珪瑯引きバットに移し、室温でこれらの卵について発生状態や、仔魚の初期の成長経過を観察した。これら以外の仔魚の飼育は親魚を取り上げた産卵池でおこない、飼料としてはミジンコ、イトミミズ、人工配合飼料を与え、飼育中は実験魚以外の魚の混入を厳重に防いだ。また仔魚は成長に従つて減数と標本製作の目的で、一定期間ごとに取り上げ、10% のホルマリン液で固定し、保存した。最終的な仔魚の形態の観察や測定は、孵化後 6 ヶ月から 7 ヶ月までの間で、順調に成長したものの中から 30 個体を無作為に取り出し、10% のホルマリン液で固定した標本によつておこなつた。

染色体の検査には、小林⁸⁾の淡水魚の組織培養による染色体標本の製作法を用い、雌親魚細胞の分裂中期核板検出には、1 個体より 3~5 枚の鱗を採取し、組織培養液 TC Medium 199 とウシ胎児血清を 3:2 の割合で混ぜた培養液を用い、30°C の CO₂ 培養器で 7 日間培養した鱗上皮細胞を材料とした。仔魚の核型検出には、形態の観察や測定をおこなつた標本魚 No. 1, 2, 3, 10, 11, 12 の 6 個体について、標本製作直前に、これらの腎臓中より遊離リンパ球を採取し、各個体のリンパ球は、組織培養液 TC Eagle Medium とウシ胎児血清を 4:1 の割合で混ぜ、これに PHA (Phytohemagglutinin) の微量を加え培養液に入れ、30°C の CO₂ 培養器で 3 日間培養し、この培養リンパ球を材料とした。上皮細胞もリンパ球も、培養細胞は低張液処理後カルノア液で固定し、flame-drying 法でプレパラートを作製した。染色体の観察に当つては、1 個体について 7~10 個の分裂中期の細胞について 1,000 倍で鏡検し、この中から一部の染色体に散在、流入、重複などのない良好な 2, 3 核板を選び、これらについて詳細な検討をおこない、染色体数や核型を決定した。本研究では記載と比較の都合上、相同と思われる染色体を 1 対とし、centromere の位置により、metacentric, submetacentric, acrocentric の 3 グループに分け、各グループはその中に含まれる染色体の長さの順に排列した。

実験結果

親魚の形態、雌親魚*は全長 145.6 mm、体色は黒褐色で背方は濃く腹方は淡く銀白色となり、体高比 2.77、背鰭主鰭条数 17、背鰭基底長比 2.75、鰓耙数 42 と最も標準的 ギンブナの中型魚であつた (Fig. 1, a, Table 1)。雄親魚は全長 151.4 mm、体色は黄褐色で背方は濃く腹方は淡く、各鱗の外縁部は孤状に明るく縁どられ、体高比は 2.77、背鰭主鰭条数は 13、背鰭基底長比は 3.66、鰓耙数は 37 で、やや体高の高い点を除けばその形態は明らかにキンブナの特徴をもち、キンブナの雄としては大型魚に属した (Fig.

* 産卵後間もなく特殊な事故により雌親魚を失った。そのため本論文では、やむを得ず同一地域で同時に捕獲された 4n 雌個体中より全長、体形などの最も類似したもの 1 個体を選び、これを雌親魚として扱った。

Table 1. Results of measurement in bodily characters in the offsprings from the cross, tetraploid ginbuna ♀ × kinbuna ♂, and their parents. Cat. No.: Catalogue number, TL.: Total length, SL.: Standard length, BD.: Depth of body, D.B.L.: Length of base of dorsal fin, D: Number of principal rays of dorsal fin, G.R.: Number of gill-rakers on the first arch, *: Fish used to chromosomal study.

Cat. No.	TL. (mm)	SL. (mm)	BD. (mm)	SL. BD.	D.B.L. (mm)	SL. D.B.L.	D	G.R.	Sex
Maternal ginbuna (4n)	145.6	114.5	41.4	2.77	41.6	2.75	17	42	♀
Paternal kinbuna	151.4	121.4	43.9	2.77	33.2	3.66	13	37	♂
Offspring (F ₁) 1.	93.2	70.8	27.1	2.61	24.5	2.89	16	41	♀
" 2.	91.4	70.6	26.9	2.63	25.5	2.77	16	41	♀
" 3.	84.8	64.6	23.3	2.77	22.7	2.85	17	40	♀
" 4	84.8	63.9	23.8	2.69	22.9	2.79	16	39	♀
" 5	90.6	68.9	24.6	2.80	25.1	2.74	16	39	♀
" 6	77.5	59.2	21.3	2.78	21.2	2.79	16	39	♀
" 7	78.6	59.9	21.1	2.84	20.7	2.89	16	39	♀
" 8	81.4	62.6	21.7	2.89	22.6	2.77	15	42	♀
" 9	82.2	62.7	20.9	3.00	22.9	2.74	17	39	♀
" 10.	86.6	66.7	23.3	2.86	23.7	2.81	16	42	♀
" 11.	83.7	63.8	21.9	2.91	22.4	2.85	16	40	♀
" 12.	80.4	61.5	20.6	2.99	21.5	2.85	15	39	♀
" 13	94.6	73.6	26.3	2.80	26.6	2.77	17	40	♀
" 14	82.7	62.5	22.9	2.73	22.6	2.77	15	41	♀
" 15	77.9	59.3	20.3	2.92	21.4	2.77	16	39	♀
" 16	80.2	60.3	21.5	2.81	21.9	2.75	16	39	♀
" 17	73.8	55.8	20.6	2.71	20.7	2.70	16	40	♀
" 18	87.4	66.3	24.5	2.71	25.0	2.65	16	40	♀
" 19	81.7	62.5	22.6	2.77	22.5	2.78	16	41	♀
" 20	92.4	70.6	27.1	2.61	26.1	2.71	17	41	♀
" 21	75.3	56.4	20.9	2.70	20.9	2.70	16	39	♀
" 22	80.9	61.9	21.8	2.84	21.3	2.91	15	41	♀
" 23	84.4	64.4	24.2	2.66	22.7	2.84	15	40	♀
" 24	84.5	64.3	23.1	2.78	23.0	2.80	16	39	♀
" 25	84.0	62.3	23.3	2.67	22.8	2.73	16	40	♀
" 26	82.7	62.4	22.1	2.82	22.9	2.73	17	39	♀
" 27	80.7	61.8	22.5	2.75	21.7	2.85	16	41	♀
" 28	80.7	61.9	22.8	2.72	22.2	2.79	16	40	♀
" 29	90.9	70.4	27.2	2.56	25.8	2.73	17	38	♀
" 30	91.0	70.5	26.8	2.63	25.5	2.73	16	41	♀

1, b, Table 1)。

発生と成長経過、交雑卵は直径 1.3~1.4 mm, 球形で卵膜に粘着力があり, 卵黄は半透明の黄緑色でやや濁を帯びていた。これらの卵の発生率は 99% ときわめて順調で, 平均水温 18.5°C の下で放卵後 93 時間より孵化を開始し, 比較的短時間に孵化を完了し, 凡そ 98% の孵化率を示した。孵化した仔魚は全長 4.56 mm で, 筋節数は 21+10=31 で, いずれも正常形をあらわし, 雑種魚に多くみられるような edema や体の湾曲したものは全く存在しなかった。孵化後 2 日で全長 5.3 mm, 卵黄の吸収も順調に進み, 5 日で全長 7.1 mm, 表層付近を游泳し, 摂餌を開始し, 10 日で全長 9.1 mm, 尾鰭鰭条を生じ, 35 日で全長 30.8 mm, 各鰭があらわれ, 鱗の形成も始まり稚魚期に到達した (Fig. 2, a~c)。

仔魚の形態, 孵化後 6~7 ヶ月を経過した 30 個体の標本を観察, 測定した結果をみると, 頭部に起つた多少の短縮を除けば, 外観は全くギンブナと一致し, 体色も黒褐色で背方は濃く腹方は淡く銀白色となつて

おり、平均体高比は 2.76、背鰭主鰭条数は 15~17 でモード 16、平均背鰭基底長比は 2.75、鰓耙数は 38~42 でモード 39 と、これらの測定値も雌親魚ギンブナとほぼ一致し、雄親魚ギンブナの影響を全く認めることができなかった。仔魚全般に認められる頭部の短縮は、遺伝的なものではなく、飼育環境の影響による形態の歪化と思われ、仔魚の鰓耙数が母親魚より多少少く現われたのは、これらの仔魚がまだ未成魚のためと考える (Fig. 2, d, Table 1)。

観察した 30 個体の仔魚はすべて雌で、未成魚とはいえ卵巣はかなり発達した状態にあつた。

染色体、雌親魚の染色体の観察は、培養鱗上皮組織中の 7 個の分裂中期の細胞についておこない、198~206 の染色体数を数えた。この中で最も良好な 3 核板を選び詳細な検討をおこなった結果、これらの染色体数はいずれも 206 で、核型分析の結果は Fig. 3 に示すように、metacentric 22 対で 44 個、submetacentric 41 対で 82 個、acrocentric 40 対で 80 個の染色体により構成されていた。これは小林ら¹⁾により報告された関東地方の 4n ギンブナの染色体数や核型分析の結果と全く一致した。

仔魚の染色体は、6 個体の各々について、10 個の分裂中期の培養リンパ球で観察し、194~208 の染色体数を数え、これらの中より各個体毎に最も信頼できる 2 核板を選び、これらについて詳細な検討を加えた結果、それらの染色体数はすべて 206 で (Fig. 4)、核型分析の結果も一致し Fig. 5 に示すように、metacentric 22 対で 44 個、submetacentric 41 対で 82 個、acrocentric 40 対で 80 個の染色体構成をあらわした。この結果は、雌親魚や小林ら¹⁾により報告された関東地方の 4n ギンブナの染色体数や核型分析の結果と完全に一致した。

本研究においては、雄親魚の染色体を実際に観察することはできなかったが、小林ら¹⁾は本研究に用いた雄親魚と同様なギンブナの染色体数を 100 とし、その核型分析の結果を metacentric 10 対、submetacentric 20 対、acrocentric 20 対と報告している。

考 察

3n のギンブナが gynogenesis という特殊な繁殖をする事実は、小林^{2,3)}や小林・越智⁴⁾の研究により明白な事実となつた。しかし、4n のギンブナについては、2n や 3n 個体との外観上の区別が困難な上、これらの出現率が低いと、これまで繁殖法を明確に知ることができなかった。そのため 4n ギンブナの繁殖法やそれに伴う倍数性フナ起源について、次のような 3 つの仮定が想定された。その第 1 は、ギンブナには本来 2n 個体と 4n 個体が存在し、両者は普通別々に繁殖を続けているが、なんらかのチャンスで 4n 個体と 2n 個体の間で交雑がおこなわれると 3n 個体が生じてくる。第 2 は、普通ギンブナには 4n 個体は存在せず、3n 個体の卵と 2n 個体の精子が受精した場合に 4n 個体が生じてくる。第 3 は、ギンブナには 2n 個体以外に 3n と 4n 個体が存在し、3n と 4n 個体はいずれも gynogenesis により繁殖している。

ここで本研究の 4n ギンブナ雌とギンブナ雄との交雑結果をみると、発生、成長経過は、異亜種との交雑にもかかわらず、きわめて順調であり、また仔魚の形態には全く雄親魚の影響はなく、雌親魚のギンブナと一致し、性比についてもすべてが雌であつた。この事実は小林³⁾が 3n ギンブナの交雑実験で、gynogenesis と判断した実験結果と全く一致しており、さらに、本実験の雌親魚と仔魚の染色体の比較において、両者が染色体数ばかりでなく、核型分析の結果まで一致したことは、同様な研究方法で 3n ギンブナの繁殖を gynogenesis とした小林・越智⁴⁾の実験結果と全く一致した。ただ本実験では、父親魚ギンブナの染色体を実際に観察していない。この点に多少の不安は残るが、小林ら¹⁾の報告により、普通のギンブナは 2n 個体と推測される。ここでこれらの事実を総合して考えると、4n ギンブナの繁殖もまた雄親魚の遺伝形質の影響を受けない gynogenesis によるものと考えてまず間違いあるまい。そこで始めに想定した 3 つの仮定中、本研究の結果より、第 3 の仮定が最も妥当性をもつものとなつてきた。

要 約

鱗上皮細胞の培養により、4n ギンブナ雌 2 個体を確認し、これらの中の 1 個体とギンブナ雄との間の交

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

雑により、次の結果を得た。

1. 交雑卵の発生、仔魚の成長は順調に進行した。
2. 仔魚の形態は雌親魚ギンブナに一致し、仔魚はすべて雌魚となつた。
3. 腎臓中のリンパ球の培養により、6 個体の仔魚の染色体を調べたところ、染色体数はいずれも 206 で核型分析の結果は、metacentric 22 対, submetacentric 41 対, acrocentric 40 対で、この結果は雌親魚の染色体数や核型と全く一致した。

これらの結果を総合して、4n ギンブナもまた gynogenesis により繁殖するものと考察した。

終りに、本文の校閲を賜つた東京医科歯科大学外村晶教授に深謝する。

文 献

- 1) 小林 弘・川島康代・竹内直政： 魚類学雑誌, 17, 153-160 (1970) .
- 2) 小林 弘： 動物学雑誌, 80, 316-322 (1971) .
- 3) 小林 弘： 日本女子大学紀要 (家政学部), 19, 231-258 (1972) .
- 4) 小林 弘・越智尚子： 動物学雑誌, 81, 67-71 (1972) .
- 5) 関谷伸一・本間義治： 動物分類学会誌, 9, 63-70 (1973) .
- 6) 小林 弘・越智尚子・竹内直政： 魚類学雑誌, 20, 7-12 (1973) .
- 7) Y. OJIMA, S. TAKAYAMA and K. YAMAMOTO: Japan. J. Genetics, 47, 445-446 (1972) .
- 8) 小林 弘： 日本女子大学紀要 (家政学部), 22, 159-168 (1975) .

Fig. 1. Parental fishes. a, maternal tetraploid ginbuna. b, paternal kinbuna.

Fig. 2. Stages in growth of the offsprings of derivative from tetraploid ginbuna ♀ × kinbuna ♂. a, pro-larval stage. b, post-larval stage. c, juvenile stage. d, immature stage.

Fig. 3. Karyotype analysis of somatic cell in maternal tetraploid ginbuna.

Fig. 4. 206 chromosomes in the somatic cells in three offsprings of derivative from tetraploid ginbuna ♀ × kinbuna ♂. a, catalogue no. 1. b, catalogue no. 3. c, catalogue no. 12.

Fig. 5. Karyotype analysis of a somatic cell in an offspring (catalogue no. 2) of derivative from tetraploid ginbuna ♀ × kinbuna ♂.