

## 広島県と山口県の三倍体ギンブナにおける 雌性発生クローンの識別と分布

前田 克明・海野 徹也・森島 輝\*・前村 浩隆  
張 全啓\*\*・荒井 克俊\*・中川 平介

広島大学生物生産学部, 東広島市 739-8528

2001年9月30日 受付

**要 旨** 三倍体ギンブナ *Carassius langsdorfii* は雌性発生によりクローンとして繁殖することが知られている。本研究は広島県と山口県に生息する三倍体ギンブナのクローン組成と分布を明らかにするため行った。広島県太田川, 黒瀬川, 沼田川, 白竜湖, 芦田川ならびに山口県錦川より合計312個体のフナ類を得た。DNA 量フローサイトメトリーあるいは赤血球径測定から倍数性判定をしたところ, 全水系で36~100%の率で全雌三倍体ギンブナが出現した。これらについて, DNA フィンガープリント法によりクローン識別を行ったところ, 複数個体間で遺伝的同一性が認められ, 全体で16クローン系統が識別できた。個体特異的 DNA 型をもつギンブナを1クローンとすると, さらに56系統が存在する。クローン16系統中, 6系統は2~3水系の間で共通して出現したが, 残り10系統は各水系に固有であった。優占的に出現する系統は水系毎に異なっていた。また, 同一地点でも, 年級毎に優占クローンが異なった。

キーワード: ギンブナ, 雌性発生, 三倍体, クローン, DNAフィンガープリント

### 緒 言

ギンブナの多くは三倍体であり (小林ら, 1970), これらは発生の開始に精子を必要とするが, 精子核の遺伝的関与の無い「雌性発生」により繁殖している (小林, 1971; YAMASHITA *et al.* 1990)。ギンブナ三倍体は体細胞の染色体数が半減しない非還元性の三倍体卵を産生することから (小林, 1976; YAMASHITA *et al.* 1993), 一腹の仔は母親の遺伝的コピーとして発生し, 同腹内では遺伝的変異の無いクローンとなる。母子間ならびに同胞間のクローン性は鱗移植とアイソザイム分析により確認され (小野里, 1983), 近年ではDNA フィンガープリント分析 (董ら, 1996; UMINO *et al.*, 1996; 1997ab, 間田ら, 2001a), RAPD (random amplified polymorphic DNA)-PCR (polymerase chain reaction) 法 (董・谷口, 1996), およびマイクロサテライト分析 (OHARA *et al.*, 1999) によっても明らかにされた。

クローン生殖を行うギンブナは単性魚種における遺伝的多様性の維持機構ならびに雌性発生や倍数性の起源解明の研究材料として考えられ, 自然集団の遺伝的調査も行われてきた。小野里ら (1983) は北海道内24水系で二倍体のほか, 三倍体と四倍体の出現を観察し, 三倍体が全体の半分以上を占めることを報告している。さらに, 小野里 (1983) は北海道の蕁菜沼に生息するギンブナには鱗移植で識別可能な主要なクローンが5つあり, これらに属する個体が三倍体中の86%を占めることを見出した。北海道ではこの様な少数クローンの優占が多く水系で見られ, 奥尻島では採集個体のすべてが同一のクローンであったという (小野里, 1983)。

西日本に生息するフナの倍数性とクローン組成についての知見は最近まで無かったが, 董・谷口 (1996) は高知県物部川水系のギンブナについて DNA フィンガープリント分析により, 複数クローンの存在を認め

\* 北海道大学大学院水産科学研究科, 函館市 041-8611

\*\* 青島海洋大学, 青島, 266003, 中国

た。一方, UMINO *et al.* (1997a) は広島県黒瀬川のフナを調査し, 約80%の個体が三倍体ギンブナであり, 同様の分析からその約90%がわずか3クローンに分類しうることを報告した。従って, 中国, 四国地方のギンブナも複数の雌性発生クローンより成ることは明らかである。さらに, 大原ら (1998) は四国の仁淀川と物部川両水系において判別した17クローンのうち6クローンが両水系に共通であることを報告している。このような研究はクローンの起源と分布を考えるうえで重要であるが, 現在のところ上記以外の水系について共通クローンの調査は行われていない。

本研究では前回調査した黒瀬川 (UMINO *et al.*, 1997b) に加え, 広島県内の太田川, 沼田川, 白竜湖, 芦田川 (支流の高屋川を含む) ならびに山口県の錦川のフナについて倍数性調査を行い, 各水系毎の三倍性ギンブナの頻度を調べた。そして, DNA フィンガープリント分析によりクローンの識別を行い, 各水系のクローン組成と水系間のクローンの共通性につき調査を行うとともに, クローン間の遺伝的類似度を検討した。

### 材 料 と 方 法

**供試魚** 1995年5～6月に広島県沼田川および白竜湖より, そして, 1996年4～8月に山口県錦川, 広島県太田川, 黒瀬川, 芦田川 (支流 高屋川2地点を含む) よりフナ類を得た。黒瀬川では前回調査 (UMINO *et al.*, 1997b) と同一の地点で採集を行った。これらの供試魚の尾部静脈より注射器を用いて採血し, これらを倍数性判定のための後述の DNA フローサイトメトリー分析および血液塗末標本作製とクローン性判定のための DNA フィンガープリント分析に供した。なお, 本研究では, ギンブナの学名は TANIGUCHI and SAKATA (1977) に従い, 三倍性が確認された個体をギンブナ *Carassius langsdorfii* として扱った。二倍体の中には, 外見上明らかにゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri* と判定される個体の他, 三倍体と区別困難な個体が見られたが, これらの種判別は行わなかった。

**各種形質の測定と計数** 採血後, 生殖腺の肉視により雌雄を判定した。また, 体重 (Body weight, BW), 全長 (Total length, TL), 体長 (Body length, BL), 体高 (Body depth, BD), 頭長 (Head length, HL), 背鰭基底長 (Length of dorsal fin base, DBL) を測定し, これらの測定値より, 体高/体長比 (BD/BL), 頭長/体長比 (HL/BL), 背鰭基底長/体長比 (DBL/BL) を求めた。背鰭軟条数および側線鱗数を計数した。測定, 計数は魚体左側について行った

**年齢査定** 鱗相による年齢査定は黒瀬川産三倍体78個体について行った。供試魚の胸鰭下部の鱗をピンセットで採取し, 水を満たしたシャーレ中で, 表皮を取り去った後, 実体顕微鏡下で第二年輪から最外側の年

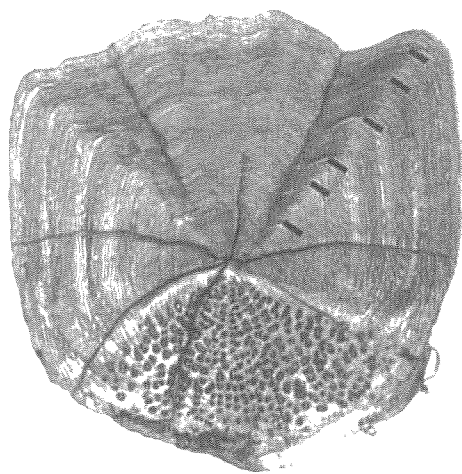


Fig. 1. Scale of gimbuna, *Carassius langsdorfii* indicating annually ring (arrows, 6).

輪までの鱗輪数を計数して年齢査定を行った (Fig. 1)。

**倍数性** UMINO *et al.* (1997b) に従い赤血球について DNA 量フローサイトメトリーを行い、キンギョ (2n=100) を対照とした相対 DNA 量より、二倍性、三倍性を判定した。また、すべての供試魚について血液塗抹標本を作成した。そして、フローサイトメトリーが行えなかった個体については、30個の赤血球長径につき測定を行い、既報 (UMINO *et al.*, 1997b) の基準に従い倍数性を判定した。以上のいずれの方法によっても、フナ類の倍数性判定は明確に行うことができた。

**クロンの識別** 各水系より得たフナ標本について、三倍体ギンブナと判定された個体についてのみ、UMINO *et al.* (1997b) に従って DNA フィンガープリント分析によるクロンの識別を行った。常法により抽出した DNA を制限酵素 *Hinf*I で消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動により分離し、ナイロン・メンブランへ転写した。そして、市販のマルチローカスプローブ33.6 (NICE™, Cellmark Diagnostic, UK) を用い、SPRUELL *et al.* (1995) の方法に従って化学発光により DNA 断片を検出した。制限酵素 *Hinf*I とプローブ33.6の組み合わせにより得られた DNA フィンガープリントについて、個体間ですべての断片が共通となった場合、これらの個体を同一クロンのメンバーと識別した。クロン識別作業は黒瀬川より開始し、確認できたクロンの順に番号を付した。黒瀬川の既知クロン I, II, III (UMINO *et al.*, 1997b) は各々クロン 1, 2, 3 とした。次に各水系の標本毎にクロンの識別を行い、新たなクロン確認の度に番号を与えた。水系内では一個体に特異的な DNA フィンガープリントを示し、クロン性が確認されない場合でも、水系間の共通クロンであることが判明した場合はクロンとした。

共通クロンと判定された個体については、DNA 試料を制限酵素 *Aat*I で消化後、プローブ33.6を用い DNA フィンガープリント分析を行い、遺伝的同一性を再確認した。

**遺伝的類似度** 識別したクロンの DNA フィンガープリント像 (制限酵素 *Hinf*I, プローブ33.6) を対象としてクロン間の BSI (Band Sharing Indices) を求めた。BSI の算出は WETTON *et al.* (1990) による次式に従った。

$$BSI=2N_{AB} / (N_A + N_B)$$

ただし、 $N_A$  と  $N_B$  は個体 (クロン) A と B の断片数、 $N_{AB}$  は両個体 (クロン) の共通断片数である。断片の比較は同じメンブラン上のフィンガープリント像について行った。なお、断片数の計数は 2Kb 以上の断片について行った。

## 結 果

**三倍体の出現頻度とその性比** 調査したすべての個体 (n=312) は二倍体 (n=117, 37.5%)、あるいは三倍

Table 1. Appearance of diploid crucian carp and triploid ginbuna *Carassius langsdorfii* collected for 8 localities (rivers and lake) in Yamaguchi and Hiroshima Prefectures.

Prefecture	River(R)/ Lak(L)	Year examined	Fish No.	Diploid <sup>1</sup>				Triploid			
				No.(%)	Female	Male	Unknown	No.(%)	Female	Male	Unknown
Yamaguchi	Nishiki R.	('96)	39	17(43.6)	2	8	7	22(56.4)	22	0	0
Hiroshima	Ohta R.	('96)	11	1(9.1)	0	1	0	10(90.9)	10	0	0
	kurose R.	('96)	145	41(28.3)	34	6	1	104(71.7)	103	0	1
	Nuta R.	('95)	50	28(56.0)	6	13	9	22(54.0)	20	0	2
	Hakryu L.	('95)	12	3(25.0)	2	1	0	9(75.0)	9	0	0
	Ashida R. <sup>2</sup>	('96)	8	0(0)	0	0	0	8(100)	8	0	0
	Takaya-A <sup>3</sup>	('96)	36	23(63.8)	14	9	0	13(36.1)	13	0	0
	Takaya-B	('96)	11	4(36.4)	0	0	4	7(63.6)	7	0	0
			312	117(38.5)	58	38	21	195(62.5)	192	0	3

<sup>1</sup> Including Gengoroubuna *Carassius cuvieri*; <sup>2</sup> Main stream; <sup>3</sup> Branch of Ashida R.

体 (n=195, 62.5%) に識別され, 三倍体以上の倍数体, 異数体およびモザイク個体は見当たらなかった (Table 1)。調査したすべての水系で三倍体が見られ, 特に太田川, 黒瀬川, 白竜湖, 芦田川 (本流) においては, その出現頻度 (71.7~100%) は高かったが, 錦川, 沼田川, 高屋川での頻度 (36.1~63.6%) は低く, 相対的に二倍体出現頻度が高かった。なお, 二倍体には雌と雄両者が見られたが, 調査した三倍体は, 性別判別が行えなかった3個体を除き, すべて雌であった。

各水系のクローン組成 DNA フィンガープリント (以下 DNA-FP) 像による三倍体ギンブナクローンの識別例を Fig. 2 および Fig. 3 に, 各水系毎の識別結果を Table 2 に示す。

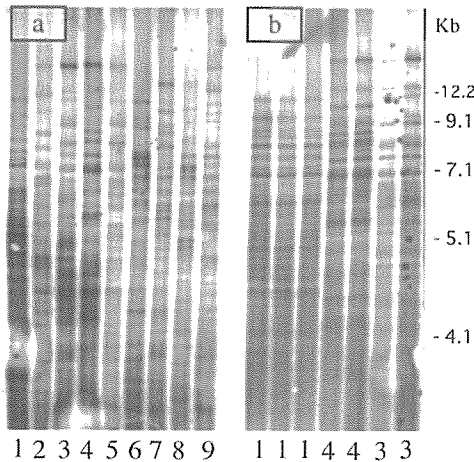


Fig. 2. DNA-fingerprinting of triploid ginbuna, *Carassius langsdorfii* captured at the Kurose River, showing clonal lines#1-9 (a) and clonal members (b). DNA was digested with *Hinf* I and hybridized with 33.6 probe.

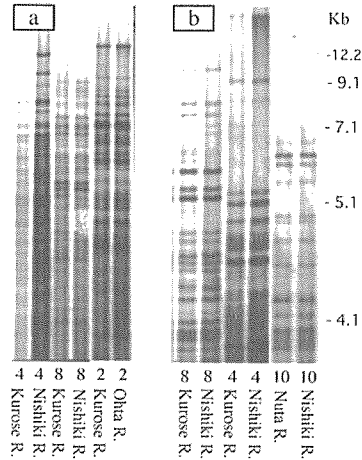


Fig. 3. DNA-fingerprinting of clonal members in triploid ginbuna, *Carassius langsdorfii* appeared in both Ymaguchi and Hiroshima Prefecture. DNA was digested with *Hinf* I (a) and *Alu* I (b) and then hybridized with 33.6 probe.

Table 2. Appearance of clonal lines in ginbuna, *Carassius langsdorfii* from six localities (rivers and lake) in Yamaguchi and Hiroshima Prefectures.

Locality	No. of 3N examined	Clone #															No. of DNA Type		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		16	Other**
Nishiki R.	22	-	-	1	2	-	-	-	3	-	2	-	-	-	-	-	-	14	18
Ohta R.	10	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	5	7
Kurose R.	98	37	0 <sup>†</sup>	11	18	4	4	6	8	5	-	-	-	-	-	-	-	5	14
Nuta R.	22	-	-	-	3	-	-	-	-	1	5	-	2	-	-	-	-	11	15
Hakryu L.	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	5	6
Ashida R. <sup>††</sup>	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	16	19
	183	37	1	12	23	4	4	6	11	6	7	4	2	4	2	2	2	-	-

<sup>†</sup> Including samples from Takase R.

<sup>††</sup> Clone was not determined among others from each water system.

<sup>\*\*</sup> Reported in UMINO *et al.* (1997)

黒瀬川では1994年に採集した標本において3系統のクローン (1~3) が報告されたが (UMINO *et al.*, 1997b), 今回の調査ではこれら以外に6クローン (4~9) が認められ, 前報と合わせ合計9クローンが識別できた (Fig. 2a)。このほか個体特異的 DNA-FP を示す三倍体が5個体見られた。Fig. 2b に黒瀬川に多



( $0.145 \pm 0.011$ , 範囲 $0.122 \sim 0.157$ )を示した。

黒瀬川の残りの7クローン(クローン10~16)と1~9クローンを同一メンブレン(ゲル)上で比較することは出来なかった。しかし, 同一メンブレンで比較した錦川の3クローン(クローン4, 8, 10), 沼田川の3クローン(クローン4, 10, 12), そして支流の高屋川を含む芦田川の3クローン(クローン14, 15, 16)の算出した平均BSIは各,  $0.221 \pm 0.099$ ,  $0.279 \pm 0.078$ ,  $0.234 \pm 0.055$ となり(Table 4), 黒瀬川9クローン間の平均BSI( $0.284 \pm 0.100$ )と比較して大きな違いは認められなかった。

Table 4. Average value of inter-clonal BSI within each location

Location	Clone · (No. of clonal line)	BSI
Nishiki R.	4,8,10 (3)	$0.221 \pm 0.099$
Kurose R.	1-9 (9)	$0.284 \pm 0.100$
Nuta R.	4,10,12 (3)	$0.279 \pm 0.078$
Ashida R*	14,15,16 (3)	$0.234 \pm 0.055$

\*Including samples from Takaya R.

**体長および年齢組成別クローン組成** 体長の測定結果とクローン識別結果のある黒瀬川産ギンブナ80個体について体長階級別のクローン組成をFig. 4に示す。クローン1は体長110mm未満の魚では0~14%の頻度でしか見られなかったが, 110mm以上200mm未満のすべての階級では30~60%の頻度で認められた。クローン3は体長110mm以上の魚で見られたが, 130mm以上の階級では比較的高い頻度(20~29%)で認められた。一方, クローン4は, 110mm以上130mm未満の群と170mm以上180mm未満および250mm以上の群で比較的高い頻度で見られた。

鱗相で査定した年齢別のクローン組成も類似した傾向が見られた(Fig. 5)。2才魚以外ではクローン1は常に認められ, 3, 4, および8才では半数あるいは半数以上を占めた。クローン3は5才, 6才ではほぼクローン1と同程度出現し, クローン4の頻度は7才, 9才の高齢魚で高かった。

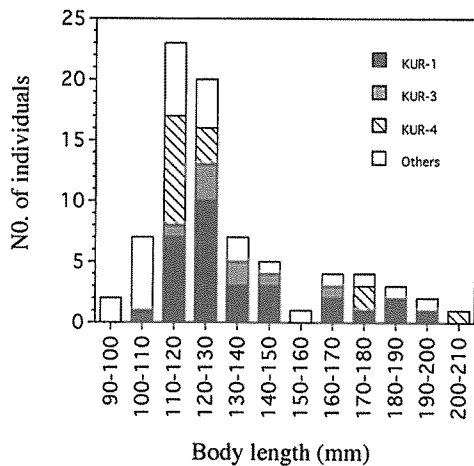


Fig. 4. Size distribution and composition of ginbuna clone#1,3,4 and others at the Kurose River.

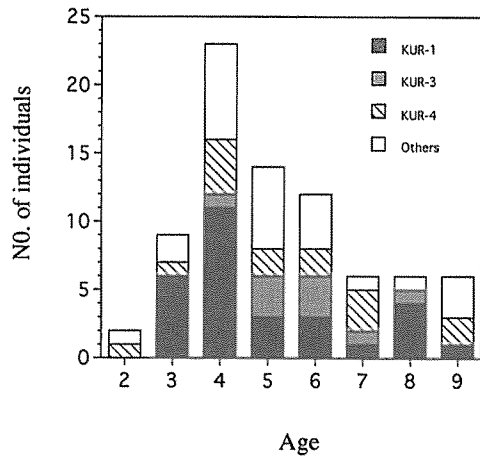


Fig. 5. Age distribution and composition of ginbuna clone#1,3,4 and others at the Kurose River.

**河川内クローン間の形態比較** 黒瀬川の三倍体ギンブナについて, 体長, 体高, 頭長, 背鰭基底長を測定した合計74個体について, 体長に対する体高の割合(BD/BL), 体長に対する頭長の割合(HL/BL), 体長に対する背鰭基底長の割合(DBL/BL)を算出して, クローン間で比較したところ, 有意差(Scheffe multiple range test)は認められなかった(Table 5)。クローン別の背鰭軟条数をTable 6に, 側線鱗数をTable 7に示す。いずれの形質においても広い範囲で変異が認められた。たとえば, 背鰭軟条数は, 同じクローン1

の中でも13~18の間で変動し、側線鱗数は25~31の間で変動した。しかし、背鰭軟条数ではモードを見ると、クローン毎の傾向も認められ、クローン1と3は16に、クローン4と9は17にモードを示した。

Table 5. Mean and standard deviation of morphometric traits of clonal ginbuna in Kurose River.

Type of clones	#Fish	BD/BL	HL/BL	DBL/BL
Total 3N	74	0.390±0.045	0.277±0.026	0.351±0.048
1	30	0.411±0.038	0.284±0.028	0.334±0.044
3	9	0.355±0.036	0.268±0.023	0.328±0.037
4	12	0.381±0.032	0.263±0.027	0.375±0.039
5	3	0.429±0.054	0.280±0.014	0.395±0.061
6	3	0.408±0.092	0.267±0.039	0.369±0.042
7	5	0.396±0.067	0.289±0.022	0.399±0.039
8	6	0.370±0.016	0.282±0.026	0.324±0.028
9	6	0.379±0.022	0.291±0.021	0.340±0.027

BL=body length, BD=body depth, HL=head length, DBL=length of dorsal fin base

Table 6. Distribution of number of soft rays on dorsal fin of ginbuna clones in Kurose River.

Type of clones	No. of fish examined	No. of soft rays of dorsal fin						
		13	14	15	16	17	18	19
1	30	2	3	6	16	2	1	0
3	9	1	1	0	5	1	1	0
4	12	1	1	1	0	6	3	3
5	3	0	0	1	0	2	0	0
6	3	0	0	1	2	0	0	0
7	5	1	0	1	1	2	0	0
8	6	0	1	2	3	0	0	0
9	6	0	0	0	2	4	0	0

Table 7. Distribution of number of scales on lateral line of ginbuna clones in Kurose River.

Types of clones	No. of fish examined	No. of scales on lateral line					
		<27	28	29	30	31	32
1	30	3	5	3	11	3	0
3	9	1	0	1	4	1	1
4	12	3	1	1	7	2	0
5	3	1	0	0	2	0	0
6	3	0	1	0	2	0	0
7	5	1	0	1	1	2	0
8	6	2	0	1	2	1	0
9	6	1	0	0	3	0	0

Table 8. Mean and S.D. of morphometric traits in ginbuna clone #8 distributed in different localities.

Locality	No. of fish	BD/BL	HL/BL	DBL/BL
Kurose R.	6	0.370±0.016	0.282±0.026	0.324±0.028
Nishiki R.	3	0.361±0.011	0.267±0.022	0.322±0.008

同一クローンの異なる河川間における形態比較 クローン8は黒瀬川と錦川の両方に見られた。そこでこれら二河川間で同一クローンの形態 (BD/BL, HL/BL, DBL/BL) を比較したところ、これらの中で統計上の有意差 (Weich's approximative *t*-method) は見られなかった (Table 8)。

## 考 察

雌性発生によりクローンとして繁殖する三倍体ギンブナと他の二倍体のフナ類との関係については不明な点が多い。小林ら (1970) はギンブナ種内に両性生殖の二倍体と、雌性発生の三倍体が存在すると考えたが、ギンブナは雌性発生をする倍数体のみで、西日本に生息する二倍体の実体は「オオキンブナ」であるという見解 (TANIGUCHI and SAKATA, 1977; 谷口, 1982) もある。本研究では、これらの問題には立ち入らず、三倍性が確認された個体はすべてギンブナとして扱い、そのクローン組成を検討した。これらが、ギンブナであることは、三倍性、全雌性、クローン組成の結果より疑問の余地は無い。

山口県と広島県の瀬戸内海へ流れる河川等の三倍体ギンブナについて、DNA フィンガープリント (DNA-FP) 法により検討したところ、先ず同一水系の標本中に DNA 断片の位置、数、濃さの全く等しい複数の個体が見られ、遺伝的同一 (クローン) 性が明らかになった。今回調査した水系で、複数の同一 DNA-FP を示す個体の存在により確認できたクローン数は1 (白竜湖) ~ 9 (黒瀬川) と水系毎に異なった。しかし、各水系の既知クローンとは異なる DNA-FP を示す三倍体個体も雌性発生により繁殖していると仮定すると、錦川では18系統、太田川では7系統、黒瀬川では14系統、沼田川では15系統、白竜湖では6系統、芦田川 (高屋川を含む) では19系統が生息することになり、各水系のクローン組成は多様であった。

クローン組成を調査個体数の多い黒瀬川で見ると、少数の優占的クローンが高い頻度で出現する傾向があった。前回調査 (UMINO *et al.*, 1997b) では86%がクローン1, 2, 3の3系統であり、66%がクローン1であった。同様に今回も、クローン1が最優占で38%を占めた。しかし、この出現率は前回調査よりも低く、前回第2位のクローン3は第3位となり、クローン4が第2位、3位であったクローン2は今回は認められなかったことは、年毎にクローンの組成が変化することを示唆する。このことは、体長別および年齢別にクローン組成を比較した結果からも支持された。クローン1は多くの年級群にみられるが、小型 (若齢) 魚では頻度が低かった。また、クローン4は大型 (高齢) 魚で高い頻度を示した。従って、一つの水系のクローン組成は年毎の環境変化により影響を受け、ある年度に発生した多数のクローン系統のうち、適応したクローンが勢力を拡大し、次世代の生産に関与するものと思われる。

ところで、多数のクローン系統の存在は何によりもたらされるのであろうか。同一水系クローン間の BSI を比較すると、平均値に比べて高い BSI (類似した DNA-FP 像) を示すクローンが見られた。このことから、何らかの原因で一つのクローンが別のクローンから派生してきた可能性が考えられる。この点について MURAYAMA *et al.* (1984) や ZHANG *et al.* (1992) は卵形成の過程で、本来生じないはずの相同染色体の部分的対合がおこり、産出卵の中に遺伝的変異が生じる可能性を示唆している。一方、ギンブナ受精卵の温度処理により四倍体が出現することから (TAKAKI and OJIMA, 1983; 董ら, 1997, 間田ら, 2001b), 精子ゲノムの取り込みも否定できない。この様な、あるいは未知の機構によりクローン系に変異が生じ、これらの変異体が生息環境に適応した場合、新たなクローンが形成されるのかもしれない。

クローン内の変異により異なるクローンが生成される場合のほか、自然的あるいは人為的要因による移住、移植の可能性がある。このことは、同一クローンが地理的に著しく隔たった水系に出現することにより示唆される。本研究では黒瀬川-錦川-沼田川 (クローン4), 黒瀬川-錦川 (クローン3, 8), 錦川-沼田川 (クローン10), 黒瀬川-沼田川 (クローン9) および黒瀬川-太田川 (クローン2) 間で共通のクローンが見られた。山口県東部の錦川と広島県東部の沼田川の河口は約 100km 離れていることから、このように地理的に隔離された河川間に同一クローンが分布していることになる。地域間の共通ギンブナクローンは大原ら (1998) によって高知県の仁淀川水系と物部川水系 (河口間距離約 50km) の間においても既に報告されており、両河川集団が共通のクローンギンブナを祖先集団として共有すると結論されている。今回、中国地方 (広島, 山口県) のギンブナにおいては地理的に離れた水系に祖先を共通とするクローンが複数いることが判明した。しかし、これらのクローンがどの程度の地理的範囲に分布するかは目下不明であり、この点



は今後の解明に待ちたい。

量的形質の全分散 (Vp) は遺伝分散 (Vg) と環境分散 (Ve) の和となるが、クローンでは  $Vg=0$  となるので、背鰭鰭条数、側線鱗数などでクローン系統内に見られた変異は  $Ve$  のみによると考えられる。今回、体長に対する体高、頭長、背鰭基底長の比率を比較すると、これらは同一河川内のクローン間、ならびに異なる河川に生息する同一クローンの間で有意差は認められず均質であった。同様の観察結果は董ほか (1996b) が報告しており、ギンブナでは特殊な発生様式と多様なクローン構造にもかかわらず、形態的な種の特徴は維持されていることが明らかになった。

## 謝 辞

フナ類の採集に協力頂いた広島県環境保健協会、錦川漁協の方々、広島県安芸郡在住の中村幸春氏、広島県比婆郡在住の中村伸行氏に深謝する。

## 引 用 文 献

- 董仕 (Dong Shi)・谷口順彦, 1996. RAPD-PCR およびアイソザイムパターンによるギンブナ腹部のクローン性の証明. 日本水産学会誌, 62: 891-896.
- 董仕 (Dong Shi)・谷口順彦・辻莊一, 1996. DNA フィンガープリントとアイソザイムパターンによるギンブナクロンの識別. 日本水産学会誌, 62: 747-753.
- 董仕 (Dong Shi)・大原健一・谷口順彦, 1997. 高水温処理によるギンブナ卵へのコイ精子の導入と DNA マーカーによる確認. 日本水産学会誌, 63: 201-206.
- 小林 弘・川島康代・竹内直政, 1970. フナ属魚類の染色体の比較研究, 特にギンブナに現れた倍数性について. 魚類学雑誌, 17: 153-160.
- 小林 弘, 1971. 三倍体ギンブナの gynogenesis に関する研究. 動物学雑誌, 8: 316-322.
- 小林 弘, 1976. 三倍体ギンブナの卵形成における成熟分裂の細胞学的観察. 魚類学雑誌, 22: 234-240.
- 間田康史・海野徹也・荒井克俊, 2001a. 皇居上道灌漑における三倍体および四倍体ギンブナ *Carassius langsdorfii* の雌性発生生殖とクローン性の証拠. 日本水産学会誌, 67: 217-221.
- 間田康史・宮川真紀子・林 大雅・海野徹也・荒井克俊, 2001b. 雌性発生ギンブナにおける精子核導入による四倍体の作出. 水産増殖, 49: 103-112.
- MURAYAMA, Y., HIJIKATA, M., NOMURA, T. and KAJISHIMA, T., 1984. Analysis of histocompatibility and isozyme variations in triploid fish, *Carassius auratus langsdorfii*. J. Fac. Sci., Shinshu Univ., 19: 9-25.
- 大原健一・董仕・谷口順彦, 1998. 仁淀川および物部川水系における DNA 多型によるギンブナのクローン判別とそれらの分布. 魚類学雑誌, 45: 21-27.
- OHARA, K., DONG, S. and TANIGUCHI, N., 1999. High proportion of heterozygotes in microsatellite DNA loci of wild clonal silver crucian carp, *Carassius langsdorfii*. Zool. Sci., 16: 909-913.
- 小野里坦, 1983. クローンブナの話. 淡水魚, 9: 33-41.
- 小野里坦・鳥澤 雅・草間政幸, 1983. 北海道に於ける倍数体フナの分布. 魚類学雑誌, 30: 184-190.
- SPRUELL, P., CUMMINGS, S.A., KIM, Y. and THORGAARD, G.H., 1994. Comparison of three anadromous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations using DNA fingerprinting and mixed DNA samples. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 51(Suppl. 1): 252-257.
- TAKAI, A. and OJIMA, Y., 1983. Tetraploidy appeared in offspring of triploid ginbuna *Carassius langsdorfii*. Proc. Japan Acad., 59B, 347-350. 谷口順彦, 1982. 西日本のフナ属魚類—オオキンブナをめぐる—. 淡水魚, 8: 59-68.
- TANIGUCHI, N. and SAKATA, K., 1977. Interspecific and intraspecific variations of muscle protein in the Japanese crucian carp - II. Jpn. J. Ichthyol., 24: 1-11.
- UMINO, T., SAKAE, K., MORISHIMA, K., ARAI, K. AND NAKAGAWA, H., 1996. Influences of the first-feeding delay on subsequent growth and viability of clonal crucian carp, *Carassius langsdorfii*. J. Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ., 35: 125-138.

- UMINO, T., ARAI, K., MAEDA, K., ZHANG, Q., SAKAE, K., NIWASE, I., and NAKAGAWA, H., 1997a. Natural clones detected by multilocus DNA fingerprinting in gynogenetic triploid ginbuna *Carassius langsdorffii* in Kurose River, Hiroshima. *Fisheries Sci.*, **63** : 147-148.
- UMINO, T., ARAI, K. and NAKAGAWA, H., 1997b. Growth performance in clonal crucian carp, *Carassius langsdorffii*. Effect of genetic difference and feeding history. *Aquaculture*, **155** : 271-283.
- WETTON, J.H., CARTER, R.E., PARKIN, D.T. and WALTERS, D. 1990. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, **327** : 147-149.
- YAMASHITA, M., ONOZATO, H., NAKANISHI, T., and NAGAHAMA, Y., 1990. Breakdown of the sperm nuclear envelope is a prerequisite for male pronucleus formation: direct evidence from the gynogenetic crucian carp *Carassius auratus langsdorffii*. *Develop. Biol.*, **137** : 155-160.
- YAMASHITA, M., JIANG, J., ONOZATO, H., NAKANISHI, T. and NAGAHAMA, Y., 1993. A tripolar spindle formed at meiosis I assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp, Ginbuna *Carassius auratus langsdorffii*. *Develop. Growth, Differ.*, **35** : 631-636.
- ZHANG, F., OSHIRO, T. and TAKASHIMA, F., 1992. Chromosome synapsis and recombination during meiotic division in gynogenetic triploid Ginbuna, *Carassius auratus langsdorffii*. *Jpn. J. Ichthyol.*, **39** : 151-155.

## Identification and Distribution of Gynogenetic Triploid Clones in Ginbuna *Carassius langsdorfii* collected from Hiroshima and Yamaguchi Prefectures

Katsuaki MAEDA, Tetsuya UMINO, Kagayaki MORISHIMA\*, Hirotaka MAEMURA  
Quanqi ZHANG\*\*, Katsutoshi ARAI\* and Heisuke NAKAGAWA

*Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,  
Kagamiyama, Higashi-hiroshima, 739-8528, Japan*

Triploid ginbuna is a unisexual species and reproduces gynogenetically as well as clonally. A total of 312 crucian carp were collected from Ohta River, Kurose R., Nuta R., Hakuryu Lake, and Ashida R. in Hiroshima Prefecture and Nishiki R. in Yamaguchi Prefecture. Ploidy status of these samples was determined by DNA content flow-cytometry and/or erythrocytes measurements and all-female triploid ginbuna were detected in frequencies between 36 and 100%. Multilocus DNA fingerprinting identified 16 clonal lines based on the genetic identity between at least two samples. An individual specific DNA fingerprints was detected in 56 samples, suggesting the presence of independent 56 and more clonal lines in the localities. Among 16 lines, six lines were commonly found in two or three localities, while the other 10 lines were specific to each locality. Predominant clonal line was different among the localities and it was also different among year classes even in the samples from the same locality.

**Key words:** ginbuna, gynogenesis, triploid, clone, DNA fingerprints

---

\* Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, 041-8611, Japan

\*\*Ocean University of Qingdao, Marine Life Science College, Qingdao, 266003, China