mtDNA 分析により評価した利根川流域における ハクレン集団の遺伝的多様性

片町太輔,^{1a*} 池田 実,¹ 董 仕,² 谷口順彦^{1b}

(2010 年 3 月 10 日受付, 2010 年 10 月 6 日受理)

¹東北大学大学院農学研究科, ²天津師範大学化学と生命科学学院

Genetic variability of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* population
introduced into the Tone River basin, Japan assessed by mtDNA analysis

DAISUKE KATAMACHI,^{1a*} MINORU IKEDA,¹
SHI DONG² AND NOBUHIKO TANIGUCHI^{1b}

¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan, ²Department of
Biology, Tianjin Normal University, Hexi, Tianjin 300074, China

To evaluate the genetic variability of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* population in the Tone River (Japan), which was introduced from the Yangtze River (China), the first half of the mtDNA control region was sequenced for 56 individuals including the adults, eggs and larvae. The results showed that the number of haplotypes (A) was 26, haplotype diversity (h) was 0.920, and nucleotide diversity (π) was 0.011. Phylogenetic relationships among haplotypes showed that the Tone River population possesses closely related haplotypes that were also detected in populations of the middle and lower Yangtze (published data), suggesting that the Tone River population originated from the middle and lower Yangtze. The high genetic variability, which is almost equivalent to that of wild populations, suggests that the Tone River population has been maintained by a considerable effective number of population (N_e) since being introduced.

キーワード : mtDNA, 遺伝的多様性, 導入種, ハクレン

近年の交通手段の発達や経済のグローバル化に伴って外来種が侵入し、在来の生態系や人間社会に大きな影響を及ぼしていることが問題視されるようになった。外来種が定着に成功した場合には、新たな病原体の蔓延、餌やニッチを巡る在来種との競合、交雑や遺伝子浸透を通じた在来種の遺伝的攪乱をもたらす、在来の生態系に大きな影響を与える場合がある。¹⁾ 日本の水圏生物においても、意図的あるいは非意図的に導入された外来種が在来の生態系に対して侵略的役割を果たしていることが数多く報告されている（例えば、高橋,²⁾ Kawamura *et al.*,³⁾ 大越⁴⁾）。

DNA マーカーを用いた外来種の集団遺伝学的あるいは分子系統学的解析は、外来種の起源や侵入経路を検討

する上で大きな貢献を果たしてきた。⁵⁾ また、外来種が定着までに経験した集団サイズの変遷を、適切な DNA マーカーと集団遺伝学的な解析によって定量的に検討することも可能で、生物集団が新しい環境に進出した際にどのようなプロセスを経て定着に至るかという進化生物学的な問題に対して有益な示唆をもたらす場合もある。⁶⁾ さらに、外来種が侵略種となっている場合、DNA 分析から得られた外来集団の遺伝的変異性や集団構造に関するデータが、分布拡大を防ぐための方策や駆除の効果を検討するための基礎的知見となる。⁷⁾

外来種の遺伝的特徴としては、原産地から持ち込まれた際の少ない個体数によってもたらされる創始者効果や、その後の親魚数の機会的変動、さらに定着過程にお

* Tel : 81-0829-55-3593. Fax : 81-0829-54-1216. Email : kata79@fra.affrc.go.jp

^a 現所属 : 鮎水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Fisheries Research Agency, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan)

^b 現所属 : 福山大学生命工学部附属内海生物資源研究所 (Research Institute of Marine Bioresources, Faculty of Life Science and Biotechnology, Fukuyama University, Onomichi, Hiroshima 722-2101, Japan)

ける自然選択によって、遺伝的多様性が低下していると考えるのが一般的である。⁸⁾ 一方、異なった地域からの複数回の導入あるいは侵入が起きている場合には、外来種集団の遺伝的多様性が起源となった個々の集団に比べて高いことが予測されるが、実際にそのようになっている例も少なくない。⁹⁻¹¹⁾

ハクレン *Hypophthalmichthys molitrix* は中国北部からベトナム北部までのユーラシア大陸東部を分布域とし、大河川に生息するコイ科の大型淡水魚である。¹²⁾ 成魚の全長は約 1 m に達し、中国においては古くから重要な水産増養殖の対象となっている。また、種苗が長時間の移動に耐えることから、中国国内のみならず、世界各地の河川や湖沼に移殖導入がなされている。本種の受精卵は河川を流下しながら約 48 時間で孵化するため、¹³⁾ 流下卵が短時間で海域に到達するような流程の短い河川や閉ざされた湖沼内では再生産ができない。流程の短い河川の多い日本では利根川流域でのみ自然繁殖が確認され、同じく中国から移殖されたソウギョ *Ctenopharyngodon idella*、コクレン *Hypophthalmichthys nobilis*、アオウオ *Mylopharyngodon piceus* とともに定着に成功している。¹³⁻¹⁵⁾

利根川流域におけるハクレン成魚の主な生息場所は霞ヶ浦、北浦、利根川下流域である。毎年 6 月から 7 月の産卵期になると利根川本流を成魚が遡上し、河口から約 130 km 上流の埼玉県北葛飾郡栗橋町付近に集まって一斉に産卵を行う。¹⁵⁾ また、この際にソウギョ、コクレン、アオウオも同一時期に産卵していることが示唆されている。¹⁶⁾ 導入されたハクレンが在来の生態系に与えている影響については利根川流域では明らかにされていないが、ミシシッピ川流域では餌や産卵場などを巡る競合により在来種の個体数を減少させていることが報告されている。¹⁷⁾

日本へのハクレンの移殖について、本種が単独で移殖されたという記録はない。しかし、ソウギョと称された種苗が 1878 年から 1955 年までに 11 回各地の河川に移殖された記録があり、¹⁸⁾ その中にハクレンが大量に混入していたと考えられている。¹⁴⁾ 利根川流域については、1943 年に長江沿岸の江西省九江付近からソウギョの稚魚が 23,600 尾放流されているが、¹⁴⁾ この中に混じっていたハクレンの稚魚が現在の利根川における集団の創始者となった可能性が高い。しかし、集団遺伝学的あるいは系統学的なアプローチによってその起源や遺伝的変異性の多寡を含めた遺伝的特徴について検討した研究は行われてこなかった。

最近、Wang *et al.*¹⁹⁾ は、ミトコンドリア (mt) DNA の調節領域前半部のシーケンス分析により、長江デルタに位置する太湖のハクレン集団の遺伝的多様性を報告した。太湖は利根川のハクレン集団の起源であると考えら

れている九江とは流程距離にして約 700 km 離れているため、起源となった集団との直接の比較とはならないが、Wang *et al.*¹⁹⁾ と同様の DNA マーカーを用いた調査を行うことで利根川のハクレン集団の遺伝的多様性や起源についてある程度の論議を行うことが可能と考えられる。

本研究は、mtDNA 調節領域前半部のシーケンス分析により、利根川流域に定着しているハクレン集団の遺伝的変異性やハプロタイプ間の系統関係を調べ、Wang *et al.*¹⁹⁾ の報告した太湖の集団との比較を通じて、その起源ならびに導入に伴った遺伝的変異性の低下が生じたかどうかについて検討することを目的とした。

材料および方法

標本 DNA 分析の標本として成魚、流下卵および仔魚を用いた。標本の採集地点を Fig. 1 に示す。成魚は、2003 年 6 月に常陸川水門（茨城県神栖町）において投網により捕獲した 17 個体（標準体長 70~93 cm）である。捕獲後すぐに各個体から尾鰭または背鰭の一部を切り取り、99.5% エタノールで固定した。流下卵は、2003 年 7 月に産卵場である利根川橋付近から約 10 km 下流の関宿水閘門（埼玉県五霞町）において目合 1 mm

Fig. 1 Location map of the samples.

のプランクトンネットを用いて集めた卵の中から 23 個をランダムに選出した。仔魚は、2003 年 8 月に利根川河口から約 15 km 上流の茨城県波崎町のワンドに蛸集していた仔魚群から 17 個体（体長約 1 cm）を採集し、99.5% エタノールで固定した。いずれの標本も DNA 抽出に供するまで 4°C の冷蔵庫内で保存した。DNA の抽出は、成魚は切り取った背鰭または尾鰭の一部、卵は胚体、仔魚は全身を試料として TNES-Urea 緩衝液を用いたフェノール・クロロホルム法²⁰⁾により行った。

mtDNA 分析 ハクレンの調節領域を増幅するためのプライマーセットは、GenBank に登録されているコイ *Cyprinus carpio* (X61010) とキンギョ *Carassius auratus* (NC_002079) の mtDNA 全長配列を参考にして設計した。まず、調節領域の上流にある tRNA^{Thr} の配列と対応したユニバーサルプライマー L15923²¹⁾を改変し、15923Ca (5'-TAAAAGCATCGGTCTTGTA-3') を設計した。さらに、調節領域のほぼ中央付近に mt4 (5'-CGAGCCTTCCTTGGT-3') のプライマーを設計した。以上のプライマーセットを用い、調節領域前半部を含む約 600 bp を増幅した。PCR の反応液は、DNA 溶液 2 μ L (80~160 ng/ μ L), 10x PCR Buffer (TaKaRa) 5 μ L, dNTP Mixture (TaKaRa) 5 μ L, プライマー (100 pmol / μ L) 各 1 μ L, rTaq DNA ポリメラーゼ (250 units, TaKaRa) 0.5 μ L, 超純水 35.5 μ L の計 50 μ L とした。増幅装置には PCR Thermal Cycler MP9600 (TaKaRa) を用いた。温度条件は、94°C 1 分の熱変性、94°C 1 分-48°C 1 分-72°C 1 分のサイクルを 30 回行い、最後に 72°C 5 分の伸長反応を行った。PCR 終了後、1% アガロースゲル (TaKaRa) を用いた電気泳動により、増幅産物を確認した。増幅産物を ExoSAP-IT (GE Healthcare) を用いて精製後、15923Ca プライマーと dGTP BigDye Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。塩基配列の検出には ABI PRISM 377 DNA Sequencer と Sequencing Analysis ver. 3.4.1 (Applied Biosystems) を用いた。

解析 得られた mtDNA 調節領域の塩基配列のアラインメントは CLUSTAL W²²⁾により行い、Collapse ver. 1.2²³⁾によりハプロタイプの分類を行った。調査の対象とした仔魚や流下卵の標本中には、ソウギョ、コクレンおよびアオウオも含まれていることが考えられるため、GenBank に登録されているハクレン (NC010156, FJ415073~FJ415091 および EU315941), コクレン (NC010194 および EU343733), ソウギョ (AY095337, NC010288 および EU391390) および アオウオ (NC011141, DQ026435 および EU979305~EU979307) の調節領域の配列と、本研究で得られた配列の系統関係を調べることにし、流下卵や仔魚の標本がハクレンで

あるかどうかの検討を行った。比較に用いたハクレンの配列のうち、FJ415073~FJ415091 の 19 配列は Wang *et al.*¹⁸⁾の報告した太湖集団のハプロタイプである。系統樹は、MEGA ver. 3.1²⁴⁾を用いてハプロタイプ間の p -distance²⁵⁾を算出し、近隣結合法²⁶⁾により作成した。ハプロタイプ間の p -distance の計算は欠失・挿入を含めずに行った。出現した各クレードの信頼性は 1,000 回のブートストラップにより検討した。

成魚ならびにハクレンと同定できた流下卵と仔魚の標本群間のハプロタイプ頻度に差異がみられるかどうかを検討するため、AMOVA 分析²⁷⁾、ペアワイズの F_{ST} 分析²⁸⁾および Exact test²⁹⁾を行った。遺伝的変異性の指標としてハプロタイプ多様度 (h)³⁰⁾および塩基多様度 (π)³¹⁾を算出した。これらの計算には ARLEQUIN ver. 3.0³²⁾を用いた。また、利根川集団のハプロタイプの系統関係をより詳細に検討するため、TCS ver. 1.18³³⁾を用いて最節約ネットワーク図³⁴⁾を作成し、ネスティング³⁵⁾を行った。

結 果

ハプロタイプの組成 ハクレン成魚 17 個体、流下卵 23 個、仔魚 17 個体の調節領域前半部 (454 bp) の配列を決定してアラインメントを行い、ハプロタイプの分類を行った結果、全体で 27 種類のハプロタイプが得られた (Type 1~26 および X)。Table 1 に各ハプロタイプの変異サイトならびに各標本群内の出現頻度を示す。各標本群の出現ハプロタイプは、成魚 11 種類、流下卵 15 種類、仔魚 10 種類であった。流下卵ならびに仔魚で同一のハプロタイプが出現する傾向がみられたものの、多くのハプロタイプは低頻度であった。ハプロタイプ間で変異が生じていたサイトは欠失・挿入を含めて 1~74 箇所であった。Type 1~26 の変異サイトは 1~15 箇所 (0.2~3.3%) であったが、これらと流下卵で検出された Type X の間では 71~74 箇所 (15.6~16.3%) と大きな差異を示し、Type X が異質なハプロタイプであることが示された。

Type 1~26 および X のハプロタイプと GenBank に登録されているハクレン、ソウギョ、コクレン、アオウオのハプロタイプを併せて系統樹を作成した結果を Fig. 2 に示す。これまでに報告されているハクレンの配列は、コクレンの配列 (NC010194 と EU343733) と結び付いた FJ415091 を除けば、他魚種とは明確に異なったクレードを形成した。検出された利根川のハプロタイプのうち、他のハプロタイプとは大きく配列が異なっていた流下卵の Type X は、ソウギョの配列 (NC010288 と EU391390) と一致あるいはごく近縁で、この卵がソウギョのものであることが示された。一方、Type 1~26 のハプロタイプは、全てハクレンのクレードに含ま

[illegible][illegible]

Dots indicate equal nucleotide to those in Type 1. Hyphens indicate deletions. The absolute frequency of each haplotype is indicated in the right column.

Fig. 2 Neighbor-joining tree relating haplotypes based on *p*-distance calculated from mtDNA control region sequences. Numbers indicate percentage bootstrap values from 1,000 replications.

Fig. 3 Statistical nested-parsimonious network of haplotypes detected from the Tone River population of silver carp. Size of circles corresponds to the frequency of haplotypes. Small black circles indicate missing haplotypes.

れており、ハクレンのハプロタイプと考えられた。以上の結果から、利根川のハクレン集団の集団遺伝学的解析は、成魚 17 個体、流下卵 22 個、仔魚 17 個体の計 56 個体の配列（26 ハプロタイプ）を用いて行うこととした。

遺伝的多様性 標本群間に遺伝的差異がみられるかどうかを AMOVA 分析によって検討した結果、標本群間の差異によって生じている変異の割合は 1.52% ($P = 0.122$) となり、0 よりも有意に大きな値とはならなかった。また、標本群間のペアワイズ F_{ST} 分析ならびに Exact test を行った結果、 F_{ST} 値は $-0.008 \sim 0.034$ (P

$= 0.081 \sim 0.523$)、Exact test の P 値は $0.126 \sim 0.763$ となり、いずれも有意な値ではなかった。そこで、3 標本群をプールして一つの「集団」とみなし、遺伝的多様性の指数を算出した結果、ハプロタイプ多様度 (h) は 0.920、塩基多様度 (π) が 1.1% となった。検出された 26 ハプロタイプの最節約ネットワーク図を Fig. 3 に示す。全てのハプロタイプの変化は 1 から 21 箇所の塩基置換または欠失・挿入で説明でき、その多くが 1 塩基もしくは 2 塩基の差異であった。ネットワーク中のクレードを探索した結果、ネットワークは最終的に 3 つのクレード (3-1, 3-2 および 3-3) にまとまった。また、

3-1 クレード中の 1-1 サブクレードは、最も高頻度の Type 3 のハプロタイプから低頻度のハプロタイプが派生する星状ネットワークであった。

考 察

中国から利根川に移殖されて定着している大型のコイ科魚類は、ハクレン、ソウギョ、コクレン、アオウオの 4 種であるが、これらの再生産のメカニズムに関してはハクレンを除いて未解明な部分が多い。金沢、田崎¹⁶⁾は、利根川でのハクレンの一斉産卵後に流下卵を採集し、実験室内で孵化させた稚魚の同定を行った結果、他の 3 種も含まれており、4 種が同一時期に産卵していることを示唆した。本研究の DNA 分析の結果、流下卵の標本中にソウギョが含まれていることが示され、ソウギョもハクレンと同一時期に産卵していることが再確認できた。今後、より多くの流下卵や仔魚について、魚種判別を含んだ DNA 分析を行うことで、利根川流域に定着しているハクレン以外の 3 種についても、その産卵生態や流下後の稚仔魚の動態を追跡することに貢献できると考えられる。

Wang *et al.*¹⁸⁾は、長江デルタに位置する太湖のハクレン野生集団 30 個体について、mtDNA の tRNA^{Pro} (48 bp) および調節領域前半部 (473 bp) の計 521 bp のシーケンス分析を行い、ハプロタイプ数が 19、ハプロタイプ多様度 (h) が 0.954、塩基多様度 (π) が 1.2 % で、その変異性が比較的高いことを報告している。本研究の分析対象領域には tRNA^{Pro} が含まれておらず、さらに調節領域の塩基数が 19 bp 短いため、Wang *et al.*¹⁸⁾の値と直接比較することはできない。しかし、変異の多くが本研究と共通の領域で生じていることを考慮すれば、ハプロタイプの分類に大きな違いがあるとは考えにくい。したがって、利根川集団のハプロタイプ多様度 (0.920) および塩基多様度 (1.1%) は太湖のハクレン集団とはほぼ同程度と考えられる。このことは同時に、利根川のハクレン集団が導入種であるにもかかわらず、高い遺伝的多様性を維持しており、大きな有効集団サイズによって再生産がなされていることを示唆している。大倉ら³⁶⁾は利根川のハクレンの産卵時期において経時的な卵の流下状況と流量により、流下卵総数を求め、産卵に関与している親魚数を 26~52 万尾と推定している。これらの中には他の 3 魚種 (ソウギョ、コクレン、アオウオ) も含まれているが、流下卵の魚種組成を調べた金澤、田崎¹⁶⁾によるハクレンの構成比率 (79.49%) を当てはめると産卵に関与した本種の親魚数は 20.7~41.3 万尾となる。この親魚数は必ずしも正確なものとは言えないが、相当な数の親魚が再生産に寄与していることは確かで、高い遺伝的多様性はこのような多くの親魚数によって維持されていると考えられる。

検出されたハプロタイプの系統ネットワークは、大きな 3 つのクレードから構成されていた。また、3-1 クレードには高頻度のハプロタイプから低頻度のハプロタイプが派生する星状ネットワークが検出された。このような星状ネットワークは比較的近年に集団サイズを拡大させた証拠と考えられている。³⁷⁾ しかし、利根川への導入後の集団サイズの増大がこのような星状ネットワークに反映されていると考えることは無理がある。なぜならば、調節領域の進化速度は、ハクレンでは推定されていないが、他魚種では 100 万年あたり 1.67~5.6% という推定がなされている。³⁸⁻⁴¹⁾ これらの推定値をハクレンに当てはめると 1 塩基置換あたり 3.9~13 万年となり、導入されてからの時間とは大幅に異なる。したがって、星状ネットワークは利根川で発達したと考えるより、起源となった集団の進化的なデモグラフィを反映したものと考える方が適切であろう。

利根川流域のハクレン集団の遺伝的多様性は比較的高いことが示されたが、このような遺伝的多様性の高さの要因の一つとして、もともと遺伝的に分化している複数の集団からの導入によることも考えられる。Lu *et al.*⁴²⁾は、長江の河口から 2,000 km 上流までの 3 地点 (蕪湖、瑞昌、天鵝洲) で採集したハクレンの標本集団を対象として mtDNA の ND5, ND6, Cyt *b* および調節領域を含む約 2.0 kbp の PCR-RFLP 分析を行い、ハプロタイプが大きな 2 つのクレードから構成されていること、地点間でハプロタイプ頻度に有意な差異がみられ、中下流の集団 (蕪湖と瑞昌) は同一クレードに属する比較的近縁なハプロタイプを保有しているが、より上流の集団 (天鵝洲) では低頻度ながら別クレードに属するハプロタイプが保有されていることを報告している。本研究と Lu *et al.*⁴²⁾とは分析手法が異なるので、直接の比較はできないが、近隣結合法による系統樹ならびに系統ネットワークには系統的に大きくかけ離れたハプロタイプの存在は示されなかったため、利根川集団の遺伝的変異性の高さが遺伝的に大きく分化した複数の集団の導入に起因するものとは考えにくい。Lu *et al.*⁴²⁾の調べた瑞昌は、利根川集団の起源と考えられている九江とは約 40 km しか離れておらず、地理的に近い位置にある。この瑞昌の集団が本研究の結果と同様に近縁なハプロタイプを保有していることや、Wang *et al.*¹⁸⁾の検出した太湖集団のハプロタイプが利根川集団のハプロタイプと近縁であったことを考え合わせれば、利根川のハクレン集団は九江を含めた長江の中下流域が起源となっていると予測される。また、比較的高い遺伝的変異性を示したことから、導入後の有効集団サイズの減少は大きなものではなく、多くの親魚の再生産への寄与により、起源集団の遺伝的変異性を変わらず維持している可能性もある。今後、起源の明確な特定や利根川における定着までの有

効集団サイズの変遷について詳しく検討するためには、九江を含めた長江の中下流域の複数の地点からサンプリングを行い、mtDNAの調節領域のシーケンス分析はもちろんであるがマイクロサテライトDNA分析などの核DNAを対象とする分析法も加え、多角的な比較研究が必要と考えられる。

謝 辞

利根川でのサンプル採集に御協力いただいた埼玉県農林総合センター水産研究所の皆様ならびに波崎土地改良区用排水担当理事の秋葉誠之進氏に厚く御礼申し上げます。本研究は、科学研究費補助金（課題番号15208018）のサポートを受けて行った。

文 献

- Pullin AS. *Conservation Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- 高橋清孝. オオクチバスによる魚類群集への影響—伊豆沼・内沼を例に. 「川と湖沼の侵略者ブラックバス」(日本魚類学会自然保護委員会編) 恒星社厚生閣, 東京. 2002; 47-59.
- Kawamura K, Ueda T, Arai R, Nagata Y, Saitoh K, Ohtaka H, Kaoh Y. Genetic introgression by the rose bitterling, *Rhodes ocellatus ocellatus* into the Japanese rose bitterling *R. o. kurumeus* (Teleostei: Cyprinidae). *Zool. Sci.* 2001; **18**: 1027-1039.
- 大越健嗣. 非意図的移入種による水産被害の実例—サキグロタマツメタ. 日水誌 2007; **73**: 1129-1132.
- 西川 潮, 米倉竜次, 岩崎敬二, 西田 睦, 河村功一, 川井浩史. 分子遺伝マーカーを用いて外来生物の侵入生態を探索: 生態系管理への適用可能性. 日生態会誌 2009; **59**: 161-166.
- Estoup A, Wilson IJ, Sullivan C, Cornuet JM, Moritz C. Inferring population history from microsatellite and enzyme data in serially introduced cane toads, *Bufo marinus*. *Genetics* 2001; **159**: 1671-1687.
- Rollins LA, Woolnough AP, Sherwin WB. Population genetic tools for pest management: a review. *Wildl. Res.* 2006; **33**: 251-261.
- Allendorf FW, Lundquist LL. Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. *Conserv. Biol.* 2003; **17**: 24-30.
- Kolbe JJ, Glor RE, Rodríguez Schettino L, Chamizo Lara A, Larson A, Losos JB. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* 2004; **431**: 177-181.
- Frankham R. Invasion biology—resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity* 2005; **94**: 385.
- Roman J, Darling JA. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends Ecol. Evol.* 2007; **22**: 454-464.
- Li S, Wu L, Wang J, Chou Q, Chen Y. *Comprehensive genetic study on Chinese carps*. Shanghai Scientific and Technical Publishers, Shanghai. 1990.
- 中村守純. 「日本のコイ科魚類」資源科学研究所, 東京. 1969.
- 丸山為蔵, 藤井一則, 木島利通, 前田弘也. 外国産新魚種の導入経過, 水産庁研究部資源課, 養殖研究所, 東京. 1987.
- 土屋 実. ソウギョとハクレン—長江生れのそう食魚. 「日本の淡水生物 侵略と攪乱の生態学」(川合禎次・川那部浩哉・水野伸彦編) 東海大学出版会, 東京. 1980; 79-86.
- 金澤 光, 田崎志郎. ソウギョ類の流下卵の魚種組成について. 埼玉県水産試験場研究報告 1990; **49**: 93-98.
- Laird CA, Page LM. Non-native fishes inhabiting the streams and lakes of Illinois. III. *Nat. Hist. Surv. Bull.* 1996; **35**: 1-51.
- 藤森三郎. 草魚本邦移植の沿革と天然繁殖までの経過. 水産資源 1958; **4**: 7-12.
- Wang M, Yang H, Zou Z, Li D, Zhu J, Xiao W. Genetic diversity of mitochondrial DNA D-loop sequences of *Hypophthalmichthys molitrix* in Tai Lake. *Chinese Agric. Sci. Bull.* 2009; **25**: 263-267 (in Chinese with English abstract).
- Asahida T, Kobayashi T, Saito K, Nakayama I. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 727-730.
- Shields GS, Kocher TD. Phylogenetic relationship of North American Ursids based on analysis of mitochondrial DNA. *Evolution* 1991; **45**: 218-221.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 1994; **22**: 4673-4680.
- Posada D. Collapse: *Describing haplotypes from sequence alignments*. University of Vigo. Vigo. Spain.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 2004; **5**: 150-163.
- Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 2000.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; **4**: 406-425.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes; application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 1992; **131**: 479-491.
- Weir BS, Cockerham CC. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 1984; **38**: 1358-1370.
- Raymond M, Rousset F. An exact test for population differentiation. *Evolution* 1995; **49**: 1280-1283.
- Nei M, Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 1981; **97**: 145-163.
- Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 1987.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 2005; **1**: 47-50.
- Clement MD, Posada D, Crandall KA. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 2000; **9**: 1657-1659.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CR. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 1992; **132**: 619-623.

- 35) Templeton AR, Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladgram uncertainty and recombination. *Genetics* 1993; **134**: 659–669.
- 36) 大倉 正, 田中繁雄, 金澤 光. ソウギョ類の天然産卵状況について. 埼玉県水産試験場研究報告 1995; **53**: 1–9.
- 37) Slatkin M, Hudson RR. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 1991; **129**: 555–562.
- 38) Sivasundar A, Bermingham E, Ortí E. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* 2001; **10**: 407–418.
- 39) Takahashi H, Goto A. Evolution of East Asian ninespine sticklebacks as shown by mitochondrial DNA control region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001; **21**: 135–155.
- 40) Donaldson KA, Wilson RR. Amphi-Panamic geminates of snook (Percoidae: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1999; **13**: 208–213.
- 41) Nagl S, Tichy H, Mayer WE, Takezaki N, Takahata N, Klein J. The origin and age of haplochromine fishes in Lake Victoria, East Africa. *Proc. R. Soc. B.* 2000; **267**: 519–553.
- 42) Lu G, Li S, Bernatchez L. Mitochondrial DNA diversity, population structure, and conservation genetics of four native carps within the Yangtze River, China. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1997; **54**: 47–5.