

寄生虫および遺伝学的手法による長崎周辺4海域産シログチの系群判別

山口 敦子, 久米 元^{*1}, 藤崎 靖志^{*2}, 樋口 貴彦^{*3}, 長富 潔, 原 研治Parasitic and genetic stock identification of white croaker, *Pennahia argentata*, in four coastal areas of Nagasaki Prefecture, Japan.Atsuko YAMAGUCHI, Gen KUME^{*1}, Yasushi FUJISAKI^{*2}, Takahiko HIGUCHI^{*3}, Kiyoshi OSATOMI, and Kenji HARA

The previous studies on life history of white croaker, *Pennahia argentata*, suggested that three stocks, comprising of Ariake Bay-Tachibana Bay, the Goto Sea and Omura Bay, may exist in the coastal areas of Nagasaki Prefecture, Japan. In this study, prevalence and abundance of a parasite species (Cestoda) and mitochondrial DNA (mtDNA) variation were used to confirm the stock structure of *P. argentata* in these areas. Based on prevalence and abundance of Cestoda, study areas were grouped into three: Ariake Bay-Tachibana Bay, the Goto Sea and Omura Bay. Two regions of mtDNA (16SrRNA and D-loop) were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses were used for the genetic stock study. Of the ten restriction enzymes assayed for 16SrRNA, only three showed multiple restriction patterns with low variation. On the other hand, of the three restriction enzymes assayed for D-loop, all showed two-three multiple restriction patterns and nine haplotypes were determined. Haplotype diversity for each population varied from 0.484 to 0.698. The genetic distances divided four localities into two groups (Ariake Bay-Tachibana Bay and Omura Bay-the Goto Sea). It is needed to further examine the population of the Goto Sea whose sample size was small compared to other localities. The present results supported the previously estimated stock structure of *P. argentata* in the coastal areas of Nagasaki Prefecture estimated based on life history studies.

Key Words: シログチ *Pennahia argentata*, 系群識別 stock discrimination, 寄生虫 parasite, ミトコンドリアDNA mitochondrial DNA, 長崎 Nagasaki

ニベ科シログチ属に属するシログチ (*Pennahia argentata*) は、東シナ海、インド洋、太平洋の温帯域に分布し、日本では北海道を除いた各地の沿岸に生息する¹⁾。シログチは全国的に漁獲量が多く、練り製品の材料や鮮魚として利用されており、重要な底魚資源となっている。有明海を含む長崎県周辺海域においても小型底曳網や刺網等の重要な漁獲対象種であるが、近年その漁獲量は大幅に減少している^{2,3)}。シログチの持続的な利用を可能とするため、本海域における適正な水産資源管理の実施が望まれる。

海産魚類を対象とした水産資源管理は、各繁殖集団を基礎とした系群単位で実施するため、対象種の系群構造に関する正しい理解が必要となる⁴⁾。長崎大学水産学部海洋動物学研究室では、長崎県周辺海域におけるシログチの系群構造を明らかにするため、その生活史特性を指標として調査を行ってきた。その結果、シログチは卵・仔魚期に相当する浮遊期を有し、成魚は高い遊泳力を持つにもかかわらず、この極めて

隣接した海域内に少なくとも有明海・橘湾・五島灘・大村湾の3系群が存在している可能性が示された²⁾。推定された系群間で、成長速度、最高年齢等には極めて大きな違いが検出されている。

海産魚類の系群構造識別に際し、これまでに様々な指標が用いられているが、系群構造をより正確に理解するためにはこれらの複数の指標を組み合わせることが有効である⁴⁾。生活史特性等に加えて、寄生虫とミトコンドリアDNA (mtDNA) は系群識別を行う際の有効なツールとなり得る⁵⁻¹⁶⁾。そこで、本研究では寄生虫の寄生数および寄生率と、mtDNAの16SrRNAおよびD-loop領域を対象としたPCR-RFLP分析結果をもとに、生活史特性から推定した長崎県周辺海域におけるシログチの系群構造について更なる検討を加えることを目的とした。

*1 ランドケアリサーチ

*2 丸大食品株式会社

*3 角上魚類株式会社

実験方法

1. 寄生虫の寄生率および寄生数

2001年9月から2002年7月に、有明海、大村湾、橘湾、五島灘で漁獲されたシログチ ($n=370$) を長崎魚市等で購入した。採集海域をFig. 1に示した。購入したシログチの全長を計測し、解剖後、生殖腺の形状をもとに性別の判定を行った。その後、肝臓における寄生虫の寄生の有無および寄生数を記録し、海域ごとに寄生率と平均寄生数を算出した。寄生率についてはカイ二乗検定により、寄生数については一元配置分散分析によりそれぞれ海域間で比較を行った。

2. mtDNAの16SrRNAおよびD-loop領域のPCR-RFLP分析

2003年4月から2003年9月に、先述した海域で漁獲されたシログチ ($n=156$) を長崎魚市等で購入した。購入した氷蔵、または冷凍状態のシログチの第一背鰭付近より筋肉を採取し、分析用の試料とした。試料からの粗全DNAの抽出は、DNA抽出キットQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社製) を用いて行った。

まず、RFLP法に用いるmtDNAの2遺伝子領域(16SrRNAとD-loop)を増幅させるのに必要なプライマーの設計を行った。16SrRNA領域については、既知の塩基配列データをもとに、新しいプライマーWC16Sr-L1と

WC16Sr-H1を設計した(Table 1)。また、D-loop領域に関しては、コイ、キンギョ、ドジョウ、タラ、ニジマス、サケ、イワナ、ブラックトラウトのtRNA-Thr領域と12SrRNA領域の塩基配列データを参考にして設計したプライマーDLP-L1(tRNA-Thr領域)とDLP-H1(12SrRNA領域)を用いた(Table 1)。

次いで、有明海、大村湾のシログチ各1個体について、D-loop領域の塩基配列(884bp)をサイクルシークエンス法により決定した後、両個体の塩基配列を比較した。制限サイトで塩基置換が起きていたのは、*Hinf*、*Ssp* および *EcoR* の認識配列を有する3箇所のみであったため、この3種の制限酵素を用いて切断多型の検出を試みることにした。また、決定したD-loop領域の長さは884bpとRFLPを行うには長すぎたため、前半をD1(490bp)、後半をD2(372bp)とし2領域に分けて、新たな4プライマー、即ちL鎖側; WCDLP-SP1, WCDLP-L2, H鎖側; WCDLP-AP1, WCDLP-AP2(Table 1)を設計した。このようにして設計したプライマーを用いて、目的とするDNA領域の増幅を行った。PCRは反応液50 μ L; 95 $^{\circ}$ C 10分のプレヒートの後、94 $^{\circ}$ C 1分, 55 $^{\circ}$ C 1分, 72 $^{\circ}$ C 1分を35サイクル、伸長反応72 $^{\circ}$ C 7分を1サイクルのプログラミング温度制御によりを行った。

16SrRNAのPCR産物に対しては *Alu*、*Hae*、*Hha*、*Mse*、*Msp*、*Sac*、*Sau*3A、*Sau*96、*Scr*F、*Taq* の10種の制限酵素で、D-loopのPCR産物に対しては

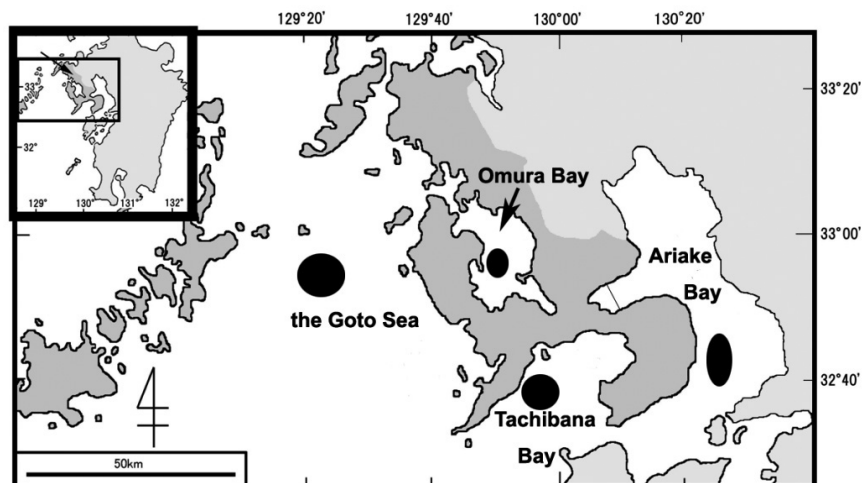


Fig. 1. The four localities where samples of *Pennahia argentata* were collected. The circles denote fishing areas: (a) Ariake Bay, (b) Tachibana Bay, (c) Omura Bay, (d) the Sea of Goto.

Table 1. Nucleotide sequences of primers for PCR amplification

Region	Primers	Primer sequences (5'–3')
16SrRNA	WC16Sr-L1	L: 5'–CAA CAA ATA AGA GGT CCT GCC TG–3'
	WC16Sr-H1	H: 5'–CAA ACG AAC CCT TAA TAG CGG–3'
D-loop	WCDLP-SP1	L: 5'–CCA CCA CTA GCC CCC AAA GC–3'
	WCDLP-AP1	H: 5'–CCC GCT TAT GTA TTA CCA CC–3'
	WCDLP-L2	L: 5'–TTC TTT CTA GAG GGT CAC TGG–3'
	WCDLP-AP2	H: 5'–TAA GCT ACG TTA GCA TGC GC–3'

先述した *Hinf* , *Ssp* , *EcoR* の3種の制限酵素で処理し, 1.2%アガロースゲル (FMC社製) 電気泳動によってRFLPの検出を行った。各制限酵素の切断型からハプロタイプを求め, ハプロタイプ間の塩基置換率, ハプロタイプ多様度 (π), 塩基多様度 (h), 塩基置換数 (d_x), 遺伝距離 (d) を算出した¹⁸⁾。

結 果

1. 寄生虫の寄生率および寄生数

肝臓には条虫 (幼生) の寄生が確認された (Fig. 2)。条虫の寄生率および寄生数について, 雌雄別および海域別にまとめた (Table 2)。有明海と橘湾では雌雄ともに条虫の寄生率が最も高く, 両海域ともに雌雄間で有意差は認められなかった。大村湾と五島灘の両海域では雄よりも雌で寄生率はやや高い傾向がみられたものの, 雌雄間で有意差はみとめられなかった。そこで, 雌雄をまとめてカイ二乗検定により海域間で寄生率の比較を行ったところ, 有明海と橘湾の間に有意差はみとめられなかった。一方で有明海と五島灘, 大村湾, 橘湾と五島灘, 大村湾, 五島灘と大村湾の間にはそれぞれ有意差が検出された (Table 3)。次に, 寄生数について海域ごとに雌雄間で比較を行ったところ, 大村湾のみで有意差がみとめられた (*t*-test, $P < 0.001$)。ただし, 他の海域では全

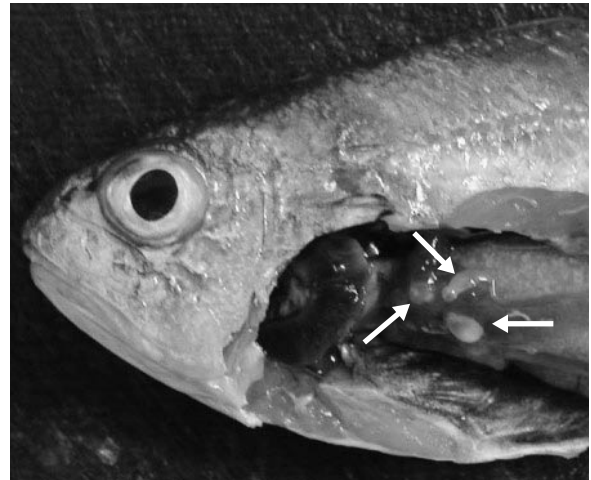


Fig. 2. Cestoda on the liver of *Pennahia argentata* from Ariake Bay. Arrows indicate parasites on the liver.

て有意差はみとめられなかったため, 雌雄まとめて海域間での比較を行った。その結果, 寄生数には海域間で有意差がみとめられた (one-way ANOVA, $P < 0.001$)。海域ごとに比較を行ったところ, 寄生率の結果と同様, 有明海と橘湾の間に有意差はみとめられず, この両海域と大村湾, 五島灘の間には全て有意差が検出された (Table 4)。以上の結果が

Table 2. Prevalence (%) and mean abundance of Cestoda on *Pennahia argentata*

Site	Sex	Sample size	Size range of fish(mm)	Prevalence (%)	Mean abundance
Ariake Bay	Male	72	137-218	95.83	10.35
Ariake Bay	Female	49	150-270	97.96	11.67
Tachibana Bay	Male	50	194-291	98.00	11.60
Tachibana Bay	Female	57	200-313	98.25	12.33
the Goto Sea	Male	13	236-408	69.23	4.69
the Goto Sea	Female	24	254-407	83.33	4.83
Omura Bay	Male	29	195-318	28.95	0.34
Omura Bay	Female	76	195-346	41.38	1.07

Table 3. Results of the chi-squared test of a Cestoda species prevalence between sampling sites

Site	Tachibana Bay	the Goto Sea	Omura Bay
Ariake Bay	ns	***	***
Tachibana Bay		***	***
the Goto Sea			***

Table 4. Results of the Tukey-Kramer test of a Cestoda species abundance between sampling sites

Site	Tachibana Bay	the Goto Sea	Omura Bay
Ariake Bay	ns	***	***
Tachibana Bay		***	***
the Goto Sea			*

ら, 条虫の寄生率と寄生数をもとに, 4 海域は有明海 - 橘湾, 五島灘, 大村湾の 3 グループに分類できることが分かった。

2. mtDNA の 16SrRNA および D-loop 領域の PCR-RFLP 分析

16SrRNA 領域の PCR 産物を 10 種の制限酵素でそれぞれ酵素消化したところ, *Hae* , *Sau* 96 , *Mse* の制限酵素でのみ切断多型が検出された (Fig. 3)。ただし, *Hae* と *Sau* 96 では大村湾の同一の 1 個体のみが異なる切断多型を示したにすぎなかった (Table 5)。一方, D-loop 領域では, 用いた 3 種の制限酵素のうち, *Hinf* では 3 つの切断多型 (A, B, C) が, *Ssp* と *Eco*R ではそれぞれ二つの切断多型 (A, B) が検出された (Fig. 4)。それぞれの多型が各海

域で占める割合を Table 6 に示した。*Hinf* については, 有明海と橘湾で A の切断多型が 90%, 五島灘では A の切断多型のみ, 大村湾では A の切断多型が 84% と, どの海域でも 80% 以上を A の切断多型が占めた。*Ssp* では, A の切断多型が有明海で 48%, 橘湾で 52% 出現したのに対し, 五島灘と大村湾では 70% 近くを占めた。*Eco*R については A の切断多型が有明海で 38% と少なかったのに対し, 五島灘では 67%, 大村湾では 68% と, この 2 海域では比較的多かった。一方で, 橘湾では A と B の切断多型の出現頻度はともに 50% であった。以上の 3 種類 (*Hinf* , *Ssp* , *Eco*R) の制限酵素による多型の組み合わせから各個体を 9 種のプロタイプに分類することができた (Table 7)。1 型または 2 型のプロタイプを持つものが何れの海域でも多く, 1 型のプロタイプを

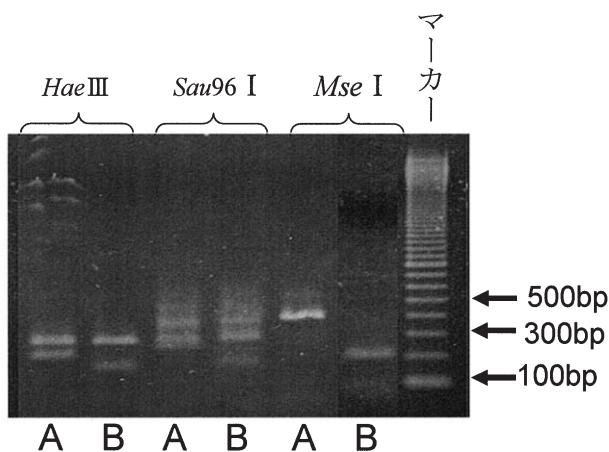


Fig. 3. Restriction profile of the mitochondrial DNA 16SrRNA region of *Pennahia argentata* digested by *Hae* , *Sau* 96 and *Mse* . The two haplotypes observed in each digestion are labeled alphabetically (A-B). M is a DNA ladder and sizes are indicated along the right margin.

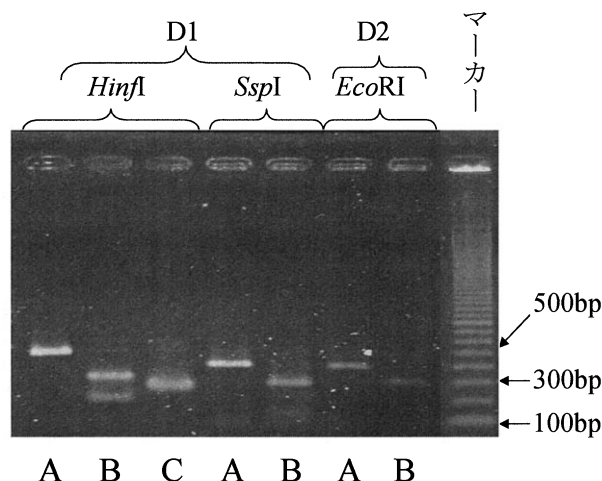


Fig. 4. Restriction profile of the mitochondrial DNA 16SrRNA region of *Pennahia argentata* digested by *Hinf* , *Ssp* and *Eco*R . The two-three haplotypes observed in each digestion are labeled alphabetically (A-C). M is a DNA ladder and sizes are indicated along the right margin.

Table 5. Frequencies of the restriction patterns from the mitochondrial DNA 16SrRNA region for *Pennahia argentata*

Restriction enzyme	Locality							
	Ariake Bay		Tachibana Bay		the Goto Sea		Omura Bay	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Hae</i> III	50 (100%)	0 (0%)	50 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	49 (98%)	1 (2%)
<i>Sau</i> 96I	50 (100%)	0 (0%)	50 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	49 (98%)	1 (2%)
<i>Mse</i> I	41 (82%)	9 (18%)	47 (94%)	3 (6%)	6 (100%)	0 (0%)	48 (96%)	2 (4%)

Table 6. Frequencies of the restriction patterns from the mitochondrial DNA D-loop region of *Pennahia argentata*

Restriction enzyme	Locality											
	Ariake Bay			Tachibana Bay			the Goto Sea			Omura Bay		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>Hinf</i> I	45 (90%)	2 (4%)	3 (6%)	45 (90%)	1 (2%)	4 (8%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	42 (84%)	1 (2%)	7 (14%)
<i>Ssp</i> I	24 (48%)	26 (52%)		26 (52%)	24 (48%)		4 (67%)	2 (33%)		34 (68%)	16 (32%)	
<i>Eco</i> R I	19 (38%)	31 (62%)		25 (50%)	25 (50%)		4 (67%)	2 (33%)		34 (68%)	16 (32%)	

Table 7. Distribution of haplotypes of the mitochondrial DNA D-loop region among the four localities of *Pennahia argentata*

	Haplotype	Arake Bay	Tachibana Bay	the Goto Sea	Omura Bay
1	AAA	18 (36%)	24 (48%)	4 (67%)	28 (56%)
2	ABB	20 (40%)	18 (36%)	2 (33%)	11 (22%)
3	AAB	6 (12%)	2 (4%)		2 (4%)
4	CBB	3 (6%)	4 (8%)		1 (2%)
5	BBB	2 (4%)	1 (2%)		1 (2%)
6	ABA	1 (2%)	1 (2%)		1 (2%)
7	CAA				3 (6%)
8	CBA				2 (4%)
9	CAB				1 (2%)
	Total	50 (100%)	50 (100%)	6 (100%)	50 (100%)

Table 8. Haplotypic diversity (h), nucleotide diversity (π), and nucleotide divergence (d_x) within populations of *Pennahia argentata*

	Ariake Bay	Tachibana Bay	the Goto Sea	Omura Bay
h	0.6974	0.6376	0.4848	0.6360
π	0.0316	0.0345	0.0274	0.0321
d_x	0.0342	0.0378	0.0299	0.0352

Table 9. Nucleotide divergence (d) between populations of *Pennahia argentata*

Site	Tachibana Bay	the Goto Sea	Omura Bay
Ariake Bay	0.0729	0.0724	0.0788
Tachibana Bay		0.0715	0.0763
the Goto Sea			0.0654

持つものは有明海 (36%), 橘湾 (48%), 大村湾 (56%), 五島灘 (66.7%) の順に多く, 逆に 2 型のハプロタイプを持つものは大村湾で最も少なく (22%), 有明海で最も多かった (40%)。また, 3 型 ~ 9 型のハプロタイプを有する個体は少なかった。特に, 3 種のハプロタイプ (7 ~ 9) については, 大村湾のシログチでのみで見られた。

各ハプロタイプ間の塩基置換率は 2.74% ~ 18.27% であった。各集団内の遺伝的多様性を表すハプロタイプ多様度 (h) は 0.4848 ~ 0.6974, 塩基多様度 (π) は 0.0274 ~ 0.0321 であった (Table 8)。また, 各集団内の塩基置換数 (d_x) は有明海で 0.0342, 橘湾で 0.0378, 五島灘で 0.0299, 大村湾で 0.0352 であった。集団間の塩基置換数を Table 9 に示した。集団間の塩基置換数が最も小さかったのは五島灘と大村湾の間で, 最も大きかったのは地理的にも距離が離れている有明海と大村湾の間であった。

遺伝距離 (d) は五島灘と大村湾の間で 0.0164 と最も近く, 次いで有明海と橘湾の間で 0.0184 であった。生活史特性を基に別系群とみなされている有明海と大村湾の間の遺伝距離は 0.0202 であった。

考 察

本研究ではシログチの系群判別に糸虫を指標として使用したが, 寄生率と寄生数をもとに対象とした 4 海域を, 有明海 - 橘湾・大村湾・五島灘の 3 グループに明確に分類することができた。糸虫の寄生率と寄生数に基づく今回の研究結果は, 生活史特性をもとに推定した長崎県周辺海域におけるシログチの系群構造を支持しており, シログチの系群判別に糸虫の使用が極めて有効であることを示している。

今回, mtDNA の 16SrRNA 領域を対象として, PCR-RFLP 法により多型の検出を試みたが, 海域間でほとんど差が見られなかった。したがって, シログチの 16SrRNA 領域は種内変異が小さく, 種として保存されている領域であり¹⁷⁾, 系群判別には適当ではないと考えられた。これに対し, D-loop 領域における切断多型の出現率は高く, 3 種の制限酵素で 9 種のハプロタイプに分類することができ, D-loop 領域はシログチの系群判別を行う際の有効なマーカーであると考えられた。先行の研究でも同様の例が報告されており, マダイを対象とした研究では, 5 種類の制限酵素による切断多型の組合せから, D-loop 領域において 27 種類の切断多型が検出されている¹⁸⁾。本研究で算出された遺伝的距離の値から

は、有明海と橘湾のシログチが同一系群であり、大村湾は有明海 - 橘湾とは異なる系群である可能性が示された。五島灘は大村湾との間で最も遺伝的距離が小さかったが、五島灘のサンプル数は6個体と他海域に比べて圧倒的に少なかった。標本中のハプロタイプ数はDNAの配列数と標本数に依存する¹⁹⁾。そのため、他海域に比べてハプロタイプ数が少なかった五島灘についてはデータの信頼性が低いことから、他海域との系群構造をより正しく理解するため、サンプル数を増やしてさらに検討する必要がある。以上の結果から、寄生虫の寄生パターン同様、mtDNAの遺伝的距離に基づく研究結果は、これまでに生活史特性をもとに推定された長崎県周辺海域におけるシログチの系群構造の結果と概ね合致していた。

海産魚類の系群構造を、より正確にかつ現実的に推定するためには、単一の指標ではなく、複数の指標を組み合わせて使用し、得られた結果をもとに総合的に判断する必要がある。以前、同海域で実施した生活史調査により、有明海 - 橘湾・大村湾・五島灘の間で成長速度や最高年齢には極めて大きな差異をみとめており、また、調査を実施した有明海 - 橘湾と大村湾の両海域間の雌の産卵頻度は明らかに異なっていた²⁾。詳細な調査を行った有明海 - 橘湾海域で産卵場は夏季に有明海の湾中央部から湾口部にかけて形成されること、また、流入河川の感潮域を含む有明海の湾奥部に成育場が形成されることが分かっている³⁾。今回、寄生虫とmtDNAを指標として長崎県周辺海域におけるシログチの系群構造について検討を行ったが、得られた結果は生活史特性から推定された結果と極めてよく一致しており、全ての指標から総合的に判断して、本海域には少なくとも有明海 - 橘湾・大村湾・五島灘の独立した3つの系群が存在することが強く示された。長崎県周辺海域におけるシログチの各繁殖集団の分離機構について理解するために、大村湾と五島灘の両海域における産卵場や成育場を特定するなど、より詳細な生態解明に向けた調査が急務である。

今後、減少傾向にある長崎県下のシログチを、漁業活動を通じて持続的に利用していくために、一連の研究により明らかとなった詳細な空間スケールに基づく系群構造に考慮した資源管理の実施が必要となる。また、卵・仔魚期に浮遊期をもち、成魚では高い遊泳力を有するシログチで、明らかな地理的障壁が存在せず、かつ極めて隣接した海域内にこのように独立した複数の繁殖集団が存在することは非常に興味深い。海産魚類を対象とした系群判別に関する従来の研究は多くが広大な空間スケールで実施されている⁵⁻¹⁴⁾。本研究で得られた結果は、本海域を含め海産魚類の系群構造について考慮する際に、より詳細な空間スケールでの視点が必要となる可能性を示唆するものである。

要 約

本研究に先立ち行った生活史調査の結果から、長崎県周辺海域に分布するシログチには有明海 - 橘湾・五島灘・大村湾の3系群が存在する可能性を示した。本研究では、寄生虫の寄生率と寄生数、mtDNAの16SrRNAとD-loopの2領域

を対象としたPCR-RFLP分析結果を基に、本海域におけるシログチの系群構造について更なる検討を行った。サンプルには、有明海、橘湾、五島灘、大村湾の4海域で採集したシログチを用いた。糸虫の1種を指標とし、その寄生率と平均寄生数に基づいて、4海域を有明海 - 橘湾・大村湾・五島灘間の3グループに分類することができた。mtDNAの16SrRNA領域のPCR産物を10種の制限酵素で消化した際、3種のみから切断多型が検出されたが、変異は少なかった。これに対し、D-loop領域のPCR産物を3種の制限酵素で消化したところ、全てで2~3の切断多型が見られ、9種のハプロタイプに分類された。各海域のハプロタイプ多様度は0.484~0.698であった。各海域間の純塩基置換数をもとに平均距離法によりデンドログラムを作成した結果、有明海 - 橘湾と大村湾 - 五島灘の2グループに分類された。五島灘は大村湾と同じクラスターに分類されたが、他の海域に比べサンプル数が極めて少なく、更なる検討が必要であることが分かった。以上の結果から判断して、今回の結果は、生活史特性をもとに推定した長崎県周辺海域におけるシログチの系群構造を支持するものであった。

謝 辞

標本採集の際に様々な便宜を図って頂きました島原漁業協同組合の吉田清之介氏に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) 山田梅芳: ニベ科. 中坊徹次 (編), 日本産魚類検索 全種の同定第二版. 東海大学出版会, 東京, 2000, 867-870.
- 2) A. Yamaguchi, G. Kume, T. Higuchi and T. Takita: *Environ. Biol. Fish.*, **71**, 179-188 (2004).
- 3) A. Yamaguchi, T. Todoroki and G. Kume: *Fisheries Res.*, **82**, 35-44 (1999).
- 4) G. A. Begg and J. R. Waldman: *Fisheries Res.*, **43**, 35-44 (1999).
- 5) S. Chow, H. Okamoto, N. Miyabe, K. Hiramatsu and N. Barut: *Mol. Ecol.*, **9**, 221-227 (2000).
- 6) S. Chow and H. Takeyama: *J. Fish Biol.*, **56**, 1087-1098 (2000).
- 7) R. Quinta, L. Gomes and A. T. dos Santos: *ICES J. Mar. Sci.*, **61**, 864-867 (2004).
- 8) N. H. Sardella and J. T. Timi: *J. Fish Biol.*, **65**, 1472-1488 (2004).
- 9) T. Yanagimoto: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **70**, 583-591 (2004).
- 10) T. Yanagimoto and K. Konishi: *Fisheries Sci.*, **70**, 336-338 (2004).
- 11) G. McClelland, J. Melendy, J. Osborne, D. Reid and S. Douglas: *J. Fish Biol.*, **66**, 1082-1100 (2005).
- 12) J. T. Timi, J. L. Luque and N. H. Sardella: *J. Fish Biol.*, **67**, 1603-1618 (2005).

- 13) R. E. Williams and R. J. G. Lester: *J. Fish Biol.*, **68**, 1707-1712 (2006).
- 14) N. Campbell, M. A. Cross, J. C. Chubb, C. O. Cunningham, E. M. C. Hatfield and K. MacKenzie: *J. Helminthol.*, **81**, 137-146 (2007).
- 15) T. G. Baker, S. Morand, C. A. Wenner, W. A. Roumillat and I. de Buron: *J. Helminthol.*, **81**, 155-167 (2007).
- 16) S. R. Tracy, A. Smolenski and J. M. Lyle: *Mar. Biol.*, **152**, 119-128 (2007).
- 17) 西田睦, 大河俊之, 磐田祐士: *水産育種*, **26**, 81-100 (1998).
- 18) 根井正利, 1990, 分子進化遺伝学 (五條堀孝・斉藤成也 訳), 初版, 培風館, 東京: pp58, 90, 155, 219, 223, 238, 252-253
- 19) 青木宙・隆島史夫・平野哲也, 1997, 魚類のDNA, 初版, (株)恒星社厚生閣, 東京: 132