RAPD 分析による琵琶湖産フナ属魚類の種・亜種判別 およびヨシ帯に出現するフナ仔稚魚の季節変化

鈴木 誉士,* 永野 元, 小林 徹, 上野 紘一

(2003 年 12 月 15 日受付, 2004 年 7 月 26 日受理)

近畿大学農学部水産学科

Seasonal changes in the number of larvae and juveniles of crucian carps in the
reed zone of Lake Biwa based on (sub) species identification using RAPD markers

TAKASHI SUZUKI,* HAJIME NAGANO, TORU KOBAYASHI AND KOUICHI UENO

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

We investigated species composition, distribution and seasonal changes in the number of larvae and juveniles of crucian carps in the reed zone of Lake Biwa using RAPD markers. A total of 973 larvae and juveniles were collected from the reed zone in a total of nine samplings conducted from April to July, 2002. In the first sampling, 868 larvae and juveniles, mainly preflexion larvae, were collected, and it was found that Gengorobuna and Ginbuna are distributed within the reed zone. However, Nigorobuna distributed between the center and close to the shore within the reed zone. After the first sampling, larvae and juveniles, mainly postflexion larvae, were collected close to the shore in the reed zone, and most of those were Nigorobuna.

キーワード：フナ属, 仔稚魚, 種・亜種判別, 琵琶湖, RAPD

琵琶湖にはニゴロブナ (*Carassius auratus grandoculis*), ゲンゴロウブナ (*C. cuvieri*) およびギンブナ (*C. a. langsdorfi*) が生息している。これらのフナはそれぞれ特徴的な形態を示しているが,¹⁻³⁾ 小型の個体, 特に仔魚や稚魚の段階では形態的に種・亜種を判別することが極めて困難である。⁴⁾ そのため, フナ仔稚魚を対象とした研究では, 単にフナ類やコイ・フナとして記録されることが多く,^{5,6)} 各フナの初期生活期に関する知見は少ない。

コイ・フナの産卵場所および初期生活期の生息場所として, 琵琶湖沿岸のヨシ帯の重要性が指摘されている。⁵⁻⁹⁾ ヨシ帯に出現するフナ仔稚魚に関してはいくつか報告されているが,^{6,7,10)} 種・亜種判別が困難であるために, 出現する仔稚魚の種組成やその季節変化, またヨシ帯内における各フナ仔稚魚の分布など不明な点が多い。琵琶湖のフナは水産資源として重要な位置を占めており, その資源管理を考える上でも各フナの初期生活期に関する知見は不可欠である。さらに, 近年水位調節による水位の低下がコイ・フナの初期生活期に影響を与え

ていることが指摘されている。^{6,9)} その影響を詳細に把握するためにも, ヨシ帯に出現するフナ仔稚魚の種・亜種判別は重要である。

形態から種判別することが困難である場合には遺伝学的手法を用いることが有効であり, ミトコンドリア DNA (mtDNA) を用いた種判別法がよく知られている。^{11,12)} 琵琶湖産フナの mtDNA を対象とした研究¹³⁾ では, ゲンゴロウブナに特異的なハプロタイプが認められること, ニゴロブナとギンブナはハプロタイプを共有することが明らかにされている。これらのことは, mtDNA を用いた手法では琵琶湖産フナ, 特にニゴロブナとギンブナの判別が困難であることを示唆しており, 琵琶湖産フナの種・亜種判別のためには他の分析手法を用いる必要がある。

全ゲノム DNA を対象とする Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 分析¹⁴⁾ は 10 塩基程度のプライマーを用いて PCR を行い, 遺伝的変異を検出する方法で, 多くの生物の種判別や地域集団の識別に用いられている。¹⁵⁻¹⁸⁾ さらにこの手法は微量の試料で分析が可能で

* Tel : 81-742-43-1511. Fax : 81-742-43-1316. Email : gf195071@nara.kindai.ac.jp

あり、かつ極めて簡便であることから、仔稚魚のように小型の個体を数多く分析するのに適しているものと思われる。

本研究では琵琶湖産フナ属魚類を対象に RAPD 分析を行い、各フナの種・亜種判別マーカーについて検討した。そして各フナ仔稚魚の初期生態に関する知見の集積を目的に、ヨシ帯に出現するフナ仔稚魚の種組成、季節変化およびヨシ帯内における各フナ仔稚魚の分布について調査した。

材料および方法

RAPD マーカーの検討 フナは琵琶湖の5地点（A～E）で採集した（Fig. 1）。また、仔魚期に類似した形態を示すコイ 10 個体も分析に加えた。採集したフナは形態的特徴および倍数性をもとに細谷³⁾に従い、3 種・亜種に分類した。

倍数性判定 魚体から血液を採取し、エタノールで固定した。DAPI 染色の後、Ploidy Analyzer を用いて DNA 量を測定した。コントロールはタモロコの血液を用い、その相対値から倍数性を判定した。

RAPD 分析 血液または体側筋から、フェノール・クロロホルム法によって DNA を抽出した。RAPD 分析のプライマーには OPERON 社のランダムプライマー OPA1 から 20 を用いた。PCR 反応のために、抽出した DNA 100 ng を鋳型として、プライマー 0.5 μ L, rTaq polymerase 0.25 μ L (TAKARA), 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, 10 $\times$ dNTP 2 μ L を加え、超純水で最終反応量 25 μ L に調整した。反応条件は 94 $^{\circ}$ C 1 分, 36 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 2 分を 45 サイクル行い、これに 72 $^{\circ}$ C 7 分の伸長反応を付加した。反応後、2%TBE アガロースゲルで約 2 時間 30 分電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色して DNA 断片を検出した。なお、RAPD 分析は再現性に関する問題が指摘されているため、1 個体につき最低 2 回分析を行い、バンドパターンに変化がないことを確認した。

仔稚魚の調査方法 調査地は琵琶湖最大の内湖である西の湖に広がるヨシ帯の 1 地点とした（Fig. 1）。ヨシ帯の広さは幅 84.5 m, 奥行き 34.4 m である（Fig. 2）。このなかに、10 m $\times$ 5 m の採集区間を沖側からほぼ等間隔に 4 区間（St. 1～4）設けた（Fig. 2）。採集期間は 2002 年 4 月 12 日から 7 月 31 日まで 2 週間ごとに計 9 回、各区間内でタモ網を用いて 5 分間の採集を行った。採集する時間帯は正午から 14 時の間とした。また、ヨシ帯の中心部において、水温と水深を採集日ごとに測定・記録した。

採集した仔稚魚は 70% エタノール溶液で固定・保存し、発育段階を記録した。発育段階は卵黄囊期仔魚、上屈前期仔魚、上屈期仔魚、上屈後期仔魚および稚魚とし

Fig. 1 Sampling locations of crucian carps and their larvae and juveniles in Lake Biwa. Solid circles with letters indicate sampling locations of adult crucian carps used for examination of RAPD markers. Triangle indicates sampling location of larvae and juveniles.

Fig. 2 Schematic of sampling sites (St. 1-4) within the reed zone.

た。¹⁹⁾ 各区間から無作為に 60 個体選び出し、DNA を抽出して RAPD 分析により種・亜種判別を行った。また、区間内の個体数がそれより少ない場合は全ての個体を分析に供した。

Table 1 Morphological traits of each crucian carp used for examination of RAPD markers

(sub-) Species	Location	N	Ploidy	SL	SL/BD	GR
<i>Carassius cuvieri</i>	A	12	2n	126.4 ± 20.8	2.36 ± 0.04	102.4 ± 5.68
	D	11	2n	306.8 ± 40.3	2.57 ± 0.11	103.6 ± 5.08
	E	8	2n	147.5 ± 43.1	2.62 ± 0.13	99.2 ± 1.3
<i>C. auratus grandoculis</i>	A	29	2n	141.9 ± 31.5	2.88 ± 0.16	62.4 ± 3.85
	B	13	2n	80.7 ± 11.8	2.88 ± 0.1	55.5 ± 1.56
	C	4	2n	141 ± 36.2	2.94 ± 0.19	62.25 ± 3.86
<i>C. a. langsdorfii</i>	A	30	3n	109.2 ± 18.4	2.41 ± 0.09	49 ± 4.19
	B	12	3n	87.1 ± 10.6	2.69 ± 0.11	44.2 ± 1.95
	C	11	3n	149.4 ± 46.7	2.58 ± 0.12	49.7 ± 2.79
	D	12	3n	201.8 ± 26.4	2.61 ± 0.12	49.6 ± 2.31
	E	2	3n	100.6 ± 12.1	2.56 ± 0.16	47.5 ± 0.71

SL, standard length; BD, body depth; GR, the number of gill rakers.

結 果

琵琶湖産フナ RAPD バンドパターン 採集したフナはニゴロブナ, ゲンゴロウブナおよびギンブナに分けられ (Table 1), 倍数性も前 2 者は 2 倍体, 後者は全て 3 倍体で形態による分類と倍数性はよく整合していた (Table 1)。

OPA1 から 20 のプライマーの内, OPA3, 13, 16, 17 を除くプライマーに増幅断片が得られた。そのなかで, OPA1, 2, 8, 15, 19 は比較的明瞭なバンドが得られた (Fig. 3)。OPA1 ではフナ 3 種類およびコイはそれぞれバンドパターンが異なっていた。ニゴロブナとギンブナのそれはよく似ていたが, ニゴロブナにおよそ 1300 bp, ギンブナにおよそ 440 bp にバンドが現れることで区別できた (Fig. 3A)。ゲンゴロウブナのそれは他の 2 種とは大きく異なり, 特に, およそ 1800, 1700 および 1000 bp のバンドが特異的であった (Fig. 3A)。コイは 300 bp 付近のバンドが特徴的であった (Fig. 3A)。OPA2 ではおよそ 2000 から 400 bp 付近にバンドが出現した (Fig. 3B)。ゲンゴロウブナは 1700 bp 付近に特異的なバンドがみられ, コイはおよそ 600 bp のバンドが特異的であった (Fig. 3B)。OPA15 はギンブナに特異的な断片がおよそ 2500 bp に認められ, コイで 1000 bp 付近にみられた (Fig. 3D)。OPA8 および 19 は個体間の変異が著しかった (Fig. 3C および 3E)。OPA19 ではゲンゴロウブナに特異的な断片がおよそ 3000 bp 付近に認められた (Fig. 3E)。これらの結果を踏まえて, ヨシ帯に出現する仔稚魚の種・亜種判別には OPA1 を用いた。

ヨシ帯内の水位変動 ヨシ帯の水深は大きく変動し, 調査を開始した 4 月 12 日では, St. 4 に水はなかったため, St. 3 が最も岸側の区間であった (Table 2)。4 月 24 日から水位が上昇し, St. 4 の区間まで水域が広がっ

Fig. 3 Electrophoretic patterns of RAPD in crucian carps and common carp in Lake Biwa. CAG: Nigorobuna; CCU: Gengoroubuna; CAL: Ginbuna; CC: Koi; A: OPA1; B: OPA2; C: OPA8; D: OPA15; E: OPA19. Arrows indicate specific band for each (sub) species.

たが, 5 月 8 日以降水位が急速に低下して 6 月 5 日および 19 日ではヨシ帯内の水域は完全になくなった

Table 2 Number and developmental stages (%) of larvae and juveniles collected from the reed zone

Date	D.W. (cm)	W.T. (°C)	Sampling site				Total	Developmental stage (%)				
			St. 1	St. 2	St. 3	St. 4		YOL	Pre-FL	FL	Pos-FL	JUV
1 2002.4.12	13.7	22	332	230	306	—	868	0	842 (97)	26 (2.9)	0	0
2 4.24	25	19	3	1	18	70	92	0	0	11 (12.5)	81 (87.5)	0
3 5.8	25	18.4	0	0	0	9	9	0	0	0	9 (100)	0
4 5.22	12	20.5	0	1	1	2	4	0	0	0	4 (100)	0
5 6.5	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 6.19	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7 7.3	17.5	27.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8 7.17	5	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9 7.31	20	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

D.W., depth of water; W.T., water temperature; YOL, yolk sac larva; Pre-FL, preflexion larva; FL, flexion larva; Pos-FL, postflexion larva; JUV, juvenile.

(Table 2)。その後、7月3日から再び水位は上昇した (Table 2)。

採集個体数および発育段階の変化 今回の採集によって計 973 個体の仔稚魚が採集された (Table 2)。これらの仔稚魚は全てコイまたはフナであり、他魚種の仔稚魚はみられなかった。採集個体数は 1 回目の 4 月 12 日が最も多く、868 個体が採集されたが、その後の採集では個体数が著しく減少した (Table 2)。また、7 月 3 日以降は水位が回復したものの、仔稚魚は全く採集されなかった (Table 2)。採集個体の発育段階は、4 月 12 日では上屈前期仔魚および上屈期仔魚の割合はそれぞれ 97.1% および 2.9% であったが、4 月 24 日では 12.5% および 87.5% となり、5 月 8 日以降は全て上屈後期仔魚であった (Table 2)。

ヨシ帯内における各フナ仔稚魚の分布および種組成の季節変化 RAPD 分析によって分析した全ての仔稚魚の種・亜種を判別することができた。4 月 12 日の採集では St. 1 から 3 全てに多くの個体がみられ、ヨシ帯全体にわたって広く分布していた (Table 2)。ニゴロブナ仔稚魚は St. 2 と 3 に見られたのに対し、ゲンゴロウブナおよびギンブナ仔稚魚は St. 1 においても多くの個体が見られた (Fig. 4)。また、コイ仔稚魚は採集期間中ほとんど出現しなかった (Fig. 4)。

4 月 24 日以降の仔稚魚は最も岸に近い St. 4 に集中的に分布していた (Table 2)。4 月 24 日に採集した仔稚魚の多くはニゴロブナであった (Fig. 4)。4 月 12 日の調査と比較すると、ニゴロブナ仔稚魚の割合が増加しているのに対し、ゲンゴロウブナおよびギンブナ仔稚魚の割合は減少しており (Fig. 4)、4 月 12 日および 24 日の種組成の差異は統計的にも有意であった ($df=3$, $\chi^2=45.7$, $p<0.01$)。

5 月 8 日および 22 日の調査における採集個体数は非常に少なく、それぞれ 9 および 4 個体であった (Table

Fig. 4 Seasonal changes in the number of larvae and juveniles of each (sub) species.

2)。その種組成は、5 月 8 日では St. 4 でニゴロブナ (6 個体) およびゲンゴロウブナ (3 個体) がそれぞれ採集された。5 月 22 日では St. 2 でギンブナ (1 個体)、St. 3 でゲンゴロウブナ (1 個体) およびニゴロブナ (1

個体), St. 4 でギンブナ (1 個体) がそれぞれ採集された (Fig. 4)。

考 察

RAPD 分析によって, 4 つのプライマーで各フナに特徴的なバンドパターンおよび特異的なバンドが観察された。これらのプライマーのうち, OPA1 を用いて仔魚を分析したところ, 全ての個体を判別することができた。RAPD 分析で小型の個体を対象とした場合, 体表などに付着している藻類やバクテリアなどのゲノムが増幅し, バンドパターンが変化する可能性が指摘されているが,²⁰⁾ 本研究では, そのような現象は認められなかった。また, RAPD 分析は反応液の組成やサーマルサイクラーの機種によってバンドパターンが変化することが指摘されている。²¹⁾ 異なる機種を使用する場合には改めて成魚のバンドパターンを確認しておくことが必要であろう。

仔魚の採集個体数は 4 月 12 日が最も多く, 868 個体が採集されたが, その後の採集では個体数が著しく減少した。また, その発育段階は, 4 月 12 日では上屈前仔魚および上屈仔魚の割合はそれぞれ 97.1% および 2.9% であったが, 4 月 24 日では 12.5% および 87.5% となり, それ以降は全て上屈後仔魚であった。これらのことから, 4 月 12 日以降はフナの産卵および仔魚の加入はないものと考えられる。山本・遊磨⁶⁾ および山本⁹⁾ は過去の報告⁷⁾ と比較して, 6 月以降の卵と仔魚の採集量が顕著に減少していることを報告し, さらに琵琶湖の水位変化のデータから水位調整による水位低下が 6 月以降のコイ・フナの産卵を抑制している可能性を指摘している。本調査地においても, 5 月下旬から 6 月にかけてヨシ帯内の水域は完全に干上がっており, この時期のフナの産卵場所や仔魚期の生息場所が大幅に減少していることが示唆された。

4 月 12 日の採集では, 仔魚は St. 1 から 3 全てに多くの個体がみられ, ヨシ帯全体にわたって広く分布していた。種・亜種判別の結果, ニゴロブナ仔魚は St. 2 と 3 に見られたのに対し, ゲンゴロウブナ仔魚とギンブナ仔魚は St. 1 においても多くの個体が見られた。ニゴロブナは岸近くの浮遊物, ゲンゴロウブナは岸から離れた浮遊物に産卵する傾向が認められており,⁵⁾ 発育初期の仔魚の分布は各フナの産卵場所を反映している可能性がある。孵化後間もない卵黄囊期仔魚や産み付けられた卵を直接分析することで, フナの産卵場所についてはより詳細な知見が得られるものと思われる。また, 4 月 12 日の調査で採集された仔魚のほとんどは上屈前期仔魚であり, 種・亜種間で発育段階に差異はなかった。ゲンゴロウブナとニゴロブナの産卵時期は若干ずれているといわれているが,⁵⁾ 本調査地ではあまり顕著な

差異はないように思われる。RAPD 分析による種・亜種判別に加え, 仔魚の日齢を調べることにより, 産卵時期に関してはさらに詳細な解析が可能になると思われる。この点は今後の課題としたい。

4 月 24 日以降の仔魚は最も岸に近い St. 4 に集中的に分布していた。フナ仔魚は水生植物帯のなかでも, 岸近くに多く見られることが知られている。^{6,9,10)} また, 人為的に放流したニゴロブナ仔魚はヨシ群落の最奥部に集まることが明らかにされている。⁸⁾ ヨシ群落内では仔魚の餌料として重要なミジンコ類やケンミジンコ類が最奥部に多い傾向が認められ,⁸⁾ 仔魚がヨシ群落の最奥部に集まる要因として, 餌料が豊富であることが挙げられている。⁸⁾ 4 月 24 日に採集した仔魚は 4 月 12 日の採集時よりも発育の進んだ上屈後期仔魚がほとんどを占めていた。これらのことは, フナ仔魚が成長と共に接岸していることを示している。また, その種組成をみるとニゴロブナ仔魚の占める割合が高い。4 月 12 日の種組成と比較すると, ニゴロブナ仔魚の割合が増加しているのに対し, ゲンゴロウブナおよびギンブナ仔魚の割合は減少している。4 月 12 日の採集以降, 新たな仔魚の加入はないことから, ゲンゴロウブナおよびギンブナ仔魚の多くがヨシ帯内から姿を消していることになる。これらのフナはヨシ帯からその周辺水域へ行動範囲を拡大しているものと推察される。一方, ニゴロブナ仔魚は 4 月 24 日の採集でも多くの個体が確認され, 最も岸側の St. 4 に集中して分布している。これらのことは, ニゴロブナ仔魚は岸近くの水域への依存度が高いこと, さらにそのような水域に他のフナよりも長く滞留する傾向があることを示唆している。琵琶湖の水位調節による水位低下がコイ・フナの初期生活の場を大幅に減少させていることが指摘されているが,^{6,9)} 琵琶湖のフナのなかでも, ニゴロブナの初期生活が水位低下の影響を最も受け易いのかもかもしれない。

フナの産卵は降雨後の増水のような環境変化と関連していることが認められ, 仔魚の個体数や出現時期も年によって若干変動することが知られている。⁵⁾ そのため, 本調査地においても, 仔魚の個体数や出現時期が年によって変動することが予想される。今後, 継続的に調査を行い, 年変動を把握することも重要であると思われる。また, 魚類の産卵場所や仔魚の成育場として, 水田や小溝などの一時的水域が重要視されている。²²⁾ 琵琶湖周辺の水田地帯もまたコイやフナなどが産卵のために侵入することが知られている。²³⁾ 琵琶湖産フナの資源管理を考える上で, このような水域に出現する仔魚の調査もまた重要であると思われる。

謝 辞

材料魚の採集に当たって, 近畿大学農学部中川雅博博

士にご助力を賜った。ここに記して感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 中村守純. 「日本のコイ科魚類」資源科学研究所, 東京, 1969; 278-282.
- 2) 谷口順彦. フナ属. 「日本の淡水魚」(川那部浩哉, 水野信彦, 細谷和海編) 山と溪谷社, 東京, 2001; 339-353.
- 3) 細谷和海. フナ属. 「日本産魚類検索第2版」(中坊徹次編) 東海大学出版会, 東京, 2000; 253-254.
- 4) 細谷和海. フナ. 「日本産稚魚図鑑」(沖山宗雄編) 東海大学出版会, 東京, 1988; 143-145.
- 5) 三浦泰蔵, 須永哲雄, 川那部浩哉, 牧 岩男, 東 幹夫, 田中 晋, 平井賢一, 成田哲也, 友田淑郎, 水野信彦, 名越 誠, 高松史朗, 白石芳一, 小野寺好之. 魚類. 「びわ湖生物資源調査団中間報告 (一般調査の部)」. 近畿地建, 1966; 711-906.
- 6) 山本敏哉, 遊鷹正秀. 琵琶湖におけるコイ科仔魚の初期生態-水位調節に翻弄された生息環境. 「淡水生物の保全生態学」(森 誠一編著) 信山社サイテック, 東京, 1999; 193-203.
- 7) 平井賢一. びわ湖内湾の水生植物帯における仔稚魚の生態 I 仔稚魚の生息場所について. 金沢大学教育学部紀要自然科学編 1970; **19**: 93-105.
- 8) 藤原公一, 白杵崇弘, 小林 徹, 水谷英志. 琵琶湖の固有種ニゴロブナ *Carassius auratus grandoculis* を育む場としてのヨシ等植物群落の重要性. 環境システム研究 1995; **23**: 414-419.
- 9) 山本敏哉. 水位調整がコイ科魚類に及ぼす影響. 遺伝 2002; **56**(6): 42-46.
- 10) 平井賢一. びわ湖内湾の水生植物帯における仔稚魚の生態 III ニゴロブナ仔稚魚の食性と生息域の関係. 日本生態学会誌 1972; **22**(2): 69-93.
- 11) 瀬崎啓次郎, 久保島康子, 三谷 勇, 福井 篤, 渡部終五. ミトコンドリア・シトクローム b 遺伝子によるマサバおよびゴマサバの種判別とホルマリン固定浮遊卵同定への応用. 日本誌 2001; **67**: 17-22.
- 12) 長富 潔, 濃添多恵子, 常本和伸, 原 研治, 市ノ木 健, 田北 徹, 石原 忠. PCR-RFLP 分析によるマゴチとヨシノゴチの種判別. 日本誌 2001; **67**: 503-504.
- 13) Murakami M, Matsuba C, Fujitani H. The maternal origins of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing. *Genes Genet. Syst.* 2001; **76**: 25-32.
- 14) Williams JKG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalsky JA, Tyngey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990; **18**: 6531-6535.
- 15) Bardacki F, Skibinski DOF. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 1994; **73**: 117-123.
- 16) Gonzales BJ, Taniguchi N, Seki S. Genetic markers for twelve species, five genera of dragonets (Gobiesociformes: Callionymidae) revealed through random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Fish. Genetics Breed. Sci.* 1996; **23**: 75-83.
- 17) Caccone A, Allegrucci G, Fortunato C, Sbordoni V. Genetic differentiation within the European sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays. *J. Hered.* 1997; **88**: 316-324.
- 18) Callejas C, Ochando MD. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *J. Fish. Biol.* 1998; **53**: 208-215.
- 19) Kendall Jr AW, Ahlstrom EH, Moser HG. Early life history stages of fishes and their characters. In: Moser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall Jr AW and Richardson SL (eds) *Ontogeny and Systematics of Fishes* Spec. Publ. No. 1, Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. 1984; 11-22.
- 20) Garcia DK, Benzie JAH. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture* 1995; **130**: 137-144.
- 21) 廣野育生. 遺伝子解析法. 「魚類のDNA」(青木 宙, 隆島史夫, 平野哲也編) 恒星社厚生閣, 東京, 1997; 18-31.
- 22) 齊藤憲治, 片野 修, 小泉顕雄. 淡水魚の水田周辺における一時的水域への侵入と産卵. 日本生態学会誌 1988; **38**: 35-47.
- 23) 前畑正善. 魚類. 「滋賀の田園の生き物」(滋賀自然環境研究会編) サンライズ出版, 滋賀, 2001; 116-128.