

[成果情報名] PCR法を用いたサクラマス性判別手法の検証

[要 約] 県内で採集されたサクラマス（降海型・残留型含む）を対象に、先行事例を参考としてPCR法を用いた性判別手法を検討したところ、有効と判明した。

[部 署] 山形県内水面水産研究所・資源調査部

[連絡先] TEL 0238-38-3214

[成果区分] 普

[キーワード] サクラマス、性判別、*sdY*、PCR法

[背景・ねらい]

近年、様々な魚類で性決定遺伝子が同定されている。マス類においても性決定遺伝子は *sdY* とされ (Yano et. al, 2012)、それを基にしたマス類の性判別手法も開発されている (木南ら, 2016)。本手法のメリットは非破壊的かつ成長段階の早い段階で個体の性を識別できることにある。一方、サクラマスにおいては *sdY* 遺伝子型と表現型との関連性は情報が不十分であることから、本県で採集されたサクラマスを対象としてPCR法を用いた性判別手法が有効であるかを検討した。

[成果の内容・特徴]

- 1 対象としたサンプルは、2017年に鶴岡市の五十川で釣獲採捕された残留型サクラマス59尾と、2020年、2021年に県沿岸で漁獲されたサクラマス成魚30尾である。各個体は解剖後、腹腔内から生殖腺を取り出し、その形状から肉眼で雌雄を判別した。なお計89個体のうち、2個体は生殖腺が小さく、また、組織の溶解があったため性別は不明とした (表1)。さらに、各個体の脂鱗または左腹鱗の一部を切り取り、99.5%エタノールで固定し、DNA抽出まで冷蔵で保管した。
- 2 DNA抽出は市販のカラム精製キットで行い、テンプレート溶液を作成した。その際、テンプレート溶液は核酸定量装置により概ね10ng/μL以上の濃度であることを確認した。PCR初期条件は、木南らを参考とした。また、PCR反応溶液の組成は、マルチプレックスPCRに対応し、かつ染色Dyeが添加されたものを使用した (表2)。反応に用いたプライマーは木南らに従った (表3)。PCR産物は、2%アガロースゲルを用いてTBEバッファー中で、50V5分、100V20分計25分間泳動した。泳動後のゲルは20分間エチジウムブロマイド染色を行い、紫外線装置で観察した。
- 3 電気泳動像の観察の結果、多くのサンプルでは明瞭な増幅が認められたものの、一部で不明瞭な結果となった。これを受けて、サイクル数を30サイクルから35サイクルに増加させ、同条件で観察したところ、全てのサンプルで明瞭なバンドが認められた (図1、図2)。バンドが1つ認められた場合には性別が雌、2つ認められた場合には性別は雄とし、このPCR条件で得られた電気泳動像の遺伝子型と生殖腺の観察から判断した表現型性を突き合せた結果、性別が不明であった2個体を除く計87個体中すべてで一致が見られた (表1、表4)。
- 4 これらの結果から、表2、3および図1、2に示すPCR法と電気泳動像の観察で、サクラマスの雌雄判別が可能であることが分かった。

[成果の活用面・留意点]

- 1 養殖魚における二次性徴以前の雌雄選別や機能的性転換個体の選別等に利用可能である。
- 2 定量的な検査精度を今後検証する必要がある。
- 3 マス類でも魚種や集団により表現型性と遺伝子型性が一致しない可能性があることに留意する。

[具体的なデータ]

表 1 生殖腺の観察による性別判定結果

	性別(尾)		
	雄	雌	不明
残留型サクラマス	44	13	2
降海型サクラマス	4	26	0

表 2 PCR 反応液の組成

組成(25μl系)	容量(μl)
Dye添加済PCRマスターミックス(2×)	12.5
sdY227U_F(10pmol/μl)	0.5
sdY227U_R(10pmol/μl)	0.5
18S514U_F(10pmol/μl)	0.15
18S514U_R(10pmol/μl)	0.15
ゲノムテンプレート	1
DW	10.2

表 3 各プライマーの配列

プライマー名 (木南ら、2016)	配列
sdY227U_F	5'-TTTTCTTGTCTCAGTGGAGTACTGCGAAGAG-3'
sdY227U_R	5'-CTTCCTCCCTAGAGCTTAAAACCACTCCAC-3'
18S514U_F	5'-GACTCTTTTCGAGGCCCTGTAATTGG-3'
18S514U_R	5'-GACGGTATCTGATCGTCTTCGAACC-3'

表 4 遺伝子型の観察による性別判定結果

	性別(尾)	
	雄	雌
残留型サクラマス	44	13
降海型サクラマス	4	26

94°C 2分
↓
94°C 30秒
68°C 30秒
72°C 30秒 } 35サイクル
↓
72°C 4分
↓
4°C ∞

図 1 サクラマス性別別の PCR 条件

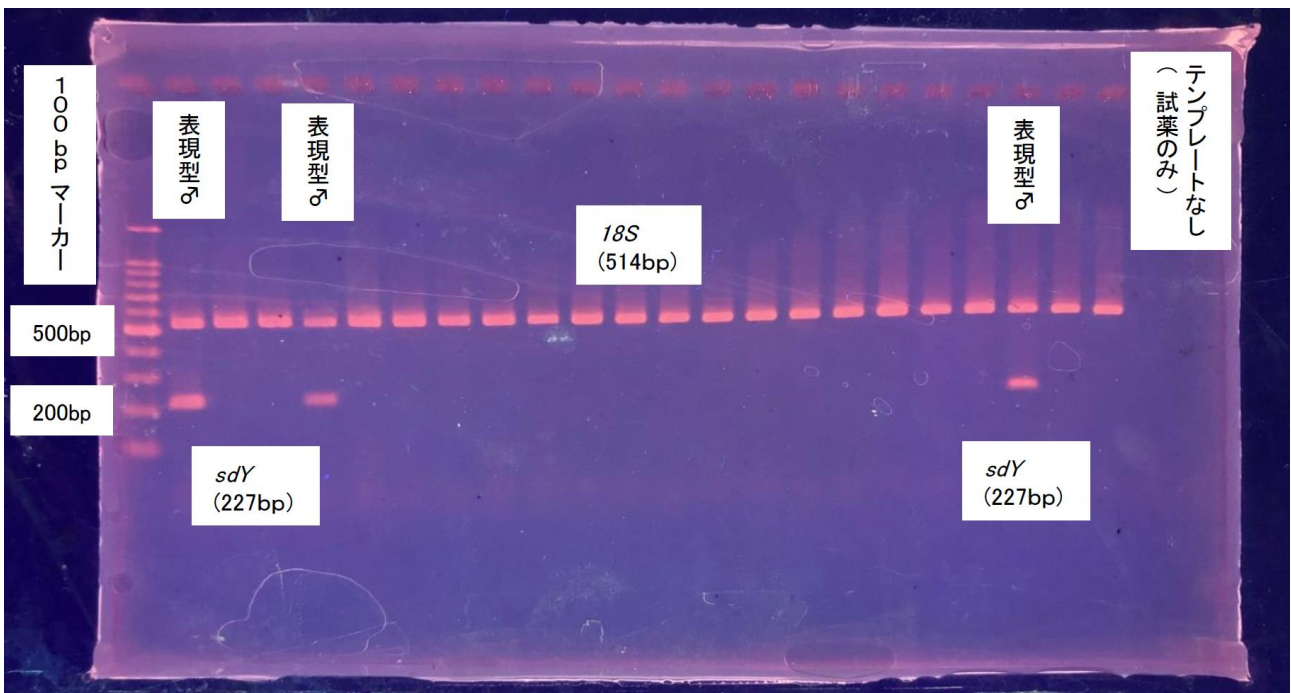


図 2 明瞭なバンドが観察された電気泳動像 (一部抜粋)

[その他]

研究課題名：大型マス安定生産技術開発 予算区分：県単 研究期間：令和 3 年度 (平成 30 年度～令和 4 年度) 研究担当者：鈴木悠斗 発表論文等：なし