HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on Seed Production and Genetic Markers for Stock Enhancement of Seahorses [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	URSUA, Shelah Mae Buen
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	乙第6984号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61639
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shelah_Ursua_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：　Shelah Mae Buen URSUA

審査委員	主査　教授	都木　靖彰
	副査　教授	荒井　克俊
	副査　准教授	藤本　貴史

学 位 論 文 題 目

Studies on Seed Production and Genetic Markers for Stock Enhancement of Seahorses

（タツノオトシゴ類資源増殖にむけた種苗生産と遺伝マーカーに関する研究）

薬用品、装飾品等の需要から東南アジア海域のタツノオトシゴ類への漁獲圧は高まり、一部は絶滅危惧種とされている。今後、タツノオトシゴ類の資源を保全し、増殖するための一つの方策として、人工種苗を用いた養殖生産の向上による野生集団への漁獲圧の低減がある。そのためには安定して人工種苗を生産するための技術開発が必要となる。また、人工種苗の放流による資源増殖には、地場野生集団の遺伝的攪乱を起こさないための事前、事後の遺伝学的なモニタリングが必要であるが、タツノオトシゴ類では研究に必須の遺伝マーカーが極めて乏しく、そのため遺伝学的な情報がほとんどない。本研究では、人工種苗生産安定化にむけた技術開発のため、生物餌料の最適給餌法による親魚の生殖能力の改善、最適な飼育用水による稚魚の安定生産、および幼魚の生残・成長のための最適生物餌料を検討するとともに（第一章~第三章）、外部形態による分類が困難であるタツノオトシゴ類各種を種判別するためのミトコンドリア DNA 遺伝マーカーならびに集団構造把握と将来の遺伝学的モニタリングのための高多型性マイクロサテライト DNA マーカーの開発を行った（第四章~第五章）。

先ず、第一章では、アルテミア(*Artemia*)、アミ類(mysid)、冷凍 *Acetes* を単独あるいは複合して給餌した時の、親魚の生殖能力（稚魚分娩数、分娩頻度、分娩間隔）への影響を *Hippocampus comes* を用いて検討した。その結果、アミ類を含む餌への嗜好性が強く、それらを与えられた親魚が最も高い分娩数を示し、最短の間隔で分娩を行うことを明らかにした。

第二章では生まれたての仔稚魚の環境飼育水と餌について検討した。その結果、砂濾過海水、塩素滅菌海水に比べて、紫外線照射海水での飼育が生残・成長とも良好であった。また、ホルマリンで消毒した生物餌料の給餌により生残性が改善できた。

第三章では、1-6 月令の幼魚の最適な餌料について検討した。その結果、2 月令以下の幼魚はアミ類を餌としたが、冷凍 *Acetes* を採餌することは難しいことを明らかにした。また，3-6 月令幼魚の生残はアミ類と *Acetes* を餌とすることにより安定することを確認した。

第四章では、ミトコンドリア DNA の *cytochrome b* (*cyt b*)と *16S rRNA* 遺伝子の塩基配列により、外見の形態、色彩から分類が困難なタツノオトシゴ類の種判別を試みた。分子系統解析から、材料とした *H. comes*、 *H. barbouri*、 *H.kuda*、 *H. spinosissimus*、 *H. trimaculatus*、 *H. abdominalis* は塩基配列により判別可能であることが分った。さらに、*16S rRNA* 遺伝子の 5'末端領域について *H. spinossimus* と *H. barbouri* を判別する種特異的な PCR プライマーを設計し、これにより両種の簡便な種判別が可能となった。さらに、フィリピン周辺海域の *H. comes* を他の 5 種から判別するための、*cyt b* 遺伝子の PCR 産物の *Bam*HI 制限酵素断片長多型 (RFLP) による種判別法を開発した。

第五章では、*H. comes* を材料にマイクロサテライト DNA 領域のクローニングと塩基配列解析を行い、最終的に 96 のクローンより、20 のプライマーセットを設計して、その有用性を調べたところ 19 のマイクロサテライト DNA マーカー座が安定して増幅した。これらのうち 18 マーカー座は高度に多型的で、2 から 11 のアリルを示し、今後の集団解析に有用と判断されたが、残り 1 座は単型であることを明らかにした。さらに、他のタツノオトシゴ類 5 種において、これらのプライマーの有効性を検討したところ、全てではないが、多くのマーカー座が他種でも増幅し、かつ多型を示したことから、広く利用可能と判断された。また、これらのマーカーのうち 5 座はヨウジウオ *Sygnathus biaculeatus* でも増幅を示した。

以上に述べた、本研究で得られたタツノオトシゴ類の種苗生産改善と遺伝マーカーに関する知見は、今後タツノオトシゴ類全般の資源増殖に応用可能な技術であり、さらに種判別のみならず野生集団の遺伝学的分化や変異性の解析に大きく貢献できる。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。