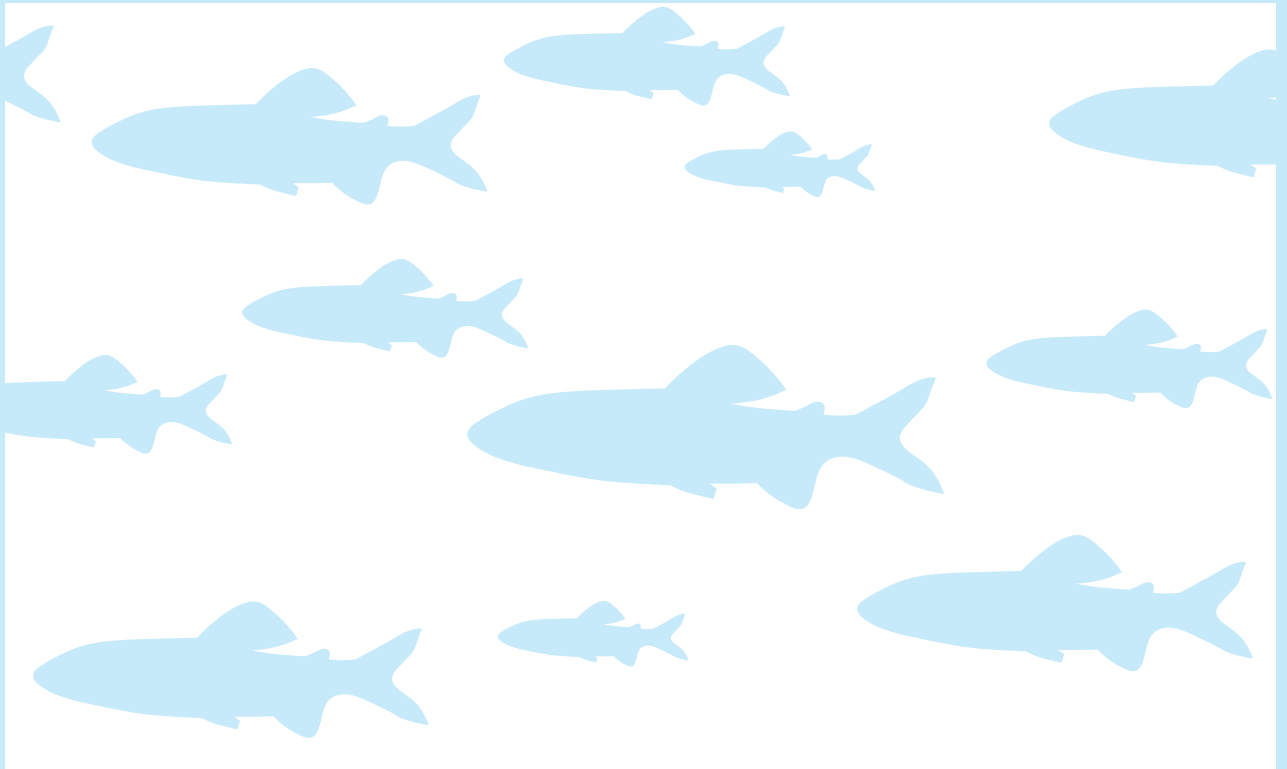


水産育種

FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE

Volume 39
Number 2
March 2010



水産育種研究会

The Japanese Society of Fish Genetics and Breeding Science

水産育種

第39巻 2号

目次

報文

DNAマーカーによるサクラマス以降海型と河川残留型との遺伝的関係 (英文)

.....劉 正南・東 典子・Vladimir BRYKOV・浦和茂彦・阿部周一 75

韓国、中国から輸入されたシジミと日本産ヤマトシジミ貝殻 Sr/Ca 比の比較

.....古丸 明・尾之内健次・柳瀬泰宏・長崎勝康・大竹二雄 87

サクラマスの胚の生残率と幼魚の計数形質におよぼす水温の影響 (英文)

.....安藤大成・下田和孝・神力義仁・水野伸也・内藤一明・中嶋正道 95

Multiplex PCRを用いた琉球列島在来フナと移殖フナの簡易判別法 ... 高田未来美・立原一憲・西田 睦 109

サバ科魚類 *vasa* cDNA のクローニングおよびその配列多型を利用した PCR によるクロマグロ

生殖細胞検出系の構築..... 壁谷尚樹・奥津智之・矢澤良輔・樋口健太郎・長澤一衛・三森亮介

中田 久・濱崎将臣・竹内 裕・吉崎悟朗 115

情報

魚介類の優良家系に関するアンケート調査結果について..... 原 素之 127

全国養鱒協議会報告書付表アンケート調査結果..... 岡本信明 131

会員通信

International Symposium on Formosa Landlocked Salmon and Masu Salmon に参加して 宮原寿恵 145

水産育種研究会会則 149

水産育種投稿要領 150

平成22年 3月21日

水産育種研究会

Genetic Relationships Between Anadromous and Non-anadromous Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*) Inferred from Mitochondrial and Microsatellite DNA Variation

Jeong-Nam YU^{*1}, Noriko AZUMA^{*1†}, Vladimir BRYKOV^{*2},
Shigehiko URAWA^{*3}, Kazumasa OHKUMA^{*4} and Syuiti ABE^{*1}

^{*1} Laboratory of Aquaculture Genetics and Genomics, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University.

^{*2} Institute of Marine Biology, Far East Branch of Russian Academy of Science, Vladivostok, Russia

^{*3} Gene Conservation Section, National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency.

^{*4} Environment and Ecology Section, National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency.

[†] Present Address: Support Office for Female Researchers, Hokkaido University Administration Center.

Abstract

Genetic relationships between homing anadromous and matured non-anadromous forms of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) from one river of Hokkaido, Japan, and two rivers of Sakhalin, Russia, collected in 2001 to 2008 were examined using nucleotide sequence variation in the mitochondrial (mt) DNA NADH dehydrogenase subunit 5 gene (*ND5*) region and allelic polymorphisms at six microsatellite (ms) DNA loci. All the non-anadromous samples examined were genetic males identified with *GH-Y* pseudogene. Significant difference between anadromous and non-anadromous samples within the Shari and Sukhopletka Rivers was suggested with F_{ST} estimates and neighbor-joining trees using msDNA but not mtDNA marker. Analyses of mtDNA and msDNA also suggested that the genetic divergence among allopatric samples in Hokkaido and Sakhalin was larger than that between two life-history forms in the same river. The present findings imply a possible genetic differentiation between the two life-history forms of masu salmon in the same river and distinct genetic structuring in the Far East.

Keywords: masu salmon, yamame, mitochondrial *ND5* gene, microsatellite DNA marker, molecular population genetics, genetic diversity

(accepted December 21, 2009)

Introduction

Masu salmon (*Oncorhynchus masou*) exclusively occurs in the Asian side of north Pacific Ocean¹⁾. From their life history, masu salmon is known to include two life-history forms, anadromous ocean migrants and non-anadromous river-residents. Fry of masu salmon emerge in Spring, stay in natal rivers for at least one year, and then smolts migrate seaward to grow up in oceans¹⁾. Smolts generally consist of

more females than males because males mostly remain in the natal rivers¹⁾, unlike other *Oncorhynchus* species with polymorphic life history, such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). In the latter two species, both the males and females of some populations remain in fresh water throughout the entire life²⁻³⁾.

The occurrence of non-anadromous males is associated with precocious sexual maturation in masu

Table 1. Details of masu salmon samples in Japan and Russia used in this study

Sampling site	Abbreviation	Year	Phenotypic sex	Genotypic sex	Morph	Number of fish
<i>Hokkaido in Japan</i>						
Shari01F	SHA01F	2001	Unknown	Female (39/78)	Anadromous	39
Shari01M	SHA01M	2001	Unknown	Male (39/78)	Anadromous	39
rShari08	rSHA08	2008	Male	Male (24/24)	Non-anadromous	24
<i>Sakhalin in Russia</i>						
Sukhopletka04F	SUK04F	2004	Unknown	Female (28/28)	Anadromous	28
rSukhopletka04	rSUK04	2004	Male	Male (15/15)	Non-anadromous	15
Lutga04F	LUT04F	2004	Unknown	Female (34/34)	Anadromous	34
rLutga04	rLUT04	2004	Male	Male (10/11)	Non-anadromous	10

Phenotypic sex was determined by the external appearance of gonads. Genotypic sex was determined by *GH-Y* typing. See text for detail.

salmon as in other salmonid species⁴). Such a precocious maturation or an alternative reproductive phenotype of males⁵ is likely influenced by genetic and environmental factors⁶. Their respective contributions, however, is still difficult to estimate precisely⁷. The precocious males may have influence on masu salmon population structure through their likely high reproductive success with strong sperm competition⁴, increase of effective population size⁸, and promotion of gene flow between different year classes of migrants⁹. Elucidating the genetic relationships between the two life history forms of masu salmon to understand the genetic characteristics of non-anadromous form will thus have a practical significance for sustainable masu salmon fisheries through conservation of wild populations and genetic resource managements of this species.

Genetic divergence has been reported between anadromous and non-anadromous forms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)¹⁰, whereas no genetic difference has been reported between the two life history forms in other salmonids^{11–12}. However, no studies have ever been conducted yet to analyze the genetic characteristics of non-anadromous form in comparison with those of anadromous counterpart in masu salmon. In the present study, genetic variability of anadromous and non-anadromous masu salmon from the same river was estimated using the mitochondrial (mt) DNA and nuclear microsatellite (ms) DNA markers to elucidate the genetic relationships between them.

Materials and Methods

Samples and DNA extraction

Liver and/or fin tissue samples from a total of

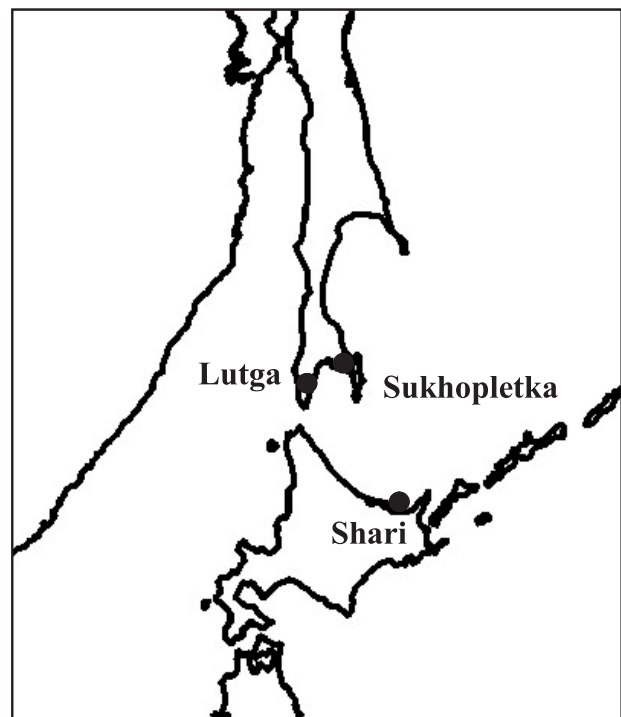


Figure 1. Sampling sites of anadromous and non-anadromous masu salmon used in the present study.

217 masu salmon of the homing anadromous and mature non-anadromous forms from the Shari River in eastern Hokkaido, Japan, and Sukhopletka River and Lutga River in southern Sakhalin, Russia, were collected from 2001 to 2008 (Table 1 and Figure 1). All anadromous samples were collected in August or September of the indicated years. All tissue samples were fixed in ethanol and stored at room temperature until DNA extraction. Phenotypic and genetic sexes of individuals were determined with the external appearance of gonads and/or the presence of male-specific growth hormone pseudogene (*GH-Y*)¹³ to be described below.

Total genomic DNA was extracted from the above

ethanol-fixed tissues with a Gentra Puregene Tissue Kit (QIAGEN) following the manufacturer's protocol. Extracted DNA was dissolved with TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.3), electrophoresed in 1% agarose gel, and stained in ethidium bromide to check the size and quality.

GH-Y typing

GH-Y typing was performed with PCR using the amplification primers GH5 (5'-AGCCTGGATGACA ATGACTC-3') and GH6 (5'-CTACAGAGTGCAGTT GGCCT-3') as previously reported¹³⁻¹⁵. PCR were carried out for 35 cycles with 1 min at 94°C, 1 min at 50~60°C, and 1 min at 72°C³. The obtained PCR products were separated on 2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, visualized on a transilluminator, and photographed.

Mitochondrial and Microsatellite DNA analyses

About 561bp of the 5' half of the mtDNA NADH dehydrogenase subunit 5 gene (*ND5*) region was amplified with PCR using a primer pair of ND5-1F and ND5-3R as previously¹⁶. The thermal cycling profile consisted of 5min initial denaturation at 92°C, followed by 36 cycles of denaturation at 95°C for 45s, annealing at 56°C for 30s and extension at 72°C for 1min, with a post-cycling extension at 72°C for 5min. The obtained PCR products were purified with AMPure magnetic beads (Agencourt, Beverly, MA), and subjected to sequence directly after sequencing reaction with an ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 on an ABI PRISM 3130xL genetic analyzer (Applied Biosystems). Novel reverse primers, ND5-R1 (5'-AGAATGAGGCCCATAGAGG-3') and ND5-R2 (5'-TAGGCTCCCGATTGTGAGAC-3'), were designed for direct sequencing as described previously¹⁷.

For msDNA variability, six loci, Oma02, Oma03ke, Oma04my, Ots520, One111 and Omi87TUF, developed for masu salmon and other salmonids¹⁸⁻²³ were analyzed in the present study. PCR was performed in a 10 μ l reaction mixture containing 0.5 μ l of genomic DNA, 2 μ M of each primer, 0.25 mM each of dNTPs, 1 unit of Taq DNA polymerase, and 1 μ l of 10x reaction buffer (with 1.5 mM MgCl₂). The temperature profile consisted of 5min initial denaturation at 94°C, followed by 28 cycles of denaturation at 94°C for 40s, annealing at the below indicated temperature for 40s, and extension at 72°C for

40s, with a post-cycling extension at 72°C for 40min. The annealing temperatures used were 52°C for the Ots520, 54°C for the One111, 56°C for the Oma02, Oma03ke and Oma04my, 61°C for the Omi87TUF, respectively. The PCR conditions, especially the annealing temperatures, were optimized for amplification of the target loci when necessary. Allele size of fluorescence-labeled fragments was measured on an ABI PRISM 3130xL genetic analyzer, followed by analysis with GeneMapper software version 3.7 (Applied Biosystems).

Data analysis

Multiple alignment of mtDNA *ND5* sequences was performed with GENETIX-WIN version 4.0.1 (Software Development Co., Ltd, Japan) to identify nucleotide variations, from which the haplotypes were defined. The genetic variation within the examined anadromous and non-anadromous samples was characterized with nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (h) using ARLEQUIN version 3.1²⁴.

For msDNA analysis, the GENEPOP version 3.4 program²⁵ was used to test for the conformation of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and to assess the significance of population differentiation in allele frequencies. Allele richness (Ar) and F_{IS} was calculated using the FSTAT 2.9.3 program²⁶. Genetic variability in each sample and the combined individuals from both anadromous and non-anadromous samples was estimated as the number of alleles per locus (Na), and the observed (ho) and expected heterozygosities (he) using ARLEQUIN version 3.1²⁴.

Cluster of the samples was examined using the neighbor-joining (NJ) method²⁷ with NEIGHBOR in the PHYLIP program version 3.67²⁸ based on the genetic distance of the Kimura-2-parameter method²⁹ for mtDNA and Cavalli-Sforza and Edwards chord distances³⁰ for msDNA data, and the consensus tree was generated using CONSENSUS in the above PHYLIP program. Bootstrap values were computed by resampling loci over 1,000 replications, and the trees were visualized using the TREEVIEW program³¹. Resampling of mtDNA and msDNA was performed using a home-made program HAPBOOT (provided by Dr. A. J. Gharrett, University of Alaska Fairbanks) and Seqboots in the PHYLIP program version 3.67, respectively. The pairwise population F_{ST} values were calculated using ARLEQUIN version 3.1²⁴.

Results

Genetic sex by *GH-Y* typing

Sexing by *GH-Y* typing was first attempted in the Shari (non-anadromous) sample that included individuals with known phenotypic sex. The GH5/GH6 primer pair amplified about 410bp fragment in all the individuals, which was probably from the *GH-II* gene¹⁵. On the other hand, about 280bp fragment occurred only in the phenotypic males (Figure 2), indicating the male specific *GH-Y*¹⁵. However, approximately 1kb fragments of the *GH-I* gene¹⁵ was not observed in this study. The concordance of phenotypic sex and the *GH-Y* typing in non-anadromous males was 100% (25/25) in the Shari River and (15/15) in the Sukhopletka River, but 99% (10/11) in the Lutga River. In the latter, one male showed a lack of 280bp *GH-Y* fragment (Figure 2), and hence excluded from the analysis. The genetic sexing was attempted for individuals with unknown phenotypic sex in anadromous fish from the other rivers. As

shown in Table 1, 39/78 (50%) and 39/78 (50%) anadromous fish in the Shari River was female and male by genetic sexing, respectively. In the Sukhopletka River, 28/28 (100%) of anadromous fish were females, and 34/34 (100%) of anadromous fish were females in the Lutga River (Table 1).

Mitochondrial DNA analysis

Twelve of 21 haplotypes indentified previously¹⁷ were found in the three anadromous and three non-anadromous samples examined herein (Table 2). The occurrence of haplotypes was mostly similar in the males and females of anadromous and the males of non-anadromous fish among the different regional samples. The observed h (0.0000-0.6017) and π (0.0000-0.0027) in the anadromous samples were comparable with non-anadromous samples (h , 0.1333-0.6014; π , 0.0004-0.0023) (Table 2), suggesting similar genetic variability between the two life history forms of masu examined herein.

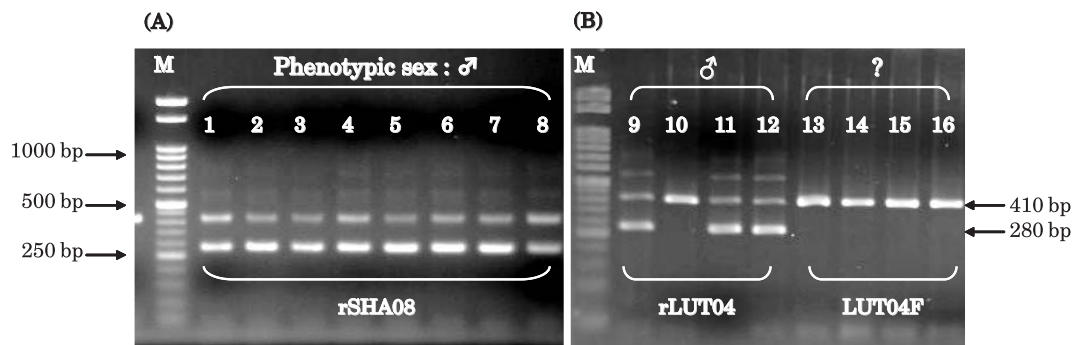


Figure 2. Male-specific distribution of masu salmon *GH-Y* pseudogene (280bp) after 2% agarose gel electrophoresis (2ul of PCR products) in the Shari River non-anadromous (A; lane 1-8), and the Lutga River non-anadromous form (B; lane 9-12) and anadromous form (B; lane 13-16). One male of the Lutga River (lane 10 in B) has not 280bp *GH-Y* band, and not included in the analysis. M: DNA size marker

Table 2. Haplotype diversity ($h \pm SD$) and nucleotide diversity ($\pi \pm SD$) among the examined masu salmon samples calculated from the mtDNA *ND5* region sequence data

Sample	Number of individuals with haplotype												Haplotype diversity ($h \pm SD$)	Nucleotide diversity ($\pi \pm SD$)
	H1	H2	H3	H4	H7	H8	H10	H11	H12	H14	H15	H20		
SHA01F	21	0	0	0	0	0	0	11	6	0	0	0	0.6017 ± 0.0543	0.002799 ± 0.001895
SHA01M	28	0	0	0	0	0	0	10	2	0	0	0	0.4564 ± 0.0725	0.001892 ± 0.001421
rSHA08	11	0	1	0	0	0	0	11	1	0	0	0	0.6014 ± 0.0548	0.002316 ± 0.001673
SUK04F	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0000 ± 0.0000	0.000000 ± 0.000000
rSUK04	14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.1333 ± 0.1123	0.000477 ± 0.000618
LUT04F	25	4	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	0.4474 ± 0.0978	0.001180 ± 0.001035
rLUT04	7	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0.5333 ± 0.1801	0.001072 ± 0.001049

Sample abbreviations are listed in Table 1.

Microsatellite DNA analysis

The observed number of alleles (N_a), allele richness (Ar), expected heterozygosity (h_e), observed heterozygosity (h_o), and the deviation from HWE at the six microsatellite loci in the examined samples are shown in Tables 3 and 4. As shown in Tables 3, the number of alleles at the six microsatellite loci examined ranged from 6 to 27 in both life history forms, showing a total of 86 different alleles over all loci for all samples. A total of 16 private alleles occurred in all the anadromous and non-anadromous samples, and the frequency of such alleles ranged from 1.3 to 5.6% in all the examined samples (Table 3). Ar was 6.21 to 6.82 for anadromous and 5.80 to 6.33 for the non-anadromous fish, respectively (Table 4). Average heterozygosity (h_e) was 0.779

for anadromous and 0.790 for non-anadromous, suggesting similar genetic variation in the two forms (Table 4). Departure from HWE was suggested at the Oma02 in SHA01-M and LUT04-F, at the Oma3ke in SHA01-F, SHA01-M, and LUT04-F, at the Ots520 in SHA01-F and LUT04-F, probably due to heterozygote deficiencies by the excess of h_e over h_o , although such departure was not found after adjustment for multiple tests with the sequential Bonferroni correction (Table 4). Additionally, F_{IS} values were calculated in each life-history form and pooled samples in the same rivers by combining anadromous and non-anadromous samples. Based on the pooled F_{IS} values, probable heterozygote deficiencies were inferred in the Shari River (0.087) and the Lutga River (0.081), but not in the Sukhopletka River (-0.016) (Table 4).

Table 3. Allelic frequencies of the six microsatellite DNA loci in masu salmon samples examined

Alleles at indicated loci	SHA01 F	SHA01M	rSHA08	SUK04F	rSUK04	LUT04F	rLUT04	Alleles at indicated loci	SHA01F	SHA01M	rSHA08	SUK04F	rSUK04	LUT04F	rLUT04
Oma3ke	38	40	24	28	15	34	9	165	0.000	0.000	0.021	0.071	0.000	0.029	0.000
105	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	167	0.092	0.075	0.000	0.018	0.000	0.015	0.000
107	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	169	0.026	0.025	0.021	0.018	0.000	0.029	0.000
109	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	171	0.053	0.038	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000
111	0.039	0.000	0.042	0.036	0.100	0.088	0.111	173	0.053	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
113	0.013	0.050	0.042	0.071	0.067	0.029	0.056	175	0.066	0.038	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000
117	0.066	0.038	0.042	0.071	0.033	0.074	0.111	185	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
119	0.158	0.138	0.083	0.036	0.067	0.029	0.056	Ots520	38	40	24	28	15	34	9
121	0.526	0.438	0.479	0.339	0.233	0.412	0.444	163	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000
123	0.092	0.188	0.229	0.250	0.133	0.206	0.167	165	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
125	0.039	0.000	0.000	0.000	0.000	0.088	0.000	167	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
127	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	171	0.066	0.038	0.063	0.054	0.100	0.000	0.000
129	0.000	0.000	0.042	0.107	0.333	0.044	0.056	173	0.184	0.163	0.292	0.071	0.100	0.176	0.111
131	0.000	0.000	0.000	0.036	0.033	0.000	0.000	175	0.118	0.063	0.042	0.250	0.233	0.118	0.111
133	0.000	0.050	0.021	0.000	0.000	0.029	0.000	177	0.026	0.038	0.000	0.018	0.100	0.015	0.000
143	0.053	0.075	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000	179	0.303	0.350	0.250	0.054	0.033	0.103	0.222
Oma4my	38	40	24	28	15	34	9	181	0.039	0.025	0.083	0.018	0.000	0.074	0.056
151	0.079	0.125	0.000	0.054	0.000	0.044	0.000	183	0.026	0.013	0.021	0.179	0.133	0.059	0.000
153	0.013	0.000	0.146	0.232	0.067	0.000	0.056	185	0.026	0.000	0.042	0.107	0.100	0.044	0.222
155	0.066	0.075	0.042	0.161	0.100	0.044	0.000	187	0.066	0.088	0.125	0.054	0.100	0.176	0.000
157	0.408	0.500	0.417	0.232	0.300	0.353	0.333	189	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.015	0.000
159	0.224	0.125	0.167	0.161	0.267	0.368	0.222	191	0.026	0.050	0.000	0.036	0.067	0.059	0.167
161	0.184	0.113	0.229	0.143	0.267	0.118	0.333	193	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.056
163	0.026	0.050	0.000	0.018	0.000	0.029	0.056	195	0.105	0.150	0.000	0.143	0.033	0.044	0.000
165	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.044	0.000	197	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Oma2	38	40	24	28	15	34	9	199	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.059	0.000
121	0.000	0.000	0.000	0.018	0.067	0.000	0.000	201	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056
125	0.000	0.000	0.021	0.054	0.200	0.000	0.056	One111	38	40	24	28	15	34	9
127	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.074	0.000	153	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
129	0.092	0.125	0.063	0.268	0.167	0.162	0.111	157	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.029	0.000
131	0.105	0.100	0.250	0.125	0.133	0.015	0.111	165	0.276	0.338	0.125	0.125	0.267	0.103	0.167
133	0.158	0.150	0.021	0.071	0.100	0.088	0.222	169	0.474	0.475	0.542	0.375	0.167	0.500	0.500
135	0.092	0.063	0.146	0.071	0.067	0.015	0.056	173	0.237	0.175	0.313	0.482	0.500	0.353	0.333
137	0.013	0.038	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	177	0.000	0.013	0.021	0.018	0.033	0.015	0.000
139	0.026	0.025	0.000	0.000	0.000	0.088	0.000	Omi87TUF	38	40	24	28	15	34	9
141	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000	100	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
143	0.000	0.013	0.021	0.000	0.000	0.074	0.111	108	0.066	0.050	0.083	0.000	0.000	0.015	0.000
145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	110	0.013	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
147	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	112	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000
149	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.056	114	0.316	0.338	0.271	0.214	0.133	0.250	0.389
153	0.000	0.013	0.000	0.018	0.000	0.015	0.000	116	0.171	0.225	0.250	0.375	0.500	0.235	0.222
155	0.118	0.063	0.104	0.018	0.033	0.000	0.000	118	0.276	0.288	0.250	0.339	0.233	0.294	0.222
157	0.000	0.038	0.000	0.000	0.067	0.044	0.000	120	0.039	0.013	0.083	0.036	0.067	0.074	0.000
159	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.162	0.000	122	0.066	0.013	0.021	0.036	0.067	0.029	0.056
161	0.000	0.038	0.000	0.036	0.133	0.029	0.056	124	0.026	0.050	0.021	0.000	0.000	0.074	0.111
163	0.066	0.150	0.250	0.179	0.033	0.074	0.167	136	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Sample abbreviations are listed in Table 1. Private alleles are indicated in bold.

Table 4. Variability at six microsatellite loci in masu salmon samples examined

Loci		Variation within each sample						
		SHA01F	SHA01M	rSHA08	SUK04F	rSUK04	LUT04F	rLUT04
Oma3ke	<i>N</i>	39	39	24	28	15	34	10
	<i>Na</i>	9	8	9	10	8	9	7
	<i>Ar</i>	5.85	5.97	6.06	7.01	6.82	6.49	7.00
	<i>ho</i>	0.538	0.615	0.583	0.893	0.933	0.676	0.900
	<i>he</i>	0.676	0.766	0.718	0.810	0.823	0.774	0.826
Oma4my	<i>P</i>	0.014	0.003	0.278	0.705	0.891	0.014	0.671
	<i>Na</i>	7	7	5	7	5	7	5
	<i>Ar</i>	5.20	5.45	4.57	5.93	4.79	5.22	5.00
	<i>ho</i>	0.667	0.744	0.750	0.750	0.933	0.618	0.900
	<i>he</i>	0.751	0.697	0.738	0.832	0.779	0.730	0.779
Oma02	<i>P</i>	0.696	0.754	0.727	0.053	0.284	0.477	1.000
	<i>Na</i>	15	17	12	14	10	20	10
	<i>Ar</i>	9.96	10.18	7.67	8.72	8.65	10.63	10.00
	<i>ho</i>	0.923	0.846	0.833	0.893	0.933	0.765	0.900
	<i>he</i>	0.920	0.918	0.850	0.874	0.901	0.922	0.932
Ots520	<i>P</i>	0.666	0.014	0.964	0.227	0.916	0.002	0.725
	<i>Na</i>	12	12	10	12	10	13	8
	<i>Ar</i>	7.79	7.32	7.32	8.26	8.76	9.20	8.00
	<i>ho</i>	0.667	0.718	0.625	0.857	0.800	0.765	0.800
	<i>he</i>	0.854	0.811	0.835	0.873	0.901	0.903	0.900
One111	<i>P</i>	0.023	0.671	0.108	0.881	0.174	0.010	0.229
	<i>Na</i>	4	4	4	4	5	5	3
	<i>Ar</i>	3.23	3.21	3.33	3.27	4.19	3.62	3.00
	<i>ho</i>	0.692	0.769	0.417	0.607	0.733	0.706	0.500
	<i>he</i>	0.650	0.640	0.618	0.622	0.671	0.623	0.668
Omi87TUF	<i>P</i>	0.822	0.256	0.061	0.732	0.257	0.440	0.347
	<i>Na</i>	9	8	8	5	5	8	5
	<i>Ar</i>	6.12	5.14	5.84	4.08	4.68	5.78	5.00
	<i>ho</i>	0.744	0.641	0.833	0.714	0.733	0.824	0.600
	<i>he</i>	0.796	0.750	0.803	0.708	0.692	0.795	0.789
Mean	<i>P</i>	0.451	0.788	0.571	0.863	0.795	0.495	0.329
	<i>Na</i>	9.33	9.33	8.00	8.67	7.17	10.33	6.33
	<i>Ar</i>	6.36	6.21	5.80	6.21	6.32	6.82	6.33
	<i>ho</i>	0.705	0.722	0.674	0.786	0.844	0.725	0.767
	<i>he</i>	0.775	0.764	0.760	0.787	0.795	0.791	0.816
Pooled F_{IS}	F_{IS}	0.095	0.053	0.114	0.001	-0.065	0.084	0.075
			0.087		-0.016		0.081	

Sample abbreviations are listed in Table 1.

N, number of individuals; *Na*, number of alleles; *Ar*, allelic richness; *he*, expected heterozygosity; *ho*, observed; heterozygosities; *P*, probability value estimates regarding departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE); *F_{IS}* and pooled *F_{IS}*, inbreeding coefficient of each sample and the pooled ones combining anadromous and non-anadromous forms in each river, respectively.

The *P* value suggesting significant departure from HWE is shown in bold, which, however, is not supported following adjustment for multiple tests with the sequential Bonferroni method ($k = 42$).

Population genetic analysis

Pairwise sample F_{ST} estimates using both mtDNA *ND5* and msDNA markers under Bonferroni correction suggested no significant difference between both females and males of anadromous form in the Shari River, although significant difference was shown between anadromous (both female and male) and non-anadromous (all male) samples in this river with msDNA markers (Table 5). Similar difference between the two forms was found in the

Sukhopletka River, but not in the Lutga River (Table 5). This may be related to the smallest samples size in the latter (Table 1). Nonsignificant difference between the two forms in the same river was shown with the mtDNA marker, which, however, suggested significant difference among non-anadromous and anadromous samples from different rivers in Japan and Russia, excepting between the anadromous females in the Shari River and non-anadromous males in the Lutga River (Table 5). In addition, pairwise

Table 5. Estimated pairwise ϕ_{ST} (mtDNA data, above diagonal) and F_{ST} (msDNA data, below diagonal) values among 7 masu salmon samples in Hokkaido and Sakhalin.

Statistical significance was tested using the exact test after sequential Bonferroni adjustments (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$).

	SHA01 F	SHA01M	rSHA08	SUK04F	rSUK04	LUT04F	rLUT04
SHA01F		0.0249	-0.0106	0.3186**	0.1904*	0.2052**	0.1812**
SHA01M	0.0003		0.0368	0.2101*	0.0813	0.0916*	0.0886*
rSHA08	0.0100*	0.0178**		0.4476**	0.2683*	0.2634**	0.2455**
SUK04F	0.0411**	0.0500**	0.0319**		0.0444	0.0549	0.1167**
rSUK04	0.0580**	0.0702**	0.0570**	0.0118**		-0.0146	-0.0194
LUT04F	0.0183**	0.0308**	0.0210**	0.0242**	0.0406**		-0.0322
rLUT04	-0.0025	0.0075	0.0007	0.0086	0.0186	-0.0008	

Sample abbreviations are listed in Table 1. Bold values denote to those from comparison within the same river.

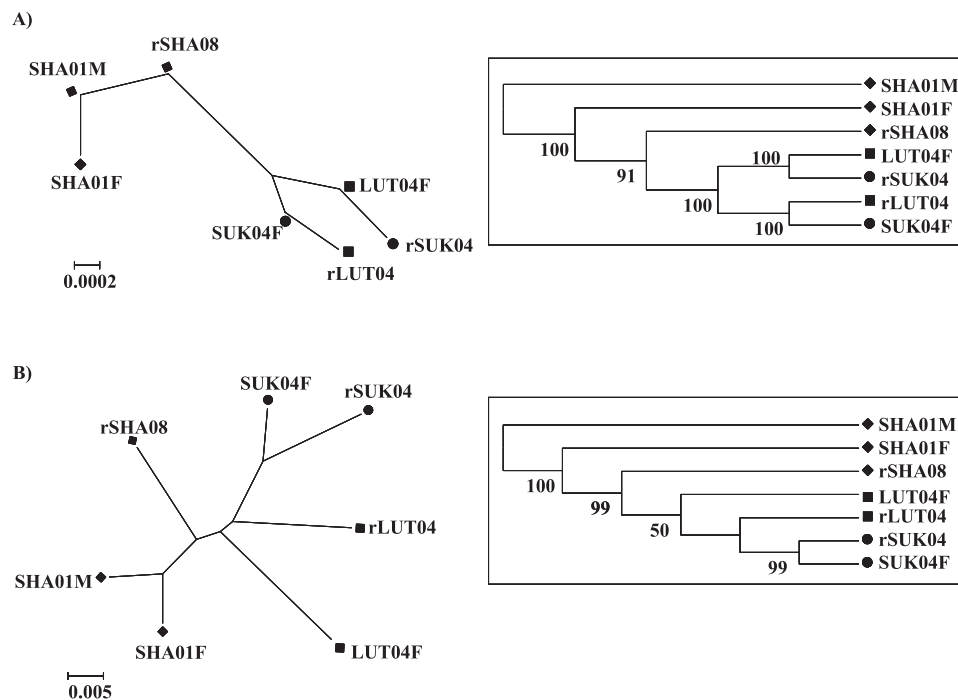


Figure 3. Unrooted NJ tree showing genetic distance among samples, based on mtDNA (A) and msDNA data (B). In the inset, the topology of the consensus tree is shown with nodal values for bootstrap support over 50% of the 1000 replicated trees. Sample abbreviations are listed in Table 1.

estimates were larger among samples from different locals than between the two life-history forms in the same river (Table 5).

The unrooted NJ trees based on the msDNA data using Cavalli-Sforza genetic distance clustered the two forms from the same rivers, but not the same forms from the different rivers (Figure 3). On the other hand, such a regional cluster was not apparent with mtDNA data, particularly for the samples from two Russian rivers (Figure 3).

Discussion

The present molecular genetic findings obtained from masu salmon samples in Hokkaido and

Sakhalin using mtDNA and msDNA markers would deserve emphasis in relation to 1) possible genetic differentiation between sympatric two life-history forms of masu salmon, 2) larger genetic divergence among allopatric samples than between sympatric life-history forms, and 3) different potential of mtDNA and msDNA markers to estimate the genetic divergence between or among samples.

Sympatric life-history forms of salmon have previously been shown to be genetically interrelated³²⁾ and more genetically similar within a locale than between regions³³⁾, suggesting that life-history forms are not derived from separate genetic lineages. In this context, a possible genetic differentiation between

anadromous and non-anadromous forms of masu salmon observed herein is intriguing finding, although this was inferred from pairwise F_{ST} estimates with only msDNA markers (Table 5). Alternative interpretation for this finding may include demographic fluctuation of populations, as both life-history forms examined are unknown as to whether they are fish of the same generations. Non-anadromous masu salmon, if not all, are known to be iteroparous or attain multiple reproduction in the life¹⁾. On the other hand, no notable genetic differentiation between different year classes of homing, semelparous masu salmon has been reported in the previous studies using allozymes³⁴⁾ and microsatellite DNA markers³⁵⁾. In addition, no genetic heterogeneity among four yearly collections of homing masu salmon in a river of Hokkaido also was found using mtDNA and msDNA markers (unpublished data). Considering these together, demographic fluctuation of populations seems not plausible or less possible than genetic divergence for interpretation of the results given in Table 5. Similar, if not the same, genetic differentiation between life-history forms has been reported for rainbow trout¹⁰⁾. Since this iteroparous trout have different life history to that of semelparous masu salmon like other *Oncorhynchus* species, the present and the previously reported findings may not be compared directly. The present findings thus suggest the possibility of moderately restricted gene flow between the two life history forms of masu salmon in the same river.

The obtained pairwise F_{ST} estimates and NJ tree suggest that anadromous and non-anadromous masu salmon are more genetically similar within each river than among rivers (Figure 3). This finding and the occurrence of the same mtDNA haplotypes and sharing many alleles between the two sympatric life-history forms, as well as among allopatric samples in Japan and Russia (Tables 2 and 3), seem to favor a common genetic lineage of the two life-history forms as has been suggested previously^{32–33)}. The observed mild but significant differentiation between the two life-history forms of masu salmon is likely related to a male-biased restriction of gene flow in the same river, as the occurrence of precociously matured males or river-residents would help gene

flow within anadromous and non-anadromous forms but limit between the two life-history forms.

The present findings also suggest different potential of mtDNA and msDNA markers in estimation of gene flow among the examined samples. Similar discordance in the population genetic inference has been observed previously in masu salmon¹⁷⁾ and some other fish species³⁴⁾. The observed discordance can be explained partly by the differences in the modes of inheritance in the two marker systems, i.e. both parental msDNA vs. matrilineal mtDNA, and differential mutation rates between the two markers³⁵⁾. In addition, a difference larger than expected has been reported to be due to sex-biased gene flow among populations in other animals^{36–37)}. As mentioned earlier, the occurrence of non-anadromous males is associated with their precocious sexual maturation¹⁾. Therefore, male-biased occurrence of non-anadromous form of masu salmon might also influence the observed discordance in estimation of gene flow, particularly for the results of pairwise F_{ST} estimates herein.

The present study analyzing the small size of samples from three rivers is actually preliminary in nature. The obtained findings should be evaluated with the findings from more river systems, since the present population genetic features might reflect particular ecological or demographic conditions in the examined rivers. Further population genetic analyses using increased sample sizes from more river systems in the Far East would help understand the pattern of gene flow between the two life-history forms of masu salmon. The genetic relationships between the life-history forms would provide a clue to conservation and managements of wild salmon populations, which therefore would allow sustainable use of salmon resources.

Acknowledgments

The present work was partly supported by Grants-in-Aid from the Northern Advancement Center for Science and Technology, Fishery Agency of Japan, and the 21st COE program (K-2) from the Ministry of Education, Sports, Culture, Science and Technology, Japan.

References

- 1) Kato, F. (1991) Life histories of masu and amago salmon (*Oncorhynchus masou* and *Oncorhynchus rhodurus*). In "Pacific salmon life histories" Eds. by C. Groot and L. Margolis, UBC Press, Vancouver, pp 396-414.
- 2) Wilson, G. M., W. K. Thomas and A. T. Beckenbach (1985) Intra- and inter-specific mitochondrial DNA sequence divergence in *Salmo*: rainbow, steelhead, and cutthroat trouts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 63, 2088-2095.
- 3) Burgner, R.L. (1991) Life histories of Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). In "Pacific salmon life histories" Eds. by C. Groot and L. Margolis, UBC Press, Vancouver, pp 1-117.
- 4) Koseki, Y. and K. Maekawa (2002) Differential energy allocation of alternative male tactics in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 59: 1717-1723.
- 5) Gross, M. R. (1996) Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trend. Ecol. Evol.*, 11: 92-98.
- 6) Myers, R.A., J.A. Hutching and R.J. Gibson (1986) Variation in male parr maturation within and among populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 1242-1248.
- 7) Brockman, H.J. (2001) The evolution of alternative strategies and tactics. *Adv. Stud. Behav.*, 30: 1-51.
- 8) Jones, M.W. and J.A. Hutchings (2002) Individual variation in Atlantic salmon fertilization success: implications for effective population size. *Ecol. Applicat.*, 12: 184-193.
- 9) Young, K.A. (1999) Managing the decline of Pacific salmon : metapopulation theory and artificial recolonization as ecological mitigation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 56: 1700-1706.
- 10) Narum, S.R., C. Contor, A. Talbot. and M.S Powell (2004) Genetic divergence of sympatric resident and anadromous forms of *Oncorhynchus mykiss* in the Walla Walla River, USA. *J. Fish Biol.*, 65: 471-488.
- 11) Hindar, K. 1986. Genetic differentiation among local populations and morphotypes of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Biol. J. Linnean Soc.*, 27: 269-285.
- 12) Hindar K, B. J. Jonsson, N. Ryman and G. Stahs (1991) Genetic relationships among landlocked, resident, and anadromous Brown Trout, *Salmo trutta*. *Heredity*, 66: 83-91.
- 13) Devlin, R. H., C. A. Biagi and D. E. Smailus (2001) Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. *Genetica*, 111: 43-58.
- 14) Devlin, R. H., (1993) sequence of sockeye salmon type 1 and 2 growth hormone genes and the relationship of rainbow trout with Atlantic and Pacific salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: pp. 1738-1748.
- 15) Zhang, Q., I. Nakayama, A. Fujiwara, T. Kobayashi, I. Oohara, T. Masaoka, S. Kitamura and R.H. Devlin (2001) Sex identification by male-specific growth hormone pseudogene (*GH-Ψ*) in *Oncorhynchus masou* complex and a related hybrid. *Genetica*, 111: 111-118.
- 16) Kitanish, S., K. Edo, T. Yamamoto, N. Azuma, O. Hasegawa and S. Higashi (2007) Genetic structure of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) populations in Hokkaido, northernmost Japan, inferred from mitochondrial DNA variation. *J. Fish Biol.*, 71: 437-452.
- 17) Yu, J.-N., N. Azuma, M. Yoon, V. Brykov, S. Urawa, M. Nagata, D.-H. Jin and S. Abe. (2009) Genetic population structure and phylogeography of masu salmon (*Oncorhynchus masou masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Zool. Sci.*, in press.
- 18) Noguchi, D., M. Ikeda, M. Nakajima and N. Taniguchi (2003) Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for population genetics study of masu salmon, *Oncorhynchus masou masou*. *Fish. Genet. Breed. Sci.*, 33: 61-66 (in Japanese with English abstract)
- 19) Takayama, Y., M. Rand-Weaver, H. Kawauchi and M. Ono (1991) Gene structure of chum salmon somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family. *Mol. Endocrinol.*, 5: 778-786.
- 20) Andersson, E., B. Peixoto, V. Tormanen and T. Matsunaga (1995) Evolution of the immunoglobulin M constant region genes of salmonid fish, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): implications concerning divergence time of species. *Immunogenetics*, 41: 312-315.
- 21) Naish, K. A. and L. K. Park (2002) Linkage relationships for 35 new microsatellite loci in chinook salmon

- Oncorhynchus tshawytscha*. Anim. Genet., 33: 312–327.
- 22) Olsen, J.B., S.L. Wilson, E.J. Kretschmer, K.C. Jones and J.E. Seeb. (2000) Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon. Mol. Ecol., 9: 2155–2234.
 - 23) Hara, T., T. Nagase, T. Kuwada, T. Tokuhara, A. Ozaki and N. Okamoto (2005) Amago salmon microsatellite markers (unpublished) GenBank: AB213231.
 - 24) Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinform. Online, 1: 47–50.
 - 25) Raymond, M. and F. Rousset (2004) Genepop (version 3.4): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. Available at: <http://genepop.curtin.edu.au/>.
 - 26) Goudet, J. (2001) FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995)
 - 27) Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406–425.
 - 28) Felsenstein, J. (2004) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
 - 29) Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16: 111–120.
 - 30) Cavalli-Sforza, L. L. and A. W. F. Edwards (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Am. J. Hum. Genet. 19: 233–257.
 - 31) Page, R. D. M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci., 12: 357–358.
 - 32) Ryman, N. (1983) Patterns of distribution of biochemical variation in salmonids: differences between species. In “Genetics in Aquaculture” Eds. by Wilkins, N. P. and E. M. Gosling, Elsevier Press, Amsterdam, pp. 1–22.
 - 33) Stahl, G. (1987) Genetic population structure in Atlantic salmon. In “Population Genetics and Fisheries Management” Eds. by Ryman, N. and F. Utter, University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 121–140.
 - 34) Okazaki, T. (1986) Genetic variation and population structure in masu salmon *Oncorhynchus masou* of Japan. Bul. Japan. Soc. Sci. Fish., 52: 1365–1376.
 - 35) Noguchi, D. and N. Taniguchi (2007) Studies on the genetic diversity of wild populations of masu salmon, *Oncorhynchus masou masou*, by microsatellite DNA markers. Aquacult. Sci., 55: 521–527 (in Japanese with English abstract)
 - 36) Lu, G., D. J. Basley and L. Bernatchez (2001) Contrasting patterns of mitochondrial DNA and microsatellite introgressive hybridization between lineages of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*); relevance for speciation. Mol. Ecol., 10: 965–985.
 - 37) Meyer, A. (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In “Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Vol. 2” Eds. by Hochachka, P.W. and T. P. Mommsen, Elsevier, Amsterdam, pp. 1–38.
 - 38) Nyakaana, S. and P. Arctander (1999) Population genetic structure of the African elephant in Uganda based on variation at mitochondrial and nuclear loci: evidence for male-biased gene flow. Mol. Ecol., 8: 1105–1115.
 - 39) Doums, C., H. Cabrera and C. Peeter (2002) Population genetic structure and male-biased dispersal in the queenless ant, *Diacamma cyaneiventris*. Mol. Ecol., 11: 2251–2264.

DNA マーカーによるサクラマスの降海型と 河川残留型の間の遺伝的關係

劉 正南（北大院水）・東 典子（北大）・Vladimir Brykov（ロシア科学アカデミー）
浦和茂彦（さけ・ます資源管理セ）・阿部周一（北大院水）

同一河川におけるサクラマスの降海型と河川残留型の間の遺伝的關係を明らかにするため、北海道の斜里川およびサハリンの2河川から採集した個体標本を用いて、ミトコンドリア DNA *ND5* 遺伝子領域および6座のマイクロサテライト DNA を用いて分析を行った。河川残留型個体は Y 染色体連鎖 *GH-Y* 分析において雄と判別された。マイクロサテライト DNA による F_{ST} 分析と近隣結合樹の結果から、同一河川の降海型と残留型の遺伝的差異が示唆されたが、ミトコンドリア DNA では確認されなかった。また、遺伝的分化の程度は、同一河川の生活史二型の間よりも異なる河川間の標本集団の間で大きかった。本研究の結果から、同一河川のサクラマスの降海型と河川残留型の間に遺伝的違いがあることが示唆された。

韓国、中国から輸入されたシジミと 日本産ヤマトシジミ貝殻 Sr/Ca 比の比較

古丸 明・尾之内健次・柳瀬泰宏（三重大院生資）・長崎勝康（地独 青森内水研）
大竹二雄（東京大学海洋研究所国際沿岸海洋研究センター）

Comparison of Sr/Ca ratio of the *Corbicula japonica* shells collected in Japan, imported *C. japonica* from Korea and *C. largillierti* from China

Akira KOMARU^{*1}, Kenji ONOUCHI^{*1}, Yasuhiro YANASE^{*1},
Katuyasu NAGASAKI^{*2} and Tsuguo OTAKE^{*3}

^{*1} Graduate School of Bioresources, Mie University

^{*2} Aomori Industrial Technology Research Center, Inland water Fisheries Institute

^{*3} International Coastal Research Center, Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

We examined the Strontium (Sr) to Calcium (Ca) ratios of the *Corbicula japonica* collected from Lake Jusan, Lake Ogawara, Ibi River and imported *C. japonica* from Korea and *C. largillierti* from Lake Taihu with an electron probe micro analyzer (EPMA). *C. japonica* collected from Lake Jusan and Ibi River estuary showed high Sr/Ca ratios in the shell: 5.87 ± 0.86 and 5.50 ± 1.10 , respectively. The ratios of *C. japonica* of northern part and southern part from low salinity Lake Ogawara were 4.02 ± 0.67 and 3.71 ± 0.43 , respectively. Ibi River samples collected at 17 km from river mouth showed lowest Sr/Ca ratios 1.38 ± 0.49 in *C. japonica*. The fresh water species *C. leana* also showed low Sr/Ca ratios (1.65 ± 0.11). *C. largillierti* from Lake Taihu showed low ratios (1.37 ± 0.20). These results indicates that Lake Taihu is freshwater lake. On the contrary, four of eight *C. japonica* samples imported from Korea showed very low Sr/Ca ratios (0.94 ± 0.42) and the remaining four samples showed high Sr/Ca ratios (4.81 ± 0.94). These results suggest that the samples may be collected from different site, the former was freshwater region and the latter was from the estuary.

(accepted January 16, 2010)

耳石に含まれるストロンチウムとカルシウムの比 (Sr/Ca 比) から、降海履歴や遡河履歴を明らかにし、生活史を解明する研究が多く、魚種で行われている¹⁾⁻⁵⁾。貝類においては、生息地の塩分と貝殻中の Sr/Ca 比の関係や、水温や成長速度と貝殻中の微量元素含有量との相関について研究がなされている⁶⁾⁻⁹⁾。二枚貝類の場合、生息水域の塩分と、貝殻中の Sr/Ca 比の間に相関があることが明らかにされている¹⁰⁾。海産二枚貝の貝殻中の Sr、Mg 等のイオン濃度は高く、淡水産二枚貝で低い傾向がある¹¹⁾。一方、Sr/Ca 比は成長速度との間に正の相関が見いだされる場合と相関

が見いだされない場合があり、種によって異なっていることが報告されている¹²⁾。

我々はヤマトシジミを含む *Corbicula* 属のシジミにおいて、生息地の塩分と貝殻中の Sr/Ca 比との関係を明らかにした¹³⁾。高塩分汽水湖である神西湖、宍道湖に生息するヤマトシジミでは貝殻中の Sr/Ca 比が高く、低塩分である小川原湖では値が低い傾向が見られた。また、淡水域に生息するマシジミでは値が最も低かった。すなわち生息水域の塩分と貝殻中の Sr/Ca 比の間には一定の傾向がみられることが判明した。これらの結果から、採集地の情報がほとんど無い輸入シ

ジミにおいて、貝殻中の Sr/Ca 比から、生息地の塩分の推定が可能になるかもしれない。

国内におけるヤマトシジミ資源が減少し、それを補うように中国や韓国などからシジミが大量に輸入されるようになった¹⁴⁾。これに伴い、海外から安く輸入したシジミに国内の有名なヤマトシジミ産地の表示を付けて流通させる、いわゆる産地偽装がしばしば行われるようになった。産地偽装を防ぐためには産地判別法の開発が必要である。ミトコンドリア DNA の解析により、国産のヤマトシジミと輸入されたシジミを判別することが可能であることを既に報告した¹⁵⁾。この方法に加え、貝殻から原産地の塩分濃度の情報を得ることができれば、産地表示されている場所の塩分と貝殻の Sr/Ca 比との間に矛盾があった場合、産地偽装を検出する根拠になり得るであろう。また、軟体部が利用できない場合にも、残された貝殻から産地偽装を検出する手法の開発も必要である。

本研究では、新しい産地に加えて、同じ産地でも異なる塩分環境の水域に生息しているヤマトシジミを分析に加えた。まず、青森県におけるヤマトシジミの二大産地、十三湖、小川原湖において採集された標本の分析を行った。十三湖は津軽半島の北部に位置し、湖の北岸に沿って日本海から海水が流入するため、北側は海水の大きな影響を受ける。湖の北側は塩分が高く、30 psu を超える¹⁶⁾。今回は湖北部の中島という地点で採集を行った。一方、小川原湖は下北半島の付け根に位置し、湖北部の高瀬川を介して太平洋とつながっている。海水は大潮満潮時にのみ高瀬川から流入する。小川原湖は海水流入が少なく、流入河川の影響を強く受け、周年塩分が低い湖として知られている^{13), 17)}。また、中部地方におけるヤマトシジミ主産地の揖斐川において、河口の標本と漁場の最も上流側の

標本との差を比較した。

中国、北朝鮮から輸入されるシジミについては、河川湖沼名等は分かる場合があるが、詳細な採集地点や環境に関する情報は得られないことが多い。輸入したシジミ標本の貝殻の Sr/Ca 比を産地の明らかな日本産ヤマトシジミのデータと比較し、生息地の塩分を推定することが可能かどうかを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

日本産ヤマトシジミとマシジミ 本研究で用いた材料は、小川原湖北部（通称倉内、st.1）、南部の小川原湖漁協前（通称タカトリ、st.2）、青森県十三湖中島周辺、愛知県揖斐川においてジョレンで採取されたヤマトシジミ *Corbicula japonica* を材料とした（Fig. 1）。揖斐川河口から17 km の岐阜県海津町帆引新田排水機場前（st. 4）と揖斐長良大橋下（河口から2.9 km、st. 5）で採取したシジミを材料とした。1 psu 以上の塩分が検出される水域を河口域とすれば、揖斐川の場合は河口から30 km の地点までが河口域にあたる¹⁸⁾。従って、河口から17 km の場所は、塩分の影響を受ける地点である。また、マシジミ *C. leana* のデータは既報¹³⁾ の壱岐島幡鉾川産のものを利用した。

中国産、北朝鮮産シジミ 北朝鮮「元山」という標示のあるヤマトシジミと中国太湖産 *C. largillierti* を国内の間屋を通じて入手した。

十三湖、小川原湖塩分・水温観測データ 小川原湖の2か所（Fig. 1）に設置された小型メモリー水温塩分計（アレック電子製 ALEC COMPACT-CT ACR-HR）により計測された塩分と水温のデータを用いた。また、十三湖に関しては青森県内水面研究所で観測したデータを利用した。揖斐川においては塩分と水温の

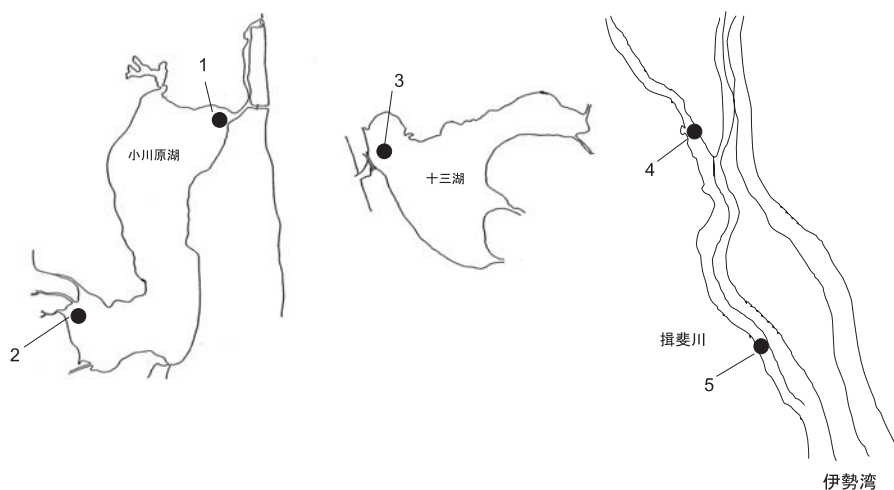


Fig. 1. The sampling sites of the *Corbicula japonica* at Lake Ogawara (st.1, st.2), Lake Jusan (st.3) and Ibi River (st.4; 17 km from river mouth, st.5; 2.9 km from river mouth).

測定は行っていない。

EPMA による貝殻中の Sr/Ca 比分析 既報¹³⁾の手法により、貝殻をエポキシ系樹脂 (SpiciFix-20, Struers 社) で包埋した。ダイヤモンドカッターで殻頂から殻縁辺部に向かって殻を切断し、スライドガラス上に貼り付けた。グラインダーで試料が適切な厚さになるまで削り、粒径70 mm のダイヤモンドカップ砥石で表面を平滑にし、その後に 3 M 社製ラッピングフィルムシートで研磨した。さらに琢磨装置 (Rotopol-35 Struers 社) 上でダイヤモンドペースト (Struers 社)、次に二酸化シリコンを使って研磨面を鏡面に仕上げた。この試料に白金パラジウムをコーティングし分析に供した。

まず、EPMA 装置 (JXA-8900 日本電子) によって螺番から殻の先端部方向 3 mm の部位において、殻の内側 (軟体部側) を原点とし、外側 (殻皮側) に向かって 5 μm 間隔で内殻層における Sr と Ca の濃度を測定し、両者の濃度比を求めた。線分析における加速電圧とビーム電流をそれぞれ、15 kV, 6 $\times 10^{-8}$ A とし、ビーム径は 5 μm とした。今回測定した部位は、内殻層の部分のみである。本論文では求めた Sr/ と Ca の濃度比を 10^3 倍した値を Sr/Ca 比として用いた。

結 果

塩分・水温観測結果 Fig. 2 に十三湖中島、小川原湖北部、小川原湖南部の 3 地点の塩分と水温の観測結果を示した。十三湖においては、塩分の変化が極めて大きく、30 psu 前後の高い塩分を示す時期もあるが、短期間で大きく変化し、0 psu に近い値となる時期もあった。しかし塩分が10 psuを超えている時期が比較的長期にわたっていた。小川原湖南部のタカトリにおいては、塩分は調査期間中 1 psu 前後の低い値を示しほとんど変化がみられなかった。同じ小川原湖北部の倉内においては、塩分がごく短期間上昇することが明らかになった。ただし、塩分の上昇は一時的で、20 psu 以上に上昇するが直ちに低下し、2 psu 前後に戻っていた。

EPMA による測定結果 各個体の線分析の結果を採集地ごとに Figs. 3-9 に示した。また各採集地における 1 個体の Sr/Ca 比の分析値の平均値を Fig. 10 に示した。

十三湖の標本は最も Sr/Ca 比が高く (Fig. 3)、6 個体の平均値は 5.87 ± 0.86 であった。各個体における最大値は12以上を示し、最小値は 0 であった。また、原点側 (貝殻の外套膜側) で値が高く、徐々に貝殻外側に向かうほど値が低下する傾向が見られた。

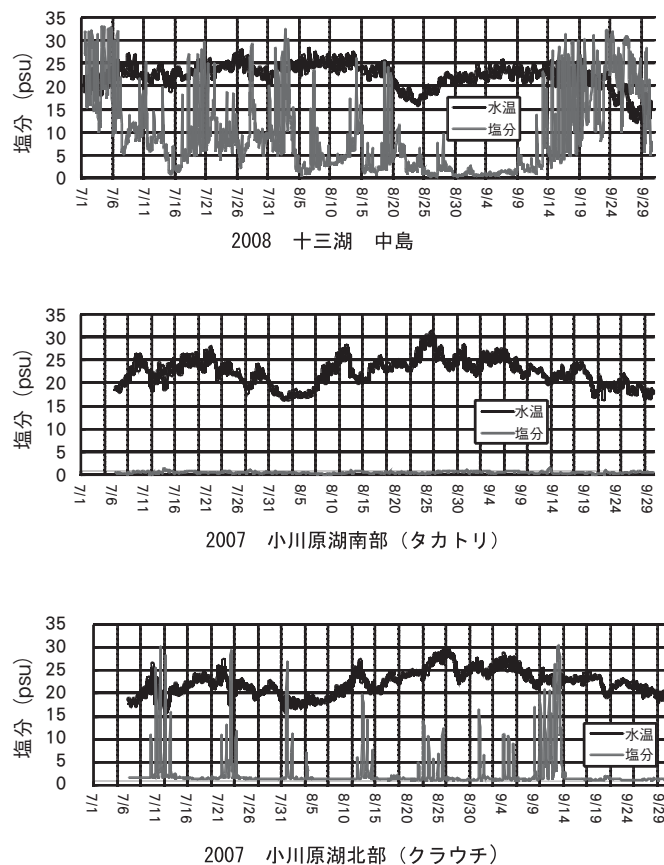


Fig. 2. Salinity and water temperature in and Lake Jusan (Aomori Pref.) and Lake Ogawara (Aomori Pref.).

小川原湖の標本 (Figs. 4, 5) では十三湖標本より Sr/Ca 比がやや低く、北部の倉内標本の平均値は 4.02 ± 0.67 、南部のタカトリ標本平均値は 3.71 ± 0.43 であ

り、両者の平均値に有意差は無かった。

揖斐川河口のヤマトシジミは十三湖について、各個体の平均値が高い値 5.50 ± 1.10 を示した (Fig. 6)。一

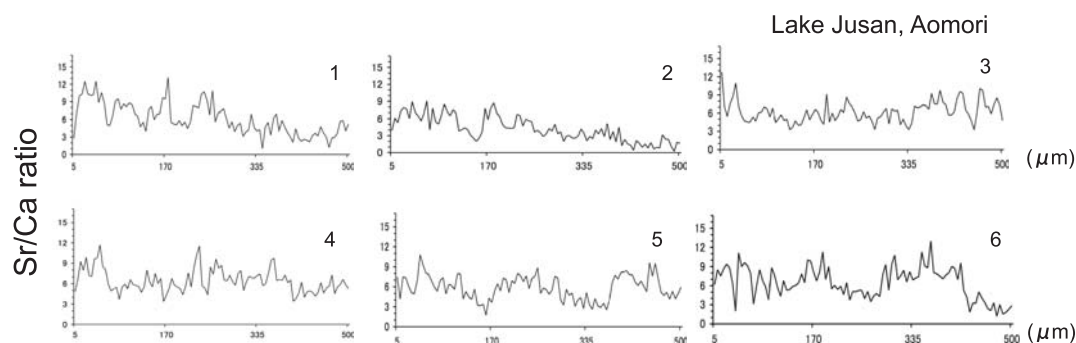


Fig. 3. Sr/Ca ratio profile of shell transection in inner calcareous layer of *Corbicula japonica* collected from Lake Jusan (Aomori Pref.) analyzed with EPMA. The number represents specimen number.

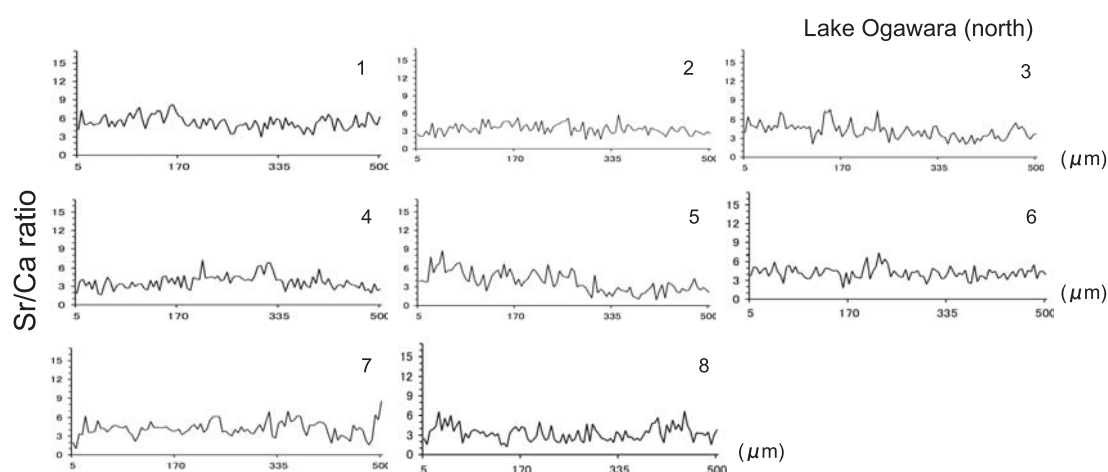


Fig. 4. Sr/Ca ratio profile of shell transection in inner calcareous layer of *Corbicula japonica* collected from northern Lake Ogawara (Aomori Pref.) analyzed with EPMA. The number represents specimen number.

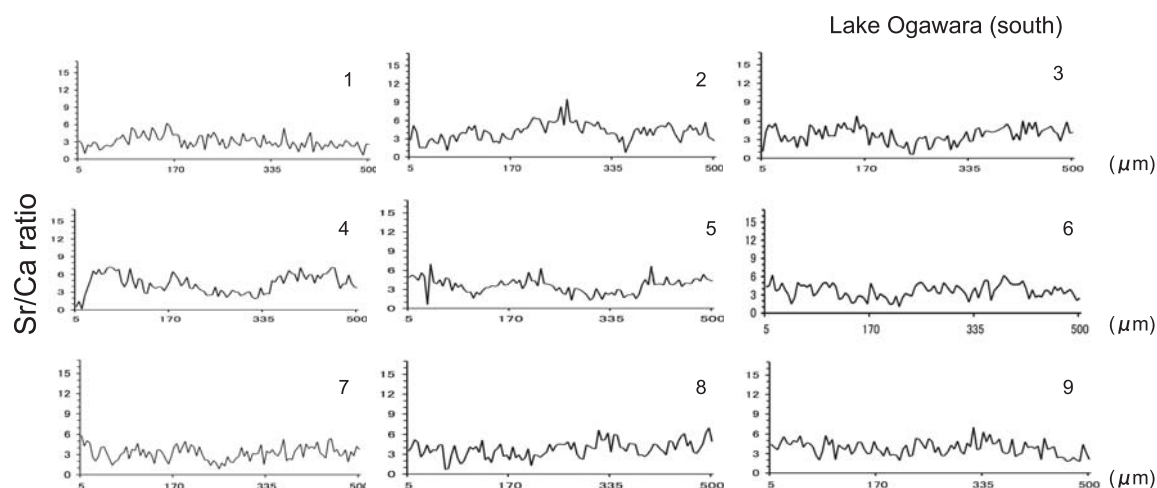


Fig. 5. Sr/Ca ratio profile of shell transection in inner calcareous layer of *Corbicula japonica* collected from southern Lake Ogawara (Aomori Pref.) analyzed with EPMA. The number represents specimen number.

方、揖斐川河口から17 km の地点で採集された標本では Sr/Ca 比はいずれの個体においても低く (Fig. 7)、平均値は 1.38 ± 0.49 で淡水域マシジミの平均値 1.65 ± 0.32 とほぼ同じ低い値であった。

北朝鮮から輸入されたヤマトシジミは、同一のロットとして輸入された標本であるが、個体によって Sr/Ca 比が大きく異なっていた。8 個体分析して平均が1以下の低い値を示す4個体 (0.94 ± 0.42) と5前後の値を示す4個体 (4.81 ± 0.94) とに分れた (Fig. 8)。中国太湖の *C. largillierii* では Sr/Ca 比はいずれの個体も低い値を示し (Fig. 9)、平均値は 1.37 ± 0.20 であった。

論 議

貝殻中の Sr/Ca 比は海水中の塩分の影響を受ける。そのため、同じヤマトシジミでも、生息環境によって、貝殻中の Sr/Ca 比は大きく異なっていた¹³⁾。ヤマトシジミは生息地の塩分の変化にともない体液の浸透圧も変化する。そのため生息場所の塩分濃度に応じた Sr が貝殻中に取り込まれると考えられる。塩分が高い十三湖、揖斐川河口域においては Sr/Ca 値が高かつ

た。一方、揖斐川のヤマトシジミでも河口から17 km の地点で採集された標本においては、2 以下の低い値を示した。おそらく、小川原湖ヤマトシジミや淡水産マシジミの Sr/Ca 値から判断して、揖斐川のこの地点は大潮満潮時以外には塩分が 1 psu 以下であることが推察される。

一方、小川原湖では、北部、南部とも底層の塩分が測定期間を通じて 1 psu 前後であり、そのためか Sr/Ca 比は 3–4 の値で安定していた。汽水域は塩分が潮汐の影響を受けて絶えず変化するため、塩分と貝殻中に取り込まれた Sr/Ca 比の間の厳密な相関をとらえるのは困難である。しかし、既報や本研究の結果から、塩分と Sr/Ca 比との間には、一定の傾向があることを読み取ることができる。小川原湖のように塩分が低くても貝殻中の Sr/Ca 比は 3–4 を示した。また淡水域に生息していたマシジミは 2 以下の値を示した。また揖斐川中流域でも値がマシジミと同様 2 以下であった。

これらの結果から、貝殻の Sr/Ca 比が 2 以下の個体は淡水域に生息していたと推測することができる。

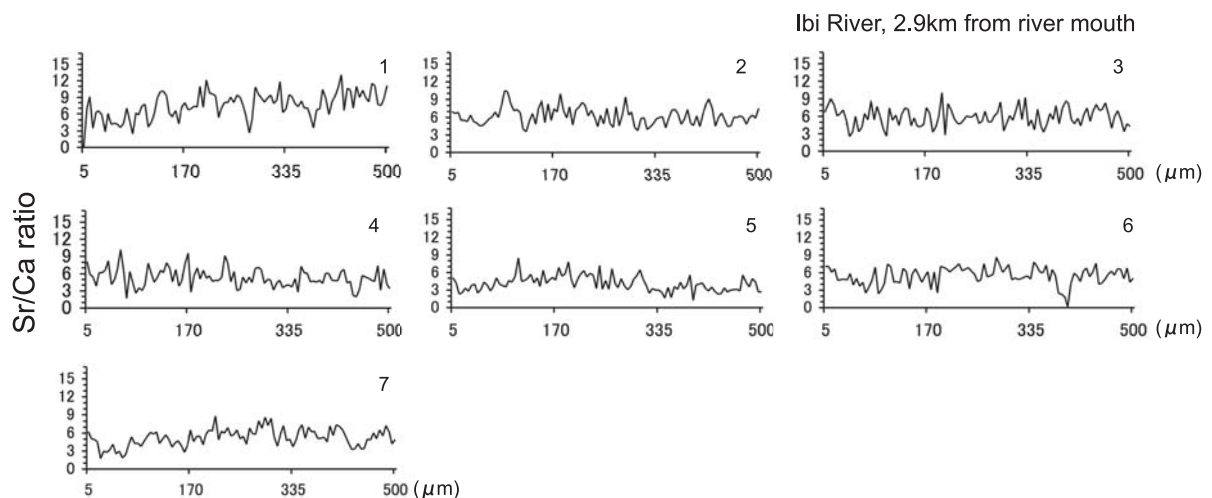


Fig. 6. Sr/Ca ratio profile of shell transsection in inner calcareous layer of *Corbicula japonica* collected from Ibi River estuary (Aichi Pref.) analyzed with EPMA. The number represents specimen number.

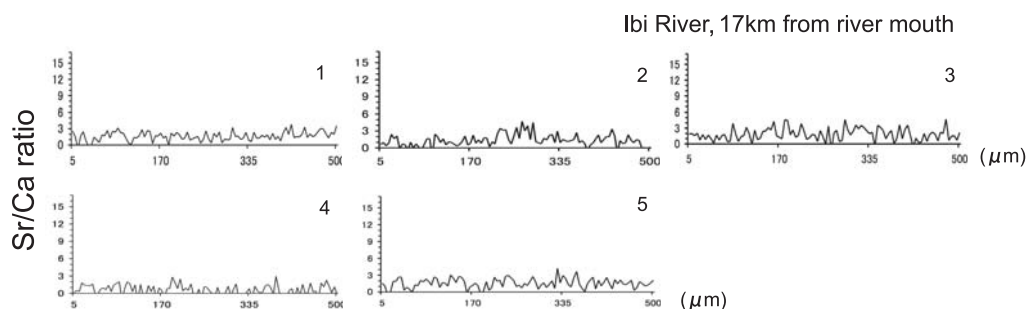


Fig. 7. Sr/Ca ratio profile of shell transsection in inner calcareous layer of *Corbicula japonica* collected from Ibi river 17 km from river mouth (Aichi Pref.) analyzed with EPMA. The number represents specimen number.

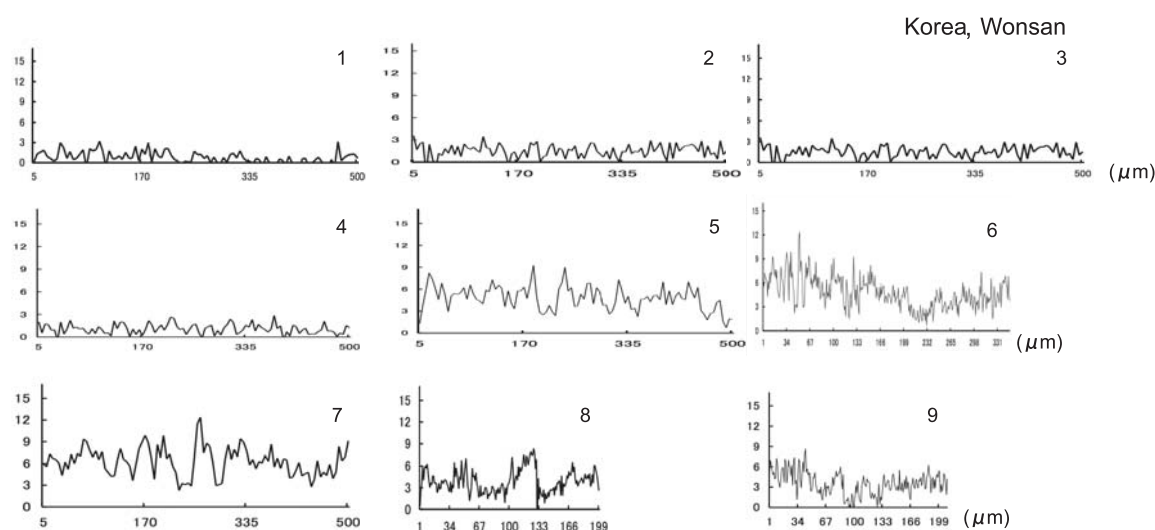


Fig. 8. Sr/Ca ratio profile of shell transsection in inner calcareous layer of *Corbicula japonica* collected from Wonsan (North Korea) analyzed with EPMA. The number represents specimen number.

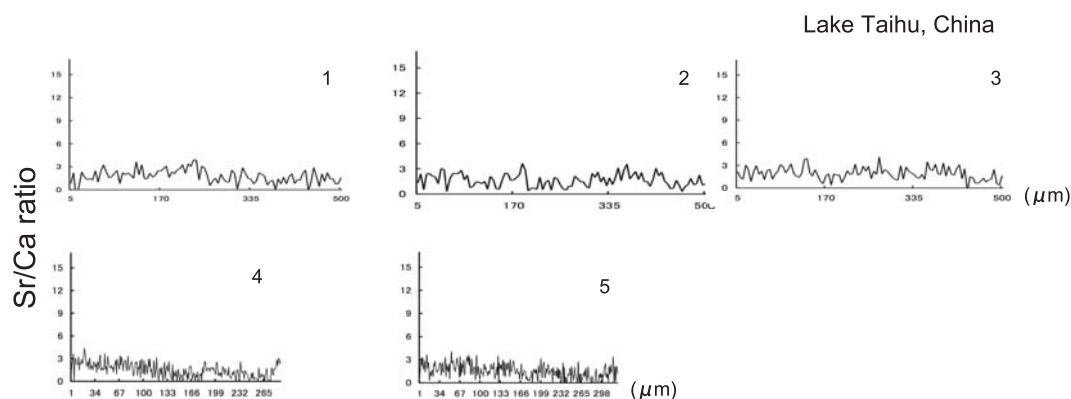


Fig. 9. Sr/Ca ratio profile of shell transsection in inner calcareous layer of *C. largillieriti* collected from Taihu (China) analyzed with EPMA. The number represents specimen number.

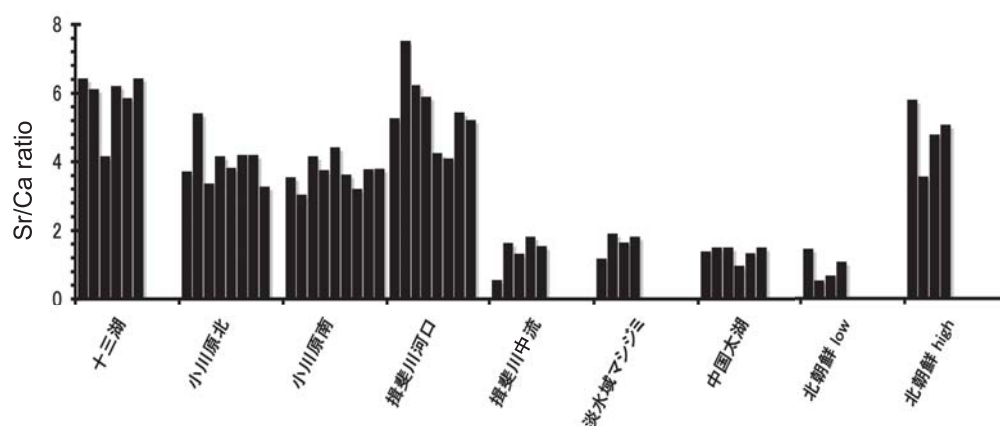


Fig. 10. Means of Sr/Ca ratio in inner calcareous layer of *Corbicula japonica* from Lakes Jusan, Lake Ogawara, Ibi River, Wonsan (North Korea), *C. leana* from Hatahoko River (Iki Island, Nagasaki Pref.), and *C. largillieriti* from Lake Taihu (China).

中国太湖標本もいずれも2以下であり、分析した個体は淡水域に生息していたと考えられる。また、北朝鮮産の標本は、Sr/Ca比が4前後の標本と、2以下の標

本とに別れた。この結果から、今回得られた北朝鮮の標本には、塩分が異なる水域で採取されたシジミが混在していたと考えられる。Sr/Ca比から判断して、河

川の中流域と河口で採取されたヤマトシジミが同一のロットとして輸入されたと考えられる。

生息水域の塩分と二枚貝貝殻中の Sr/Ca 比は相関があることが報告されている¹⁰⁾。海水中の Sr 濃度は淡水に比べて顕著に高く、それを反映して、海産二枚貝の貝殻の方が淡水産に較べて Sr/Ca 比が高い。塩分が 0 psu 以上 10 psu 以下では、塩分と貝殻中の Sr/Ca 比に相関があることが報告されている¹⁰⁾。ただし、塩分 10 psu の水域に生息していた貝と 35 psu に生息していた貝とでは、Sr/Ca 比が大きな違いがなかったことも示されている。従って、10 psu 以上の水域に生息している標本では、塩分が高くなってもそれにとってもって Sr/Ca 比は上昇せず、ほぼ一定の値を示すことになる。本研究においても、淡水産マシジミで 1 前後、塩分がわずかに 1 psu しかない小川原湖で 4 前後、神西湖、十三湖のような塩分が 20 psu 以上になる高塩分湖でも Sr/Ca 比の平均値は 6 から 10 の範囲であった。ヤマトシジミにおいても塩分が高くなると、実際は生息場所の塩分が異なっているにもかかわらず貝殻の Sr 濃度には大きな差が出ない可能性が想定される。

和田は二枚貝の外殻膜外液におけるイオン組成と環境水のイオン組成を比較している¹¹⁾。興味深いことに、海産のアコヤガイ、ハボウキガイ、マガキ、ヒオウギガイ外殻膜外液と Na、Sr、Mg、Ca 等のイオン濃度は海水とほぼ等しい。一方、淡水産のイケチョウガイ、カラスガイなどでは、外液のこれらのイオン濃度は環境水よりも著しく高い。淡水産二枚貝では、外殻膜外液中に Sr や Ca 等のイオンが濃縮されていると考えられる。ヤマトシジミでは環境水の浸透圧によって、体液の浸透圧が変化する¹⁹⁾。しかし、貝殻形成の場においては、塩分の低い水域に生息する貝においては効率的に貝殻形成を行うため、外殻膜外液には貝殻形成に必要なイオンが濃縮され、環境水よりも浸透圧が高く保たれている事が想定される。

ヤマトシジミの体液の浸透圧は環境水とほぼ等張であることが知られている。また、環境水の浸透圧を人為的に変化させると、体液中のアミノ酸濃度を変化させて、体液の浸透圧を変化させることも明らかにされている。ヤマトシジミを 10 psu の汽水に馴致させた後に淡水に移した場合、ヘモリンパ液の浸透圧が低下し、値が一定になるまでに 6 時間程度を要する。また、逆に淡水に馴致させたヤマトシジミを 10 psu の汽水に移した場合は、ヘモリンパ液が 10 psu に上昇するまでには 2 時間を要し、さらに 24 時間、浸透圧は上昇を続けた¹⁹⁾。すなわち、塩分が潮汐の影響で短時間の間に大きく変化しても、直ちにヘモリンパ液の浸透圧が変化するわけではない。小川原湖北部で観測された

ような、塩分の一時的な上昇、下降が起こっても、ヤマトシジミヘモリンパ液の浸透圧や外殻膜外液のイオン濃度には短時間では反映されない可能性がある。そのため、小川原湖北部のヤマトシジミ貝殻中の Sr/Ca 比は塩分の短期的な上昇に対応した変化を示さなかったのであろう。

シジミ貝殻中の Sr/Ca 比を EPMA で分析する事により、生息水域の環境を推定することは可能であろう。ただし、塩分に関する情報しか得られない上に、個体差もあり、定量性が高いとはいえない。この手法単独では産地偽装を検出することは難しい場合が想定される。十三湖のような高塩分の水域で漁獲されたシジミ貝殻では高い Sr/Ca 比が得られる。十三湖産の標示があるシジミ貝殻を分析して 2 以下の低い値が得られた場合は、産地偽装の可能性が高い。逆に小川原湖の標示がある標本の貝殻から、Sr/Ca 比 9 以上の高い値が得られた場合は、偽装の可能性が高い。しかし、手法の汎用性や検出感度という点では、ミトコンドリア遺伝子解析の方が産地偽装を見破るという点では優れていると思われる。また、塩分がほぼ同じ環境に生息していたシジミであれば、日本産であろうが外国産であろうが、同じ Sr/Ca 比が得られることになる。EPMA による手法は産地判別に関しては遺伝子解析の補助手段として、あるいは、貝殻しか残っていない場合の手段としてとらえるべきであろう。

要 約

中国太湖、北朝鮮から輸入されたシジミ標本の貝殻中の Sr/Ca 比を日本産ヤマトシジミのデータと比較し、生息域の塩分を推定することができるかどうかを検討した。塩分の高かった青森県十三湖と揖斐川河口で採集したヤマトシジミの Sr/Ca 比は高い値を示し、それぞれの産地の個体ごとの平均値は 5.87 ± 0.86 と 5.50 ± 1.10 であった。一方、塩分の低い小川原湖北部のヤマトシジミ平均値は 4.02 ± 0.67 、南部の平均値は 3.71 ± 0.43 であった。ヤマトシジミの中で最も値の低かったのは、揖斐川河口から 17 km の地点で採取された個体の値 1.38 ± 0.49 であった。淡水産マシジミも値が低く、 1.65 ± 0.32 であった。輸入された中国太湖産の *C. largillierti* 標本の平均値は 1.37 ± 0.20 であり、太湖は小川原湖よりもさらに塩分が低い淡水湖であることが推察される。また、北朝鮮産という表示のあったヤマトシジミ標本の平均値は、5 前後の個体と 2 以下の個体にはっきり分かれた。塩分の全く異なる水域で採取された標本が流通の過程でまとめられて、同一のロットとして日本に輸入されたことが想定される。

謝 辞

本研究は青森県小川原湖漁業協同組合の職員の皆さんの御協力を得て実施する事ができた。この場で深く

感謝する。また、本研究は小川原湖漁業協同組合からの奨学寄付金によって行われた。濱田正隆組合長はじめ組合員各位に深く御礼を申し上げる。

文 献

- 1) Radtke, R.L., M. Svenning, D. Malone, A. Klements, J. Ruzicka and D. Fey (1996) Migration in an extreme northern population of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*: insights from otolith microchemistry. Mar. Ecol. Prog. Ser. 136: 13-23.
- 2) Otake, T. and K. Uchida (1998) Application of otolith microchemistry for distinguishing between amphidromous and non-amphidromous stocked ayu, *Plecoglossus altivelis*. Fish. Sci. 64: 517-521.
- 3) Katayama, S., R.L. Radtke, M. Omori and D.J. Shafer (2000) Coexistence of anadromous and resident life history styles of pond smelt, *Hypomesus nipponensis*, in Lake Ogawara, Japan, as determined by analyses of otolith structure and strontium: calcium ratios. Environ. Biol. Fish. 58: 195-201.
- 4) Arai, T., A. Kotake, M. Ohji, N. Miyazaki and K. Tsukamoto (2003) Migratory history and habitat use of Japanese eel *Anguilla japonica* in the Sanriku coast of Japan. Fish. Sci. 69: 813-818.
- 5) Saito, T., T. Kaga, J. Seki and T. Otake (2007) Otolith microstructure of chum salmon *Oncorhynchus keta*: formation of sea entry check and daily deposition of otolith increments in seawater conditions. Fish. Sci. 73: 27-37.
- 6) Stecher, H.A., D.E. Krantz, C.J. Lord III, G.W. Luther III and K.W. Bock (1996) Profiles of strontium and barium in *Mercenaria mercenaria* and *Spisula solidissima* shells. Geochim. Cosmochim. Acta. 60: 3445-3456.
- 7) Carré, M., I. Bentaleb, O. Bruguier, E. Ordinola, N.T. Barrett and M. Fontugne (2006) Calcification rate influence on trace element concentrations in aragonitic bivalve shells: evidence and mechanisms. Geochim. Cosmochim. Acta. 70: 4906-4920.
- 8) Taylor, J.D., W.J. Kennedy and A. Hall (1973) The shell structure and mineralogy of the bivalvia II. Bull. Br. Mus. nat. Hist. Zool. 22: 255-294.
- 9) Strasser, C.A., L. Mullineaux and B.D. Walther (2008) Growth rate and age effects on *Mya arenaria* shell chemistry: implications for biological studies. Exp. Mar. Biol. Ecol. 355: 153-156.
- 10) Dodd, J.R. and E.L. Crisp (1982) Non-linear variation with salinity of Sr/Ca and Mg/Ca ratios in water and aragonitic bivalve shells and implications for paleosalinity studies. Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 38: 45-56.
- 11) 和田浩爾 (1994) 殻体と外套膜. 「軟体動物学概説」上巻 (波部忠重, 奥谷喬司, 西脇三郎編). サイエンス社, 東京, pp.135-158.
- 12) Gilikin, D.P., A. Lorrain, J. Navez, J.W. Taylor, L. Andre, E. Keppens, W. Baeyens and F. Dehairs (2005) Strong biological controls on Sr/Ca ratios in aragonitic marine bivalve shells. Geochim. Geophys. Res. 10: Q05009, doi:10.1029/2004GC000874.
- 13) 古丸 明・尾之内健次・柳瀬泰宏・成田光好・大竹二雄 (2009) EPMA (Electron probe micro analyzer) による塩分濃度の異なる水域で採集されたヤマトシジミ貝殻の Sr/Ca 比. Nippon Suisan Gakkaishi 75: 443-450.
- 14) 中村幹生 (2000) 「日本のシジミ漁業 その現状と問題点」第4章 問題点と対策 (中村幹生編) たちばな出版, 米子, pp.230-257.
- 15) 古丸 明 (1996) ミトコンドリア DNA によるシジミの種判別「水産学シリーズ149 水産物の原料・産地判別」(福田 裕, 渡部終五, 中村弘二編) 恒星社厚生閣, 東京, pp.78-86.
- 16) 田村眞通 (2000) 「日本のシジミ漁業 その現状と問題点」第3章 シジミ漁業の概要 6. 十三湖 (中村幹生編) たちばな出版, 米子, pp.74-83.
- 17) 藤原広和・水野俊輔・高杉 奨・杉田尚男・矢口淳一 (2003) 小川原湖の塩分および水温分布に関する現地研究. 八戸高専紀要 38: 169-173.
- 18) Nanbu, R., T. Mizuno and H. Sekiguchi (2008) Post-settlement growth and mortality of brackishwater clam *Corbicula japonica* in the Kiso estuaries, central Japan. Fish. Sci. 74: 1254-1268.
- 19) 中村幹生 (1997) 宍道湖におけるヤマトシジミ *Corbicula japonica* Prime と環境との相互関係に関する生理生態学的研究 北海道大学水産学部博士論文

Effects of Water Temperature on Embryonic Survival Rates and Meristic Characters of the Juveniles in Masu Salmon (*Oncorhynchus masou masou*)

Daisei ANDO ^{*1, *2}, Kazutaka SHIMODA ^{*1}, Yoshihito SHINRIKI ^{*1}, Shinya MIZUNO ^{*1}, Kazuaki NAITO ^{*1} and Masamichi NAKAJIMA ^{*2}

^{*1} Hokkaido Fish Hatchery

^{*2} Laboratory of Population Genetic Informatics, Graduate School of Agriculture, Tohoku University

Abstract

Eggs from four full-sib families of masu salmon *Oncorhynchus masou masou* were exposed to five different temperatures (4, 9, 12, 16, and 20°C) from fertilization to eye-pigmented embryonic stage for investigating the effects of water temperature on the embryo survival rate and nine meristic characters (upper, lower, and total gill rakers; pelvic, pectoral, dorsal, anal, and caudal fin rays; and pyloric caeca) of the surviving juveniles. Survival rates at the two extreme temperatures (4 and 20°C) were generally low. All embryos from two families died during the thermal treatment at 20°C. Rearing groups at 16°C showed the next highest survival rates compared to controls kept at 9°C. Mortality under the same temperatures was significantly different among the four families. Moreover, mortality during thermal treatment was greatly variable (13.3–76.7%), but was similar during the post-treatment period (14.5–24.9%). These results suggest that the sensitivity to water temperature is different among families. Changes in the meristic characters of juveniles were dependent on the incubation water temperature at the early developmental stage, and the degree of modification was different among families. However, there was a general response pattern for lower gill and total gill rakers (sum of upper and lower gill rakers) as well as pectoral and anal fin rays, which showed the greatest average counts at intermediate temperatures. Dorsal and anal fin ray counts were significantly lower than those of the controls in all experimental groups reared over 16°C. Thus, meristic characters of masu salmon juveniles may be influenced by the incubation water temperatures exposed in the early embryonic stage. The present findings suggest that the observed meristic characters, which are significantly affected by water temperatures, may be useful for discriminating between stream-spawned and hatchery-reared populations.

(accepted February 1, 2010)

Introduction

It has been reported that incubation water temperature during embryonic stages has a major influence on the survival rate and development rate in salmonids^{1,2)}. However, survival rates during the early developmental stage as well as the upper and lower lethal limits of incubation water temperatures are different among species^{3,4)}, stocks or strains⁵⁻⁹⁾, bloodlines¹⁰⁾, and families^{6-8,10-12)}. For example, Murray and McPhail³⁾ incubated embryos of five species of *Oncorhynchus* at water temperatures ranging

from 2 to 14°C and compared survival rates. They found that pink *O. gorbuscha* and chum salmon *O. keta* did not survive until hatching at 2°C, and that, at low temperatures, coho *O. kisutch* and sockeye salmon *O. nerka* had higher survival rates than Chinook salmon *O. tshawytscha*. They also reported that the survival rates of chum, pink, and Chinook salmon embryos at 14°C were higher than those of sockeye and coho salmon. The upper temperature at which 50% mortality of embryos occurs is different for these five *Oncorhynchus* species; it is 16°C for

Corresponding author: Daisei Ando, Hokkaido Fish Hatchery, 3-373 Kitakashiwagi, Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan

Tel: +81-123-32-2136, Fax: +81-123-34-7233, E-mail: mydcb192@ybb.ne.jp

chum and Chinook salmon, 15–15.5°C for pink and sockeye salmon, and 13.5°C for coho salmon²⁾. In general, it is thought that coho and sockeye salmon embryos have a greater tolerance to cold waters, and that chum, pink, and Chinook salmon may be better adapted to warmer waters^{2,3,13,14)}. These results suggest that incubation water temperatures during the embryonic development stage are an important factor in the survival of embryos.

It has also been reported that some meristic characters in fish may be affected by external environmental factors such as incubation water temperatures. However, meristic characters also have inherited components^{15–17)}. In salmonids, meristic characters such as the number of gill rakers, as well as the number of dorsal and pectoral fin rays, are important in the identification of different stocks^{18–21)}. However, mean values of meristic characters are not always stable and differences between populations do not always originate from genetic components²²⁾. For example, based on parent-offspring regressions, heritability in the number of gill rakers is high in salmonids, *i.e.*, 0.67 for rainbow trout *O. mykiss*, 0.45–0.63 for pink salmon, and 0.60 for masu salmon *O. masou masou*^{23–25)}. Regardless of this high heritability, the number of gill rakers can change in artificially reared salmonid populations²⁶⁾. Furthermore, meristic character modification responses to incubation water temperature differences are reported to be different among families. Tåning²⁷⁾ surveyed the modification responses of dorsal fin ray numbers in sea trout *Salmo trutta trutta* at several different temperatures using a number of families, while Ali and Lindsey²⁸⁾ conducted a similar experiment using medaka *Oryzias latipes* families. In general, their results showed that the number of fin rays was highest at an intermediate temperature. However, the absolute values at the same temperature were different among families with some exceptions. These results suggest that a study of several families is necessary when investigating meristic character modification responses to incubation water temperatures.

Masu salmon are important in the commercial and recreational fisheries of northern Japan, including Hokkaido Island^{29,30)}. Stock enhancement of masu salmon has been conducted in all areas of Hokkaido and artificially fertilized eggs are incubated in spring

water (the temperature of spring water is usually stable at approximately 8°C) as used in chum salmon hatcheries³¹⁾. However, masu salmon adults usually spawn during early or middle September when stream water temperatures are higher (12–16°C) than those in hatcheries³²⁾. Thus, there may be a marked difference in the incubation water temperatures between hatchery-reared and stream-incubated eggs. If the meristic characters of masu salmon change with incubation water temperatures, then these plastic characters may be useful when distinguishing hatchery-reared populations from stream-incubated populations. However, meristic character modification responses and survival rates have not been examined in embryos and/or juveniles exposed to different incubation water temperatures during the early developmental stage in masu salmon. Therefore, masu salmon embryos from full-sib families were incubated at five different temperatures from fertilization to the eye-pigmented embryonic stage, and the survival rates were determined. Subsequently, meristic characters of the surviving juveniles from each incubation water temperature were compared for investigating the modification responses to incubation water temperatures.

Materials and Methods

Fish and thermal treatment

Masu salmon adults used in this study originated from Shiribetsu River located on the Sea of Japan side of the western Hokkaido Island. This stock was introduced into the Mori Research Branch of Hokkaido Fish Hatchery (Mori, Hokkaido) in 1989 (118,000 eggs) and was then domesticated under a stock enhancement program. In 1998, 20 adults were transported to Hokkaido Fish Hatchery (HFH; Eniwa, Hokkaido) for laboratory experiments and artificial fertilization was repeated over three generations using a small number of parents (50 adults per generation). This stock has been reared in spring water at HFH throughout their life.

In 2007, eggs of four dams were collected and fertilized individually using the milt of four sires producing four full-sib families (OM11–14). Fertilized eggs were placed in running spring water for 1 h for hardening the egg envelop. Then, egg batches were divided into five groups and housed in separate

mesh baskets. These baskets were placed in aquaria containing still water under different temperatures until the eye-pigmented embryonic stage. Masu salmon eggs were managed according to the procedure for stock enhancement of chum salmon³¹⁾. Chum salmon eggs can be practically tolerated for transportation after 300 degree-days³³⁾. The hatching time of masu salmon eggs in normal spring water at HFH is approximately 470 degree-days³⁴⁾ and the biological eye-pigmented embryonic stage occurs at approximately 240 degree-days (30 days at 8°C)³²⁾. However, hatchery managers usually treat masu salmon eggs carefully without disturbance until 300 degree-days, similar to the treatment given for chum salmon eggs. Therefore, this developmental stage (300 degree-days) is important in the management of masu salmon eggs.

Five groups (4D, 9D, 12D, 16D, and 20D) were incubated at five water temperatures; *i.e.*, 4, 9, 12, 16, and 20°C, respectively, controlled with heaters and incubators. Water temperatures were recorded daily and mean water temperatures and standard errors in the five groups were 4.4 ± 0.01 , 8.8 ± 0.05 , 12.2 ± 0.12 , 16.2 ± 0.10 , and 19.9 ± 0.12 °C, respectively. These five groups were incubated in still water until 319–334 degree-days and then transferred into aquaria with running spring water until hatching. The mean spring water temperature after thermal treatment was 8.4 ± 0.03 °C. Total rearing duration for the five groups, from fertilization to sampling, was 199–266 days (Table 1).

Meristic characters

Up to 50 fish from each group were sampled to investigate the nine meristic characters. For each fish, nose-fork lengths (FL) were measured to the

nearest 0.1 cm. The number of upper gill rakers (UGR), lower gill rakers (LGR), gill rakers (GR), pelvic fin rays (PelFR), pectoral fin rays (PecFR), dorsal fin rays (DFR), anal fin rays (AFR), caudal fin rays (CFR), and pyloric caeca (PC) were also recorded. In masu salmon, it has been reported that the number of PelFR, PecFR, DFR, AFR, and PC becomes fixed at a standard body length of 3–4 cm³⁵⁾. However, GR numbers are thought to be fixed in most masu salmon when the fish have a nose-fork length of more than 7 cm³⁶⁾. Therefore, fish with FLs of ≥ 7 cm were selected for this study. All meristic characters, excluding PC, were stained with Alizarin Red S and numbers counted under a binocular microscope. The total number of GR was the sum of the numbers of UGR and LGR of the first left gill arch. Rudimentary umbos were included in the analysis, and an intermediate raker was included in the LGR. Pelvic and pectoral fins were removed from the left side of the fish and fin rays were counted excluding rudimentary rays preceding the anterior-most major ray¹⁹⁾. For the anal and dorsal fins, the first vestigial rays on the anterior fin base were counted when possible. The last bifurcated rays were counted as one fin ray. For the caudal fin, all observed rays (branched and single) were enumerated. The PC was removed from the fish along with the stomach and intestine. Subsequently, each caecum was separated and counted. At the same time as the alimentary system was removed, sex was determined according to the external appearance of gonads.

Survival rates and statistical analysis

Dead eggs and fish were counted and removed from each mesh basket every day. At the time of

Table 1. Rearing procedures and water temperatures in five thermal treatment groups

Group	Thermal treatment* ¹			Post-treatment* ¹			Total rearing days from fertilization to analysis
	Rearing days (degree-days)	Water temperature (°C)		Rearing days until analysis	Water temperature (°C)		
		Mean ± SE	Range		Mean ± SE	Range	
4D	75 (328.7)	4.4 ± 0.01	4.2 – 4.6	191			266
9D* ²	38 (333.9)	8.8 ± 0.05	8.3 – 9.7	187			225
12D	27 (329.4)	12.2 ± 0.12	10.8 – 13.0	183	8.4 ± 0.03	7.6 – 9.7	210
16D	20 (324.9)	16.2 ± 0.10	15.8 – 17.8	188			208
20D	16 (319.0)	19.9 ± 0.12	19.3 – 20.7	183			199

*1 Treatments in each water temperature were conducted using static waters from fertilization to eye-pigmented embryonic stage. Then each eggs were transferred into identical running spring water until analysis.

*2 Control.

emergence, the fry in each group were counted. Exact initial egg numbers were calculated as the sum of the number of dead eggs and the number of fry that emerged. At the end of rearing, survival rate and standard error in each group from fertilization to sampling time were calculated using the Kaplan-Meier method, and compared using log rank tests within thermal treatment groups. At the final sampling, the number of surviving juveniles and the total individuals lost (*i.e.*, sum of dead eggs and fry) in each group within the full-sib family was compared using the 9D group as a control, because rearing water temperatures during thermal treatment and post-treatment period were maintained between 8.4 and 8.8°C for this group (Table 1). The data were statistically evaluated using chi-square tests.

Mean values of FLs and the nine meristic characters in 4D, 12D, 16D, and 20D groups were compared to the 9D group using Dunnett's test. Sex ratios in each group were analyzed using Fisher's exact probability test to detect deviation from a 1:1 sex ratio. Significance levels were set at $P = 0.05$ for all statistical analyses.

Meristic character modification rates in the 4D and 16D groups were compared to the 9D group using the mean meristic character values of the four full-sib families in each thermal treatment group. The modification rates were calculated as:

$$\text{Modification rate (\%)} = \frac{TM_X - TM_{9D}}{TM_{9D}} \times 100 + 100$$

where TM_X is the mean value of the target meristic character in the X (4D or 16D) thermal treatment group and TM_{9D} is the mean value of the same target meristic character in the 9D group.

Results

In four full-sib families, 993–1283 eggs were taken from each dam and 143–272 fertilized eggs were used in each experimental group. The range of survival rates from fertilization to final sampling was 0–80.5% (Table 2). All members of two families in the 20D group (families OM13 and OM14) died during thermal treatment. The survival rates of the family OM14 in the 12D group was poor (2.8%) with only six juveniles surviving until the final sampling. Therefore, OM13 and OM14 in the 20D group and OM14 in the 12D group were excluded from further analysis. The remaining 17 family groups were used for meristic character analysis. The average survival rates of the four full-sib families in each thermal treatment group were, in descending order, 9D (72.2%) > 16D (62.8%) > 12D (33.1%) > 4D (21.1%) > 20D (4.9%).

Survival rates among families in the same thermal treatment group were significantly different ($P < 0.001$). The survival rate for OM11 was generally

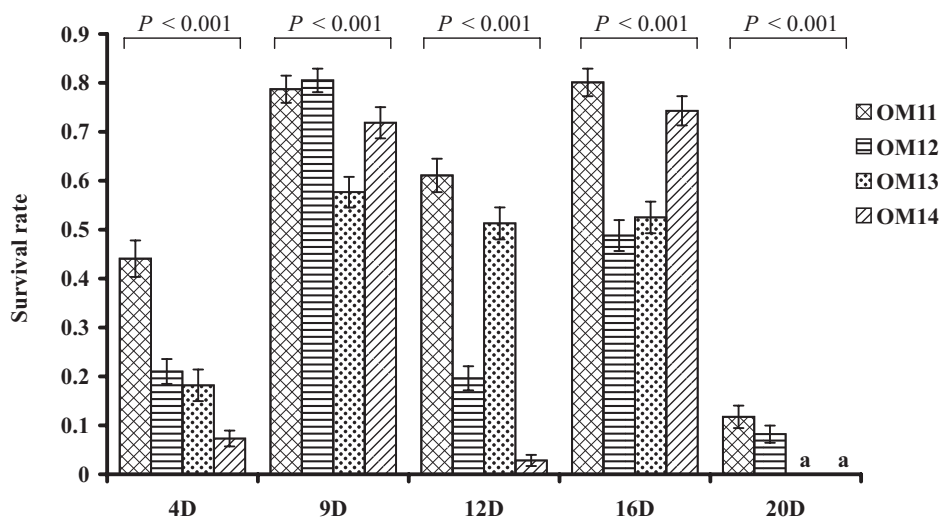


Fig. 1. Survival rates of four full-sib families (OM11–14) from fertilization to sampling. Bars denote standard errors estimated by the Kaplan-Meier method. Groups 4D, 9D, 12D, 16D, and 20D reflect thermal treatments (4.4, 8.8, 12.2, 16.2, and 19.9°C, respectively) applied from fertilization to the eye-pigmented embryonic stage. Symbol “a” indicates that all eggs died during thermal treatment. Survival rates among families were compared using a log rank test. Significance levels were set at $P = 0.05$ for all statistical analyses.

higher than the rates in the other families for each of the thermal treatment groups (Fig. 1). In the 4D and 20D groups, survival rates within a family were significantly different from the 9D group, and the mortality in the thermal treatment and post-treatment periods varied among families (Fig. 2). Among the families, there was no significant difference in survival in the 16D groups in OM11, OM13, and OM14 families. On the other hand, the 12D group survival rates for the OM11, OM12, and OM14 families were lower than those of 9D. However, survival rates were similar between the 9D and 12D treatments in family OM13 (Fig. 2). In general, mortality mainly occurred during the thermal treatment periods in the 20D extreme temperature group. In the pooled data for the four families, mortality varied widely (13.3 – 76.7%) during thermal treatment while mortality rates during the post-treatment period were similar, 14.5 – 24.9% (Fig. 3). Within the pooled family data, the average survival rate of the 16D group was highest (62.8%), with the exception of the 9D group (72.2%; Table 2).

For the 17 groups with sufficient numbers to assess meristic variation, 708 fish were analyzed for meristic characters. Mean FL ranged from 7.0 to 9.2 cm; however, mean FLs for 4D in OM13 family, 12D in

OM12 and OM13, and 16D in OM11 and OM13, were significantly different from the 9D FLs within those families (Table 2). Sex ratios were not skewed from 1:1 within thermal treatment groups in each family, but male occurrence in the 9D group in the data pooled for the four families was significantly high (Table 2).

The response to incubation water temperatures for LGR, GR, PecFR, and AFR counts varied similarly, with the highest number of rays or rakers occurring at intermediate temperatures (Figs. 4 and 5). However, the magnitude of the response and the absolute values at the same temperature differed. For the LGR and GR of OM11, the number of gill rakers in the 12D and 16D groups was significantly higher than in the 9D group, but the other three families showed no such differences. On the other hand, LGR and GR counts in the 4D group of OM12, OM13, and OM14 were significantly lower than the counts for 9D, whereas the mean value in OM11 family showed no such difference (Fig. 4). In PelFR, the number of rays showed little change with temperature for all families, although, at all temperatures, the absolute values for OM11 were higher than those for the other three families. For the DFR and CFR counts, the response of OM12 showed an arched

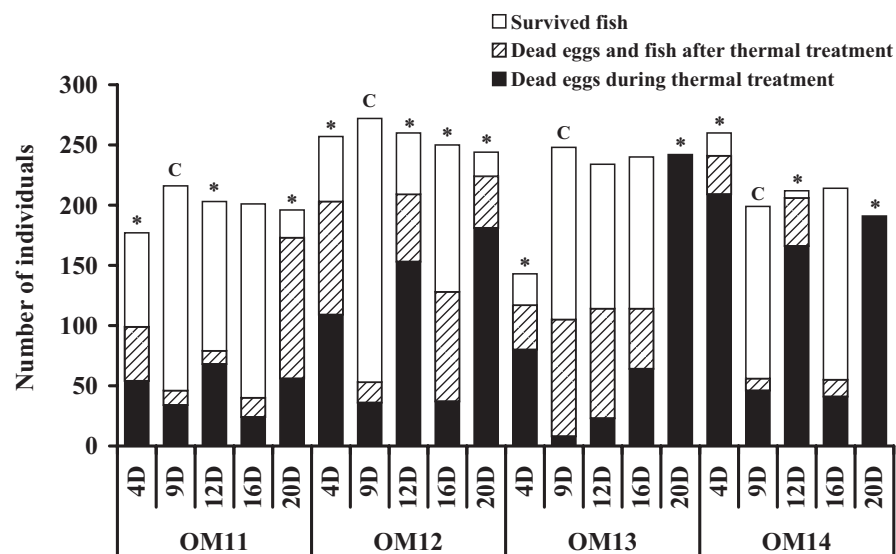


Fig. 2. The number of surviving and deceased individuals in each group of four full-sib families (OM11 – 14). Group names 4D, 9D, 12D, 16D, and 20D, indicate thermal treatments (4.4, 8.8, 12.2, 16.2, and 19.9°C, respectively) of the eggs from fertilization to the eye-pigmented embryonic stage. The number of deceased individuals is shown according to the developmental periods: during thermal treatment period until the eye-pigmented embryonic stage (closed bar) and the period after that (hatched bar). Symbol “C” denotes control group (9D) and asterisks on the bars indicate significant differences from the family’s 9D control. The ratio of surviving and deceased individuals was compared using a chi-square test. Significance levels were set at $P = 0.05$ for all statistical analyses.

curve; however, the other three families showed either null or declivous responses³⁷⁾. For PC, there was no clear response to water temperature. However, there was a tendency towards an increasing count in the 4D groups, except in OM13 family. The DFR and AFR modification responses in the 16D and 20D groups were similar with both counts showing a declivous curve while water temperature increased, and all group counts were significantly lower than those in the 9D group (Fig. 5).

In the 4D, 9D, and 16D thermal treatment groups, meristic data were obtained for all four families. The meristic character modification rates ranged from 94.7% in AFR mean counts in the 4D group to 109.2% in PC mean counts in the 4D group. The

modification responses of UGR, LGR, GR, DFR, and CFR showed similar tendencies; UGR, LGR, and GR showed acclivous responses³⁷⁾, while DFR and CFR showed declivous responses (Fig. 6).

Discussion

It has been reported that incubation water temperatures have a marked effect on embryo survival in Pacific salmon^{2,7,9,11)}. Beacham and Murray¹¹⁾ investigated the survival rate of chum salmon at incubation water temperatures of 4, 8, and 12°C, and found that survival rates from the eye-pigmented embryonic stage to hatching was lowest at 12°C. On the other hand, survival rates at a low temperature (4°C) in pink salmon embryos varied greatly among families.

Table 2. Survival rate, sex, and fork length in four masu salmon families treated by five different temperatures

Family	Group	Initial egg numbers	Number of survival fish until analysis (%)	Number of individuals for analysis			Fork length (cm)	
				Female	Male	Total	Mean $\pm$ SE	Range
OM 11	4D	177	78 (44.1)	29	21	50	7.4 $\pm$ 0.05	7.0 – 8.4
	9D	216	170 (78.7)	18	32	50	7.3 $\pm$ 0.04	7.0 – 7.9
	12D	203	124 (61.1)	26	24	50	7.4 $\pm$ 0.05	7.0 – 8.6
	16D	201	161 (80.1)	24	26	50	7.5 $\pm$ 0.05 ^b	7.0 – 8.2
	20D	196	23 (11.7)	8	8	16	7.5 $\pm$ 0.08	7.1 – 8.2
	Subtotal	993	556 (56.0)	105	111	216	7.4 $\pm$ 0.02	7.0 – 8.6
OM 12	4D	257	54 (21.0)	19	21	40	7.8 $\pm$ 0.07	7.0 – 8.9
	9D	272	219 (80.5)	20	30	50	7.8 $\pm$ 0.04	7.3 – 8.4
	12D	260	51 (19.6)	20	29	49	8.2 $\pm$ 0.08 ^b	7.0 – 9.2
	16D	250	122 (48.8)	24	25	49	7.7 $\pm$ 0.06	7.0 – 8.4
	20D	244	20 (8.2)	11	8	19	8.0 $\pm$ 0.10	7.1 – 8.5
	Subtotal	1283	466 (36.3)	94	113	207	7.9 $\pm$ 0.03	7.0 – 9.2
OM 13	4D	143	26 (18.2)	7	11	18	7.5 $\pm$ 0.09 ^b	7.0 – 8.6
	9D	248	143 (57.7)	21	29	50	8.0 $\pm$ 0.01	7.5 – 8.6
	12D	234	120 (51.3)	23	27	50	8.4 $\pm$ 0.05 ^b	7.5 – 9.1
	16D	240	126 (52.5)	21	28	49	7.7 $\pm$ 0.05 ^b	7.0 – 8.5
	20D	242	0 (0.0)	–	–	–	no data	no data
	Subtotal	1107	415 (37.5)	72	95	167	8.1 $\pm$ 0.04	7.0 – 9.1
OM 14	4D	260	19 (7.3)	9	9	18	7.9 $\pm$ 0.13	7.0 – 8.8
	9D	199	143 (71.9)	17	33	50	7.7 $\pm$ 0.07	7.1 – 9.2
	12D	212	6 (2.8)	–	–	–	no data	no data
	16D	214	159 (74.3)	20	30	50	7.6 $\pm$ 0.06	7.0 – 9.1
	20D	191	0 (0.0)	–	–	–	no data	no data
	Subtotal	1076	327 (30.4)	46	72	118	7.7 $\pm$ 0.04	7.0 – 9.2
Total	4D	837	177 (21.1)	64	62	126	7.6 $\pm$ 0.02	7.0 – 8.9
	9D	935	675 (72.2)	76	124	200 ^a	7.7 $\pm$ 0.04	7.0 – 9.2
	12D	909	301 (33.1)	69	80	149	8.0 $\pm$ 0.09 ^b	7.0 – 9.2
	16D	905	568 (62.8)	89	109	198	7.6 $\pm$ 0.05	7.0 – 9.1
	20D	873	43 (4.9)	19	16	35	7.7 $\pm$ 0.03	7.1 – 8.5
	Total	4459	1764 (39.6)	317	391	708 ^a	7.7 $\pm$ 0.08	7.0 – 9.2

Egg batch reared at 9°C (9D) was defined as control.

Symbol “a” indicate the significant difference from 1:1 sex ratio treated with Fisher’s exact probability test at $P = 0.05$ level.

Symbol “b” indicate the significant difference from 9D control treated with Dunnett’s test at $P = 0.05$ level.

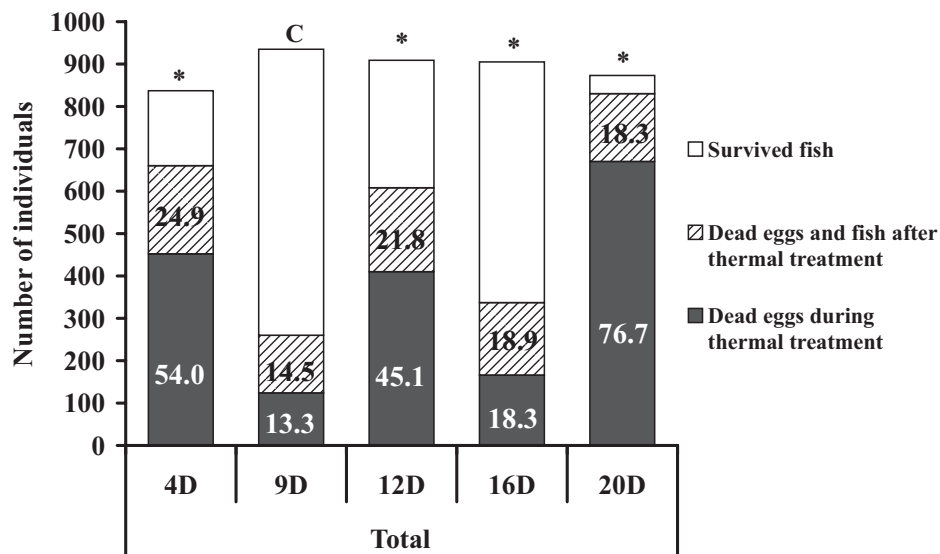


Fig. 3. The number of surviving and deceased individuals in all four families. Group names 4D, 9D, 12D, 16D, and 20D, reflect thermal treatments (4.4, 8.8, 12.2, 16.2, and 19.9°C, respectively) from fertilization to the eye-pigmented embryonic stage. The number of deceased individuals is shown according to developmental periods: during thermal treatment period until the eye-pigmented embryonic stage (closed bar) and the period after that (hatched bar). Symbol “C” denotes control group (9D) and asterisks on the bars indicate significant differences from the 9D control. The ratio of surviving and deceased individuals was compared using a chi-square test. Significance levels were set at $P = 0.05$ for all statistical analyses. The figures in the bars indicate mortality (%).

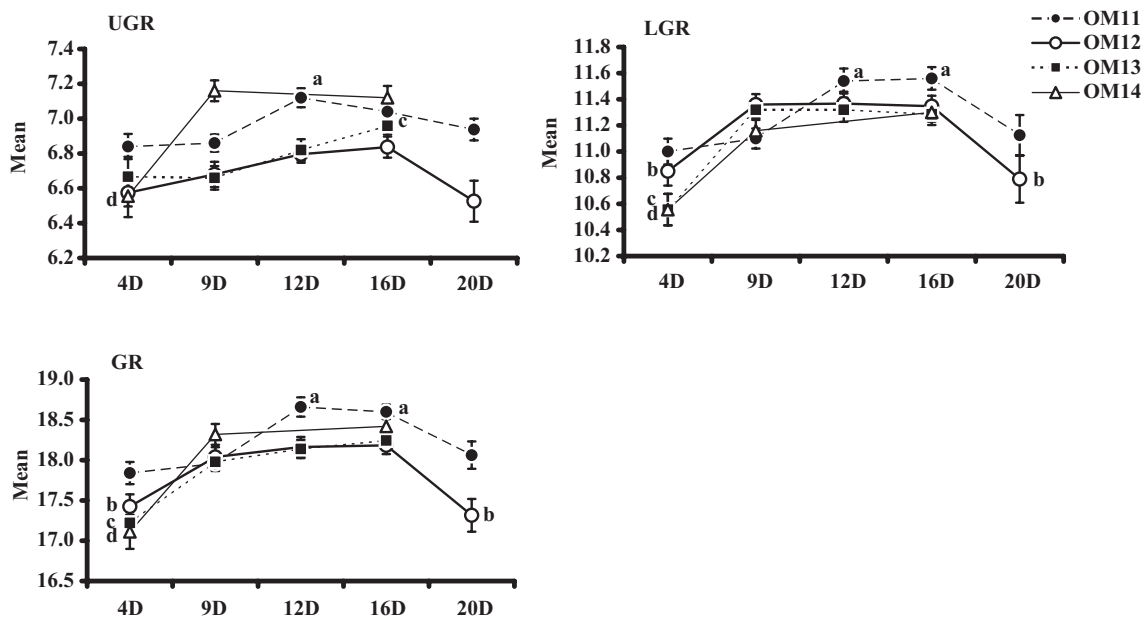


Fig. 4. Modification responses to incubation water temperatures for upper gill rakers (UGR), lower gill rakers (LGR), and total gill rakers (GR is the sum of UGR and LGR) in four full-sib families (OM11–14). Bars denote standard error of the mean. Group names 4D, 9D, 12D, 16D, and 20D, reflect thermal treatments (4.4, 8.8, 12.2, 16.2, and 19.9°C, respectively) from fertilization to the eye-pigmented embryonic stage. Letters “a” (OM11), “b” (OM12), “c” (OM13), and “d” (OM14) indicate significant differences from the family’s 9D control derived by Dunnett’s test. Significance levels were set at $P = 0.05$ for all statistical analyses.

However, the variation was lowest at 8 and 12°C¹⁰. In sockeye salmon, no significant differences in embryo survival rates were observed at 4, 8, 12, and 15°C, but the rate was lowest at 2°C⁸. In addition, no Chinook salmon embryos survived at 2°C⁸. On the

other hand, while coho salmon embryos were found to survive in cold waters (for example, 1.3°C), coho salmon embryo mortality increased above 11°C, with complete mortality at 14°C^{2,3,14}. Lower and upper lethal temperatures for Chinook salmon embryos

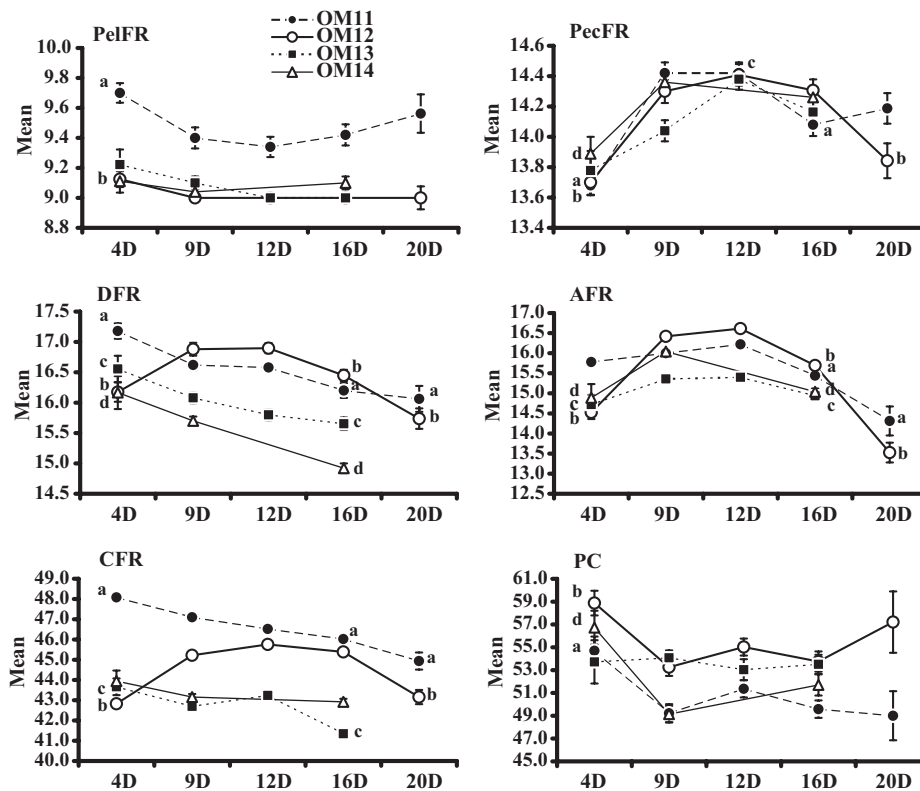


Fig. 5. Modification responses to incubation water temperatures for pelvic (PelFR), pectoral (PecFR), dorsal (DFR), anal (AFR), and caudal fin rays (CFR), and pyloric caeca (PC) in four full-sib families (OM11–14). Bars denote standard error of mean. Group names 4D, 9D, 12D, 16D, and 20D, reflect thermal treatments (4.4, 8.8, 12.2, 16.2, and 19.9°C, respectively) from fertilization to the eye-pigmented embryonic stage. Letters “a” (OM11), “b” (OM12), “c” (OM13), and “d” (OM14) indicate significant differences from the family’s 9D control derived by Dunnett’s test. Significance levels were set at $P = 0.05$ for all statistical analyses.

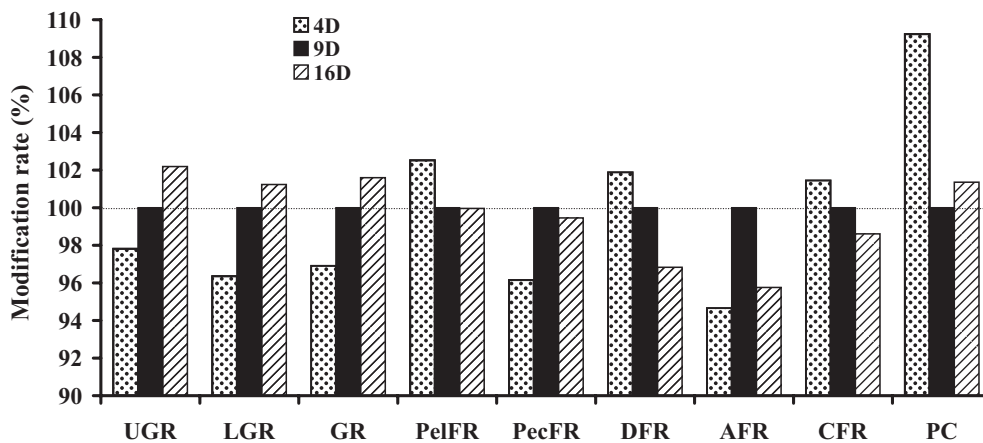


Fig. 6. Modification rates relative to the 9D controls for nine meristic characters in all four full-sib families. Group names 4D, 9D, and 16D, reflect thermal treatments (4.4, 8.8, and 16.2°C) from fertilization to the eye-pigmented embryonic stage. The 9D groups were set as controls (i.e., 100%). Abbreviations for each trait are as follows: upper gill raker (UGR), lower gill raker (LGR), total gill raker (GR; sum of UGR and LGR), pelvic fin rays (PelFR), pectoral fin rays (PecFR), dorsal fin rays (DFR), anal fin rays (AFR), caudal fin rays (CFR), and pyloric caeca (PC), respectively.

(i.e., resulting in 50% mortality in the period from fertilization to 50% hatching) range from 2.5–3.0 to 16.0°C¹⁾. Moreover, Kashiwagi *et al.*³⁸⁾ reported that rainbow trout embryos did not survive to hatching at

temperatures above 18°C. These results suggest that *Oncorhynchus* embryos can survive in water temperatures ranging from 1.3 to 16°C. However, there are species-specific upper and lower lethal temperatures.

In our study, survival rates were lowest at the two extreme temperatures tested (4 and 20°C). The low survival rate at 4°C suggests that low incubation water temperature tolerance in masu salmon embryos may not be as strong as in sockeye and coho salmon. On the other hand, although overall survival was only 4.9% at 20°C, eggs from two full-sib families survived until they reached the eye-pigmented embryonic stage at 20°C. Moreover, there was no significant difference in survival rates between the 9D and 16D groups in three families (OM11, OM13, and OM14). These results suggest that masu salmon embryos have a greater tolerance of high incubation water temperatures than other *Oncorhynchus* species. However, mortalities in the middle temperature range (12D) group were higher than those in the 9D and 16D groups (Figs. 2 and 3). The cause of this phenomenon is not known, but we note that mortality during thermal treatment in the 12D group was higher than that in both the 9D and 16D groups (Fig. 3). As all groups were housed, incubated, and reared in similar conditions, we suggest that the experimental process was not responsible for the observed survival differences. In salmonids, it has been reported that incubation water temperature sensitivity is different within a species among families, stock, parental female size class, and population brood-year⁶⁻¹⁴). Moreover, there is evidence of marked decreases in survival rates around 12°C in one study²). The fish used in this study were from a domesticated stock incubated at the hatchery in spring water, with minimal water temperature changes (7–12°C). More detailed research using a larger number of full-sib families is necessary to investigate this apparently low survival rate phenomenon at 12°C in masu salmon embryos.

Although the spawning season of masu salmon adults ranges from late August to early October, most adults spawn during September when the water temperature in the rivers of Hokkaido ranges between 13 and 17°C³⁹). Thermal tolerance depends on species or stock, and differences in sensitivity to low and high incubation water temperature are thought to be related to the natural history of the target organisms^{2,4,6}). For example, Beacham and Murray²) noted that coho salmon in North America spawn during the latter part of the spawning season of the

coho, Chinook, pink, chum, and sockeye salmon populations they surveyed, suggesting that coho salmon have a higher tolerance to low temperatures. Furthermore, this tolerance suggests that coho salmon have become adapted to spawning during late fall and early winter. In chum salmon, it has been reported that late-spawning stocks exhibit higher embryo survival rates at low water temperatures than early-spawning ones⁷). Hendry *et al.*⁹) and Tang *et al.*¹⁴) indicated that eggs taken from sockeye and coho salmon stocks that experience high temperatures in their spawning streams exhibit higher survival rates under high-temperature conditions in the laboratory, than those of stocks that spawn in lower temperature streams. Although the masu salmon adults used in this study were not from a stream spawning population, their fertilized embryos seem to exhibit a tolerance for water temperatures similar to those in streams. Wild masu salmon stocks spawn in rivers with high water temperatures during fall. A clearer indication of incubation water temperature tolerances may have been obtained if both hatchery and wild-origin masu salmon were used to investigate the survival rates at different temperatures.

It has been reported that most of the mortality in fish embryos occurs during the early developmental period, especially from the stage of fertilization to epiboly or to the eye-pigmented embryonic stage^{4,6,12}). Marten⁴⁰) noted that such temperature effects were restricted to the period between fertilization and the eye-pigmented embryonic stage with no significant effects after the eye-pigmented embryonic stage in brook trout *Salvelinus fontinalis*. Murray and Beacham⁴¹) observed that a period of incubation at warmer temperatures was necessary before pink salmon embryos could survive lower incubation water temperatures. In our study, there was no large variation in the mortality rates after the eye-pigmented embryonic stage (14.5–24.9%). However, mortality during the early developmental stage (from fertilization to the eye-pigmented embryonic stage) was highly variable (13.3–76.7%). These results suggest that mortality differences during the thermal treatment period are related to incubation water temperatures and not rearing technique.

Meristic characters in masu salmon changed with incubation water temperatures until the eye-pigmented

embryonic stage. Final GR and PC counts as well as the number of fin rays are dependent on fish size. However, PC and fin ray numbers, excluding CFR, are approximately fixed at 3–4 cm^{35,36}. Most fish attain a fixed number of GR at an FL ≥ 7 cm; however, GR counts are not completely fixed until an FL of 8 cm³⁶. Because we used an FL of approximately 7 cm in our study, our GR counts may not be fully representative of final values. However, we suggest that the general tendency in the GR modification response to water temperature has been detected. For example, although there are no differences in FLs between the 9D and the 4D groups in OM12 and OM14, the mean GR in the 4D groups is significantly lower than that of the 9D. Moreover, the FLs of the 9D and 12D groups in OM11 were similar. However, the mean GR number in the 12D group was significantly higher than that in the 9D group. Unfortunately, information about CFR numbers is scarce. Hikita⁴² reported that CFR ranged from 45 to 47 in masu salmon with FLs of 17.9–57.0 cm. Here, CFR counts in the 9D group varied from 40 to 50 rays and mean values were 42.7–47.1. Based on similarities with the data of Hikita⁴², we suggest that the CFR counts had approximately reached the fixed number observed in adults. The FL of OM11 in the 9D group was smaller than those of OM13 and OM14. However, the CFR of OM11 in the 9D group was apparently higher than those of the other two families (Fig. 5).

Meristic characters may change with incubation water temperatures, but there are also meristic character modification responses that depend on families. Here, LGR, GR, PecFR, and AFR showed the same modification responses to water temperature (an arched curve) in all four families. PC counts in the 4D groups of the four families showed the largest modification rate compared with the 9D group (Fig. 6). However, in stream-spawned masu salmon embryos, water temperatures of 4°C may not be experienced until the eye-pigmented embryonic stage. Therefore, the 4D groups represent an extreme experimental setting in our analysis, and we suggest that the extreme modification rate reflects that setting. For DFR and AFR, the high water temperature rearing groups (16D and 20D) showed significantly lower ray counts than that of the 9D in all families.

As hatchery-reared fish experience colder water temperatures than stream-incubated fish in early embryogenesis, and as DFR and AFR show significant changes with water temperature, these traits may be useful tools in distinguishing hatchery-reared or stream-incubated stocks. Furthermore, an arched curve in meristic characters over several temperatures has been reported in other salmonids. For example, Seymour¹³ found that DFR and AFR were greatest at intermediate temperatures in Chinook salmon, while Tåning²⁷ found that the modification responses of DFR and AFR in sea trout showed arched curves at several temperatures. To examine modification responses in further detail, and investigate the arched curve more accurately, more than three incubation water temperatures should be used in future analyses.

In our study, sex ratios in each group did not vary significantly from 1:1. However, the sex ratio in the four family-pooled 9D group had a significantly high proportion of males. In this study, large-sized fish were primarily selected to determine GR. Survival rates of 9D and 16D groups were generally high in all four families. It has been reported that the growth of potential smolts (fish which become smolts in the following year) did not differ between the sexes. However, growth of precocious males is reported to be faster than that of immature males in masu salmon^{43,44}. The minimum size for the appearance of precocious males is 7–8 cm⁴⁴. Therefore, it is thought that some of these males were included in the group we analyzed, because larger fish were selected for analysis. Traits were analyzed without stratifying for sex in this study because previous studies have reported that several meristic characters in *Oncorhynchus* show no significant differences between the sexes^{7,18,21,25,45,46}.

In masu salmon, our results show that meristic characters may be affected by temperatures in early embryogenesis, at least until the eye-pigmented embryonic stage. This finding could be utilized to detect hatchery-reared populations in the field, because the water temperatures experienced up to the eye-pigmented embryonic stage will be different between hatchery-reared and stream-incubated populations. However, the effects of water temperatures after the eye-pigmented embryonic stage are unknown.

For example, it is reported that the phenocritical period for DFR and PecFR begins at the eye-pigmented embryonic stage and lasts after hatching in sea trout²⁷⁾. Water temperature from the eye-pigmented embryonic stage to emergence in the stream is lower than that of the hatchery³²⁾. Moreover, stream-spawned masu salmon embryos may experience daily fluctuations and seasonal variations in water temperatures. More detailed surveys including the post eye-pigmented embryonic period will be necessary to allow hatchery-reared and stream-incubated populations to be distinguished.

Acknowledgments

We are grateful to Shu-ichi Mano, Eastern Hokkaido Inland Water Fisheries Section of the Hokkaido Fish Hatchery, for providing useful information for analysis. We thank Ayako Nagasawa, Akiko Mikawa, Shigeko Sugimoto, and Chiaki Wakabayashi for their help with the full-sib fish breeding. Additional support was provided by the staff of the Department of Salmon Resource Management in the Hokkaido Fish Hatchery. We also thank two anonymous reviewers for their critical comments on an earlier version of the manuscript. This study was supported by a grant from the Hokkaido Government.

References

- 1) Alderdice, D. F. and F. P. J. Velsen (1978) Relation between temperature and incubation time for eggs of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). J. Fish. Res. Bd. Canada, 35: 69-75.
- 2) Beacham, T. D. and C. B. Murray (1990) Temperature, egg size, and development of embryos and alevins of five species of Pacific salmon: a comparative analysis. Trans. Am. Fish. Soc., 119: 927-945.
- 3) Murray, C. B. and J. D. McPhail (1988) Effect of incubation temperature on the development of five species of Pacific salmon (*Oncorhynchus*) embryos and alevins. Can. J. Zool., 66: 266-273.
- 4) Stonecypher, Jr. R. W., W. A. Hubert and W. A. Gern (1994) Effect of reduced incubation temperatures on survival of trout embryos. Prog. Fish-Cult., 56: 180-184.
- 5) Peterson, R. H., H. C. E. Spinney and A. Sreedharan (1977) Development of Atlantic salmon (*Salmo salar*) eggs and alevins under varied temperature regimes. J. Fish. Res. Bd. Canada, 34: 31-43.
- 6) Beacham, T. D. and C. B. Murray (1986) Comparative developmental biology of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) from the Fraser River, British Columbia. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43: 252-262.
- 7) Beacham, T. D. and C. B. Murray (1987) Adaptive variation in body size, age, morphology, egg size, and developmental biology of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in British Columbia. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44: 244-261.
- 8) Beacham, T. D. and C. B. Murray (1989) Variation in developmental biology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) and Chinook salmon (*O. tshawytscha*) in British Columbia. Can. J. Zool., 67: 2081-2089.
- 9) Hendry, A. P., J. E. Hensleigh and R. R. Reisenbichler (1998) Incubation temperature, developmental biology, and the divergence of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) within Lake Washington. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 55: 1387-1394.
- 10) Beacham, T. D. and C. B. Murray (1988) Variation in developmental biology of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) in British Columbia. Can. J. Zool., 66: 2634-2648.
- 11) Beacham, T. D. and C. B. Murray (1985) Effect of female size, egg size, and water temperature on developmental biology of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) from the Nitinat River, British Columbia. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 1755-1765.
- 12) Beacham, T. D. and C. B. Murray (1986) Comparative developmental biology of pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, in southern British Columbia. J. Fish Biol., 28: 233-246.
- 13) Seymour, A. (1959) Effects of temperature upon the formation of vertebrae and fin rays in young Chinook salmon. Trans. Am. Fish. Soc., 88: 58-69.
- 14) Tang, J., M. D. Bryant and E. L. Brannon (1987) Effect of temperature extremes on the mortality and development rates of coho salmon embryos and alevins. Prog. Fish-Cult., 49: 167-174.

- 15) Barlow, G. W. (1961) Causes and significance of morphological variation in fishes. *Syst. Zool.*, 10: 105-117.
- 16) MacGregor, R. B. and H. R. MacCrimmon (1977) Evidence of genetic and environmental influences on meristic variation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Env. Biol. Fish.*, 2: 25-33.
- 17) Beacham, T. D. and C. B. Murray (1986) The effect of spawning time and incubation temperature on meristic variation in chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Can. J. Zool.*, 64: 45-48.
- 18) Vernon, E. H. (1957) Morphometric comparison of three races of kokanee (*Oncorhynchus nerka*) within a large British Columbia lake. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 14: 573-598.
- 19) MacGregor, R. B. and H. R. MacCrimmon (1977) Meristic variation among world hatchery stocks of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Env. Biol. Fish.*, 1: 127-143.
- 20) Dempson, J. B. and R. K. Misra (1984) Identification of anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) stocks in coastal areas of northern Labrador based on a multivariate statistical analysis of meristic data. *Can. J. Zool.*, 62: 631-636.
- 21) Beacham, T. D. (1985) Meristic and morphometric variation in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) in southern British Columbia and Puget Sound. *Can. J. Zool.*, 63: 366-372.
- 22) Lindsey, C. C. (1981) Stocks are chameleons: plasticity in gill rakers of coregonid fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 1497-1506.
- 23) Leary, R. F., F. W. Allendorf and K. L. Knudsen (1985) Inheritance of meristic variation and the evolution of developmental stability in rainbow trout. *Evolution*, 39: 308-314.
- 24) Funk, W. C., J. A. Tyburczy, K. L. Knudsen, K. R. Lindner and F. W. Allendorf (2005) Genetic basis of variation in morphological and life-history traits of a wild population of pink salmon. *J. Hered.*, 96: 24-31.
- 25) Ando, D., S-I. Mano, K. Shimoda, Y. Shinriki, N. Koide and M. Nakajima (2008) Heritability estimates by intra-sire regression of offspring on dam and half-sib analysis of the number of gill rakers and vertebrae in masu salmon, *Oncorhynchus masou masou*. *Fish Genet. Breed. Sci.*, 38: 87-96.
- 26) McCart, P. and B. Andersen (1967) Plasticity of gillraker number and length in *Oncorhynchus nerka*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 24: 1999-2002.
- 27) Tåning, Å. V. (1952) Experimental study of meristic characters in fishes. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*, 271: 169-193.
- 28) Ali, M. Y. and C. C. Lindsey (1974) Heritable and temperature-induced meristic variation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Can. J. Zool.*, 52: 959-976.
- 29) Ando, D., Y. Miyakoshi, K. Takeuchi, M. Nagata, T. Sato, S. Yanai and S. Kitada (2002) Estimates of numbers of juvenile masu salmon *Oncorhynchus masou* caught by recreational anglers in an urban stream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 68: 52-60. (in Japanese with English abstract)
- 30) Ando, D., M. Miyamoto, K. Kasugai, Y. Miyakoshi and M. Nagata (2005) Seasonal distribution of yearling masu salmon released from the Sea of Japan side of southwestern Hokkaido, Japan. *North Am. J. Fish. Manage.*, 25: 22-37.
- 31) Tanaka, H. (1984) Conservation and propagation, pp. 51-58, in "Stock Enhancement and Aquaculture for Masu Salmon," ed. by Hokkaido Fish Hatchery, Eniwa. (in Japanese)
- 32) Osanai, M. and M. Otsuka (1967) Ecological studies on the masu salmon, *Oncorhynchus masou* (Brevoort), of Hokkaido; 1. morphology and spawning habit of the masu salmon which ascends the river. *Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery*, 22: 17-32. (in Japanese)
- 33) Hokkaido Salmon Propagation Association (2007) "Technical Manual for Salmon Hatchery Programs in Hokkaido," Hokkaido Salmon Propagation Association, Sapporo, pp. 102. (in Japanese)
- 34) Ando, D., T. Teranishi, S. Mizuno, K. Naito, N. Koide and K. Araya (2008) Effects of single and several-time treatment with 17 α -methyltestosterone on masculinization in masu salmon. *Fish Genet. Breed. Sci.*, 38: 73-80. (in Japanese with English abstract)
- 35) Kato, F. (2001) Morphology of fingerlings and a key to young Japanese salmon, genus *Oncorhynchus*. *Bull. Fukui City Mus. Nat. His.*, 48: 49-64. (in Japanese with English abstract)

- 36) Mayama, H. (1992) Studies on the freshwater life and propagation technology of masu salmon, *Oncorhynchus masou* (Brevoort). Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery, 46: 1-156. (in Japanese with English abstract)
- 37) Lindsey, C. C. (1988) Factors controlling meristic variation. pp. 197-274, in "Fish Physiology XI," eds. by Hoar, W. S. and D. J. Randall, Academic Press Inc., San Diego.
- 38) Kashiwagi, M., T. Iwai and A. Saji (1987) Effect of temperature and salinity on egg hatch of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. Bull. Fac. Fish. Mie Univ., 14: 41-48.
- 39) Tanaka, H. (1984) Life history of masu salmon in rivers. pp. 11-29, in "Stock Enhancement and Aquaculture for Masu Salmon," ed. by Hokkaido Fish Hatchery, Eniwa. (in Japanese)
- 40) Marten, P. S. (1992) Effect of temperature variation on the incubation and development of brook trout eggs. Prog. Fish-Cult. 54: 1-6.
- 41) Murray, C. B. and T. D. Beacham (1986) Effect of varying temperature regimes on the development of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) eggs and alevins. Can. J. Zool., 64: 670-676.
- 42) Hikita, T. (1962) Ecological and morphological studies of the genus *Oncorhynchus* (Salmonidae) with particular consideration on phylogeny. Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery. 17: 1-97.
- 43) Hirata, T., A. Goto and F. Yamazaki (1988) Individual growth and smoltification of juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou* Brevoort, under rearing conditions. J. Fish Biol., 32: 77-84.
- 44) Utoh, H. (1977) Study of the mechanism of differentiation between the stream resident form and the seaward migratory form of masu salmon, *Oncorhynchus masou* (Brevoort), II, growth and sexual maturity of precocious masu salmon parr (2). Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 28: 66-73. (In Japanese with English abstract)
- 45) Beacham, T. D. (1984) Age and morphology of chum salmon in southern British Columbia. Trans. Am. Fish. Soc., 113: 727-736.
- 46) Beacham, T. D., R. E. Withler, C. B. Murray and L. W. Barner (1988) Variation in body size, morphology, egg size, and biochemical genetics of pink salmon in British Columbia. Trans. Am. Fish. Soc., 117: 109-126.

サクラマスの子の生存率と幼魚の計数形質におよぼす水温の影響

安藤大成（東北大院農・道孵化場）・下田和孝・神力義仁
水野伸也・内藤一明（道孵化場）・中嶋正道（東北大院農）

サクラマス4家系から得られた卵を、5つの異なる水温区（4、9、12、16、20℃；9℃飼育群を対照群に設定）で受精から発眼時期まで飼育し、生存率と9計数形質（上枝鰓耙数、下枝鰓耙数、鰓耙数、腹鰭鰭条数、胸鰭鰭条数、背鰭鰭条数、尻鰭鰭条数、尾鰭鰭条数、幽門垂数）を調べた。生存率は4℃飼育群と20℃飼育群で低く、特に20℃飼育群では2家系が処理中に全滅した。16℃飼育群の生存率は対照群に次いで高かった。家系間の死亡率は、同一水温下での飼育において有意に異なっていた。また、死亡率は、処理中に大きな変動を示したが（13.3～76.7%）、処理後は14.5～24.9%とほぼ同様な値を示した。これらの結果から、卵の死亡率は家系によって異なることが示唆された。計数形質は飼育水温によって変化した。しかし、下枝鰓耙数、鰓耙数（上枝鰓耙数+下枝鰓耙数）、胸鰭鰭条数、尻鰭鰭条数は同様な変化を示し、中間水温で平均値が最も高くなっていた。背鰭鰭条数と尻鰭鰭条数は、16℃以上の高水温飼育群において、対照群よりも有意に低い値を示した。これらの結果は、サクラマスの計数形質は発眼時期までの水温により変化するを示している。また、飼育水温により変化する計数形質は、孵化場で飼育された集団と野生集団の判別に利用できる可能性が考えられた。

Multiplex PCRを用いた琉球列島在来フナと移殖フナの簡易判別法

高田未来美 (東京大・海洋研)・立原一憲 (琉球大・海洋自然)・西田 睦 (東京大・海洋研)

Simple and Easy Method using Multiplex PCR for Distinguishing between Ryukyuan Domestic and Introduced *Carassius auratus*Mikumi TAKADA^{*1}, Katsunori TACHIHARA^{*2} and Mutsumi NISHIDA^{*1}^{*1}Department of Marine Bioscience, Ocean Research Institute, The University of Tokyo^{*2}Laboratory of Fisheries Biology & Coral Reef Studies, Faculty of Science, University of the Ryukyus

Abstract

Both domestic and introduced *Carassius auratus* are distributed widely in the Ryukyu Archipelago. Because they cannot be distinguished morphologically, we developed a simple and easy method that can distinguish domestic and introduced specimens. Two allele-specific primers targeting mitochondrial ND4 and ND5 gene regions were developed based on published sequences. These primers are specific to domestic and introduced *C. auratus*, respectively. Each primer was designed to amplify different size fragment by reacting with respective reverse primers. From the confirmatory experiments, the multiplex PCR reaction using primer mixture including the above two specific primer sets and one non-specific primer set for positive control was confirmed to be an effective method for distinguishing between Ryukyuan domestic and introduced *C. auratus*.

(accepted February 20, 2010)

フナ (ここでは *Carassius auratus* を指す) は、台湾および日本列島を含むユーラシア大陸一帯の地域に広く分布するコイ目コイ科の一次性純淡水魚で¹⁾、特に東アジアでは人々にとって馴染みのある一般的な魚である。本種の分布域は北海道から琉球列島までのほぼ全域に渡り、山間部の溪流および高山帯の湖沼を除く淡水域、特に湖沼や流れの穏やかな河川等に生息する²⁾。

TakadaらによるフナのミトコンドリアDNA (mtDNA) 4,669塩基対 (bp) を用いた系統解析の結果、日本の本州、九州、本州+四国、琉球列島、ロシア+中国、台湾、および中国の7地域には、それぞれ独自に進化した7つの地域固有系統が分布していることが明らかになった³⁾。フナでは mtDNA を用いた系統解析の結果が、核 DNA のそれと基本的に一致することが確かめられてきており⁴⁾、mtDNA の解析により得られた上記の結果は十分に信頼できるものである

と言える。そうだとすると、この7地域には、それぞれそこにしか見られないハプロタイプを持つ地域固有集団が分布しており、これらは固有のハプロタイプにより互いに識別可能であるということになる。近年日本に分布するゲンゴロウフナ *Carassius cuvieri* 以外のフナ *C. auratus* については、5亜種への分類が提案されている⁵⁾。しかし、上記の7地域固有集団のうち、日本に固有の系統である4集団を亜種の定義と照らし合わせると、日本のフナ5亜種とは必ずしも対応しない (Murakami et al.⁶⁾, Iguchi et al.⁷⁾, Yamamoto et al.⁴⁾ も参照)。

琉球列島は、隔離された島嶼で独自に進化した多くの固有種や固有亜種を含む、生物学的に重要な地域である^{8,9)}。ここに分布するフナもまた、他地域の集団から遺伝的に大きく分化した、およそ20–100万年前に分岐したと推定される在来固有集団である³⁾。この琉球列島で、初めてその存在を明らかにされた在来

フナ個体群は、その遺伝的独自性と地域特異性の高さから evolutionarily significant unit (ESU)¹⁰⁾と見なすことができ、保全の必要性が高い。しかし、近年その分布域や個体数は急速に減少しつつあり、島嶼によっては絶滅が危惧されている¹¹⁾。さらに、これまでに琉球列島で採集されたフナ485個体のうち、在来個体は254個体(52%)しか確認されず、残りの231個体(48%)は日本主列島、中国および台湾からの人為的移殖個体で³⁾、琉球在来個体群の遺伝的独自性は急速に失われつつある。

この在来系統の減少を食い止めるためには、何らかの有効な保全対策を講じることが急務である。現在琉球列島に生息するフナのおよそ半分は移殖個体であると考えられており³⁾、在来フナの分布の現状ならびにその生態の詳細を把握するだけでなく、保護ならびに増殖の対象を明らかにするためにも、それが在来個体であるか、移殖個体であるかを判別する必要がある。在来個体と移殖個体は外部形態による識別が困難であることから、両者の判別には mtDNA 情報が必要とされる³⁾。そこで本研究では、両系統に明瞭な遺伝的差異が確認されている mtDNA について、PCR 法を用いた在来系統と移殖系統の簡易判別法の開発を試みた。まず、両型に特徴的な一塩基変異を検出するプライマーを既知の塩基配列をもとに設計し、次にこれを用い、Multiplex PCR によるフナの琉球系統の判別の実用性を検討した。

材料と方法

プライマーデザイン 琉球列島に分布する在来型(琉球系統に属する mtDNA ハプロタイプを持つ個体)と移殖型(本州、本州+四国、九州、ロシア+中国、台湾および中国系統に属する mtDNA ハプロタイプを持つ個体)を判別する2つの上流プライマーを、mtDNA の ND4 遺伝子領域の46–66番目の座位、および ND5 遺伝子領域の956–978番目の座位に作製した(Fig. 1)。ND4 遺伝子領域の66番目と ND5 遺伝子領域の978番目の座位は、在来型では G、移殖型では A に固定されており(Fig. 1)、これらの1塩基変異を検出することにより両者の判別が可能になる。作製した上流プライマーの3'末端は、66番目の座位に対しては在来型のみマッチするように G に、978番目の座位に対しては移殖型のみマッチするように A とした。さらに、増幅の特異性を高めるために、プライマーの3'末端から3塩基目にミスマッチとなる塩基を導入した¹²⁾(Fig. 1)。以上のようにして作製した2つのプライマーの塩基配列は、次の通りである：ND4-66L-RDS、5'-TGA TTA ACT TCC CCT AAA CGG-3'；ND5-978L-IS、5'-TTG GAC TAA AYC AAC CAC ARA TA-3'。ND4-66L-RDS に対応する下流プライマーとして、ND4の285–266番目の座位に ND4-266H (5'-CAR YCG TKG TCG RCT RAT TG-3') を作製し、ND5-978L-IS に対しては、ND5の1319–1300番目の座位に ND5-1300H (5'-ACG AAT CGY GGG GTT CCT AT-3') を作製した(Fig. 2)。

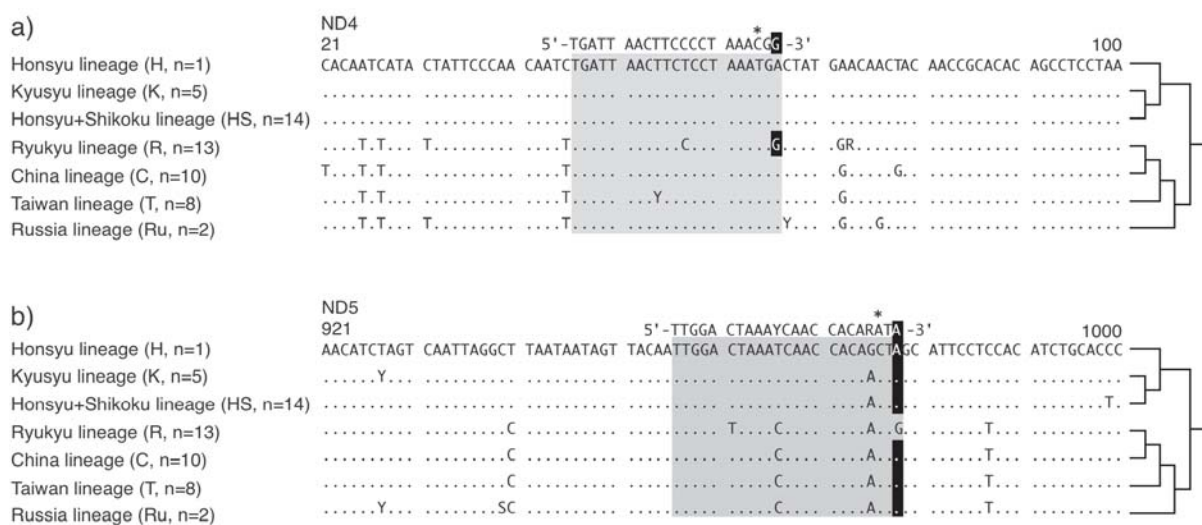


Fig. 1. Sequences and locations of the Ryukyu domestic specific primer ND4-66L-RDS (a) and those of introduced specific primer ND5-978L-IS (b) with aligned sequences of ND4 and ND5 gene regions of 53 *Carassius auratus*. Dots indicate sequence structures that are identical with those in the top line. Degenerated positions are indicated using IUPAC codes. Asterisks indicate introduced mismatch. To show outline of phylogenetic relationships between major lineages in *C. auratus*, schematic trees generated by Bayesian analysis based on concatenated 4.665bp sequences of CR, ND4, ND5, and cyt *b* regions of mtDNA³⁾ are provided on the right side.

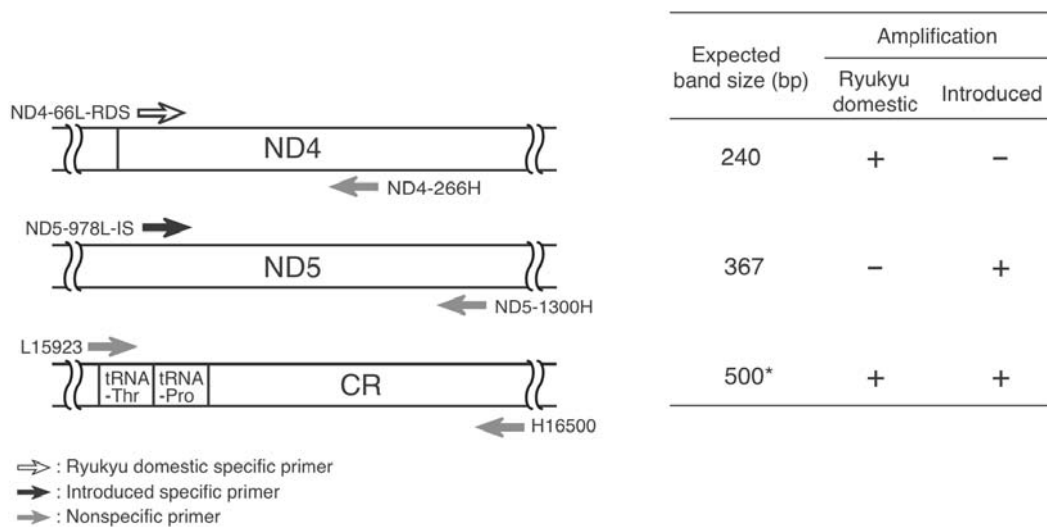


Fig. 2. Schematic representation of the ND4/5 and CR regions showing relative positions of specific primers and expected band size for each primer set. *Expected sizes of positive control band vary among haplotypes because of indels in the CR.

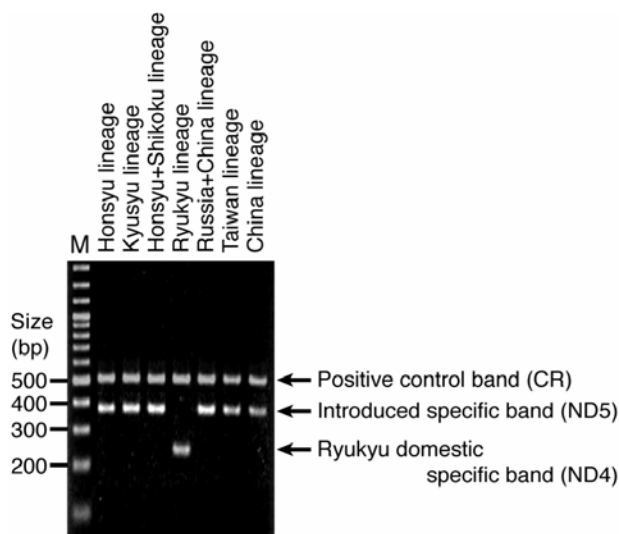


Fig. 3. Multiplex PCR amplification of DNA from seven *Carassius auratus* specimens using a primer set including following six primers: ND4-66L-RDS, ND4-266H, ND5-978L-IS, ND5-1300H, L15923, and H16500. MtDNA haplotypes of the seven specimens are previously distinguished from CR, ND4, ND5, and cyt *b* sequencing. M indicates size marker.

PCR 反応を行う際には、上記 2 プライマーセットの他に、PCR 反応の成否を確認するためのポジティブコントロールとして、全ての個体について mtDNA の CR 前半部約 500bp を増幅する脊椎動物汎用プライマー L15923¹³⁾ (5'-TTA AAG CAT CGG TCT TGT AA-3') と H16500¹⁴⁾ (5'-GCC CTG AAA TAG GAA CCA GA-3') を加えた。これら 3 プライマーセットを含む反応液を用

いてマルチプレックス PCR を行うと、対象が在来型であった場合には約 500bp (CR には挿入／欠失が存在するため、ハプロタイプによりサイズは異なる) と 240bp の断片が増幅されることが期待される。一方、対照が移殖型であった場合には、約 500bp と 364bp の断片の増幅が期待される (Fig. 2)。ただし、実際に PCR 反応を行うと、プライマーの 3' 末端に数 bp 程度の塩基が付加されることもあるため、場合によっては増幅断片は上記よりも長くなる。しかし数塩基付加された場合でも、期待される断片の長さはそれぞれ 100 塩基以上違うので、明瞭に区別できる。

プライマーの有効性の確認に用いた DNA プライマーの有効性を確認するための PCR 反応には、Takada et al.³⁾ でフナの系統を解析する際に用いた DNA を使用した。まず、プライマーが琉球系統とそれ以外の 6 系統を判別できるかどうかを確認するために、本州、九州、本州+四国、琉球列島、中国、台湾およびロシア+中国系統のそれぞれに属するハプロタイプを示す 7 個体の DNA を鋳型に、PCR 反応を行った。次いで、琉球列島でみられる全ての移殖系統 (九州、本州+四国、台湾、中国系統) を含む沖縄島の奥首川、羽地ダム、石川川から採集した 75 個体より抽出した DNA を鋳型に PCR 反応を行い、このプライマーセットが実用できるかどうかを確認した。なお、この 75 個体は、CR の塩基配列から mtDNA ハプロタイプが判っているものである³⁾ (DDBJ 登録番号: AB368569, AB368572, AB368578, AB368585-86, AB368588, AB368596-97, AB368601-02)。

PCR 反応 PCR 反応には、プライマーの特異性を

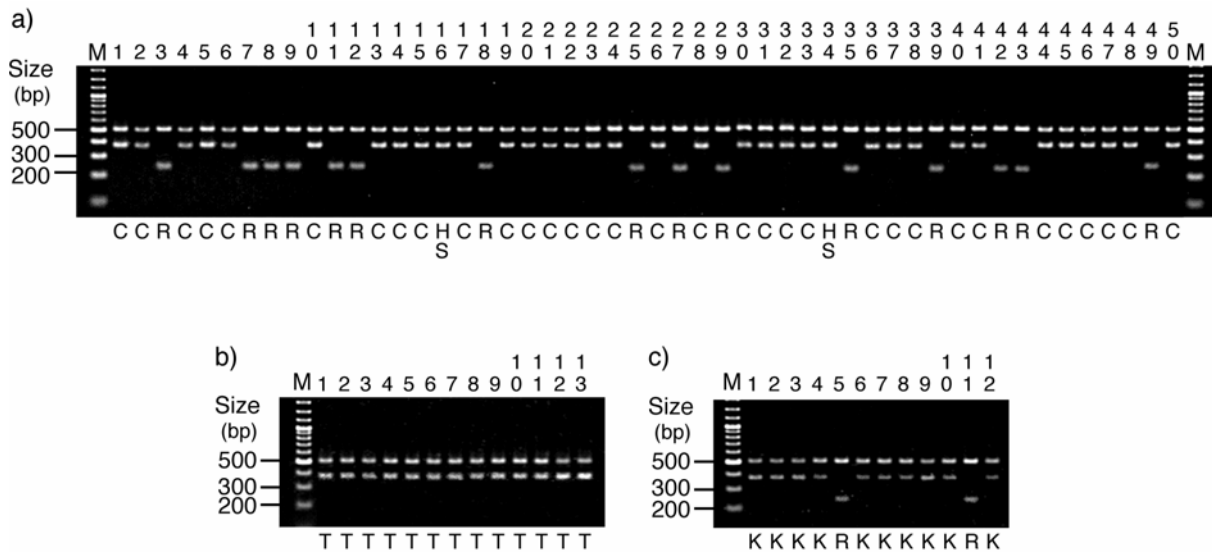


Fig. 4. Multiplex PCR amplification of DNA from 75 *Carassius auratus* specimens collected from Okukubi River (a), Haneji Dam (b), and Ishikawa River (c) using a primer set include six primers (for details of primers, see legend of Fig. 3). MtDNA haplotypes of the 75 specimens were previously distinguished from CR sequencing, and this resultant band pattern is identical with those expected from mtDNA haplotypes. M indicates size marker. Numbers above each lane indicate individual code number. Codes below each lane indicate lineages distinguished from CR sequencing: C, China lineage; R, Ryukyu; HS, Honshu + Shikoku; T, Taiwan; K, Kyushu.

高めるために、校正活性のない Takara *Taq* Polymerase (宝酒造) を使用した。反応液 (全量 $10 \mu\text{l}$) の組成は以下の通りである: Takara *Taq* Polymerase ($5 \text{ units}/\mu\text{l}$) $0.1 \mu\text{l}$ 、 $10 \times \text{PCR}$ バッファー (Mg^{2+} -free) $1 \mu\text{l}$ 、 25 mM MgCl_2 $0.6 \mu\text{l}$ 、dNTP 溶液 (2.5 mM each) $0.8 \mu\text{l}$ 、 $5 \mu\text{M}$ プライマー $0.5 \mu\text{l} \times 6$ 、精製水 $3.5 \mu\text{l}$ 、テンプレート DNA $1 \mu\text{l}$ 。以上の反応液について、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社) を用いて、 94°C 2分の熱変性後、 94°C 10秒の熱変性、 50°C 10秒のアニーリング、 72°C 30秒の伸長反応を35サイクル行い、最後に 72°C 5分の伸長反応を行った。

増幅断片の検出 PCR 産物は、2% GenePure LE アガロースゲル (ISC Bioexpress 社) を用いて100V 定電圧で45分の電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色により検出した。検出された増幅断片のサイズはサイズマーカー Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas 社) をもとに推定した。短い増幅断片をより明瞭に検出するために、ゲル作製および泳動時には $0.5 \times \text{TBE}$ バッファーを使用した。

増幅断片のシーケンス 増幅された断片が目的領域であることを確認するために、前述した、7系統を代表する7個体のDNAを鋳型としたPCR産物の、ダイレクトシーケンスを行った。PCR産物は、ExoSAP-IT (USB 社) で処理した後、BigDye Terminator Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems 社) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。反応には、PCR増幅に用いた

プライマーをそれぞれ用い、塩基配列の決定には ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer を使用した。

結 果

本州、九州、本州+四国、琉球、中国、台湾およびロシア系統それぞれに属する mtDNA ハプロタイプを示す7個体のDNAを鋳型としたPCR反応を行った結果、ハプロタイプから予想される通りのバンドパターンが得られた (Fig. 3)。すなわち、琉球系統の個体では、ポジティブコントロールであると期待される約500bpの増幅断片と、在来型に特異的なバンドとして期待される約240bpの増幅断片が確認された。一方、それ以外の個体では、ポジティブコントロールであると期待される約500bpの増幅断片と、移殖型に特異的なバンドとして期待される約370bpの増幅断片が確認された。これらのバンドの塩基配列を決定したところ、約240bpの断片はND4の、約360bpの断片はND5の、約500bpの断片はCRの配列であることが確認され、間違いなく目的の領域が増幅されていることが確認できた。

実際のサンプルについてもこのプライマーセットが在来フナと移殖フナの判別に有効であることを確認するために、様々な系統のフナが分布する沖縄島の3水域から得られた75個体を解析した。その結果を Fig. 4 に示す。琉球系統に属する17個体 (個体番号 a-3、7-9、11、12、18、25、27、29、35、39、42、43、

49 ; c-5、11) では、ポジティブコントロールである約500bpの増幅断片と、在来型に特異的な約240bpの増幅断片が確認された。一方、移殖系統である九州 (c-1-4、6-10、12)、本州+四国 (a-16、34)、台湾 (b-1-13)、中国系統 (a-1、2、4-6、10、13-17、19-24、26、28、30-34、36-38、40、41、44-48、50) では、ポジティブコントロールである約500bpの増幅断片と、移殖型に特異的な約370bpの増幅断片が確認された (Fig. 4)。

考 察

以上の結果より、今回設計したプライマーセットが、琉球列島の在来系統と、これまでに確認されている全移殖系統 (九州、本州+四国、台湾および中国系統) の判別において有用であることが明らかとなった。本州およびロシア+中国系統のフナは未だ琉球列島では確認されていないが、仮にこれらが琉球列島に移殖されても、全7系統のフナのDNAを用いたPCR反応の結果 (Fig. 2) より、このプライマーセットを用いることで在来個体との識別は可能であると考えられる。

本研究で開発された簡易判別法は、1度のマルチプレックスPCRで2カ所の変異サイトを同時に調べることができる、簡便であると同時に精度の高い方法である。また、短い領域を対照としたPCR反応を低温で行うため、比較的狀態の悪いDNAサンプルからでも結果が期待される。このため、Chelex 溶液中で組織を99℃、5分間加熱処理した後に冷却するだけでDNAが抽出できるChelex抽出法¹⁵⁾等の簡便な方法で抽出されたDNAも使用可能である。DNAを抽出するサンプルは、純エタノール中で固定、または冷凍した鱗、鰭、血液等、DNAを含む組織であれば何を用いても良い。鱗や鰭の一部だけを用いることで結果が得られるので、DNAに基づく調査研究では常識的なことではあるが、対象となる魚を殺すことなく判別が行える。

本判別法は、琉球列島に分布する在来フナの実態を探る上で非常に有用であると考えられる。我々はこれまで琉球列島に分布するフナの調査を行って来たが³⁾、未調査の水域も多い。この判別法を用いた、琉球列島における在来フナの詳細な分布状況の把握が求められる。また、最近沖縄県下では在来フナ的重要性が認識され始め、様々な保全活動が行われている。しかし、著者らの知る範囲でも、扱うフナが在来個体であるか、移殖個体であるかを確認せずに保護・増殖するような活動も中には見受けられる。これまでに琉球列島で行われたフナの詳細な分布調査の結果、現在琉球列島に生息するフナのおよそ半分は移殖個体であるこ

とが明らかになっており³⁾、由来の明らかでないフナを保護・増殖した場合、在来個体だけでなく、移殖個体も人為的に増やしてしまう可能性が高い。また、このようにして増やされた移殖個体が自然水域に放たれると、移殖個体が分布を広げるだけでなく、それらがそこに元々生息していた在来個体と交雑するならば、在来集団の遺伝的独自性が攪乱されることになる。このような事態を避け、在来フナを確実に保全するために、本プライマーが活用されることが望まれる。

今回開発した簡易判別法は、あくまでmtDNAを分析対照にしたものである。mtDNAは母系を通じて遺伝するため、雌性生殖を行うフナを調査する上では有用であるが、有性生殖を行うフナでは交雑があった場合、mtDNA分析のみではこれを検出することは難しい。すなわち、琉球系統であると判定された個体が交雑個体である可能性も否定できない。本判別法は、在来フナを検出するための必要最低限の判別方法の一つであり、今後、核ゲノムの研究とそれに基づいたマーカーの開発も必要である。

要 約

琉球列島のフナは、高い遺伝的独自性と地域特異性を持つ進化的に重要な単位 (ESU) である。しかし、近年その減少は著しく、さらに残された個体群は日本主列島、台湾、中国からのフナの人為的移殖の影響を強く受けており、これまでに分析した485個体のうち、231個体 (48%) は移殖個体であった。我々はこのESUの保全に関する調査研究に資するため、琉球列島の在来フナと移殖フナを簡易に判別する方法を開発した。在来フナの塩基配列のみを検出する上流プライマーをmtDNAのND4遺伝子領域に、移殖フナに対するそれをND5遺伝子領域に設計した。これらに対応する下流プライマーは前者では240bp、後者では364bpの断片を増幅するように設計した。これら2プライマーセットと、PCR反応の正否を確認するためのポジティブコントロール用の1プライマーセットを含む反応液を用いてマルチプレックスPCRを行ったところ、今回開発したプライマーセットを用いることで、琉球列島に分布する在来フナと移殖フナを正しく判別出来ることが確認された。

謝 辞

本研究で使用した標本を提供して下さった井口恵一朗氏にお礼申し上げます。なお、本研究の一部は琉球大学と東京大学の21世紀COEプログラム、および日本学術振興会の科学研究費補助金 (15380131・17405035・19207007) によって行われた。

文 献

- 1) Eshmeyer, W. N. (2008) Catalog of fishes, On-Line version: <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.
- 2) 中村守純 (1969) 日本のコイ科魚類 (日本産コイ科魚類の生活史に関する研究). 資源科学シリーズ4. 資源科学研究所, 東京, 455 pp.
- 3) Takada, M., K. Tachihara, T. Kon, G. Yamamoto, K. Iguchi, M. Miya and M. Nishida (2010) Biogeography and evolution of *Carassius auratus*-complex in the East Asia. BMC Evol. Biol., doi: 10.1186/1471-2184-10-7.
- 4) Yamamoto, G., M. Takada, K. Iguchi and M. Nishida (2010) Genetic constitution and phylogenetic relationships among Japanese crucian carps (*Carassius*). Ichthyol. Res., in press.
- 5) 細谷和海 (2000) コイ科. 「日本産魚類検索 全種の同定 第二版」中坊徹次編, 東海大学出版会, 東京, pp. 253-254.
- 6) Murakami, M., C. Matsuda and H. Fujitani (2001) The maternal origins of the triploid gimbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing. Genes. Genet. Syst., 76: 25-32.
- 7) Iguchi, K., G. Yamamoto, N. Matsubara and M. Nishida (2003) Morphological and genetic analysis of fish of a *Carassius* complex (Cyprinidae) in Lake Kasumigaura with reference to the taxonomic status of two all-female triploid morphs. Biol. J. Linn. Soc. Lond., 79: 351-357.
- 8) 池原貞雄 (1996) 貴重な動物たちの島ー琉球列島の動物. 「日本の自然 地域編 8, 南の島々」中村和朗・氏家 宏・池原貞雄・田川日出夫・堀 信行編, 岩波書店, 東京, pp. 149-158.
- 9) 西田 睦・鹿谷法一・諸喜田茂充 (2003) 「琉球列島の陸水生物」東海大学出版, 東京, 572 pp.
- 10) Moritz, C. (1994) Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. Trends. Ecol. Evol., 9: 373-375.
- 11) 高田未来美・立原一憲 (2005) ギンブナ「改訂・沖縄県の絶滅のおそれのある野生生物 (動物編): レッドデータおきなわ」沖縄県文化環境部自然保護課編, 沖縄県文化環境部自然保護課, 那覇, pp. 176-177.
- 12) Sommer, S. S., A. R. Groszback and C. D. K. Bottema (1992) PCR amplification on specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. BioTechniques, 12: 82-82.
- 13) Iguchi, K., Y. Tanimura and M. Nishida (1997) Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms of ayu. Fish. Sci., 63: 901-905.
- 14) 西田 睦・大河俊之・岩田裕士 (1998) ミトコンドリアDNA分析による集団構造解析法. 水産育種, 26: 81-100.
- 15) Walsh, P., D. Metzger and R. Higuchi (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques, 10: 506-513.

サバ科魚類 *vasa* cDNA のクローニングおよび その配列多型を利用した PCR によるクロマグロ生殖細胞検出系の構築

壁谷尚樹 (海洋大)・奥津智之 (国際農水セ)・矢澤良輔 (海洋大)・樋口健太郎 (水産総合研究セ)
長澤一衛 (海洋大)・三森亮介 (葛西臨海水族園)・中田 久・濱崎将臣 (長崎総合水試)
竹内 裕 (海洋大・先端科学技研セ)・吉崎悟朗 (海洋大)

Identification of Bluefin Tuna Germ Cells and Larvae by PCR Detection of *vasa* Sequence Polymorphisms

Naoki KABEYA^{*1}, Tomoyuki OKUTSU^{*2}, Ryosuke YAZAWA^{*1}, Kentaro HIGUCHI^{*3},
Kazue NAGASAWA^{*1}, Ryosuke MIMORI^{*4}, Hisashi CHUDA^{*5}, Masaomi HAMASAKI^{*5},
Yutaka TAKEUCHI^{*6} and Goro YOSHIZAKI^{*1}

^{*1} Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology

^{*2} Japan International Research Center for Agricultural Sciences

^{*3} Amami Station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency

^{*4} Tokyo Sea Life Park

^{*5} Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries

^{*6} Research Center for Advanced Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology

Abstract

The production of bluefin tuna gametes via interspecies germ cell transplantation with small-bodied surrogate broodstocks, which have short generation times, enables rapid and simple seed production of the bluefin tuna. Due to their high degree of relatedness, members of the family Scombridae are the most promising candidate surrogate species for the production of bluefin tuna gametes. The successful use of surrogate broodstock requires an efficient and reliable method to trace donor-derived germ cells in the recipient fish. PCR analysis of sequence polymorphisms of gene(s) specifically expressed in germ cells provides a powerful approach to distinguish donor-derived germ cells from the recipient-derived cells. Herein, we describe a method for the specific detection of bluefin tuna *vasa* in mRNA transcripts and genomic DNA. Full-length *vasa* cDNAs were cloned from six potential surrogate scombrid species. A bluefin tuna-specific *vasa* primer pair was designed based on an alignment of bluefin tuna and other scombrid *vasa* cDNA open reading frame sequences. Importantly, amplification of the target 578-bp fragment by RT-PCR with this primer pair was successful only for gonadal bluefin tuna cDNA template. Additionally, the bluefin PCR product could be digested into two fragments (364 and 214 bp) by *Hpa*I, a restriction enzyme specific to the bluefin tuna *vasa* sequence. Similar results were obtained for genomic DNA extracted from bluefin tuna larvae. Thus, detection of sequence polymorphism of *vasa* would be invaluable for detecting the donor-derived bluefin tuna germ cells and resultant larvae when Scombridae recipients are used as surrogates.

(accepted February 25, 2010)

近年、世界各地で、養殖用種苗としてクロマグロ *Thunnus orientalis* の幼魚が採捕されており、これによる天然クロマグロ資源量の減少が危惧されている¹⁾。この問題を解決するため、天然の幼魚を採捕せずに、人工飼育下で養成親魚から得られた受精卵を用いてクロマグロを生産する完全養殖技術の開発が行われている^{2,3)}。しかし、この方法で受精卵を得るためには、高額な餌代や、多くの人手、さらには大規模施設を必要とする。そこで我々は、新たな人工種苗生産技術として「代理親魚技法」の開発に取り組んでいる^{4,6)}。代理親魚技法とは、目的とする魚種の配偶子を飼育が容易で成熟までに時間を必要としない異種または異系統の代理の親魚に生産させる技術である⁶⁾。本技法を利用し、クロマグロの配偶子を陸上水槽において近縁の小型種に生産させることができれば、短期間のうちにクロマグロの配偶子を容易に得ることが可能となる。具体的には、ドナーとなる魚種の精巢から精原細胞を調製し、それを免疫的に未熟な仔魚期の宿主腹腔内に移植する。その後、移植されたドナー精原細胞は自ら生殖腺原基に移動し、そこに生着した後、最終的には正常な配偶子に分化する。我々はすでにドナーにニジマス *Oncorhynchus mykiss* 宿主にニジマスを用いた同種間⁷⁾のみならず、ドナーにニジマス、宿主にヤマメ *Oncorhynchus masou* を用いた異種間^{4,5)}においてもドナー由来配偶子を生産させることに成功している。また近年、海産魚のニベ *Nibea mitsukurii* においても、精原細胞移植技法が構築されている⁸⁾。

代理親魚技法を成功させるためには、ドナーとなる生殖細胞が近縁種の宿主生殖腺に生着し、宿主生殖腺内で増殖、さらに長期間生き残ることが必要である。もし、ドナー生殖細胞由来の次世代子孫が作出されるまで、移植の成否を確認する方法が無ければ、世代の長い種を宿主に用いた場合、結果が明らかになるまでに長い時間を要する。そのため、精原細胞移植系を構築していく際には、宿主腹腔内に移植したドナー生殖細胞が宿主生殖腺内でどのような挙動を示すかをリアルタイムでモニタリングする技術の開発が重要である。

宿主生殖腺内でドナー由来の生殖細胞を検出するためには、まず宿主自身がつ生殖細胞と移植によって生着したドナー種の生殖細胞の判別、次にドナー由来の体細胞と生殖細胞を判別する必要がある。我々が行ったニジマス、ヤマメ間の異種間移植実験においては、生殖細胞が特異的に緑色蛍光を発している *pvasa-Gfp* 遺伝子導入ニジマス^{9,10)}をドナーとして用いたため、ドナー生殖細胞に特異的な緑色蛍光を指標として、移植後の生殖細胞の追跡を行うことが可能であっ

た。しかし、養殖対象魚種に対して遺伝子導入技術を用いることは好ましくない。また、多くの有用海産魚種が産出する卵は直径 1 mm 程度と小型であり、ハンドリングに弱い、マイクロインジェクションなどを用いた遺伝子導入技法の開発が非常に困難である。

これらの課題を解決するためには、生殖細胞で特異的に発現する内在性の遺伝子の種間配列多型を検出することで、移植した生殖細胞が宿主の生殖腺に生着したか否かを明らかにすることが有効であると考えられる。具体的には、種特異的プライマーを用いた RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) 法¹¹⁾や、PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法¹²⁾の活用である。これらの方法により、宿主の成熟を待たずに移植の成否を判定することが可能となり、ドナー種と宿主種の最適な組み合わせの検討、さらには精原細胞の移植技法の検討の際の有用なツールになるものと期待される。

これらの方法を実現するためには、生殖細胞で特異的に発現し、多くの動物種で生殖細胞マーカーとして利用されている *vasa* 遺伝子が有用である¹³⁾。すなわち *vasa* 遺伝子の種間での多型をもとにクロマグロの *vasa* 遺伝子に特異的な PCR プライマーを作成し、RT-PCR により宿主の生殖腺内にドナー種由来の *vasa* mRNA (cDNA) が検出できれば、ドナー由来生殖細胞が存在していることの明瞭な証拠となる。また、代理親魚技法を用いてクロマグロの仔魚が得られた場合、同じプライマーを用いてそのゲノム DNA を鋳型として PCR を行うことにより、宿主由来の次世代個体とクロマグロ由来の次世代個体を識別することも可能になる。そこで本研究では、クロマグロ生殖細胞移植の宿主候補であるサバ科魚類 6 種を用いて *vasa* 遺伝子の cDNA クローニングを行い、その塩基配列を決定した。さらに、これらの情報を基に、クロマグロ *vasa* 遺伝子のみを検出する技法の開発を行った。

材料と方法

供試魚 本研究では、奄美大島の民間養殖場で飼育されたクロマグロの精巢、甌島および和歌山県串本の民間養殖場で飼育されたクロマグロの卵巣、千葉県館山市洲崎の定置網で採捕されたクロマグロの卵巣をそれぞれ各一尾より単離し用いた。各々の魚体重 (生殖腺指数 = 生殖腺重量 ÷ 魚体重 × 100) は、55.0 kg (0.16)、3.1 kg (0.046)、35.7 kg (0.784)、6.6 kg (0.038) であった。また、クロマグロの配偶子を生産させる代理親魚候補のサバ科魚類として、千葉県南房総市千倉の定置網で採捕されたカツオ *Katsuwonus pelamis* (魚体重: 1544.5 g、生殖腺指数: 0.28、以下同様) の卵巣、

千葉県館山市波左間の定置網で採捕されたマルソウダ *Auxis rochei* (293.4 g, 0.17) およびヒラソウダ *A. thazard* (782.8 g, 0.42) の卵巣、和歌山県東牟婁郡串本町の民間養殖場で飼育されたスマ *Euthynnus affinis* (1827.3 g, 0.049) の卵巣、千葉県館山市洲崎の定置網で採捕されたマサバ *Scomber japonicus* (159.8 g, 0.07) の精巣およびゴマサバ *S. australasius* (143.0 g, 0.13) の卵巣を用いた。摘出した生殖腺はそれぞれドライアイスで急速凍結した後、 -80°C にて保存した。

供試魚生殖腺からの RNA 抽出および cDNA 合成 各魚種の卵巣および精巣から ISOGEN (ニッポンジーン) により、添付のプロトコルに従い全 RNA を抽出した。続いて、TURBO DNase (Ambion) を用いて添付のプロトコルに従い DNA 分解反応を行った後に、中山ら¹⁴⁾の方法に従いフェノール抽出、エタノール沈澱にて精製した。得られた全 RNA のうち $2\mu\text{g}$ を鋳

型として Ready To Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare Life Sciences) により、オリゴ (dT) アダプタープライマー (Table 1) を用いて第 1 鎖 cDNA を合成した。

vasa 遺伝子のクローニング 合成した各魚種 cDNA を鋳型とし、Nagasawa ら¹⁵⁾の方法を参考に縮重プライマーを設計し、Table 1 に示すプライマーを用いて RT-PCR を行った。PCR 反応液は、合成した cDNA (20倍希釈) $1\mu\text{l}$ 、 $10\times\text{ExTaq}$ buffer (タカラバイオ) $1\mu\text{l}$ 、25 mM dNTP mixture (タカラバイオ) $0.8\mu\text{l}$ 、 $1\mu\text{M}$ の各プライマー $1\mu\text{l}$ 、Takara *ExTaq* ポリメラーゼ (タカラバイオ) $0.05\mu\text{l}$ 、DW (蒸留水) $5.15\mu\text{l}$ の計 $10\mu\text{l}$ とした。温度条件は 94°C で 3 分間の熱変性の後、 94°C で 30 秒間、 58°C で 30 秒間、 72°C で 30 秒間のサイクルを 35 回繰り返し、 72°C で 5 分間の最終伸長反応を行った。得られた PCR 反応液を 2.0% の

Table 1. List of primers used for degenerate PCR, RACE-PCR, RT-PCR, and Genomic PCR

Step	Primer name	Sequence	Species	Order
cDNA synthesis	Adaptor-oligo (dT)	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGG CCCGGGCTGG(T) $\times 19$ -3'	All	Antisense
Degenerate PCR	mixFw1- <i>vasa</i>	5'-TAYRWBAAGCCBACNCCCHGTNCAGAA-3'	All	Sense
Degenerate PCR	mixRv4- <i>vasa</i>	5'-TCHTCDGGGWANGTRGCRCTGAACAT-3'	All	Antisense
3'RACE first	mixFw1- <i>vasa</i>	5'-TAYRWBAAGCCBACNCCCHGTNCAGAA-3'	EA, SJ	Sense
3'RACE nested	mixFw2- <i>vasa</i>	5'-TATYKCHGCGYGGMMGRGAYCTVATGGC-3'	EA, SJ	Sense
3'RACE first	GOMAvasa_GSP_Fw1	5'-TCCTAGATGAGGCTGACCGGATGTT-3'	SA	Sense
3'RACE nested	GOMAvasa_GSP_Fw2	5'-TCCAAAGAGAACCGTCAGACTCTT-3'	SA	Sense
3'RACE first	Katsuo_3RACE_Fw1	5'-TAAGCTGCGGTACCTGGTGCTAGAT-3'	KP, AR, AT	Sense
3'RACE nested	Katsuo_3RACE_Fw2	5'-TGGGCTCACCTGGAATGCCATCCAA-3'	KP, AR, AT	Sense
3'RACE first	Adaptor1	5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3'	All	Antisense
3'RACE nested	Adaptor2	5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'	All	Antisense
5'RACE first	MASABA_vas_GSP1	5'-TCCATGAGATCTCTGCCAGCAGAGATA-3'	SJ	Antisense
5'RACE nested	MASABA_vas_GSP2	5'-TGATCTCTGCCAGCAGAGATAATTGGAAT-3'	SJ	Antisense
5'RACE first	GOMA_vas_GSP1	5'-TGCCATGAGATCTCTGCCAGCAGAGATGA-3'	SA	Antisense
5'RACE nested	GOMA_vas_GSP2	5'-TGATCTCTGCCAGCAGAGATGATTGGAAT-3'	SA	Antisense
5'RACE first	SUMA_vas_GSP1	5'-TCATCTGCCATCAGCTGCTGCAGAAT-3'	EA, AR	Antisense
5'RACE nested	SUMA_vas_GSP2	5'-TATGCAGCCGTTTACCAGATCCAGTCT-3'	EA, AR	Antisense
5'RACE first	Katsuo_5RACE_Rv1	5'-AATCTGGTTGATGAGCTCCCTAGTT-3'	KP, AT	Antisense
5'RACE nested	Katsuo_5RACE_Rv2	5'-TGATTGCTTCAGGCTCCTGCAGCTCACT-3'	KP, AT	Antisense
Vasa total-length PCR	Katsuo_vasa5UTR_F1	5'-TACCATAGACTTCTGCCTGAGAAGT-3'	EA, KP, AR, AT	Sense
Vasa total-length PCR	Katsuo_vasa3UTR_R1	5'-TTGGTTCGACAGACACATTGTT-3'	KP, AR, AT	Antisense
Vasa total-length PCR	Saba_vasa5UTR_F1	5'-TTAGTGACCAGACGAGAACAACGACTT-3'	SJ, SA	Sense
Vasa total-length PCR	Saba_vasa3UTR_R1	5'-TGCCAGTCAGTGAATGGAGATGACAGAT-3'	EA, SJ	Antisense
Vasa total-length PCR	Goma_vasa3UTR_R1	5'-TGGTTTCGCCATTACCATCTCACTTAGC-3'	SA	Antisense
RT-PCR, Genomic PCR	BFT-specific Fw	5'-GGCTGACTTCCTCAAGACAG-3'	All	Sense
RT-PCR, Genomic PCR	BFT-specific Rv	5'-TAAAGCCAGTGGTAGCAGGT-3'	All	Antisense
RT-PCR, Genomic PCR	Common Fw	5'-CTATTTGTCTCTGGCTGTGG-3'	All	Sense
RT-PCR, Genomic PCR	Common Rv	5'-GCAGACTCTTCTAACCATGAAGG-3'	All	Antisense

※abbreviations; EA, *E. affinis*; SJ, *S. japonicus*; SA, *S. australasius*; KP, *K. pelamis*; AR, *A. rochei*; AT, *A. thazard*.

アガロース電気泳動に供し、予想されるサイズの増幅断片を UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO Bio) を用いて添付のプロトコルに従い切り出し精製した。精製した増幅断片を pGEM T-Easy Vector System I (Promega) を用いて添付のプロトコルに従い pGEM T-Easy プラスミドベクターにサブクローニングした。得られたプラスミドの塩基配列は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems) により決定した。次に全長の cDNA 配列を決定するため、3'末端および5'末端の rapid amplification of cDNA ends (RACE) を行った。上述の縮重プライマーを用いた PCR により決定した cDNA 配列の一部から、Table 1 に示すプライマーを用いて 3'RACE を行った。PCR 反応は、上述と同様の鋳型 cDNA を用い、温度条件は、94℃で3分間の熱変性の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で1分間のサイクルを35回繰り返し、72℃で5分間の最終伸長反応を行った。得られた PCR 産物の100倍希釈液を鋳型とし、Table 1 に示すプライマーを用いて nested PCR を行った。nested PCR の温度条件は、94℃で3分間の熱変性の後、94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で1分間のサイクルを35回繰り返し、72℃で5分間の最終伸長反応を行った。5' RACE は GeneRacer Kit with SuperScript III RT, TOPO TA Cloning for Sequencing (Invitrogen) を用いて添付のプロトコルに従い行った。最後に、Table 1 に示すプライマーを用いて *vasa* cDNA の全長を増幅した。PCR 反応は、上述の GeneRacer Kit により合成した cDNA (40倍希釈) を鋳型とし、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて付属のプロトコルに従い行った。それぞれ得られた増幅断片は上述の方法でゲル精製後、pGEM T-Easy にサブクローニングし、上述の方法を用いて *vasa* 全長の塩基配列を決定した。

系統解析 続いて、得られた cDNA 配列より推定されるアミノ酸配列の相同性検索を National Center for Biotechnology Information のウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) にて行った。各配列のアライメントには CLC Sequence Viewer (CLC bio) を使用し、近隣結合法¹⁰⁾により系統樹を作成した。系統解析は全て初期設定の状態で行い、系統樹の分岐は1000回のブートストラップ解析により評価した。

クロマグロ *vasa* 特異的 RT-PCR および制限酵素処理 クロマグロ *vasa* 遺伝子のみを特異的に増幅するプライマーを作成するため、得られたサバ科各魚種 *vasa* 遺伝子の塩基配列と既知のクロマグロ *vasa* 遺伝子の塩基配列¹⁵⁾を上述のソフトウェアを用いて比較

した。次に、サバ科各魚種 *vasa* 遺伝子配列とクロマグロ *vasa* 遺伝子配列間で多型が集中している領域に PCR プライマー (BFT-specific Fw, BFT-specific Rv) を設計した (Fig. 3)。このプライマーがクロマグロ *vasa* 遺伝子に特異的であることを確認するために、クロマグロの卵巣および精巣 cDNA、サバ科各魚種の卵巣および精巣 cDNA を鋳型に RT-PCR を行った。PCR 反応液は、合成した cDNA (50倍希釈) 1 μ l、10 $\times$ ExTaq buffer (タカラバイオ) 1 μ l、25 mM dNTP mixture (タカラバイオ) 0.8 μ l、1 μ M の各プライマー 1 μ l、Takara ExTaq ポリメラーゼ (タカラバイオ) 0.05 μ l、DW 5.15 μ l の計10 μ l とした。温度条件は94℃で3分間の熱変性の後、94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で30秒間のサイクルを30回繰り返し、72℃で5分間の最終伸長反応を行った。また、各魚種 *vasa* 遺伝子の保存領域から設計したプライマー (Table 1) を用いて同様の条件で PCR を行い、陽性対照とした。得られた PCR 産物を2.0%のアガロースゲル電気泳動にて確認した。さらに、PCR により増幅した断片が間違いなくクロマグロ由来のものであるかを確認するために、クロマグロ *vasa* 遺伝子のみがその認識配列を保有する *HpaI* により酵素消化を施した。反応液は、得られた PCR 産物2.0 μ l、10 $\times$ K バッファー (タカラバイオ) 1.0 μ l、*HpaI* (タカラバイオ) 0.5 μ l、蒸留水7.5 μ l の計10 μ l とした。37℃で3時間処理した後、アガロースゲル電気泳動にて断片長を確認した。

孵化仔魚からのゲノム DNA 抽出およびクロマグロ特異的 PCR RT-PCR 法で用いたプライマーがゲノム DNA を鋳型とした場合にも有効であるか検討するために、長崎県五島の民間養殖場で生産された孵化後1日齢のクロマグロ仔魚、および、東京都葛西臨海水族園から譲渡されたスマ、カツオ受精卵より得られた孵化後1日齢の仔魚から、Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen) を用いて添付のプロトコルに従い全ゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA を鋳型として、上記 RT-PCR で使用したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 反応液は、孵化仔魚ゲノム DNA (原液) 1 μ l、10 $\times$ ExTaq buffer (タカラバイオ) 1 μ l、25 mM dNTP mixture (タカラバイオ) 0.8 μ l、1 μ M の各プライマー 1 μ l、Takara ExTaq ポリメラーゼ (タカラバイオ) 0.05 μ l、DW 5.15 μ l の計10 μ l とした。温度条件は94℃で3分間の熱変性の後、94℃で30秒間、60℃で30秒間、72℃で30秒間のサイクルを35回繰り返し、72℃で5分間の最終伸長反応を行った。2.0%アガロースゲル電気泳動にて増幅断片を確認した後、増幅断片の *HpaI* 消化が可能であるか否か調べた。また、

		20	40	60																
T. orientalis	MDEWEEEGNTSTITLTSRTSS	EGTQGD	FWNNNG	GEFG	RGGRGRGRGRGGFKSS	YSSGGD	GNDK	WNNAG	70											
K. pelamis	MDEWEEEGTTSITLTSHTLS	EGTQGD	SWNNNG	GEFG	RGGRGRGRGRGGFKSS	YSSGGD	ENDENN	WNNAG	70											
E. affinis	MDEWEEEGTTSITLTSHTLS	EGTQGD	SWNNNG	GEFG	RGGRGRGRGRGGFKSS	YSSGGD	ENDENN	WNNAG	70											
A. rochei	MDEWEEEGTTSITLTSHTLS	EGTQGD	SWNNNG	GEFG	RGGRGRGRGRGGFKSS	YSSGGD	ENDENN	WNNAG	70											
A. thazard	MDEWEEEGTTSITLTSHTLS	EGTQGD	SWNNNG	GEFG	RGGRGRGRGRGGFKSS	YSSGGD	ENDENN	WNNAG	70											
S. japonicus	MDEWEEEGTTSITLTSHTLS	EGTQGD	SWNNNG	GEFG	RGGRGRGRGRGGFKSS	YSSGGD	ENDENN	WNNAG	70											
S. australasicus	MDEWEEEGTTSITLTSHTLS	EGTQGD	SWNNNG	GEFG	RGGRGRGRGRGGFKSS	YSSGGD	ENDENN	WNNAG	70											
		80	100	120	140															
T. orientalis	GERGGFRGRGGQGRGRGFC	MDSEF	NGDDN	MRNENY	RGGRGRGRGRGG	FSQGGD	QGGRRGF	GGGYRGR	140											
K. pelamis	GERGGFRGRGGQGRGRGFC	MDSEF	NGDDN	MRNENY	RGGRGRGRGRGG	FSQGGD	-GRRGS	GGGYRGR	139											
E. affinis	GERGGFRGRGGQGRGRGFC	MDSEF	NGDDN	MRNENY	RGGRGRGRGRGG	FSQGGD	-GRRGS	GGGYRGR	136											
A. rochei	GERGGFRGRGGQGRGRGFC	MDSEF	NGDDN	MRNENY	RGGRGRGRGRGG	FSQGGD	-GRRGS	GGGYRGR	125											
A. thazard	GERGGFRGRGGQGRGRGFC	MDSEF	NGDDN	MRNENY	RGGRGRGRGRGG	FSQGGD	-GRRGS	GGGYRGR	125											
S. japonicus	GERGGFRGRGGQGRGRGFC	MDSEF	NGDDN	MRNENY	RGGRGRGRGRGG	FSQGGD	-GRRGS	GGGYRGR	140											
S. australasicus	GERGGFRGRGGQGRGRGFC	MDSEF	NGDDN	MRNENY	RGGRGRGRGRGG	FSQGGD	-GRRGS	GGGYRGR	140											
		160	180	200	220															
T. orientalis	DEEIFTRGEDKDPEKKD	DSRP	KIYV	PPTL	PEDEDS	IFSHY	ETGIN	FDKYDD	IMVDV	SGTN	FPQAV	MTF	210							
K. pelamis	DEEIFTRGEDKDPEKKD	DSRP	KIYV	PPTL	PEDEDS	IFSHY	ETGIN	FDKYDD	IMVDV	SGTN	FPQAV	MTF	209							
E. affinis	DEEIFTRGEDKDPEKKD	DSRP	KIYV	PPTL	PEDEDS	IFSHY	ETGIN	FDKYDD	IMVDV	SGTN	FPQAV	MTF	206							
A. rochei	DEEIFTRGEDKDPEKKD	DSRP	KIYV	PPTL	PEDEDS	IFSHY	ETGIN	FDKYDD	IMVDV	SGTN	FPQAV	MTF	195							
A. thazard	DEEIFTRGEDKDPEKKD	DSRP	KIYV	PPTL	PEDEDS	IFSHY	ETGIN	FDKYDD	IMVDV	SGTN	FPQAV	MTF	196							
S. japonicus	DEEIFTRGEDKDPEKKD	DSRP	KIYV	PPTL	PEDEDS	IFSHY	ETGIN	FDKYDD	IMVDV	SGTN	FPQAV	MTF	210							
S. australasicus	DEEIFTRGEDKDPEKKD	DSRP	KIYV	PPTL	PEDEDS	IFSHY	ETGIN	FDKYDD	IMVDV	SGTN	FPQAV	MTF	210							
		220	240	260	280															
T. orientalis	DEAALCESLRKNVSKSGYV	KPTPV	QKHG	PIIS	AGRDL	MACA	QOTG	SGKTAA	AFLLP	ILQQL	LMAD	GVAAS	RF	280						
K. pelamis	DEAALCESLRKNVSKSGYV	KPTPV	QKHG	PIIS	AGRDL	MACA	QOTG	SGKTAA	AFLLP	ILQQL	LMAD	GVAAS	RF	279						
E. affinis	DEAALCESLRKNVSKSGYV	KPTPV	QKHG	PIIS	AGRDL	MACA	QOTG	SGKTAA	AFLLP	ILQQL	LMAD	GVAAS	RF	276						
A. rochei	DEAALCESLRKNVSKSGYV	KPTPV	QKHG	PIIS	AGRDL	MACA	QOTG	SGKTAA	AFLLP	ILQQL	LMAD	GVAAS	RF	265						
A. thazard	DEAALCESLRKNVSKSGYV	KPTPV	QKHG	PIIS	AGRDL	MACA	QOTG	SGKTAA	AFLLP	ILQQL	LMAD	GVAAS	RF	266						
S. japonicus	DEAALCESLRKNVSKSGYV	KPTPV	QKHG	PIIS	AGRDL	MACA	QOTG	SGKTAA	AFLLP	ILQQL	LMAD	GVAAS	RF	280						
S. australasicus	DEAALCESLRKNVSKSGYV	KPTPV	QKHG	PIIS	AGRDL	MACA	QOTG	SGKTAA	AFLLP	ILQQL	LMAD	GVAAS	RF	280						
		300	320	340	360															
T. orientalis	SELOEPEAIIVAPTR	ELIN	QIY	LEARK	FAFG	TCVR	PVVV	YGGV	STGH	QIR	EIR	SGCN	VCCG	TFGR	LLD	MI	350			
K. pelamis	SELOEPEAIIVAPTR	ELIN	QIY	LEARK	FAFG	TCVR	PVVV	YGGV	STGH	QIR	EIR	SGCN	VCCG	TFGR	LLD	MI	349			
E. affinis	SELOEPEAIIVAPTR	ELIN	QIY	LEARK	FAFG	TCVR	PVVV	YGGV	STGH	QIR	EIR	SGCN	VCCG	TFGR	LLD	MI	346			
A. rochei	SELOEPEAIIVAPTR	ELIN	QIY	LEARK	FAFG	TCVR	PVVV	YGGV	STGH	QIR	EIR	SGCN	VCCG	TFGR	LLD	MI	335			
A. thazard	SELOEPEAIIVAPTR	ELIN	QIY	LEARK	FAFG	TCVR	PVVV	YGGV	STGH	QIR	EIR	SGCN	VCCG	TFGR	LLD	MI	336			
S. japonicus	SELOEPEAIIVAPTR	ELIN	QIY	LEARK	FAFG	TCVR	PVVV	YGGV	STGH	QIR	EIR	SGCN	VCCG	TFGR	LLD	MI	350			
S. australasicus	SELOEPEAIIVAPTR	ELIN	QIY	LEARK	FAFG	TCVR	PVVV	YGGV	STGH	QIR	EIR	SGCN	VCCG	TFGR	LLD	MI	350			
		360	380	400	420															
T. orientalis	GRGKVG	LSKL	RYLV	LVD	DEADR	MLDM	GFEP	DMRRL	VGS	PGMPS	KENR	QTL	MFSA	TYP	EDI	QRM	AAD	FLK	TDY	420
K. pelamis	GRGKVG	LSKL	RYLV	LVD	DEADR	MLDM	GFEP	DMRRL	VGS	PGMPS	KENR	QTL	MFSA	TYP	EDI	QRM	AAD	FLK	TDY	419
E. affinis	GRGKVG	LSKL	RYLV	LVD	DEADR	MLDM	GFEP	DMRRL	VGS	PGMPS	KENR	QTL	MFSA	TYP	EDI	QRM	AAD	FLK	TDY	416
A. rochei	GRGKVG	LSKL	RYLV	LVD	DEADR	MLDM	GFEP	DMRRL	VGS	PGMPS	KENR	QTL	MFSA	TYP	EDI	QRM	AAD	FLK	TDY	405
A. thazard	GRGKVG	LSKL	RYLV	LVD	DEADR	MLDM	GFEP	DMRRL	VGS	PGMPS	KENR	QTL	MFSA	TYP	EDI	QRM	AAD	FLK	TDY	406
S. japonicus	GRGKVG	LSKL	RYLV	LVD	DEADR	MLDM	GFEP	DMRRL	VGS	PGMPS	KENR	QTL	MFSA	TYP	EDI	QRM	AAD	FLK	TDY	420
S. australasicus	GRGKVG	LSKL	RYLV	LVD	DEADR	MLDM	GFEP	DMRRL	VGS	PGMPS	KENR	QTL	MFSA	TYP	EDI	QRM	AAD	FLK	TDY	420
		440	460	480	500															
T. orientalis	LFLAVGVVGGACSD	VEQTF	IQVTK	FSKRE	QLDL	LLKTT	GERT	MTVF	VETK	ROAD	FIAT	FLC	QEK	VPT	TSI	490				
K. pelamis	LFLAVGVVGGACSD	VEQTF	IQVTK	FSKRE	QLDL	LLKTT	GERT	MTVF	VETK	ROAD	FIAT	FLC	QEK	VPT	TSI	489				
E. affinis	LFLAVGVVGGACSD	VEQTF	IQVTK	FSKRE	QLDL	LLKTT	GERT	MTVF	VETK	ROAD	FIAT	FLC	QEK	VPT	TSI	486				
A. rochei	LFLAVGVVGGACSD	VEQTF	IQVTK	FSKRE	QLDL	LLKTT	GERT	MTVF	VETK	ROAD	FIAT	FLC	QEK	VPT	TSI	475				
A. thazard	LFLAVGVVGGACSD	VEQTF	IQVTK	FSKRE	QLDL	LLKTT	GERT	MTVF	VETK	ROAD	FIAT	FLC	QEK	VPT	TSI	476				
S. japonicus	LFLAVGVVGGACSD	VEQTF	IQVTK	FSKRE	QLDL	LLKTT	GERT	MTVF	VETK	ROAD	FIAT	FLC	QEK	VPT	TSI	490				
S. australasicus	LFLAVGVVGGACSD	VEQTF	IQVTK	FSKRE	QLDL	LLKTT	GERT	MTVF	VETK	ROAD	FIAT	FLC	QEK	VPT	TSI	490				
		500	520	540	560															
T. orientalis	HGDREQREREQAL	ADFR	SGKCP	VLV	ATSVA	ARGLD	IPD	VQHV	VNFD	LPNN	IDEV	VH	RIGRT	GR	CGNT	GRA	560			
K. pelamis	HGDREQREREQAL	ADFR	SGKCP	VLV	ATSVA	ARGLD	IPD	VQHV	VNFD	LPNN	IDEV	VH	RIGRT	GR	CGNT	GRA	559			
E. affinis	HGDREQREREQAL	ADFR	SGKCP	VLV	ATSVA	ARGLD	IPD	VQHV	VNFD	LPNN	IDEV	VH	RIGRT	GR	CGNT	GRA	556			
A. rochei	HGDREQREREQAL	ADFR	SGKCP	VLV	ATSVA	ARGLD	IPD	VQHV	VNFD	LPNN	IDEV	VH	RIGRT	GR	CGNT	GRA	545			
A. thazard	HGDREQREREQAL	ADFR	SGKCP	VLV	ATSVA	ARGLD	IPD	VQHV	VNFD	LPNN	IDEV	VH	RIGRT	GR	CGNT	GRA	546			
S. japonicus	HGDREQREREQAL	ADFR	SGKCP	VLV	ATSVA	ARGLD	IPD	VQHV	VNFD	LPNN	IDEV	VH	RIGRT	GR	CGNT	GRA	560			
S. australasicus	HGDREQREREQAL	ADFR	SGKCP	VLV	ATSVA	ARGLD	IPD	VQHV	VNFD	LPNN	IDEV	VH	RIGRT	GR	CGNT	GRA	560			
		580	600	620	640															
T. orientalis	VSFYDPD	ADGQL	ARS	ITVLS	KAQ	QEVPS	WLEES	AFSG	PAT	TG	FN	PRKN	FAST	DS	SRK	GS	FQDN	SV	QSQ	630
K. pelamis	VSFYDPD	ADGQL	ARS	ITVLS	KAQ	QEVPS	WLEES	AFSG	PAT	TG	FN	PRKN	FAST	DS	SRK	GS	FQDN	SV	QSQ	629
E. affinis	VSFYDPD	ADGQL	ARS	ITVLS	KAQ	QEVPS	WLEES	AFSG	PAT	TG	FN	PRKN	FAST	DS	SRK	GS	FQDN	SV	QSQ	626
A. rochei	VSFYDPD	ADGQL	ARS	ITVLS	KAQ	QEVPS	WLEES	AFSG	PAT	TG	FN	PRKN	FAST	DS	SRK	GS	FQDN	SV	QSQ	615
A. thazard	VSFYDPD	ADGQL	ARS	ITVLS	KAQ	QEVPS	WLEES	AFSG	PAT	TG	FN	PRKN	FAST	DS	SRK	GS	FQDN	SV	QSQ	616
S. japonicus	VSFYDPD	ADGQL	ARS	ITVLS	KAQ	QEVPS	WLEES	AFSG	PAT	TG	FN	PRKN	FAST	DS	SRK	GS	FQDN	SV	QSQ	630
S. australasicus	VSFYDPD	ADGQL	ARS	ITVLS	KAQ	QEVPS	WLEES	AFSG	PAT	TG	FN	PRKN	FAST	DS	SRK	GS	FQDN	SV	QSQ	630
		640																		
T. orientalis	PAVOTA	AADD	-EWE*	645																
K. pelamis	PAVHTA	AADD	-EWE*	644																
E. affinis	PAVHTA	AADD	-EWE*	641																
A. rochei	PAV-	AADD	-EWE*	628																
A. thazard	PAV-	AADD	-EWE*	628																
S. japonicus	EAVQPA	AADD	-EWE*	644																
S. australasicus	EAVQPA	AADD	-EWE*	646																

Fig. 1. Comparison of the deduced amino acid sequence of *vasa* gene sequence from *Thunnus orientalis*, *Katsuwonus pelamis*, *Euthynnus affinis*, *Auxis rochei*, *Auxis thazard*, *Scomber japonicus* and *Scomber australasicus*. Identical sequences are shaded. Arginine-glycine repeats and arginine-glycine-glycine repeats in the N-terminal region, which are well-conserved among the *vasa* orthologs of various species, are underlined and double underlined, respectively. Eight consensus sequences for the DEAD protein family, including an adenosine triphosphate (ATP)-A motif and an ATP-B motif, are enclosed in boxes. Individual sequence data is available from GenBank (*Thunnus orientalis*: EU253482; 1292 bp-1869 bp, *Katsuwonus pelamis*: GU581281; 1276 bp-1853 bp, *Euthynnus affinis*: GU581280; 1299 bp-1876 bp, *Auxis rochei*: GU581282; 1263 bp-1840 bp, *Auxis thazard*: GU581283; 1236 bp-1813 bp, *Scomber japonicus*: GQ404693; 1311 bp-1888 bp, *Scomber australasicus*: GU581279; 1350 bp-1927 bp).

クロマグロ由来の DNA 断片に関しては、*HpaI* 認識部位が増幅された領域に 1 ヶ所しかないことを確認するために、増幅断片をサブクローニングし、塩基配列を決定した。

結 果

サバ科各魚種 *vasa* cDNA のクローニングおよび系統解析 サバ科各魚種 *vasa* 遺伝子のアミノ酸翻訳領域 (ORF) の長さは、カツオ、スマ、ヒラソウダ、マルソウダ、マサバ、ゴマサバの順に 1932 bp、1923 bp、1884 bp、1884 bp、1932 bp、1938 bp であった。これらの塩基配列を比較したところ、ORF の相対性は 91%~99% であった (Table 2A)。また、3' 非翻訳領域 (3'-UTR) の長さは 367 bp、341 bp、368 bp、367 bp、380 bp、369 bp であった。3' 非翻訳領域の塩基配列を比較したところ、相対性は 87%~98% であり、特にクロマグロとカツオ、スマとの間では極めて高い相対性が認められた (Table 2B)。また、得られた塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、上記と同様の順に 644、641、628、628、644、646 残基であった。これらアミノ酸配列には、DEAD ボックス RNA ヘリカーゼに保存された 8 か所のコンセンサス配列¹⁷⁾が存在した。また、N 末端領域には、アルギニン-グリシン、および、アルギニン-グリシン-グリシンの繰り返し配列が集中していた (Fig. 1)。しかし、この繰り返し配

列の回数は種によって異なり、クロマグロおよびカツオではアルギニン-グリシンの繰り返しが 17 回、アルギニン-グリシン-グリシンの繰り返しが 8 回であるのに対し、スマでは 17 回と 7 回、マルソウダおよびヒラソウダでは 16 回と 7 回、マサバおよびゴマサバでは 16 回と 8 回であった。また、マルソウダおよびヒラソウダでは 122 番目から 133 番目のアミノ酸までの比較的長い欠失領域が存在した (Fig. 1)。魚類 VASA および PL10 の系統樹解析により、*vasa* 遺伝子は単系統であり、本研究で単離したサバ科各魚種の VASA 配列は既知の VASA 配列と非常に強い関係性を示した (Fig. 2)。

クロマグロ *vasa* 遺伝子特異的 RT-PCR および制限酵素切断断片の検出 次に、クロマグロとサバ科各魚種間の *vasa* 遺伝子の多型をもとに、クロマグロ *vasa* 遺伝子のみを増幅するためのプライマー (BFT-specific Fw、BFT-specific Rv) を作成した (Fig. 3)。これらプライマーがクロマグロ *vasa* 遺伝子に特異的であることを確認するために、各魚種卵巣および精巣 cDNA を鋳型に、PCR を行った。その結果、クロマグロ生殖腺 cDNA を鋳型として用いた区においてのみ予想分子量 (578 bp) のバンドが検出された (Fig. 4A)。また、本実験で用いた日本国内の異なる 4 地域からのクロマグロサンプル間で、この PCR 解析の結果には差が認められなかった。以上の結果、本プライマーセットは、クロマグロ *vasa* 遺伝子の特異的に増

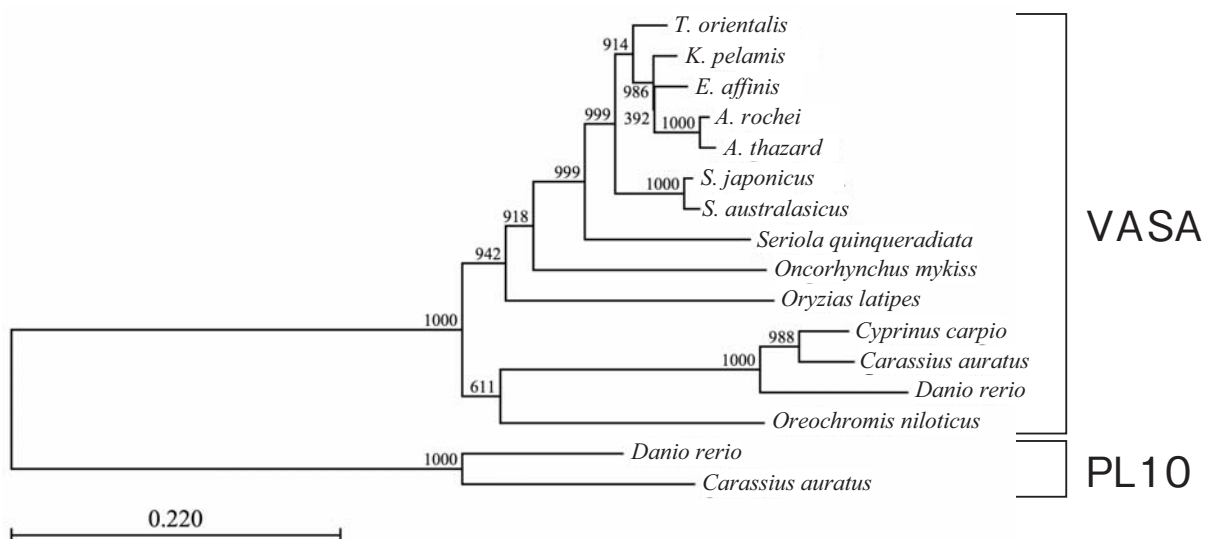


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of VASA and PL10. The numbers adjacent to phylogenetic nodes indicate bootstrap values for 1,000 replicates with the length of the horizontal lines indicating genetic distances. The GenBank accession numbers of the amino acid VASA and nucleic acid *vasa* sequences shown in the alignment are as follows: VASA (*T. orientalis*: EU253482, *K. pelamis*: GU581281, *E. affinis*: GU581280, *A. rochei*: GU581282, *A. thazard*: GU581283, *S. japonicus*: GQ404693, *S. australasicus*: GU581279, *Seriola quinqueradiata* (japanese amberjack): GU596411, *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout): AB032566, *Oryzias latipes* (medaka): AB063484, *Cyprinus carpio* (common carp): AF479820, *Carassius auratus* (goldfish): AY773078, *Danio rerio* (zebrafish): NM_131057, *Oreochromis niloticus* (tilapia): AB032467, and PL10 (*C. auratus*: AY842133, *D. rerio*: BC059794).

Table 2. Identity matrix showing pair-wise comparison of ORF (A) and 3'-UTR (B) among various scombrid *vasa* sequences

(A)		TO	KP	EA	AT	AR	SJ	SA
<i>T. orientalis</i> (TO)	100	96	95	94	94	93	93	
<i>K. pelamis</i> (KP)		100	98	96	96	92	92	
<i>E. affinis</i> (EA)			100	95	96	92	92	
<i>A. thazard</i> (AT)				100	98	91	91	
<i>A. rochei</i> (AR)					100	91	91	
<i>S. japonicus</i> (SJ)						100	99	
<i>S. australasicus</i> (SA)							100	

(B)		TO	KP	EA	AT	AR	SJ	SA
<i>T. orientalis</i> (TO)	100	95	94	92	92	89	89	
<i>K. pelamis</i> (KP)		100	97	96	95	90	90	
<i>E. affinis</i> (EA)			100	94	94	89	89	
<i>A. thazard</i> (AT)				100	97	87	87	
<i>A. rochei</i> (AR)					100	87	87	
<i>S. japonicus</i> (SJ)						100	98	
<i>S. australasicus</i> (SA)							100	

幅可能であることが明らかとなった。さらに、クロマグロとサバ科各魚種の *vasa* 遺伝子配列から、クロマグロ *vasa* 遺伝子のみを特異的に切断する制限酵素として *HpaI* が検出された (Fig. 3)。クロマグロ生殖腺 cDNA から RT-PCR により増幅した断片を *HpaI* で消化したところ、全ての地域から得られたクロマグロサンプルに関して予想サイズ (364 bp、214 bp) の切断断片が得られた (Fig. 4B)。

クロマグロ *vasa* 遺伝子特異的 PCR によるクロマグロ孵化仔魚の検出 クロマグロ、スマ、カツオの孵化仔魚からそれぞれ抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR においても、上述のプライマーセット (BFT-specific Fw、BFT-specific Rv) はクロマグロ *vasa* 遺伝子のみを特異的に検出した (Fig. 5B、上段)。しかし、RT-PCR による増幅断片よりも高分子側に増幅断片が検出されたことから本領域内にイントロンが存在することが示唆された。そこで、この増幅断片の塩基配列を決定し、既知のクロマグロ *vasa* cDNA 配列¹⁵⁾との比較を行ったところ、1 bp~140 bp、430 bp~529 bp、601 bp~871 bp、1104 bp~1171 bp の配列で100%の相同性が得られ、その他の領域は、クロマグロ *vasa* cDNA 配列上には存在しなかった。さらに、ゼブラフィッシュ *vasa* のゲノム領域¹⁸⁾との比較により、クロマグロ *vasa* cDNA 配列上に存在しなかった領域にはイントロンが挿入されていることが明らかとなった。また、クロマグロ *vasa* ゲノム配列上の予想

エキソン-イントロン境界には、スプライシングサイトの保存配列である GT-AG 配列が存在した¹⁹⁾。これらの結果より、ゲノム上のクロマグロ *vasa* 遺伝子では、プライマー配列で認識される配列間に3つのイントロンが存在することが明らかとなった (Fig. 5A)。また、増幅断片中にクロマグロ *vasa* を特異的に切断する制限酵素 *HpaI* の認識配列は1ヶ所しか存在せず、実際に増幅断片の *HpaI* 処理により、予想される切断断片長である722 bp および449 bp の断片が検出された (Fig. 5B、上段)。陽性対照として各魚種 *vasa* の保存領域に設計したプライマー (Common Fw、Common Rv) を用いて PCR を行った場合には、すべての実験区において DNA 断片の増幅が確認できたが、その大きさは魚種によって異なり、高分子側からクロマグロ、カツオ、スマの順に増幅断片が検出された (Fig. 5B、下段)。

考 察

本研究ではサバ科魚類7種由来の *vasa* 遺伝子の塩基配列多型を解析し、この多型を利用することで、クロマグロの *vasa* 配列を特異的に検出可能であることを示した。実際にクロマグロの配偶子生産を目的とした代理親魚を作出する際は、ドナー種 (クロマグロ) の精巣を酵素処理により分散し、体細胞と様々な生殖細胞が混在した細胞懸濁液を宿主 (各種サバ科魚類) の腹腔内に移植する⁴⁾。そのため、移植したクロマグロ精巣細胞のうち、増殖分化を繰り返し、最終的に大量の卵や精子へと分化することが可能な精原細胞が、サバ科の代理親魚の生殖腺内に存在していることを確認することが必要となる。既に Nagasawa ら¹⁵⁾は、クロマグロの *vasa* 遺伝子の発現が精原細胞に特異的であることを、in situ ハイブリダイゼーションにより明らかにしている。このことは、本研究で開発したクロマグロ *vasa* 配列を特異的に検出する技法が、クロマグロの精原細胞を特異的に検出する技法として有用であることを意味している。また、クロマグロの *vasa* 配列中に特異的に存在する制限酵素認識部位で PCR 増幅断片を切断することで、より確実にクロマグロ由来の *vasa* mRNA 分子を同定することも可能となった。さらに本研究では、異なる産地から得られたクロマグロ由来の cDNA を鋳型とした場合でも、すべて同様の電気泳動像が得られたため、本技法は種内の配列多型などに影響されないことが予想される。従来、クロマグロの生殖細胞をサバ科の小型宿主に移植した場合、ドナー由来の生殖細胞を宿主の生殖腺内で長期間追跡することは非常に困難であった。しかし、本研究で至適化した *vasa* 遺伝子に対する RT-PCR を用い

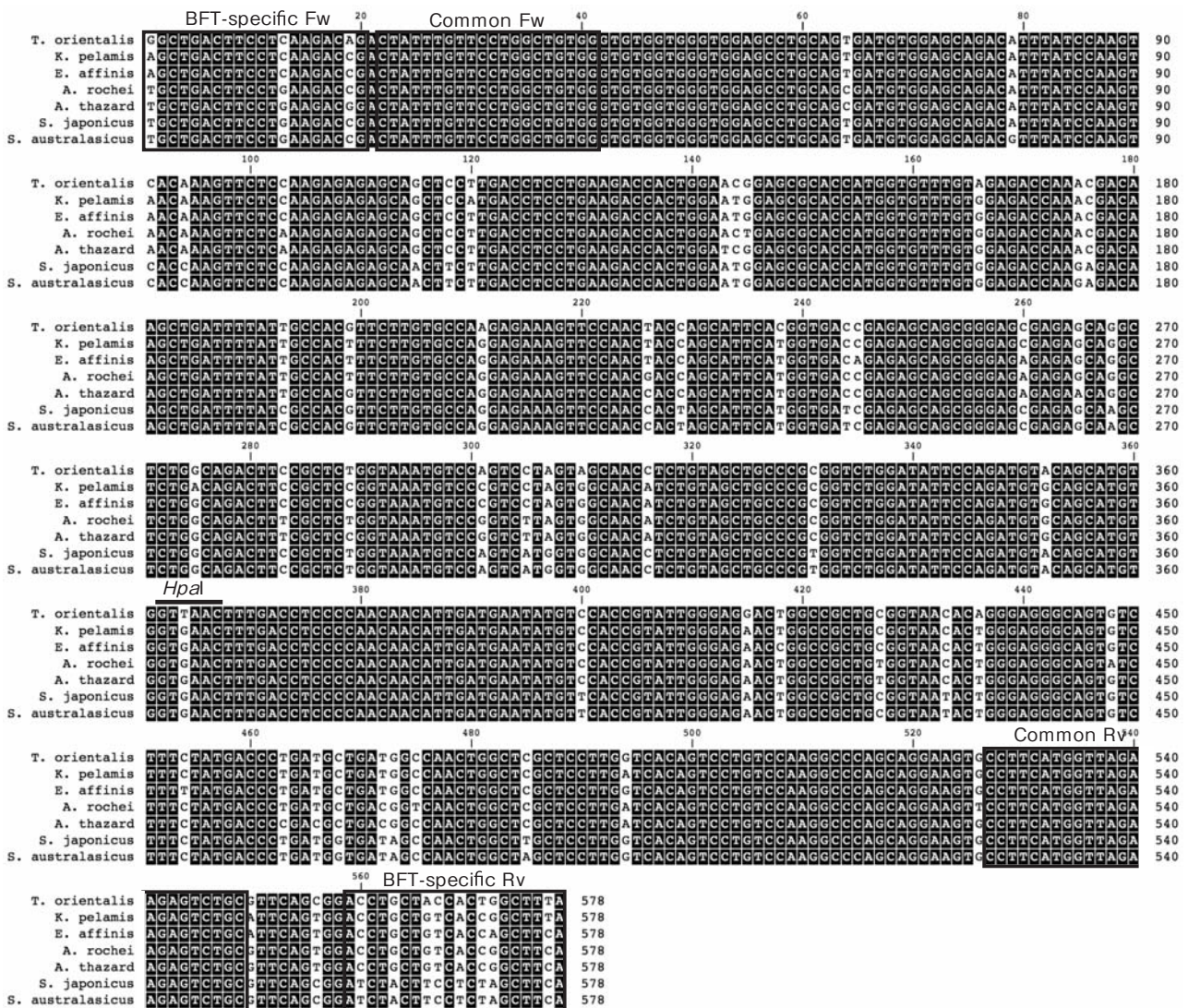


Fig. 3. Comparison of the partial *vasa* gene sequence from *Thunnus orientalis* (bluefin tuna), *Katsuwonus pelamis* (skipjack tuna), *Euthynnus affinis* (kawakawa), *Auxis rochei* (bullet tuna), *Auxis thazard* (frigate tuna), *Scomber japonicus* (chub mackerel) and *Scomber australasicus* (blue mackerel). The annealing sites for the novel primers designed in this study are enclosed in boxes and labeled with the name of the corresponding primer (BFT-specific Fw, BFT-specific Rv, Common Fw, and Common Rv). Identical sequences are shaded.

ることで、宿主生殖腺に取り込まれたクロマグロ生殖細胞を特異的に、かつ鋭敏に検出することが可能になるものと期待される。

また、ゲノム DNA を鋳型に用いた場合でも、クロマグロ細胞を識別可能であったことから、本法を用いることでクロマグロ細胞を移植した代理親魚がドナー由来のクロマグロ卵あるいは精子、さらには孵化仔魚を生産するか否かを確認することも可能になった。特に、クロマグロ、スマ、カツオ孵化仔魚のゲノム DNA を鋳型として増幅した *vasa* 遺伝子断片の分子量は、わずかではあるがクロマグロ、カツオ、スマの順に高かった。本領域に含まれる cDNA 配列にはこれらの 3 魚種間で分子量の差異が認められて

いないため、この分子量の差異はイントロンにおける分子量の差と推測されるが、この分子量多型を利用することで、簡便にクロマグロ、カツオ、スマの細胞、さらには卵、仔魚を識別することも可能であると考えられる。現在までに、サバ科魚類の受精卵および孵化仔魚の種同定法としては、ミトコンドリア DNA 配列の多型を用いる方法が報告されている²⁰⁻²²⁾。効率の良い代理親魚技法を構築するためには、宿主を不妊化することが重要であるが^{4, 23)}、これらの方法を用いた場合でも、宿主由来の配偶子がわずかながら生産される事例²⁴⁾もあり、次世代に雑種が生じる可能性を否定できない。このような際には、受精の際に用いられた卵の遺伝的背景のみしか解析できないミトコンドリア

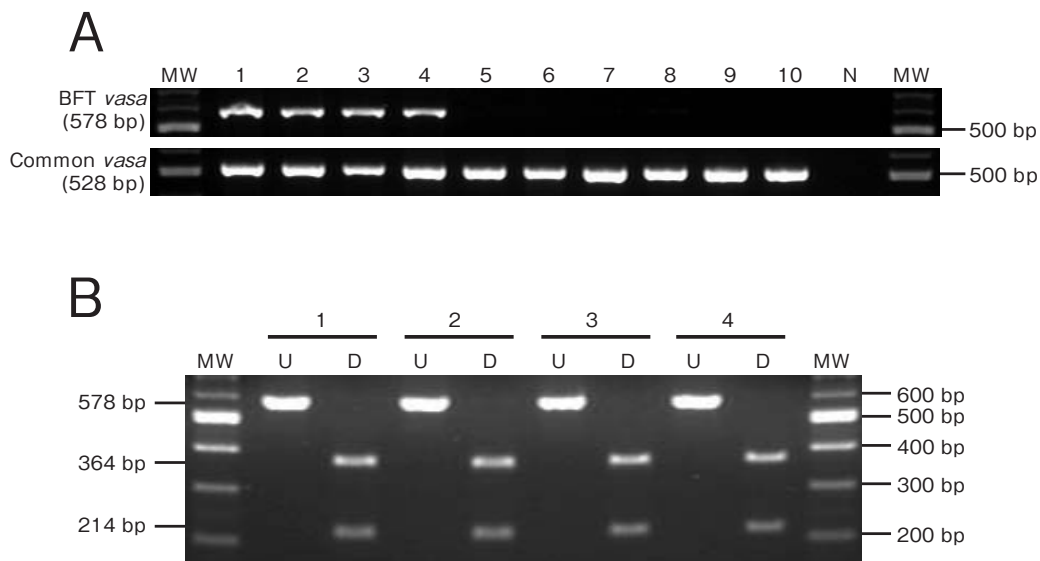


Fig. 4. Evaluation of the specificity of bluefin tuna *vasa* gene-specific primers (BFT-specific Fw, BFT-specific Rv) with gonadal cDNA templates. (A) Upper, Templates are as follows: lanes 1-4, *Thunnus orientalis* from Amami-oshima, Koshikijima, Sunosaki, and Kushimoto, respectively; lane 5, *Euthynnus affinis*; lane 6, *Katsuwonus pelamis*; lane 7, *Auxis rochei*; lane 8, *Auxis thazard*; lane 9, *Scomber japonicus*; and lane 10, *Scomber australasicus*. Lower, Amplification using the primer set for the conserved regions of the Scombridae *vasa* (Common Fw and Common Rv) with the same templates as in Upper (internal control for RT-PCR amplification). Lane N, no template (negative control). MW is a molecular weight marker (2-log DNA ladder, New England Biolabs); (B) Restriction digestion of BFT-specific *vasa* in bluefin tuna: lanes 1-4 (corresponding to lanes 1-4 in A) contain PCR products undigested (U) and digested (D) with *Hpa*I. Lane MW contains molecular weight markers (2-log DNA ladder).

DNA 解析に加え、本研究で構築した核ゲノムを用いた DNA 解析を行うことが、卵および精子それぞれの遺伝的起源を同定するうえで有効な方法になると考えられる。

これまでにサケマス類を用いて行われた代理親魚研究では、遺伝子導入により生殖細胞を特異的に蛍光標識することで、ドナー由来生殖細胞の追跡を行っていた。しかし、本研究で開発した技法を用いることで、遺伝子導入技術を用いずに宿主生殖腺内に存在するドナー由来生殖細胞を検出することが可能なため、天然水界への放流や食用を前提にした種苗生産に代理親魚技術を応用することも可能になる。一方、蛍光タンパク質をコードするキメラ RNA を用いて生殖細胞を標識する方法も開発されているが^{25, 26)}、これは発生初期の胚が保持する始原生殖細胞の標識に限定された方法であり、より汎用性が高い精原細胞を用いた方法には利用できない。したがって、*vasa* 遺伝子の配列多型を用いた PCR 法は、精原細胞移植時には特に有用な方法になることが期待される。

一般に、*vasa* 遺伝子は DEAD タンパク質ファミリーに属する ATP 依存型 RNA ヘリカーゼ活性を有することが知られている²⁷⁾。本研究で得られたサバ科各魚種の *vasa* 配列には、DEAD タンパク質ファミリーに共通する 8 つの保存配列が存在した¹⁷⁾。また、すべて

の魚種においてタンパク質の N 末端領域にアルギニン-グリシンおよびアルギニン-グリシン-グリシンの繰り返し配列が存在した。これらの繰り返し配列は、他種の *vasa* オーソログ中にも存在しており、RNA ヘリカーゼのような一本鎖の核酸に結合するタンパク質の特徴であると考えられている²⁸⁾。以上より、本研究により得られたサバ科各魚種の cDNA は ATP 依存型 RNA ヘリカーゼ活性を有する DEAD タンパク質をコードしていることが強く示唆された。また、*Auxis* 属に属するマルソウダおよびヒラソウダでは、上述のアルギニン-グリシンの繰り返し配列の後にクロマグロ、マサバ、ゴマサバと比べ 12 アミノ残基の、スマ、カツオと比べ 11 アミノ残基のギャップが存在した。このギャップ領域を含む cDNA 配列の両端にプライマーを設計すれば、増幅断片の長さによりクロマグロと *Auxis* 属を識別することが可能であると考えられる。この方法は、比較的小型で成熟するため親魚管理が容易と考えられる *Auxis* 属のマルソウダ²⁹⁾、ヒラソウダ³⁰⁾を宿主としたときの簡便なクロマグロ生殖細胞検出系として有効である。

3'非翻訳領域は一般に種間多型に富むことが知られているが、今回用いたサバ科魚種の *vasa* 遺伝子においては、*in situ* ハイブリダイゼーションにより組織切片上でドナー由来細胞を識別するのに十分な配列

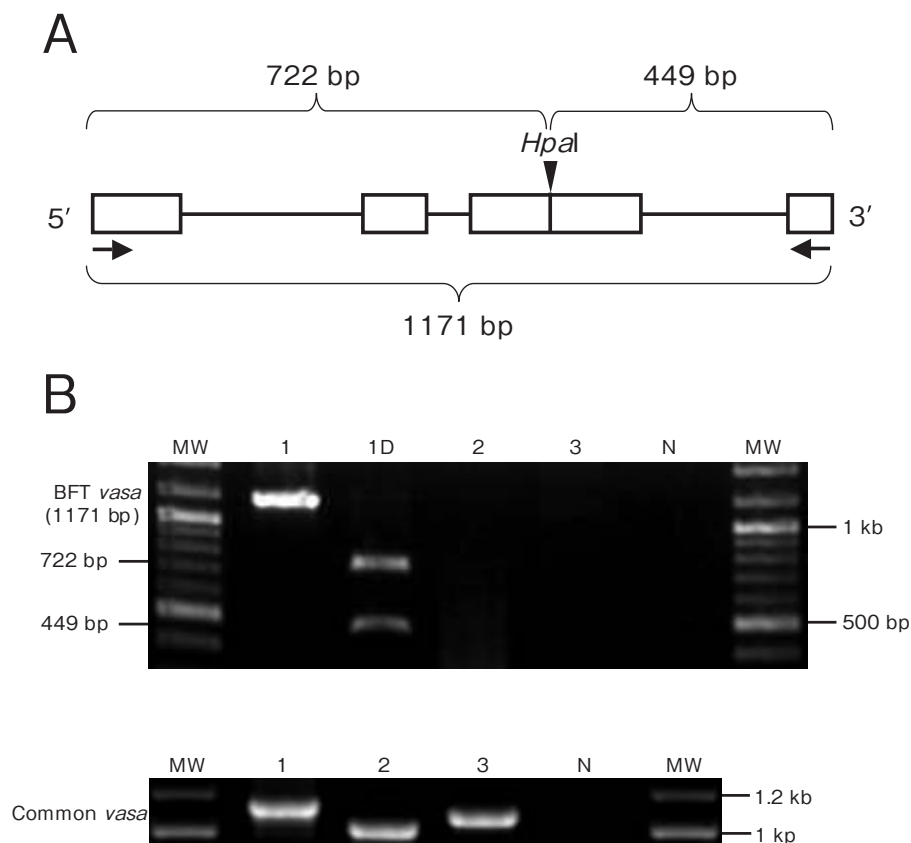


Fig. 5. Evaluation of specificity of bluefin tuna *vasa* gene-specific primers (BFT specific Fw, BFT specific Rv) with genomic DNA templates. (A) Schematic restriction enzyme cleavage pattern of bluefin tuna *vasa* gene within the region amplified by PCR. Bluefin tuna-specific primers are denoted by arrows. White boxes and solid lines represent exon and intron regions, respectively. The 1171-bp PCR product, obtained from genomic DNA templates for bluefin tuna, is cleaved into 722-bp and 449-bp fragments by *HpaI* digestion. (B) Upper, Amplification of genomic DNA obtained from juveniles: lane 1, *Thunnus orientalis*; lane 2, *Euthynnus affinis*; lane 3, *Katsuwonus pelamis*; lane 1D, *HpaI*-digestion of PCR product in lane 1. Lower, Amplification using the primer set for the conserved regions of Scombridae *vasa* (Common Fw and Common Rv) with the same templates as in Upper (internal control for genomic PCR amplification). Lane N, no template (negative control). Lane MW contains molecular weight markers (2-log DNA ladder).

多型は認められなかった。しかし、本研究において、タンパク質の N 末端および C 末端のアミノ酸配列には多型が比較的集中する部位が存在することを見出した。したがって、これらの領域に対してペプチド抗原を作成し、モノクローナル抗体を生産すれば、クロマグロの VASA タンパク質を特異的に識別することも可能であると考えられる。

本研究により、クロマグロ代理親魚養殖の宿主候補であるサバ科魚類 6 種の生殖細胞とクロマグロの生殖細胞を高感度で識別する技法が確立された。また、併せてクロマグロ孵化仔魚を特異的に検出する技法も確立された。本技法がクロマグロ代理親魚技術の発展へ貢献し、クロマグロの種苗生産が代理親魚を用いて効率よく行われることが期待される。

要 約

これまで代理親魚技法の開発においては、遺伝子導

入やキメラ RNA 分子の注入により生殖細胞を蛍光タンパク質で標識することで、ドナー生殖細胞を追跡していた。しかし、クロマグロなどの養殖対象魚種に遺伝子導入技法を用いることは望ましくない。そこで本研究では、宿主生殖細胞とクロマグロ生殖細胞を識別する PCR 反応系の構築を目指した。本研究では、生殖細胞で特異的に発現する *vasa* 遺伝子に着目した。まず、宿主候補であるカツオ、スマ、マルソウダ、ヒラソウダ、マサバ、ゴマサバの各種サバ科魚類 *vasa* 遺伝子の塩基配列を決定し、既知のクロマグロ *vasa* 遺伝子との間に認められる配列多型を利用したクロマグロ *vasa* 遺伝子特異的プライマーを開発した。このプライマーは宿主候補魚の *vasa* 遺伝子は検出せず、クロマグロ *vasa* 遺伝子のみを検出可能であることが示された。以上の結果より、本技術は、代理親魚の生殖腺内におけるクロマグロ生殖細胞の存在を確認する方法として有用であると期待される。

文 献

- 1) Ottolenghi, F., C. Silvestri, P. Giordano, A. Lovatelli and M. B. New (2004) Capture-based aquaculture: The fattening of Eels, Groupers, Tunas and Yellowtails. FAO, Rome.
- 2) Sawada, Y., T. Okada, S. Miyashita, O. Murata and H. Kumai (2005) Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. Aquac. Res., 36: 413-421.
- 3) Nakamura, Y., M. Ando, M. Seoka, K. Kawasaki and Y. Tsukamasa (2006) The changes in proximate compositions and glycogen contents in the dorsal ordinary muscles of the full-cycle cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* occurring with growth. Fish. Sci., 72: 1140-1146.
- 4) Okutsu, T., S. Shikina, M. Kanno, Y. Takeuchi and G. Yoshizaki (2007) Production of trout offspring from triploid salmon parents. Science, 317: 1517.
- 5) Okutsu, T., T. Takeuchi and G. Yoshizaki (2008) Spermatogonial transplantation in fish: Production of trout offspring from salmon parents. Fisheries for global welfare and environment, 5th world fisheries congress, pp. 209-219, Terrapub, Tokyo.
- 6) Okutsu, T., A. Yano, K. Nagasawa, S. Shikina, T. Kobayashi, Y. Takeuchi and G. Yoshizaki (2006) Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. J. Reprod. Dev., 52: 685-693.
- 7) Okutsu, T., K. Suzuki, Y. Takeuchi, T. Takeuchi and G. Yoshizaki (2006) Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 2725-2729.
- 8) Takeuchi, Y., K. Higuchi, T. Yatabe, M. Miwa and G. Yoshizaki. (2009) Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). Biol. Reprod., 81: 1055-1063.
- 9) Yoshizaki, G., Y. Takeuchi, S. Sakatani and T. Takeuchi (2000) Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under the control of the rainbow trout *vasa*-like gene promoter. Int. J. Dev. Biol., 44: 323-326.
- 10) Takeuchi, Y., G. Yoshizaki, T. Kobayashi and T. Takeuchi (2002) Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the *vasa* gene promoter. Biol. Reprod., 67: 1087-1092.
- 11) 奥津智之・小林輝正・竹内 裕・吉崎悟朗 (2008) 異種間生殖細胞移植実験における *vasa* 遺伝子の種特異的プライマーを利用したドナー由来生殖細胞および精子の検出法. 水産育種: 37, 29-36.
- 12) 谷口順彦・高木基裕 (1997) DNA 多型と魚類集団の多様性解析「魚類の DNA 分子生物学的アプローチ」(青木 宙・隆島史夫・平野哲也 編), 共立出版, 東京, pp. 117-137.
- 13) Erez, R. (2000) The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. Genome Biol., 1:reviews 1017.1-reviews 1017.6.
- 14) 中山広樹・西方敬人 (1995) 「バイオ実験イラストレイテッド ①分子生物学実験の基礎」, 秀潤社, 東京, pp. 113-120.
- 15) Nagasawa, K., Y. Takeuchi, M. Miwa, K. Higuchi, T. Morita, T. Mitsuboshi, K. Miyaki, K. Kadomura and G. Yoshizaki (2009) cDNA cloning and expression analysis of a *vasa*-like gene in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Fish. Sci., 75: 71-79.
- 16) Saito, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406-425.
- 17) Linder, P., P. F. Lasko, M. Ashburner, P. Leroy, P. J. Nielsen, K. Nishi, J. Schnier and P. P. Slonimski (1989) Birth of the D-E-A-D box. Nature, 337: 121-122.
- 18) Krøvel, A. V. and L. C. Olsen (2002) Expression of a *vas::EGFP* transgene in primordial germ cells of the zebrafish. Mech. Dev., 116: 141-150.
- 19) Sharp, P. A. (1987) Splicing of mRNA precursors. Science, 235: 766-771.
- 20) Chow, S., K. Nohara, T. Tanabe, T. Itoh, S. Tsuji, Y. Nishikawa, S. Uyeyanagi and K. Uchikawa (2003) Genetic and morphological identification of larval and small juvenile tunas (Pisces: Scombridae) caught by mid-water trawl in the western Pacific. Bull. Fish. Res. Agen., 8: 1-14.

-
- 21) Paine, M. A., J. R. McDowell and J.E. Graves (2008) Specific identification using COI sequence analysis of scombrid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island. *Ichthyol. Res.*, 55: 7-16.
 - 22) Robertson, M. D., J. R. Ovenden and S. C. Barker (2007) Identification of small juvenile scombrids from northwest tropical Australia using mitochondrial DNA *cytochrome b* sequences. *Ichthyol. Res.*, 54: 242-246.
 - 23) Saito, T., R. Goto-Kazeto, K. Arai and E. Yamaha (2008) Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol. Reprod.*, 78: 159-166.
 - 24) 最上泰秀・宮木廉夫・荒川敏久 (1991) 3 倍体作出処理を施したイシダイの精子について. 長崎県水産試験場研究報告, 17: 47-49.
 - 25) Saito, T., T. Fujimoto, S. Maegawa, K. Inoue, M. Tanaka, K. Arai and E. Yamaha (2006) Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.*, 50: 691-699.
 - 26) Yoshizaki, G., Y. Tago, Y. Takeuchi, E. Sawatari, T. Kobayashi and T. Takeuchi (2005) Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. *Biol. Reprod.*, 73: 88-93.
 - 27) Hay, B., L. Y. Jan and Y. N. Jan (1988) A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicase. *Cell*, 55: 577-587.
 - 28) Liang, L., W. Diehl-Jones and P. Lasko (1994) Localization of *vasa* protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA binding and helicase activities. *Development*, 120: 1201-1211.
 - 29) 原田輝雄・村田 修・古谷秀樹 (1973) マルソウダの人工ふ化と仔魚飼育について. 近畿大学農学部紀要, 6: 113-118.
 - 30) 原田輝雄・村田 修・宮下 盛 (1973) ヒラソウダの人工ふ化と仔魚飼育について. 近畿大学農学部紀要, 6: 109-114.

— 情 報 —

魚介類の優良家系に関するアンケート調査結果について

原 素之 (独立行政法人水産総合研究センター 養殖研究所)

Report on Breeding Families of Fish and Shellfish in Japan

Motoyuki HARA

National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency

水産生物遺伝資源が今後の水産業の発展を支えるために重要であると考えられることから、藻類・微細藻類並びに微生物を探索・収集し、原種またはそれらのうちで特性が有用と評価された株について、独立行政法人水産総合研究センターでは継代飼育による保存を行っている。それらのうち、配布が可能な状態にある株については養殖研究所のホームページのジーンバンク (<http://nria.fra.affrc.go.jp/bank/list.pdf>) にリストアップされている。一方、魚介類については、その重要性が認識されながらも施設や維持費の確保、人手などさまざまな問題から未着手であったが、平成15年度から試験研究機関等で作出され飼育保存されている優良家系を中心に、将来有用な DNA 情報を得るための一手段として、エタノール固定標本や抽出 DNA の保存を行っている。しかしながら、現在の科学技術レベルでは魚介類の個体再生には継代飼育が前提であることから、優良家系を継代飼育し保存することへの要望も少なくない。

そこで、今後の魚介類における継代飼育保存の可能性を検討するためには、各試験研究機関等で飼育保存されている優良家系等の現状をできるだけ正確に把握することが重要と考えて、平成15年11月に水産養殖関係試験研究推進会議「育種部会」(当時) 参加機関等を対象に「水産生物の優良群および優良家系等に関するアンケート」を実施した。その集計結果については、既に同会議での報告や養殖研究所のホームページ (<http://nria.fra.affrc.go.jp/bank/dna-bank1.pdf>) を通し

て公表された。

近年の漁業生産量の低位停滞や食の安全・安心への関心の高まりから養殖の重要性が見直されているなか、育種による新たな付加価値を有する品種の作出や生産の安定化が期待されている。このような水産業を取り巻く情勢の変化に伴い優良家系の重要性も増しているにもかかわらず、平成15年以降、優良家系等の保存状況を調べた報告はない。前回のアンケート調査取り纏めから6年が経過し、すでにリアルタイムな情報とは言い難いが、水産育種研究会から育種の基盤となる情報として発信させたいとの要望もあることから、その機関誌である「水産育種」に掲載することにした。

ここで、本誌に掲載の機会を与えて頂いた水産育種研究会岡本信明会長、またアンケート調査にご協力頂いた水産試験研究機関、種苗生産機関および水産系大学の皆様に心から感謝する。

1. アンケートの調査項目

魚介類の作出家系等に関するアンケート調査は、以下の項目で実施された。

(1) 作出された魚介類の家系について

- ① 種類 ② 特性 ③ 特性評価の方法とその結果

(2) 家系の保存状況について

- ① 保存方法 ② 保存継続年数、③ 今後の保存計画
④ 保存を継続する上での問題点

- (3) 過去に保有した（作出し廃棄した）家系
- ① 種類 ② 特性 ③ 特性評価の方法とその結果
 - ④ 保存を中止した主な理由
- (4) 今後の育種研究への要望および意見について

2. アンケート調査結果の概要

(1) アンケート回収率と作出家系を保有していた機関

調査は87の公立水産試験研究機関、23の種苗生産機関および22の水産系大学の合計132機関を対象に実施された。全体の55%にあたる73機関から回答が得られ、そのうち家系を保存している機関が35（調査機関全体の27%）、保存していない機関が38（29%）であった。無回答が59機関（47%）あったが、その殆どは作出された家系を保有しないと思われた。

- (2) 保存されている種類と家系統数
- 保有されていた家系は、海産魚介類が32家系で36%、淡水産魚類が58家系で64%であった。（表1）
- 海産魚介類では6種類が作出家系として保存されて

表1 継代飼育によって保存されている種類と家系統数

	家系統数	(割合%)
海産魚介類		
ヒラメ	12	(38%)
クロソイ	1	(3%)
アワビ類	8	(25%)
アコヤガイ	7	(22%)
マガキ	3	(9%)
トリガイ	1	(3%)
小計	32	
淡水産魚類		
ニジマス	19	(33%)
アマゴ	9	(16%)
ヤマメ	5	(9%)
イワナ	3	(5%)
ギンザケ	1	(2%)
アユ	5	(9%)
コレゴヌス	1	(2%)
ヤマトゴイ	1	(2%)
インドネシアゴイ	1	(2%)
中国ゴイ	1	(2%)
キンギョ	2	(3%)
ニシキゴイ	1	(2%)
グッピー	3	(5%)
イトウ	1	(2%)
ドジョウ	1	(2%)
フナ	1	(2%)
ギンブナ	1	(2%)
カワチブナ	1	(2%)
テツギョ	1	(2%)
小計	58	
合計	90	

いた。その内訳はヒラメが12家系、クロソイが1家系、エゾアワビが8家系、アコヤガイが7家系、マガキが3家系、トリガイが1家系の合計32家系であった。このように保存されている種類および家系統数は多くはなく、さらに、ヒラメが全体の39%、アワビ類が26%、アコヤガイが23%と3種でほぼ9割を占めていた。

淡水産魚類では19種が報告されており、その内訳は養殖業が盛んなサケマス類を中心にニジマス19家系、アマゴ9家系、ヤマメ5家系、イワナ3家系、ギンザケ1家系、アユ5家系で、上位の4種類で66%を占めた。その他、原種保存として試験研究機関においてコイ類が3家系およびキンギョとニシキゴイの観賞魚がそれぞれ1家系、大学においてグッピーやフナなどの実験用魚の7種類で10家系が保存家系として報告された。

- (3) 育種目標となっている形質
- 家系を作出するための対象となっている形質（育種目標）としては、成長や耐病性などの生産性に関わる形質が48%と多く、表現形質として判別しやすいアルビノなど色変異に関する形質も21%程を占めた。また、地域特性を重視した地方品種の保存（原種保存）的意図のために収集された家系および形質評価が不十分なため不記載の家系もみられた（表2）。

海産魚介類と淡水産魚類とでは、共に成長の改善（22%と19%）や色変異（26%と19%）に関した形質が上位を占めた。海産魚介類ではヒラメのリンフォシスチス耐性家系などの耐病性に関する形質（22%）が多かったのに対して、淡水産魚類ではニジマスの晩成熟性やアマゴの高スモルト化などの成熟に関する形質（12%）が多い傾向がみられた。その他、アコヤガイでの真珠質、アユの飼育しやすさ、ニジマスの高温耐性や可食部の割合が高い特性などが育種目標形質として報告された。

表2 育種目標となっている形質

	全体		海産魚介類		淡水産魚類	
	家系統数	(割合%)	家系統数	(割合%)	家系統数	(割合%)
成長	18	20	7	22	11	19
成熟	8	9	1	3	7	12
耐病性	10	11	7	22	3	5
耐性	4	4	2	6	2	3
形態	4	4	2	6	2	3
色	19	21	8	26	11	19
不明	15	17	1	3	14	24
原種	9	10	2	6	7	12
他	4	4	2	6	2	3
計	90		32		58	

(4) 魚介種類別の育種目標とされた主な形質

①海産魚介類

- a. ヒラメ：高成長、耐病性、高白化性
- b. エゾアワビ：高成長、色変異、低温耐性
- c. アコヤガイ：耐病性、真珠質、アルビノ、高温耐性
- d. マガキ：高成長、高生残、地方品種特性(原種保存)
- e. トリガイ：色変異

②淡水産魚類

- a. ニジマス：高成長、耐病性、産卵期、
高可食部生産性、高温耐性
- b. ヤマメ：高成長、高スモルト化性、高パー化性、
アルビノ、無班紋
- c. イワナ：ニッコウ系（原種）、ヤマト系（原種）
- d. アユ：高成長、耐病性、飼育のしやすさ
- e. キンギョ：アルビノ
- f. ニシキゴイ：色変異
- g. コイ：ヤマトゴイ（原種）、中国ゴイ（原種）、
インドネシアゴイ（原種）
- h. その他：グッピー（成長、色変異）、フナ（色変異）、
ギンブナ（原種）カワチブナ（原種）、
イトウ（アルビノ）、テツギョ（原種）

(5) 保存尾数、飼育年数について

保存尾数についての記載は少なく、保存90家系のうち、20家系（22%）の情報しか得られなかった。この中で、保存尾数は2尾から4000尾と大きな幅があったが、殆どは100～1000尾の範囲での継代飼育による保存が行われていた。

飼育世代数については、50家系（56%）の情報が得られた。1～33世代とかなりの幅があり、保存が始められたばかりの初代家系も9家系（18%）あり、2世代目の15家系を含めるとこれらでほぼ半数を占めた。飼育世代数が多かったものとしては、飼育しやすい形質を狙ったアユの33世代、高温耐性ニジマスの18世代、高スモルト化アマゴの14世代、色変異トリガイの14世代、ビブリオ病耐性アユの8世代、晩成熟ニジマスの7世代、高パー化アマゴの7世代、高生残マガキの6世代、高成長エゾアワビの6世代飼育家系が報告された。

飼育年数については53家系（59%）の回答があり、飼育世代数と同様に2～47年間と大きな幅がみられた。その中には、飼育年数が3年以下と比較的短い9家系（17%）もみられたが、平均飼育年数としては13年程であった。飼育世代数が長い家系として、アルビノニジマスの47年、低スモルト化ヤマメの42年、高温耐性ニジマスの37年、飼育しやすい形質を狙ったアユ

の33年、無班紋ニジマスの28年、晩成熟ニジマスの27年、高成長・早産卵アユの26年などあげられた。全体的には育種の歴史が長い淡水産魚類の飼育年数が長い傾向がみられた。

(6) 継代飼育上の問題点

継代飼育を行っている殆どの場所において、飼育のための経費、飼育労力（人手）、飼育場所（スペース）等施設の問題があげられた。また、優良家系作出のための育種技術の情報が不足していること、特性を評価するための基準が未確立であること、有用形質の素材となる原種の保存体制がないこと、優良家系作出後の普及方法が未確立であることなどが指摘された。

(7) 作出され、その後廃棄された家系とその理由

この項目については、6機関からの回答があり、廃棄された家系としてニジマス、ヒラメ、マダイ、アユ、コイ類、テラピアなどがあげられた。廃棄の理由としては、それぞれの場所や事例によって異なっており、近交弱勢等と思われる現象により家系の維持が困難になったこと、形質が分離し特性が失われたこと、実験的作出で研究目的が達成され不要になったことなどがあげられた。

(8) 育種研究への要望および意見など

この項目では「継代飼育上の問題点」と関わりが強く、予算、労力、施設の問題を解決するためのいくつかの要望が出された。現状では、各県独自に育種関連事業を実行することが極めて困難であることから、①国レベルでの育種関連のプロジェクト研究や事業の確保、②作出された家系等の権利を保障・保護するための登録制度の確立、③有用家系や実験用家系を作出・維持するための補助金の制度化、④精子凍結保存技術、雄性発生技術、成長・耐病などに関連する遺伝マーカーの開発等の育種関連基礎研究の推進、⑤産・官・学共同研究体制の確立、⑥最新の育種技術情報等を取り入れるための指導・研修体制の確立、⑦家系飼育の危険分散体制の確立などが要望・意見としてあげられた。

3. 今後の対応

魚介類の優良家系等に関するアンケート調査は初めての試みで、調査対象機関の吟味も不十分であったことから、回収率が55%と決して高い値とは言えない結果となった。しかし、一部の大学、個人的な小規模漁家や企業で保有する優良家系を除いては、大部分の作出・保存されている家系情報を把握できたと思っている。今回のアンケート調査では、育種の歴史の浅い

海産魚介類についてもいくつかの種類で実用家系候補が出始めている。一方、養殖産業の歴史の長いサケマス類やアユなどの淡水産魚類で優良家系の保存家系数や飼育個体数が多く、飼育世代数も長い傾向がみられた。

予想されていたことではあるが、優良家系の作出とその保存には、多くの時間、労力、予算が必要なが大きな問題点として浮き彫りにされ、今後もこれらの家系等を維持するためには、大変な努力が必要であることが再認識させられた。育種研究への要望についても、現場での経験等を基に種々の貴重な意見などが出され、今後の育種研究の方向性を考えるための多くの有益な情報が得られたと思っている。しかし、優良家系作出・維持のための育種研究の現状は厳しさを増しており、これらの要望項目について吟味しながら、

対応可能な項目から順次論議を進めて行くことが必要と考えられる。

最後に、前述したようにこのアンケート調査結果は6年前に実施され記載されたものであるが、その後魚介類の家系保存の状況は好転したとは言い難い。一方、育種を支える技術研究はDNA分析技術の躍進に伴い大きく進展したが、形質の確保すなわち優良家系の作出や保存がそれに対応していないのが現状と思われる。6年前決して多いとは言えないながらも優良家系候補が報告されていたが、現在なおこれらの家系が各場所で維持されている保証はなく、残念ながら確認もとれていない。しかし、このような資料が今後の「ものづくり」を目指した育種研究に役立つことを望みたい。

— 情 報 —

全国養鱒協議会報告書付表アンケート調査結果

全国養鱒技術協議会、育種・バイオテクノロジー研究部会報告書第3号（平成21年3月）の付録として掲載された「サケ・マス類の性質調査結果（平成20年度）」には、我国で飼育されているサケ・マス類の特定集団（系統）の表現型情報が掲載されている。これらの中にはすでにその表現型を特徴として実用品種化されているものもあるが、すべての系統について表現型が記載されている点で、新たな育種目標の実現に向けた育種素材としての価値がある。育種素材は使われて初めて輝くのであって、使ってくれる人を待っている。本資料は、全国養鱒技術協議会、育種・バイオテクノロジー研究部会の許可を得て「水産育種」に転載するものであるが、その理由は、遺伝育種に関連するより多くの人に育種素材としてのサケ・マス類の在りかを知ってもらうことにある。本誌「水産育種」が魚介類をはじめとする多くの水産関連の遺伝資源の情報開示の場になってほしいと願っている。なお、本誌への転載にあたり、年号は西暦に統一した。（会長記）

サケ・マス類の性質調査結果（平成20年度）

【目 的】

今後の育種・バイオテクノロジー研究に役立たせるため、会員県等が保有するサケ・マス類の性質について全国的な調査を行った。

【調査対象】

本会会員県及び関係する機関 26機関

26機関すべてから回答があり、回収率は100%であった。

【調査結果】

26機関中5機関（秋田県・富山県・石川県・兵庫県・岡山県）を除く21機関でサケ・マス類の系統を保有しており、合計（延べ数）で127性質^{*}が回答された。

魚種数は、ニジマス、ヤマメ（サクラマスを含む）、アマゴ、イワナ、ギンザケ、ヒメマス、ビワマス、コレゴヌス、ブラウンマス、イトウ、コカニー、レイクトラウト、カワマス、カットスロート、マスノスケの15種であった。

魚種別ではニジマスが60性質（47.2%）と最も多く、次いでヤマメ19（15.0%）、アマゴ15（11.8%）の順位

であった。機関別では中央水研が16性質（12.6%）と最も多く、次いで岐阜、山梨が14性質（11%）の順位であった。内訳では、ニジマスは多い順にドナルドソン系、クローン、アルビノ系、無斑系、スチールヘッド系、IHN 耐性系、早期産卵系、晩期産卵系、三倍体などで合計18性質あった。平成8年度の結果と比較すると、ドナルドソン系（2→8性質）、無斑系（1→5性質）、アルビノ系（1→5性質）、スチールヘッド系（2→5性質）、晩期産卵系（2→4性質）の5性質で増加が著しかった。ヤマメ・アマゴは放流目的に応じてパー系・スモルト系の性質が多い傾向にあった。イワナはヤマメ・アマゴより在来系の占める割合が85.7%と高かった。ニジマスやヤマメでは多産系の性質が見られなくなった。ニジマスではロングフィン系といった特異な事例も見られた。

各機関では行財政の規模が縮小される中で、系統保存を縮小したり中断したりする事例が見られ、今後こうした事例は増加傾向にあるものと推察された。

なお、今回通常飼育と表記した魚には、業務として飼育は行っているが性質を良く把握していないものもあると見られる。こうした魚をアンケート調査の対象外にした機関もあると考えられるため、今後調査する場合はこの点にも留意する必要がある。

※ 前報に従い性質として記述した。なお、通常飼育魚（業務生産用）も1性質として計数した。

魚種毎のそれぞれの性質及び保有機関については以下のとおりである。紙面の都合上一部割愛したので、詳細については各県の担当者（最終頁に記載）に直接お問い合わせ願いたい。

1 ニジマス

性 質	保有機関
スチールヘッド系 1967年に北米ワシントン州から発眼卵で導入。形態的には摩周湖系に近く、体高が低くて体の赤色が強い。二次性徴は顕著。恵庭市の本場における産卵期は2～4月（8℃の湧水条件下）。卵は通常のニジマスに比べて大型で、浮上稚魚のサイズが比較的大きい。2⁺では大部分がスモルト化するが、淡水中で飼育を継続すると3⁺で戻りをおこす。3⁺で成熟する。高年齢魚の成長遅滞が少ないので、大型化する。遊泳力が強い。 ドナルドソン系 1967年に日光支所から発眼卵で導入。形態的には体高が高く肥満度も高い。恵庭市の本場における産卵期は1～3月（8℃の湧水条件下）。初期成長が良好で高年齢魚の成長遅滞が少ない。卵は通常のニジマスに比べて小型。 アルビノ系 民間養鱒場から導入したアルビノ個体を交配し、それらのF₂の後代検定を行って、優性ホモ個体を選別した。現在は優性ホモのみを継代している。 無斑系 本場で出現した無斑型（正確な系群は不明）同士を交配し無斑型のみを選抜中。優性ホモ個体の判別には至っていない。体表に黒点がなく、パーマークもない。0～1⁺時点での体色は通常のニジマスに比べて薄く、やや青みがかかる。 青森系ニジマス IHN 耐性系（クローン魚） 人為感染により、IHNに耐性を持つ個体を選抜、現在は雌性発生（GI処理：第2極体放出阻止）により継代している。	北海道 青森県

山梨系ニジマス IHN 耐性系（クローン魚）
人為感染により、IHNに耐性を持つ種苗を選抜、現在は雌性発生（GI処理：第2極体放出阻止）により継代している。

青森系ニジマス高温耐性系（クローン魚）
23℃の高水温に耐性を持つ系群。2006年度で飼育中止。

本県における淡水魚養魚場では、飼育水温が23℃に達することや高水温が長期間継続することはほとんどないため、系群維持の必要性がないと判断されたことから飼育中止となった。

青森系ニジマス成長優良系（クローン魚）
ニジマス焼き魚用に適した出荷サイズ、100gまでに短期間で成長する個体の選抜を行った結果、対照魚（無選抜群）と比較して有意に大型に成長する優良系群を確保、現在は雌性発生（GI処理：第2極体放出阻止）により継代している。

ドナルドソン系

（ニジマス海水高適応系・高年齢成熟系）
海面養殖用種苗に適した海水高適応系さらに、高年齢成熟形質（満3年成熟）を持った個体を選抜、現在は通常交配により群を継代している。現在飼育中のドナルドソンの成熟状況は、満2年で95%以上が未成熟であった。なお、種苗は本県津軽海峡沿岸で行われている海面養殖用種苗（海峡サーモン）に用いられている。

ドナルドソン系

本県においては1973年に養殖研日光支所から発眼卵で移入し、以来現在に至るまで継代飼育による親魚養成を行っている。しかし、長年の継代により本来のドナルドソン系の形質の変化あるいは遺伝的多様性の縮小が危惧されている。このことから2007年に独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所内水面研究部より再度発眼卵で移入し、現在、同年齢の本県継代種苗と成長を比較検討中である。また、今後経時的に成熟度調査を行うとともに、大型魚生産用の系群としての可能性を評価する予定である。

青森県

岩手県

<u>IHNV フリー系</u> 1951年～1965年、長野県明科産及び北海道摩周湖産を導入。IHNV の発症歴がない。1996年に処分。(社)山形県内水面養殖振興会に当场から以前に配布し、継代されていた同系統の発眼卵 5 万粒を同年12月に導入。2003年に処分。2004年11月に(財)山形県水産振興協会(旧・(社)山形県内水面養殖振興会)から同系統の受精卵 3 万粒を再導入。	山形県	<u>ドナルドソン系</u> 1980年代頃民間養魚場経由で導入し、現在晩熟型に固定試験中。 <u>スチールヘッド系</u> 1970年代頃民間養魚場経由で導入。 <u>無斑系</u> ホウライマスと継代系有斑魚の交雑により IHN 耐性が得られたと考えられる個体群を斑型選抜により無斑型固定されたもの。	新潟県
<u>四倍体</u>	福島県	<u>早期採卵系</u> 試験場の継代親魚群の 1 つで、産卵期が 9 月中旬から11月上旬の群(通常の産卵期は10月中旬から)。 <u>高水温耐性系</u> 1988年宮崎県から導入。30℃、60～100 秒で浸漬暴露による選抜淘汰を繰り返した群の継代魚。現在も高温耐性を有しているかは試験を行ってない。 <u>全雌異質 3 倍体 (ニジニジアメ型)</u> 2008年から本格生産を開始。酸欠、魚病に比較的強く成長も良好である。新潟県にじます組合で「魚沼美雪ます」という名称を商標登録している。	新潟県
<u>スチールヘッド系</u> 1986年 2 月に水産庁養殖研究所日光支所から導入。 瞬発力が通常のニジマスより強いため、釣り対象魚としての将来性が見込まれる。現在、試験計画している釣り対象用作出魚の親魚候補として系統保存している。 <u>ドナルドソン系</u> 1985年 2 月に水産庁養殖研究所日光支所から導入。 成熟期間中でも摂餌が低下しないため成長が良く、大型化するため刺身用に向いている。系統保存は整理縮小により、昨年度で終了。 <u>成熟遅延系</u> 2 年では成熟しない(3 年または 4 年で成熟)。通常のニジマスと異なり、2 年目で成熟による肉質低下がないため生食用のまま大型化が可能である。ギンヒカリ。1987年から選抜育種によって固定化試験開始し、2002年商標登録。 <u>早期産卵系</u> 採卵時期：9 月下旬～10月中旬、種卵・種苗供給事業用。	群馬県	<u>早期産卵系 (当所産継代魚)</u> 産卵期が早い。産卵期 8 月下旬～9 月末。従来は11月～12月の産卵期であったが、継代により産卵期が早まる。1996年の報告では 9 月上旬～11月上旬としたが、さらに10日程度早まっている。1 尾あたり採卵数は3,500粒。1 粒卵重は62.9 mg。 <u>ドナルドソン系</u> 1982年に多産系 D9として中央水研日光支所より導入し継代。産卵数が多い、体色の銀白色が強い、飽食させると大型化する、成熟年令が遅い(導入当初の特性)。 ※前回未報告 産卵期10月下旬～12月上旬。従来は12月～1月の産卵期であったが、継代により産卵期が早まる。1 尾あたり採卵数は5,100粒で、導入当初の5,400粒とほぼ変わらない。1 粒卵重は78.9 mg で、導入当初の77.7 mg とほぼ変わらない。体色の銀白色は導入当初と異なってきたように感じられるため、今後、成熟年令を含めた特性評価の再検討が必要である。	山梨県
<u>晩期産卵系</u> 産卵期 1 月中旬～2 月下旬。 <u>IHN 抗病系</u> 攻撃試験による選抜育種で抗病性の高いものを選抜中。 斃死率 2 g 10.8%、 8 g 0.8% (2007年度) ※保有機関：財団法人 東京都農林水産振興財団 奥多摩さかな養殖センター	東京都		

<u>無斑系スチールヘッド</u> 1992年に北海道大学から導入したスチールヘッドに無斑個体が混じって出現。無斑遺伝子は有斑遺伝子に対して完全優性である。産卵期12月～1月。 ※毎年、無斑個体同士の交配により継代中（有斑個体も継代中） <u>アルビノ系</u> 1984年頃県内の民間養魚場から導入し、以後継代中。	山梨県																														
<u>若年産卵系</u> 雄は0⁺、雌は1⁺での成熟比率が高い。 2002年調査結果によると雄の0⁺の成熟率は65%（群中の雌雄比1：1と仮定）、最小成熟個体はBW 34.0 g、雌の1⁺成熟率は83%、最小成熟個体はBW 199.7 g。 <u>アルビノ系</u> 1956年に当場の飼育魚中に突然変異で発生した。黒色素胞は著しく収縮しており、体色は白から黄色を示す。通常のアルビノと異なり優性遺伝する。ホモ型でも体表の一部に黒色が現れることがある。 <u>四倍体</u> 通常受精卵の圧力処理による卵割阻止で初代を作出。交配による四倍体の再生産が可能。二倍体との交配により三倍体作出可能。四倍体卵と他魚種の精子の交配により異質三倍体を得ることができる。四倍体精子は頭部が大きく卵門通過が困難なため受精率が低下する。 ニジマス四倍体との交配による 異質三倍体作出（1997年） <table><tr><th>雌親魚</th><th>雄親魚</th><th>発眼率</th><th>孵化率</th><th>正常魚浮上率</th></tr><tr><td>ニジマス4n</td><td>ニジマス4n</td><td>55.6</td><td>48.8</td><td>33.3</td></tr><tr><td>ニジマス4n</td><td>ニジマス2n</td><td>41.4</td><td>40.0</td><td>39.0</td></tr><tr><td>ニジマス4n</td><td>カワマス</td><td>29.5</td><td>29.5</td><td>28.7</td></tr><tr><td>ニジマス4n</td><td>ブラウンマス</td><td>67.9</td><td>55.2</td><td>45.2</td></tr><tr><td>ニジマス4n</td><td>イワナ</td><td>40.1</td><td>39.2</td><td>32.3</td></tr></table> <u>クローン</u> 卵割阻止型雌性発生魚から作出したホモ型クローン5系統を保有。系統により疾病に対する感受性に差が見られる。別にクローン性未確認の卵割阻止型雌性発生魚の後代5系統を飼育中。	雌親魚	雄親魚	発眼率	孵化率	正常魚浮上率	ニジマス4n	ニジマス4n	55.6	48.8	33.3	ニジマス4n	ニジマス2n	41.4	40.0	39.0	ニジマス4n	カワマス	29.5	29.5	28.7	ニジマス4n	ブラウンマス	67.9	55.2	45.2	ニジマス4n	イワナ	40.1	39.2	32.3	長野県
雌親魚	雄親魚	発眼率	孵化率	正常魚浮上率																											
ニジマス4n	ニジマス4n	55.6	48.8	33.3																											
ニジマス4n	ニジマス2n	41.4	40.0	39.0																											
ニジマス4n	カワマス	29.5	29.5	28.7																											
ニジマス4n	ブラウンマス	67.9	55.2	45.2																											
ニジマス4n	イワナ	40.1	39.2	32.3																											

(1) 保有系統				長野県		
系統名	クローンの確認			MHC タイプ		
AA1	DNA フィンガー プリント	MS (FGT2, FGT3) で疑問・要再確認		B		
AA4	DNA フィンガー プリント			A		
AB7	DNA フィンガー プリント			C		
C25	AFLP 解析			C		
J32	DNA フィンガー プリント			D		
(2) 表現形質の特徴						
クローンと作出母群（ドナルドソン系ニジマス※ ¹ ）との特性比較						
特 性		クローン	比 較			
			優る	同等	劣る	
抗病性	IHN ※2	AA4			●	
		AB7			●	
		C25		○		
	OMV ※3	AA4		△		
		AB7		△		
		C25		△		
	ビブリオ病	AA4			●	
		AB7		○		
		C25		○		
	レンサ球菌症	AA4			●	
		AB7		○		
		C25	◎			
細菌性鰓病	C25			●		
成長	単独飼育	AA4	◎			
		AB7	◎			
		C25			●	
	混合飼育	AA4			●	
		AB7		○		
		C25			●	
※1：長野水試で継代した系統、当场一般群との交雑が生じている可能性大						
※2：結果の再現性に乏しい						
※3：試験設定（攻撃強度）が適当でないため差が出なかった可能性あり						
ニジニジブラ（信州サーモン）						
ニジマス四倍体卵にブラウントラウト偽雄精子を交配した異質三倍体。						
IHN、OMVD による死亡率がニジマスより低い。						
魚類病原体に対するニジニジブラ、ニジマス及びブラウントラウトの感受性（2002年）						
病原体	攻撃方法	攻撃量	供試尾数 (平均体重:g)	死亡率 (%)		
				ニジニジブラ	ニジマス	ブラウントラウト
IHN	浸漬	10 ^{5.3} TCID50/mL 1h	25 (1.0~1.6)	64***	88 ^b	20 ^c
OMV	注射	10 ⁵ TCID50/mL	20* (16.7~34.2)	0 ^a	85 ^b	0 ^a
*:ブラウントラウトは10尾						
**:異なる肩符号は有意差あり						
通常群(当場の業務生産用の中心的な群)						
1973年から、IHN で壊滅的な被害を受けた際の生残魚を継代飼育。採卵ピークは10～11月。						

<u>晩期産卵系</u> 成熟年齢が3歳、3月下旬～4月上旬が産卵期の系統。1975～1978頃に飛騨市(旧宮川村)の養魚場より導入した。導入当時から産卵時期が遅かったが、選抜育種によりさらに晩期化された。	岐阜県	<u>スチールヘッド系</u> 体形は細身で、黒点が非常に多く目立つ。尾鰭がやや大きめの個体が多い。産卵期が遅い(富士養鱒場では1月)。小型魚では通常系に比べて肉質が水っぽく食味が劣る。1999年度に養殖研(日光)より発眼卵で導入した。通常系と異なる家系のニジマスとして、バイテク等の試験目的で保有。	静岡県
<u>ドナルドソン系</u> 通常系よりも成長が早く、大型(4 kg以上)になる。成熟は3年。背部が青い(ブルーバック)、体側の銀色が非常に強い、黒点が少ない、体高が高い等の際立った形態的特徴がある。肉質は、色乗り、脂乗りが良く、やや柔らかい。広い飼育池では、流れに関係なく群れで回るように遊泳する。1978年度に養殖研(日光)より発眼卵で導入し、以後10代以上継代。数代前より現在の特徴が際立ってきた。成長：満3歳の平均体重4 kg以上。2009年度より、肉質評価などの具体的な品種の特徴に関する研究を開始する。 <u>4年成熟系</u> 通常系(3年成熟)よりも成熟年齢が1年以上長い。通常の飼育方法で、満3歳時の大型魚も未成熟となる(成長遅延による未成熟ではない)。1969年度～1997年度にかけて育種した群は特徴が不明瞭であったため継代中止。現在、1987年度から選抜を開始した群(F₅)を飼育している。F₃より急に大型化が進み、F₄は3年目の銀毛率も向上している。成長(満4歳の平均体重 F₂: 4.8 kg、F₃: 8.4 kg、F₄: 8.2 kg、銀毛率(満3歳時) F₃: 約11%、F₄: 約37%) <u>アルビノ系(優性・ホモ)</u> 優性遺伝するアルビノニジマス。体色は黄白色(色揚げにより黄色が強くなる)で、黒色素は全く出現しない。眼は赤色。現在、ホモ化したものを継代している。1956年に富士養鱒場通常系の突然変異で出現。優性遺伝することを確認し、その後ホモ化を行った。	静岡県	<u>ロングフィン系</u> 突然変異で出現したニジマスのロングフィン。鑑賞魚でよくみられるタイプのロングフィンで、全てのヒレが伸長する。通常系から突然変異で出現したロングフィン(雌)から、2003年度に採卵した(雄:通常魚)。約半数がロングフィンタイプとなり(優性遺伝)、各ヒレの長さは満2歳魚の時点で通常魚の約2倍。成熟とともにさらに伸長する見込み。2008年度に2歳魚で成熟した雄とホモ・アルビノの雌を交配し、アルビノ・ロングフィンを作出中。 <u>5月成熟系</u> 4～5月のみに成熟する。現在育種中で、固定化はあまり進んでいない。通常系の中で5月に成熟した個体を用い、1996年度より育種を開始。現在F₃で、2系統を保有。 <u>晩期成熟系</u> 1～2月のみに成熟する。現在育種中で、固定化はあまり進んでいない。通常系の中で2月に成熟した個体を用い、1993年度より育種を開始。現在1系統(F₅)を保有。 <u>クローン系(RT92H04、RT92H10)</u> 抗病性(IHN、ビブリオ病)、成長、成熟に関して異なる特徴を持つ。 日水誌. 73(5)、844-850(2007)参照 「染色体操作により得られたニジマス2系統の耐病性ならびに再生産形質に見られた差異」 望月 他	

無斑系（ホウライマス） 体表の斑紋、黒点が全くないニジマス。ホウライマスが持つ無斑遺伝子は野生型ニジマスが持つ有斑遺伝子に対して優性であり、単純なメンデル遺伝をする。無斑遺伝子は雑種化（異質三倍体化）した場合においても他魚種（アマゴ、イワナ、ギンザケで確認）の有斑遺伝子に対して優性に働く。水試が保有するホウライマスの量的形質については、野生型ニジマスに対してやや肥満度が高い傾向が見られていたが、現在では系統維持が困難となっており、保有形質については不明である。マス類養殖試験に関する予算規模の縮小に伴い、親魚の多数保有が困難となっており、個体数の限られた交配により作出された少数の稚魚群で継代飼育している。これにより、現在保有している飼育魚では近交化が進んでいると考えられる。 無斑系（ホウライマス） 水試が保有していたホウライマスに他県産野生型ニジマスとの交配を繰り返して継代飼育している。IPN 耐性を有する野生型ニジマスとの交配により IPN 耐性形質が導入され、現在まで IPN による大量へい死は認められていない。その他、成長等の量的形質については野生型ニジマスと概ね大差ない。なお、ホウライマスと野生型ニジマスを混合して継代しており、飼育魚群での無斑出現率は80%程度となっている。ホウライマスは野生型ニジマスと同じ利用形態をしており、愛知県ブランド魚の絹姫サーモン生産、ホウライマス全雌三倍体魚生産にも利用している。スモルト化した個体は美しいと評価され、釣り堀などでも人気が高い。 全雌異質三倍体魚（ニジニジアマ・絹姫サーモン） ニジマス雌とアマゴ性転換雄を用い、受精卵を加温処理により倍数化して作出する。ホウライマス雌を用いると無斑の個体が得られる。食味に優れており、旨味成分とされるイノシン酸がニ	愛知県 愛知淡水	ジマスに比べてやや多い。成長はニジマスに比べてやや劣り、三倍体魚に共通する特性である酸欠等のストレスに弱い傾向が認められる。 1994年6月20日付け6水研第81号により特性評価が確認された。 全雌異質三倍体魚（ニジニジイワ・絹姫サーモン） ニジマス雌とイワナ性転換雄を用い、受精卵を加温処理により倍数化して作出する。ホウライマス雌を用いると無斑の個体が得られる。イワナの持つ IHN 耐性が導入され、IHN に対して耐性を有する。三倍体魚に共通する特性である酸欠等のストレスに弱い傾向が認められる。大型魚になると、体型は魚雷のようになり、色上げしても肉色は肌色を呈する程度に留まる。1997年7月2日付け9水研第485号により特性評価が確認された。生産現場で、魚雷型の体型や肉色が白いことなどから敬遠され、現在では生産は行われていない。 超肥育系・早期産卵系（業務生産系） 醒井養鱒場でニジマス養殖が開始された1907年代頃から継代飼育しているもので、特筆すべき特徴はないが100年近く継代されていると思われる。この系統から雌性発生により肥満度の高くなる超肥育系や早期産卵系が作出され、潜在的に多様な特性を保有していると考えられる。成長－2年で約1kg（水温12℃）、成熟－雌は2年魚で半数以上が成熟する。三倍体化率－99%以上（受精15分後に26℃、20分の温水処理により、第2極体放出阻止） 高水温選抜系 高温域適応型として継代選抜。これまでに、高水温選抜系に特異的に発現するいくつかの遺伝子を見出している。 ドナルドソン系 導入年：1966年、導入元：ワシントン大学の L. R. Donaldson 教授が交雑し、選抜育種して分離固定した。体高、体幅が大きくなる特徴をもつ。1971年以降に日光支所で多産系と大型卵系を選抜分離し、多産系だけを現在も継代中。	愛知県 愛知淡水 滋賀県 宮崎県 中央水研
--	---------------------	---	---

性質：海中養殖が可能な品種であり、淡水密飼育では給餌量に対し成長が遅い。全ての鰭がスレやすいが、産卵期等の取扱時の傷やスレに対し抵抗性があり、水カビ病にも強い。特に産卵後の斃死は他のニジマス類と比較して少ない。 一般飼育系 導入年：1951年以前、導入元：アメリカ 性質：飼育過程（再生産を含む）は容易である。採卵後等、水カビ病に弱く斃死が目立つ。媒精後の歩留まりはヒメマス等と比較すると低い。 年2回産卵系 導入年：1995年、導入元：埼玉県水産試験場熊谷支場 性質：ニジマスに酷似。産卵期、多年の魚体であっても卵径は小さい。 アルビノ系 導入年：1964年以前、導入元：静岡県水産試験場富士養鱒場、長野県水産試験場。 性質：ニジマスに酷似する。成長が遅いので混生飼育は避ける。起源は1956年に静岡県水産試験場富士養鱒場で出現したアルビノニジマス数個体から同胞交配によって継代し固定されたものと長野県水産試験場で出現したアルビノニジマス。 無斑系 導入年：1970年（または1971年） 導入元：愛知県水産試験場内水面分場鳳来養魚場 性質：ニジマスに酷似する。起源は1965年に愛知県水産試験場内水面分場鳳来養魚場で突然変異として見出された雄1個体と通常♀とを交配して子孫をとり、第2世代の雌親魚3個体を同胞交配あるいは戻し交配して得られた第3世代（1969年級群の一部）。 スチールヘッド系 導入年：1973年、導入元：北海道立千歳孵化場 性質：飼育過程（再生産を含む）は容易である。成長も良く頑強だが、混生飼育では他魚に競り負け成長が悪い。	中央水研
--	------

2 ヤマメ

性 質	保有機関
在来系（森池産系サクラマス） 1965年に北海道西部日本海岸の千走川から、1966年に北海道東部太平洋岸の当幌川遡上系親魚から森支場に発眼卵で導入。現在まで淡水池で継代しているものは当幌川系の子孫と考えられているが、詳細は不明。高水温（12℃）の湧水条件下では浮上後の成長が早く、半年でスモルト化する（0⁺スモルト）。0⁺秋の早熟雄出現率は低い。1⁺で成熟、採卵可能となる。低水温（8℃）の湧水条件下では通常の1⁺スモルト、2⁺で成熟となる。稚魚期からストレスに強く飼育が容易。現在は恵庭市の本場で継代している。 森支場（現森試験地）の湧水条件下（12℃）におけるデータ 孕卵数平均 1372粒（1995～1997）、卵重平均0.139 g（1989～1991）、スモルト化率97.1%（1991） 在来系（尻別池産系サクラマス） 1987～1989年に北海道西部日本海側の尻別川遡上系親魚から森支場に発眼卵で導入。以後淡水池で継代し、2007年採卵時点でF₈まで継代。高水温（12℃）の湧水条件下でも0⁺スモルトの出現率は低い。0⁺秋には早熟雄が出現する。1⁺でスモルト化し、2⁺で成熟。低水温（8℃）の湧水条件下では3⁺で成熟する個体も出現する。現在は恵庭市の本場で継代している。	北海道
在来系 大原川系：ヤマメ未放流河川である大原川在来魚から採卵、継代飼育。 歌津系：ヤマメ未放流河川である伊里前川の河川残留型在来魚から採卵、継代飼育。 03年級のF₁ではパー出現率74.3% 大原川系は1996年調査時に高スモルト系として報告していたが、事業終了に伴い在来系として継代飼育。	宮城県

<u>スマルト系（サクラマス）</u> 赤川遡上系の親魚を池産継代飼育。雌親魚の成熟は満3年が主体。成長の良い個体は満2年で成熟可能。1996年に処分。 2004年11月に最上川遡上系の発眼卵1,000粒を導入。 2005年10月に赤川遡上系の発眼卵300粒を導入。 2006年11月に赤川遡上系の発眼卵2,900粒を導入。 現在、赤川遡上系および最上川遡上系の2系統の親魚を池産継代飼育している。雌親魚の成熟は満3年が主体。成長の良い個体は満2年で成熟可能。 <u>パー系</u> 東京都奥多摩湖で陸封化された系統。スマルトの出現率が低い。当歳魚での成熟が可能。パーマークが少ない小斑系。1996年処分。 同年12月東京都水産試験場奥多摩分場より同系統の発眼卵1万粒を再導入。 2006年9月に処分。 2008年11月、東京都奥多摩さかな養殖センター（旧・東京都水産試験場奥多摩分場）より同系統の発眼卵5,000粒を再導入。	山形県	約28%が無斑遺伝子を持っていることが確認された）により有斑個体と無斑個体が自然交配していることが確認された。	茨城県
	福島県	<u>在来系（吾妻系）</u> 1966年吾妻川支流で採捕。箱島養鱒センターで継代。1983年川場養魚センターに移入し、以後両センターで継代飼育。箱島養鱒センターにおける系統保存は整理縮小により、2008年度で終了。陸封性が強く銀毛になりにくいため停滞性がよく、ほとんど降海しないため群馬県の河川放流用種苗として適している。	群馬県
<u>全雌魚</u>	茨城県	<u>小斑系</u> 天然魚に近い黒点数の少ないヤマメの選抜育種を、1987年から継続中。2007年現在、事業系ヤマメの黒点数は、雌雄全体の平均で30.3個（8～49）。 <u>IHN 抗病系</u> 攻撃試験による選抜育種で抗病性の高いものを選抜中。 斃死率 2g 32.8%、8g 75.3%（2007年度） ※保有機関：財団法人 東京都農林水産振興財団 奥多摩さかな養殖センター	東京都
<u>無斑系</u>	茨城県	<u>通常飼育（サクラマス）</u> 1990年に北海道大学から導入し、以後継代。3年成熟。	山梨県
無斑形質は有斑ヤマメとの交配実験で劣性遺伝子であることが確かめられている（茨城内水試研究報告）。 ①茨城県北部を流れる河川に天然分布し、その生息範囲は流域約2kmほどの限られた範囲内となっている。 ②無紋ヤマメと通常（有斑）ヤマメとの交配実験で無斑形質は劣性遺伝子であることが確かめられている。 ③2006年度の調査で、天然分布域での無紋ヤマメの出現頻度は6～7%程度であった。 ④2007年度に実施した交配実験（天然分布域から採捕した有斑ヤマメと無斑ヤマメの戻し交配実験により、天然域に生息する有斑個体ヤマメの	岐阜県	<u>パー・スマルト系（神通川系）</u> 2001年から神通川のサクラマスの卵を富山漁業協同組合より導入し継代した系統、現在パー系とスマルト系の分離を試みている。3年成熟だったが、現在2年で成熟する率が上昇している。 <u>パー系（関東系）</u> 1967年から東京都水試より発眼卵で導入したヤマメ。 2年成熟でスマルト化率がきわめて低い。	岐阜県
		<u>在来系</u> 1967年に一ツ瀬川支流の石堂川で採集された受精卵を起源とし、継代。	宮崎県

通常飼育（北海道尻別川産サクラマス） 導入年：1979年、導入元：不詳、起源：北海道尻別川 性質：飼育過程（再生産を含む）は容易であるが、体サイズにバラツキが生じる。ただし粗飼育では縄張り行動を示すため、密飼育の方が有効と思われる。銀毛変態個体も出現するが早熟雄も多い。	中央水研
---	------

3 アマゴ

性 質	保有機関									
<u>アルビノ系</u> 1993年11月に民間養魚場で出現。アルビノ同士の交配による発眼卵を導入し継代。アルビノ形質は劣性遺伝子による。体色・眼色以外の形態、成長、成熟は通常魚とほぼ同じ。 ※アルビノと通常魚との交配による子孫の表現型 <table><tr><td>親魚の種類</td><td>アルビノ♂</td><td>通常魚♂</td></tr><tr><td>アルビノ♀</td><td>アルビノ型</td><td>通常型</td></tr><tr><td>通常♀</td><td>通常型</td><td>通常型</td></tr></table>	親魚の種類	アルビノ♂	通常魚♂	アルビノ♀	アルビノ型	通常型	通常♀	通常型	通常型	山梨県
親魚の種類	アルビノ♂	通常魚♂								
アルビノ♀	アルビノ型	通常型								
通常♀	通常型	通常型								
<u>在来系</u> 1966年より飛騨川水系で天然魚を採捕し継代した魚。 <u>パー系</u> 1993年より早熟雄を交配させることによりパーの率を高めた系統。 <u>スモルト系</u> 1975年スモルト同士を掛け合わせるによりスモルト化率を高めた系統。当所の飼育条件では9割以上がスモルト化する。 <u>アルビノ系</u> 飼育中のアマゴから出現したアルビノを固定した系統。今後の魚病研究や標識魚としての活用を目指して飼育中。 <u>全雌三倍体（飛騨大天女魚）</u> 1992年水産庁より認可されたアマゴの全雌三倍体。	岐阜県									

事業系全雌パー系 パーの容姿に優れた個体を選抜育種し、第2極体放出阻止型雌性発生により作出した系統、当所の飼育条件では9割以上がパーになる。 全雌パー・全雌スモルト 同母群よりパーとスモルト個体をそれぞれ選抜し、第2極体放出阻止型の雌性発生により継代した系統。パー系は90%以上パーになり、スモルト系は90%以上スモルトになる。 クローン 第1卵割阻止型雌性発生魚を親魚に用いて、第2極体放出阻止型雌性発生により次世代を作出。在来系より冷水病に強い。スモルト化率70－90%、作出1991年。	岐阜県
スモルト系 マス類養殖試験に関する予算規模の縮小に伴い、親魚の多数保有が困難となり、系統維持が困難となったため、現在はアマゴ保有系統を混合し、「アマゴ」として維持継代している。混合後、量的形質の評価は実施していない。稚魚の一部を性転換雄化し、愛知淡水における絹姫サーモン生産に供与している。	愛知県
在来系（業務生産用） 親魚の由来は不明。成長は優良で、1年で約50g、2年で平均1kg以上に成長、ほとんどが成熟する。成長－ふ化後22か月：1,137g（2007年採卵親魚）	滋賀県
在来系（大野川系） 継代魚（10代目くらい）。雄は採卵後12ヶ月、雌は24ヶ月齢で成熟する、非常に一般的なアマゴ。これらの採卵時期を電照で春にずらし、18ヶ月もしくは30ヶ月目に採卵する試験を実施中（2005年～）。 過去3回春採卵を行ったが発眼率やふ化率が低く、技術としては開発途上にある。ちなみに、2007年の5月に生まれた稚魚を通常飼育したところ、2008年秋に普通に成熟し、発眼率もふ化率も通常採卵群と変わらなかった。	大分県

通常飼育 導入年：1979年、導入元：不詳、起源：岐阜県益田郡木曾川水系益田川 性質：飼育過程（再生産を含む）は容易である。以前は満2年で再生産していたが卵径・孵化仔魚ともに小さく手間がかかることから、現在は満3年魚を再生産することで2年では成熟しなくなった。体サイズのバラツキが大きいがサクラマスほど縄張り行動は強くない、銀毛化個体の出現も若干ある。	中央水研
--	------

4 イワナ

性 質	保有機関
在来系 荒川系：鳴瀬川水系荒川の在来魚から採卵、継代飼育 栗駒系：迫川上流栗駒山麓の養魚場が養殖化したものを導入し、継代飼育 鳴子系：江合川上流域の枝沢の在来魚から採卵、継代飼育 2006年に、mtDNA シトクローム b 遺伝子領域のハプロタイプ解析により在来個体群と推定し、親魚採捕、採卵を行った。	宮城県
在来系 最上川水系置賜地方産（最上川上流）。1996年に処分。	山形県
在来系（ニッコウイワナ系） 常陸太田市指定の天然記念物（里美イワナという名称で呼ばれている） （注）現在も県北支場で系統保存を行っている。 背中から頭部にかけて「く」型紋様を呈している。 側線有孔鱗数が103～120の範囲にあり、国内に生息するイワナの中では特異に少ない。 産卵期になると、体側の斑点が橙色もしくは赤色となる。 ①久慈川支流里川上流域の標高500 m 以上の溪流に生息してる。 ②生息域の下流には魚止めの滝があり、ヤマメは生息していない。ただ	茨城県

し、一部の生息域では、ヤマメの放流などにより、イワナとヤマメが共生している。 ③1975年代には、4支流で生息が確認されていたが、2支流で絶滅し現在は2支流でのみ生息している。	茨城県
在来系（ニッコウイワナ系） 1994年に利根川水系鬼怒川の支流蜂ヶ沢で採捕した親魚から人工繁殖した。以後、継代して保存している。ミトコンドリア DNA の分析により、在来のニッコウイワナであることを確認している。	栃木県
在来系（ホタカイワナ） 1983年10月群馬県川場村溝又川最上流域（標高650～700メートル）の伏流水部で採捕した個体を初代の親とした系統を継代飼育。DNA 分析結果では他系統との交雑がないと考えられる。現在では継代により養殖適性が高く、飼育しやすい系統となっている。	群馬県
偽雄（性転換雄魚、アメマス） 一般的なイワナに比べて飼育が容易で、ホルモンによる性転換率が良好。	新潟県
在来系 2006年と2007年に富士川支流荒川水系で採捕した在来イワナを継代中。ヤマトイワナタイプと呼ばれている（現在確認中）。 産卵期：10月下旬（天然）、12月（継代魚） 通常飼育（アメマス） 1990年に北海道大学より導入。以後継代。	山梨県
在来系（ヤマトイワナ） 移殖放流がされていない木曾川源流の味噌川から親魚を採捕し、系統保存を目的として継代。1988、89年に天然親魚採捕。1993、94、96年に天然雄魚追加導入。 在来系（ニッコウイワナ） 移殖放流がされていない千曲川水系犀川支流の鎖川源流域から親魚を採捕し、系統保存を目的として継代。1991、92年に天然親魚採捕。1996年に天然雄魚追加導入。	長野県

在来系（ニッコウイワナ） 1973年より飛騨市（旧宮川村）の養魚場より導入した。親魚は神通川水系支流の天然魚。	岐阜県
アルビノ様（白化イワナ） 劣性遺伝し、眼球は黒色であったことから、イワナの不完全アルビノと思われたが、詳細な情報は残されていない。マス類養殖試験に関する予算規模の縮小に伴い、産業上有用性の低い本系統は廃棄された。	愛知県
在来系（業務生産用） 導入の由来は県内の天然河川とされているが、くわしいことは不明である。形態的にもニッコウ系、ヤマト系の特徴を示すものから、無斑や白点のみなど様々な個体が出現する。成長－ふ化後22か月：408g、34か月：1,300g（2007年度）、成熟－2年でほとんどが成熟、採卵事業では2年魚と経産魚を親魚として使用している。	滋賀県
通常飼育 導入年：1965年頃、導入元：栃木県那珂川支流蛇尾川 性質：飼育過程（再生産を含む）は容易である。共食いが多いので給餌量や飼育密度に注意が必要である。現在飼育しているイワナは中禅寺湖産のイワナとは系統が違うため、今後中禅寺湖産イワナの継代飼育を計画中である。	中央水研

5 ギンザケ

性 質	保有機関
通常飼育（内水試系） 1978、79年にワシントン州から発眼卵導入、継代飼育。 ※1996年調査で報告した DOMSEA 系については、事業終了に伴い処分。	宮城県
全雌二倍体 全雌種苗生産を1992年に実用化し海面養殖用種苗として生産していたが、現在は養殖用種苗の需要が無いため継代飼育のみ。	新潟県

6 ヒメマス

性 質	保有機関						
偽雄（性転換雄魚） 偽雄を用いて作出した全雌種卵を用いて、①積算水温530℃（飼育水温9℃）から18℃で2週間処理した種苗、②ふ化直後に17αメチルテストステロンで2時間処理した種苗の両群の全雄化を確認し、現在親魚候補として飼育中。	岩手県						
通常飼育 1994年に北海道大学、2001年に岩手県内水面養殖漁業協同組合から導入し、以後継代中。産卵期は8月～9月。発眼率が50%前後と低く、ふ化率も悪いため、新たな問題となっている。西湖と本栖湖に種苗放流している。 アルビノ系 2005年に民間養魚場で出現したアルビノ稚魚を導入（全て雄魚と判明）。アルビノ遺伝形質は劣性遺伝子による。固定化実施中。 ※アルビノと通常魚との交配による子孫の表現型 <table><tr><td>親魚の種類</td><td>アルビノ♂</td><td>通常魚♂</td></tr><tr><td>通常♀</td><td>通常型</td><td>通常型</td></tr></table> ☆アルビノ♀との交配は行っていない。	親魚の種類	アルビノ♂	通常魚♂	通常♀	通常型	通常型	山梨県
親魚の種類	アルビノ♂	通常魚♂					
通常♀	通常型	通常型					
通常飼育（池産・湖産） 導入年：1976年、導入元：中禅寺湖 起源：中禅寺湖へのヒメマスは1906年、阿寒湖産ヒメマスが十和田湖よりはじめて導入された。1934～41年に択捉島ウルモベツ系ベニザケが、1956年にはカナダフレーザー川系ベニザケが移殖された。 性質：稚魚期は飼育が容易である。 1歳上半期までの成長具合によっては、その初秋に早熟雄が多数出現し減耗する。幼魚期から成魚期にかけて取扱には注意が必要である。外部要因に過敏で、響音や人影に驚き、側壁に衝突するなどして傷やスレ、鱗のはがれ等から斃死する個体も少なくない。0+～1+の初夏にかけ、銀毛変態し、降下行動を示す。	中央水研						

7 ビワマス

性 質	保有機関
<u>高成長系</u> 天然ビワマスは飼育管理下では成長が悪く（ふ化後22か月：体長20.9 cm、体重108 g）、かつては養殖の対象となっていなかった。そこで醒井養鱒場で累代飼育していたビワマスから、高成長親魚を選抜し交配することによって、高成長系が作出された。2年で体重1 kgに達し、養殖魚として実用的な系統と評価している。成長－ふ化後20か月：平均体長41 cm、体重1,017 g、成熟－1年魚での早熟雄が多く出現し、2年で雌雄ともほとんどが成熟する。肉質－市販の配合飼料を与えても、天然ビワマスと遜色ない肉質となる。周年、大型の個体を供給するため、全雌三倍体の安定量産技術を研究中である。三倍体化率－2006年度作出：57%、2007年度作出：83%。	滋賀県
<u>ホンマス（中禅寺湖産ビワマス）</u> ビワマスとサクラマスの交雑種。成長にバラツキがあり共食いが多いので注意が必要である。銀毛化する個体が数多く出現する。	中央水研

8 コレゴヌス

性 質	保有機関
<u>通常飼育（コレゴヌス・ペレッド）</u> 1988年に長野県から卵を導入。会津ユキマスと称す。	福島県

9 ブラウンマス

性 質	保有機関
<u>通常飼育</u> 1996年に青森県内水面水産試験場から導入（起源は山梨県内の民間養殖業者）し、以後継代中。 産卵期は1～3月、体側の朱点の色の薄い個体もある。	山梨県

<u>偽雄（性転換雄魚）</u> 性転換雄魚。ニジニジブラ作出（信州サーモン）に使用。	長野県
<u>通常飼育</u> 導入年：不明、導入元：アメリカ、本種はアメリカから導入されたカワマス卵あるいはニジマス卵に混じって導入された。 性質：飼育過程（再生産を含む）は容易。稚魚期の成長は緩やかだが、その後の成長は良い。水カビ病などにより、採卵後の斃死は多い。	中央水研

10 イトウ

性 質	保有機関
<u>通常飼育</u> 導入年：1992年、導入元：北海道大学（空知川系） 親魚の成熟産卵を促すため、水車で飼育水温に差（年変動）が出るよう工夫している。	山梨県
<u>通常飼育</u> 導入年：1996年、導入元：北海道大学 七飯淡水実験所 性質：成熟するまでの期間が6年以上と長く、雄の精液量が非常に少ないので、媒精が難しい。飼育自体は容易。	中央水研

11 コカニー

性 質	保有機関
<u>通常飼育（陸封性ヒメマス？）</u> 導入年：1988年、導入元：ロシア カムチャツカ南西部 マルキンスキー 孵化場、起源：ロシア カムチャツカ クロノツキー湖 性質：全体としてヒメマスと酷似するが、銀毛変態する個体は少なく降下行動は示しにくい。パーマークがある程度残存しヒメマスに比べ抱卵数が少ない。	中央水研

12 レイクトラウト

性 質	保有機関
通常飼育 導入年：1966年、導入元：カナダ オンタリオ州オペオン湖産 性質：卵径は小さく抱卵数が多い。孵化から餌付け期までは魚体が小さいため、逸散に注意する。その後の飼育は容易。	中央水研

いため、給餌量を工夫する必要がある。その後の飼育は容易だが、交雑を避けるためイワナ等の混生は避ける。

中央水研

14 カットスロート

性 質	保有機関
通常飼育 1993年に北海道大学から導入し、以後継代。	山梨県

13 カワマス

性 質	保有機関
通常飼育 導入年：1901年、導入元：アメリカコロラド州レッドビル コロラド川産 性質：卵径が小さく孵化魚体が小さいので逸散に注意する。また、餌付け期から稚魚期にかけては共食いが多	中央水研

15 マスノスケ

性 質	保有機関
通常飼育 1994年に北海道大学から導入し、以後継代。ニジマスとの異質三倍体の研究を2007年より開始している。	山梨県

【保有機関】

北海道：北海道立水産孵化場（内藤一明）
 青森県：青森県水産総合研究センター内水面研究所（榑 昌文）
 岩手県：岩手県内水面水産技術センター（山野目 健）
 宮城県：宮城県水産技術総合センター内水面水産試験場（谷合祐一）
 山形県：山形県内水面水産試験場（荒木康男）
 福島県：福島内水面水産試験場（加藤 靖）
 茨城県：茨城県内水面水産試験場（山口安男）
 栃木県：栃木県水産試験場（沢田守伸）
 群馬県：群馬県水産試験場（泉 庄太郎）
 東京都：東京都島しょ農林水産総合センター（竹之内卓夫）
 新潟県：新潟県内水面水産試験場（井熊孝男）
 山梨県：山梨県水産技術センター忍野支所（高橋一孝）
 長野県：長野県水産試験場（上島 剛）
 岐阜県：岐阜県河川環境研究所下呂支所（徳原哲也）
 静岡県：静岡県水産技術研究所富士養鱒場（望月万美子）
 愛知県：愛知県水産試験場内水面漁業研究所三河一宮指導所（服部克也）
 滋賀県：滋賀県水産試験場醒井養鱒場（桑村邦彦）
 大分県：大分県農林水産研究センター水産試験場内水面研究所（木本圭輔）
 宮崎県：宮崎県水産試験場小林分場（田牧幸一）
 中央水研：水産総合研究センター中央水産研究所日光庁舎（東 照雄）
 愛知淡水：愛知県淡水養殖漁業協同組合（小堀彰彦）

－ 会 員 通 信 －

International Symposium on Formosa Landlocked Salmon and Masu Salmon に参加して

三重大学大学院生物資源学研究科

宮原 寿恵

本シンポジウムは2000年4月に台湾で開催されたサラムオマスの保全に向けたワークショップの後を受け、今秋台湾で行われたものである。サラムオマス (Formosa landlocked salmon; *Oncorhynchus masou formosanus*) はサケマス類の中で最南端に生息するサクラマス *O. masou* の台湾固有亜種である。サラムオマスは元来台湾北部を流れる大甲溪の上流全域に生息していたが、ダムや堰堤の建設、農地の開発といった人間活動によりその生息地を徐々に減らし、現在は雪霸国立公園内を流れる一支流、七家湾溪わずか7 kmの流程のみに生息している。このため本種は絶滅が危惧されており、IUCN (国際自然保護連合) においてCR (絶滅危惧IA類) に位置づけられている。台湾ではサラムオマスを“国宝魚”とし、国をあげて保護活動を行っている。今回のシンポジウムではサラムオマスの生態や遺伝等に関する研究発表に加え、サクラマスの仲間やイワナといった東アジアのサケマス類における保全への取り組みを中心とした発表が行われた。シンポジウムは2009年10月23・24日に開催され、25・26日にはエクスカーションとしてサラムオマスの生息地の見学が行われた。主催者は国立台湾海洋大学の郭教授であり、参加者は主に日本と台湾の研究者と学生を合わせた約40名で、他にアメリカから2名の研究者が招待されていた (写真1)。



写真1. シンポジウム参加者の集合写真

シンポジウム前日の22日には国立台湾博物館において icebreaker party が行われたが、筆者は飛行機の便の関係により残念ながら参加できず、翌23日のシンポジウムから参加した。シンポジウムは台北市内にある台湾師範大学の国際会議場で行われ、1日目のセッションは、“台湾鮭生物学 (Biology of Formosa landlocked salmon)” 5題と“保育鮭魚 (Conservation of salmon)” 9題で、サラムオマスの生態や個体群動態、保全に向けた現在の取り組みに関する発表や、サケマス類における染色体操作技術、ダムの影響や交雑の問題に関する発表が行われた。2日目のセッションでは、“鮭魚生物技術 (Biotechnique of salmon)” 6題、“鮭魚生産 (Salmon production)” 3題、“鮭魚生態 (Ecology of salmon)” 5題で、サケマス類の遺伝的多様性に関する発表や再生産技術および行動生態に関する発表が行われた。シンポジウムの内容は非常に多岐に渡り、サラムオマスの生息環境に関する話題を一つ取っても、現在の生息地におけるダムによる小集団化やこれに伴う集団の遺伝的劣化、河畔の農業活動において用いられた農薬による水質の汚染によって生じた性比の偏りの発生といった様々な観点から発表がなされた。印象としては、いずれの発表からもサラムオマスの保全における台湾の研究者の危機感がひしひしと伝わってきた。また日本のサケマス類に関する発表では、北海道を中心とした日本各地における生息の現状が報告されたが、サラムオマスと同様、ダムによる河川の分断の影響や国内外からの移入種による生態的攪乱の問題が指摘されていた。また、私自身の発表とも重なるが日本に生息するアマゴ *O. m. ishikawae* やサクラマス（ヤマメ）の遺伝的集団構造に関する発表もあった。サクラマス類の在来集団はサラムオマスと同様にいずれもダムや漁獲圧などの様々な外部要因により遺伝的多様性が低下している印象を受けたが、サラムオマスの遺伝的多様性はこれらと比べても非常に低く集団内にほとんど遺伝的差異の無いことには驚かされた。英語のシンポジウムは慣れていない自分としては常に集中していても話を聞き取るのが難しく、また緊張もあり非常に疲れたが、幅広い研究分野に触れることができとても面白かった。シンポジウム参加者には参加の記念としてそれぞれサラムオマスをあしらったコースター、ポストカード、Tシャツがプレゼントされた（写真2）。

台北での宿泊場所は、同じく台湾師範大学内のホテルであった。大学の近くには学生街のような夜市があり、ちょっとした食べ物を買うには困らなかった。独特の雰囲気の中、南国の果物や台湾の食べ物が屋台で売られており、並びで洋服や日用品も売られていた（写真3）。また食堂や甘味処もあり興味を引かれるものばかりで、滞在中に何度か訪れ夜食を調達した。またシンポジウム1日目の夕食は台北駅前のホテル内のレストランにおいて台湾料理のバイキングに舌鼓を打った。翌2日目には台湾故宮博物院の敷地内にあるレストランでディナーを取り、その後故宮博物院を見学することができた。故宮博物院は自分が一度は訪れたと思っていた場所でもあり、緻密な象牙細工の装飾品や色鮮やかな食器類、中国の歴史的な遺産を見ることができた。



写真2. シンポジウム参加者へ配られたアブストラクト・プロシーディングと記念品。



写真3. 夜市の屋台。この屋台では並んでいる食材から好きなものを選ぶと、加熱し、茹でた麺の上のにのせてくれた。

心配されていた台風の影響もなく25日からのエクスカージョンには日本の研究者を中心とした約20名が参加し、バスに乗りサラマオマスの生息する雪霸国立公園へと向かった。途中、台湾北東部の宜蘭にある国立伝統芸術センターに立ち寄り、台湾の伝統工芸品などの見学や観劇も行った。施設内にあった廟には学問の神様が祀られているとのことであったので、今後の研究がうまくいくようにと祈ったが、台湾の神様は果たして日本でも御利益があるのか少し心配である。郭教授の知り合いの方の経営する農場での昼食後、待ちに待ったサラマオマスの生息する武陵を目指した。武陵までは3時間かけて宜蘭川沿いを登っていくのだが、前日のシンポジウムで聞いていた通り、目にする河川の両岸にはあちこちに台風による土砂の流出した跡があり、道路が補修中の部分もあった。また河川敷や道の両側といった至る所にキャベツが植えられていたことも印象的だった（写真4）。

サラマオマスの生息する七家湾溪にさしかかり、最初に“観魚台”という場所でバスは停車した。道沿いから川の大きな淵を覗き込むと、そこには全長20 cmぐらいのサラマオマスが数匹泳いでいた（写真5）。数メートルの至近距離から大人数が見ているにも関わらず悠々と泳いでおり、こんなにも簡単に近くで見られることに少し拍子抜けした。七家湾溪は富士山よりも高い4000 m 近い山々の中腹にあり、半袖や薄着でも大丈夫であった台北市内と打って変わって肌寒く感じた（写真6）。バスから外を見ていると道沿いに一部荒地があったが、その場所は昨年まではリンゴ畑であったのを政府が買い取り、今後植林する予定とのことであった。武陵ではまず、源流域にある30メートルほどの高さの砂防ダムのすぐ真下にある吊り橋へと案内された。吊り橋から下の淵を覗くと、先ほどの観魚台よりも多い10尾以上のサラマオマスの群れがおり、ちょうど産卵行動を行っている場面に出くわすことができた（写真7）。これまでに七家湾溪を訪れたことのある方も、このように多数のサラマオマスの産卵行動を見るのは初めてとのことであり、今回は非常に幸運であった。ただ残念なことに到着時にはすでに日が暮れかかっており、あまり長い時間観察することはできなかったが、郭教授の御配慮により翌日の早朝に再度見学できることになった。この日最後に訪れたのはサラマオマスを孵化・飼育し、放流を行っている施設である Taiwan salmon eco-center であった。このセンターは訪問者にサラマオマスの生態を紹介するコーナーと、実際にサラマオマスの孵化・飼育を行っている施設からなっていた。孵化施設ではサラマオマスの他



写真4. 一面に広がるキャベツ畑と宜蘭川。



写真5. 観魚台から淵を眺める一行。



写真6. 吊り橋からの景色。中央を流れる川がサラマオマスの生息する七家湾溪。

に、同じく七家湾溪に生息しているコイ科のクーハ（苦花；*Varicorhinus barbatulus*）とサラマオマス飼育の練習台ということでニジマスが飼育されていた。宿泊は武陵農場というホテルで、夕食後の自由行動時には満点の星空を見ることができた。翌26日の朝食後、前日に産卵行動の行われていた吊り橋へと再び向かった。淵では前日と同様にサラマオマスがペアを作り産卵行動を行っていた。自分の場合サケマス類の産卵行動を生で見るのは初めてで貴重な体験をすることができ嬉しかったが、同時に眼前の種が絶滅に瀕していると思うと少し複雑な気持ちでもあった。

サラマオマスの観察後、場所を Shei-Pa Visitor Center に移しサラマオマスの今後の保全に向けた取り組みについて、国立公園管理事務所のスタッフを含めたディスカッションが行われた。事務所のスタッフからのこれまでに実施された放流事業についての説明後、参加した研究者により次の点が指摘された。まずサラマオマスの保全において最も重要なのが、生息地の保全や拡大、生息数の増大のどれなのかが曖昧であるという点であった。また生息環境に関しては化学物質の調査の必要性和ダムの存在が問題であり、生態についてはもっと正確に調査すべきとの指摘があった。最後にいずれの研究者からも指摘されたことは孵化場におけるニジマスの飼育の危険性であった。ニジマスについてはシンポジウム終了後すぐに処分されたと聞き、サラマオマスの保全に関する事務所のスタッフの迅速な行動力には感動した。

昼食後、武陵から台北へと戻り夕方には解散となった。郭教授のご厚意により、夜は台湾海洋大の学生みなさんに台北市内最大のマーケットである士林夜市を案内して頂いた。そこで食べた牡蠣とミントティーと臭豆腐の味はきっと忘れないだろう。また日本では決して味わえないような飲み物や食べ物、光景はとも印象に残った。今回のシンポジウムの間、郭教授を始めとする台湾海洋大の方々には本当に良くして頂いた。滞在中の食事はどれも美味しく食べきれないほどであったし、滞在中は特に不自由を感じることもなく、またサラマオマスの見学などのこちらからのお願いにも快く応じて下さった。大変感謝の念に堪えない。

今回、河村功一先生にこのシンポジウムを紹介され、外国に行ってみたいという単純な動機で参加を決めたため、直前になって不安になり少し後悔もしたのだが、実際に発表を行い、様々な体験ができ、今思うと参加して本当に良かった。特にシンポジウムを通して自分が関わっている保全という分野の難しさと幅広さを感じ、それとともに自分の勉強不足を痛感できたのは良い経験であった。また、日本のサケマス類における様々な立場の研究者の方々や考え方に触れることができたのも貴重な勉強であった。今後この経験を自分自身の研究活動に少しでも活かしていきたいと思っている。



写真7. 群れをなし産卵行動を行うサラマオマス。中央の岩の上下にペアを作り泳いでいるのがわかる。

水産育種研究会組織

会 長	岡本信明
庶務幹事	坂本 崇、藤加菜子
会計幹事	吉崎悟朗
編集幹事	古丸 明（主任）、河村功一、荒井克俊、阿部周一、池田 実、 奥村誠一、木島明博、関 伸吾、高木基裕、中嶋正道、 中山一郎、西田 睦、山羽悦郎
国際学会担当幹事	谷口順彦、和田克彦
総括幹事	藤尾芳久、山崎文雄
会計監査	青木 宙

水産育種 第39巻2号

2010年(平成22年)3月20日印刷

2010年(平成22年)3月21日発行

編集者 古丸 明

代表者兼発行者 岡本信明

発行所及び著作権者 水産育種研究会

〒514-8507 津市栗真町屋町1577

三重大学生物資源学研究科

TEL 059-231-9527 FAX 059-231-9540

印刷所：(有)西村謄写堂

〒780-0901 高知市上町1丁目6-4

TEL (088)822-0492 FAX (088)825-1888

FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE

Volume 39 Number 2, March 2010

CONTENTS

Originals

- Genetic Relationships Between Anadromous and Non-anadromous Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*) Inferred from Mitochondrial and Microsatellite DNA Variation
J.-N. YU, N. AZUMA, V. BRYKOV, S. URAWA, K. OHKUMA and S. ABE 75
- Comparison of Sr/Ca Ratio of the *Corbicula japonica* Shells Collected in Japan, Imported *C. japonica* from Korea and *C. largillierti* from China
A. KOMARU, K. ONOUCHI, Y. YANASE, K. NAGASAKI and T. OTAKE 87
- Effects of Water Temperature on Embryonic Survival Rates and Meristic Characters of the Juveniles in Masu Salmon (*Oncorhynchus masou masou*)
D. ANDO, K. SHIMODA, Y. SHINRIKI, S. MIZUNO, K. NAITO and M. NAKAJIMA 95
- Simple and Easy Method using Multiplex PCR for Distinguishing between Ryukyuan Domestic and Introduced *Carassius auratus*
Mikumi TAKADA, Katsunori TACHIHARA and Mutsumi NISHIDA 109
- Identification of Bluefin Tuna Germ Cells and Larvae by PCR Detection of *vasa* Sequence Polymorphisms
N. KABEYA, T. OKUTSU, R. YAZAWA, K. HIGUCHI, K. NAGASAWA, R. MIMORI,
H. CHUDA, M. HAMASAKI, Y. TAKEUCHI and G. YOSHIKAZI 115

Information

- Report on Breeding Families of Fish and Shellfish in Japan M. HARA 127
- A Report of an Investigation for Traits of Salmonid Fish in Public Stations in Japan
N. OKAMOTO 131
- International Symposium on Formosa Landlocked Salmon and Masu Salmon
H. MIYAHARA 145

The Regulations 149

Instructions for Authors 150