広島県成羽川におけるアユの個体別系統判別とその組成

占部 敦史,^{1a} 谷口 順彦,² 野口 大毅,³ 海野 徹也^{1*}

(2013年3月1日受付, 2013年6月11日受理)

¹広島大学大学院生物圏科学研究科, ²福山大学内海生物資源研究所, ³株式会社日本総合科学Strain identification and stock composition of ayu *Plecoglossus altivelis altivelis*
collected at the Nariwa River in Hiroshima Prefecture, western JapanATSUSHI URABE,^{1a} NOBUHIKO TANIGUCHI,² DAIKI NOGUCHI³ AND TETSUYA UMINO^{1*}¹Graduate school of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-hiroshima, Hiroshima 739-8528, ²The Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Onomichi, Hiroshima 722-2101, ³Nihon Total Science Inc., Fukuyama, Hiroshima 720-0832, Japan

Strain identification to assess the stock efficiency of ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* was performed using microsatellite DNA loci, otolith Sr/Ca ratio and scale number above the lateral line at the Nariwa River, a tributary of the Takahashi River, in western Japan. The specimens collected by angling from mid-July to August represented 61.7% for the transplanted landlocked form (from Lake Biwa), 28.3% for native landlocked form (from Lake Nariwa), 1.7% for the transplanted amphidromous form, and 8.3% for hatchery-reared, while the specimens collected by gill net in September were identified as 58.6% for the transplanted landlocked form, 3.5% for the native landlocked form, and 37.9% for the hatchery-reared without transplanted amphidromous form. We discussed the effectiveness of stock separation markers for practical usage and the stock contribution status in each strain through the stocking program.

キーワード：アユ, 系統判別, 耳石 Sr/Ca 比, マイクロサテライト DNA, 尤度比分析

アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* は全国の内水面漁業における主要魚種の1つである。最近ではダム建設や河川汚染などで天然アユが遡上しなくなる区間が増加しており、放流事業は欠かせないものになっている。¹⁾ 天然アユの遡上がみられる河川においても各年の遡上量は著しく不安定である。そのため、河川漁業協同組合は天然種苗および人工種苗を積極的に移植放流しており、2008年のアユの放流尾数は合計1億3千万尾に達した。²⁾

アユの放流事業に使用される種苗はいくつかの種内系統があり、それらは天然種苗と人工種苗に大別される。前者の天然種苗には天然海産アユ（両側回遊型）と琵琶湖産アユ（陸封型）があり、琵琶湖産アユが多数を占めている。また、人工種苗は各地の種苗生産施設で採苗されたもので、創始集団の多くは海産アユである。この他、ダム湖において陸封集団が発生する場合がある。³⁾

したがって、河川の漁業および遊漁において資源利用されるアユはこれらの系統のどれかであると考えられる。⁴⁾

天然種苗は疾病による大量死がない限り、放流後の定着状態、生残状況、再捕実績は良好であり、これまで内水面漁業関係者の評価は高かった。人工種苗については生産技術が進歩したものの、行動・習性などの種苗特性に関するクレームがつけられる事がある。^{1,5)} しかし、河川において系統や由来の異なる種苗が混在する場合、その識別は容易ではなく、クレームがどの放流種苗に対して付けられたのかは判然としないケースが多い。このため、原因の究明と種苗特性の改善への見通しが立たない状態が続いている。

近年、DNA マーカーによって個体レベルの系統判別が可能であることが証明されており、⁶⁾ 再捕魚の由来判別について実証研究が実施されるようになった。⁷⁾ しか

* Tel & Fax : 81-82-424-7944. Email : umino@hiroshima-u.ac.jp

^a 現所属：高知県水産振興部宿毛漁業指導所（Kōchi Prefectural Fisheries Extension Station, Sukumo, Kōchi 788-0265, Japan）

し、アユの放流事業の現場で使用されている多様な種苗への個体レベルの系統判別は必ずしも容易ではなく、判別手法のさらなる応用が求められている。

高梁川支流の広島県成羽川には天然海産および琵琶湖産の移植種苗、広島県の人工種苗および新成羽ダム湖で発生した遡上魚（ダム湖陸封アユ）など4つの系統のアユが存在する。本研究は、同河川に資源貢献したアユを供試魚とし、マイクロサテライト DNA マーカーによる尤度解析、耳石ストロンチウム/カルシウム比分析、側線上方横列鱗数を識別マーカーとして個体レベルの系統判別を行った。また、系統判別マーカーの有効性について論議するとともに、系統の構成比から放流後のアユの資源貢献について考察した。

材料および方法

調査区域、種苗放流実績および供試魚 成羽川は岡山県西部を貫流する高梁川の1支流である（Fig. 1）。本

Fig. 1 Sampling sites St. 1 (by angling) and St. 2 (by gill net) at the Nariwa River. In this area, four strains—the landlocked form from Lake Biwa, the amphidromous form from Miyazaki Prefecture, hatchery-reared from Hiroshima Prefecture, and native landlocked population from Lake Nariwa—could be expected as stock (see Table 1).

研究は広島県との県境に位置する新成羽ダム湖より上流側において実施した。ダムより上流には海産アユが自然遡上することはないので、アユの生産はすべて種苗放流事業に依存している。成羽川は広島県側では東城川と呼ばれ、アユの種苗放流事業はそこを管轄区域とする東城川漁業協同組合によって実施されている。

種苗放流地点は東城川漁業協同組合の管轄下のおよそ延長 25 km 区間に広がっている。2009 年度の放流実績は、琵琶湖産種苗が 1,500 kg (5 g 換算で 30 万尾)、宮崎県産沖取り天然海産種苗（以下、天然海産種苗）が 400 kg (5 g 換算で 8 万尾)、広島県栽培漁業センターで生産され帝釈川漁業協同組合で中間育成された海産系統広島人工種苗（以下、人工種苗）が 1,500 kg (5 g 換算で 30 万尾) である（Table 1）。供試魚の採集は中下流区で実施した（Fig. 1）。供試魚は 2009 年 7 月中旬から 8 月末にかけて友釣りにより釣獲した 60 尾、および終漁期の 9 月に刺し網により採集した 58 尾、計 118 尾である。

系統判別のための基準集団として 2007 年 7 月に滋賀県安曇川で採集した琵琶湖産アユ（標準体長 12.1 ± 1.4 cm；体重 14.2 ± 5.3 g；以下、琵琶湖産）46 尾を、2009 年 4 月に福岡県加茂川で採集した天然海産アユ（体長 8.5 ± 0.5 cm；体重 7.1 ± 1.4 g；以下、福岡県天然海産）60 尾を、2009 年に放流に用いられた人工種苗（体長 7.8 ± 0.7 cm，体重 6.4 ± 1.4 g）64 尾を入手し、後述する系統判別分析に供した（Table 1）。既報¹⁾から九州地域の天然海産アユは遺伝学的に類縁関係にあるということを考慮し、宮崎県天然海産種苗の基準集団として福岡県天然海産を用いた。

系統判別分析の概要 再捕魚には東城川漁業協同組合が種苗放流を実施した天然海産種苗、琵琶湖産種苗、人工種苗および成羽ダム湖で自然繁殖した陸封アユ（以下、ダム湖産）が含まれている。

これら 4 系統のうち、琵琶湖産系統と海産系統は遺伝的な分化の違いによりマイクロサテライト DNA マーカーにより個体毎の判別が可能である。⁶⁾ 人工種苗とそ

Table 1 Released strains for stock enhancement in the Nariwa River in 2009 and reference strains for basic information on stock separation markers (assignment test, otolith Sr/Ca ratio and scales above the lateral line)

Strain form	Released strains			Reference strains		
	Origin	Abbreviation	Amount	Origin	Abbreviation	Sample
Landlocked form	Lake Biwa	LB	1,500 (kg) 300,000 (ind.)	Ado River	LB-R	46
Native landlocked form	Lake Nariwa	LN	—	—	—	—
Amphidromous form	Miyazaki Pref.	AM	400 (kg) 80,000 (ind.)	Fukuoka Pref.	AF-R	60
Hatchery	Hiroshima Pref.	HH	1,500 (kg) 300,000 (ind.)	Hiroshima Pref.	HH-R	64

ind.: individuals

他の海産系統は DNA マーカーのアリル型に違いがあれば判別できる可能性がある。⁷⁾ 海洋生活履歴形質である耳石 Sr/Ca 濃度比分析により, 湖産 (琵琶湖産種苗もしくはダム湖産), 天然海産種苗および人工種苗の判別が可能である。^{3,8,9)} また, 側線上方横列鱗数および下顎側線孔数により人工種苗とその他の天然アユとの判別が可能である。^{10,11)} 以下, 系統判別分析に用いたマイクロサテライト DNA マーカー解析, 耳石 Sr/Ca 比分析, 側線上方横列鱗数と下顎側線孔数 (以下, 下顎孔数) について述べる。

マイクロサテライト DNA マーカーと尤度比解析 採集したアユの鱗組織から市販の抽出キット (DNAzol, Molecular Research Center 社)¹²⁾ を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は PCR を行うまで 4°C で保存した。マイクロサテライト DNA マーカー座は, *Pal1*, *Pal3*, *Pal5*,¹³⁾ *PalAyu42*, *PalAyu191*, *PalAyu194*, *PalAyu199*¹⁴⁾ の 7 座を用いた。これらのマーカー座は, フラグメントの出現位置を考慮し, *Pal1*, *Pal3*, *Pal5*, *PalAyu191* の 4 座のマルチプレック PCR 反応検出系 (Panel A) と, *PalAyu42*, *PalAyu194*, *PalAyu199* の 3 座のマルチプレック PCR 反応検出系 (Panel B) の 2 つの反応系で増幅検出を行った。各ローカスの一方のプライマーに同一パネル上で蛍光色が異なるように蛍光標識 (FAM, NED, PET および VIC) を修飾した。フラグメント増幅 PCR には, 鋳型-DNA を終濃度 1 ng/ μ L, プライマー混液 (Panel A または B) を終濃度各 0.2 μ M, QIAGEN Multiplex PCR Master Mix を終濃度が 1× になるように超純水を用いて調合した。PCR 反応は 95°C-15 分の熱変性を行った後, 94°C-30 秒, 57°C-90 秒, 72°C-90 秒の温度変化を 35 サイクル実施し, 72°C-10 分の最終伸長反応を行った。PCR 産物を Panel A の場合は 150 倍, Panel B の場合は 200 倍に希釈し, HI-Di Formamide 8 μ L, サイズスタンダード (600LIZ, Applied Biosystems) 1 μ L, PCR 産物 1 μ L を加えて攪拌し, 95°C で 2 分間熱変性を行った後, 氷冷した。電気泳動は Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems) Fragment Analysis を用い, Gene Mapper (Applied Biosystems Soft) によりアリルサイズを決定した。

尤度比解析では, まず, 基準集団として入手した琵琶湖産および福岡県天然海産の尤度を, マイクロサテライト DNA アリル型データを用いて PC ソフト WHICHRUN V3.2¹⁵⁾ により算出した。次に, 基準集団との対数尤度比に基づき未知標本個体が琵琶湖系統か海産系統かの判別を行った。同様な系統判別を基準集団として入手した福岡県天然海産および人工種苗で行い, 対数尤度比に基づいて未知標本個体を人工種苗とその他の海産系統に判別した。

系統毎のアリル数, 有効アリル数の計算には PC ソフト, FSTAT2.9.3.2 (Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Updated from Goudet (1995)¹⁶⁾) を用いた。系統間の AMOVA 分析 (分子分散分析), ペアワイズ F_{ST} 値, Hardy-Weinberg (H-W) 平衡の検定, 平均ヘテロ接合度 (期待値・観察値) の計算には ARELQUIN3.11¹⁷⁾ を用いた。ペアワイズ F_{ST} 値の有意性の検定において多重検定を行う場合は Bonferroni の補正¹⁸⁾ を行った。Nei の遺伝的距離¹⁹⁾ を計算し, UPGMA 法による標本群間の遺伝的類縁性をコンピュータソフト Populations1.2.30 (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>) で求め, デンドログラムを作成し, TreeExploere V2.12 (<http://evolgen.bio.metro-u.ac.jp/TE/>) で表示した。

耳石 Sr/Ca 比分析 耳石 (扁平石) を摘出し, エタノール中で付着物を完全に除去した。耳石の凸面が上になるようにスライドガラス上に置き, これをエポキシ樹脂 (Epofix, Struers 社製) で包埋後, 耳石の核が露出するまで耐水研磨紙 (#1200~2400) を装着した研磨機 (Struers S5629) で研磨し, 最終的に 1 μ m のダイヤモンドペーストで研磨面を鏡面仕上げした。表面にカーボン蒸着を施した試料を波長分散型電子線マイクロアナライザー (日本電子, JXA-8200, 以下 EPMA) 分析に供し, 発育に伴う耳石上のカルシウムとストロンチウムの濃度変化を調べた。線分析は耳石中心部から縁辺部にかけて 10 μ m 間隔で行った。なお, 線分析条件は前報³⁾ に従い, カルシウムに対するストロンチウムの濃度比を 10³ 倍し表記したものを Sr/Ca 比とした。耳石中心部から縁辺部の Sr/Ca 比の変化により未知標本を湖産 (琵琶湖産種苗もしくはダム湖産), 天然海産種苗, 人工種苗のいずれかに判別した。

側線上方横列鱗数と下顎側線孔数 基準集団および成羽川で採集された全個体の体側部をメチレンブルーで染色し, 背鱗の第 1 鱗条基部先端から側線にかけての鱗数 (側線上方横列鱗数) を計数した。同じように全個体の下顎を染色し, 下顎孔数を計数した。得られた計数値は基準集団のものと比較し, DNA マーカーや耳石 Sr/Ca 比分析によって系統判別された個体との整合性を確認した。

結 果

DNA マーカーによる尤度比分析 解析に用いた 7 つローカスで多数のマーカーアリルが検出された。尤度比分析で用いる基準集団の遺伝学的特徴を Table 2 に示す。また, H-W 平衡からの逸脱の検定では, 福岡県天然海産 (AF-R) の *Pal1* および *PalAyu199* のみで有意

な逸脱が認められた ($P < 0.05$)。

基準集団である琵琶湖産および福岡県天然海産の対数尤度比分析に基づき、友釣りにより採集したアユ 60 尾を判別したところ、琵琶湖産系統 (Type LB) が 37 尾、海産系統 (Type A) が 23 尾となった。刺し網で採集した 58 尾は琵琶湖産系統 (Type LB) が 34 尾、海産

Table 2 Genetic variability of reference and captured strains assessed by seven microsatellite loci

Strains	<i>n</i>	<i>A</i>	<i>A_r</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>H_o/H_e</i>	<i>H-W</i>
Reference strains							
LB-R	46	7.4	4.9	0.63	0.62	1.01	0/7
AF-R	60	10.3	6.2	0.65	0.68	0.96	2/7
HH-R	64	5.1	4.0	0.54	0.57	0.96	0/7
Captured strains							
LB	71	8.7	5.2	0.64	0.62	1.04	
LN	19	6.9	5.5	0.67	0.65	1.03	
HH-A	10	4.3	4.3	0.70	0.67	1.05	
HH-B	17	7.1	5.7	0.61	0.61	1.00	

n, sample size; *A*, average number of alleles; *A_r*, allelic richness; *H_o*, observed heterozygosity; *H_e*, expected heterozygosity; *H-W*, significance of tests for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$)

Fig. 2 Assignment tests using seven microsatellite loci for three reference strains (upper chart) and for recaptured samples by angling and gill net in the Nariwa River (lower chart). Each axis indicates minus the decimal logarithm of the likelihood distance using two reference strains, the landlocked and amphidromous populations. For strain abbreviations, refer to Table 1.

系統 (Type A) が 24 尾となった (Fig. 2)。

次に、友釣り採捕アユのうち海産系統 (Type A) に判別された 23 尾に対し、基準集団を福岡県天然海産および人工種苗とする対数尤度比分析を行ったところ、天然海産系統 (Type AF) が 20 尾、人工種苗 (Type HH) が 3 尾となった。刺し網で採捕アユのうち、海産系統 (Type A) と判別された 24 尾は、天然海産系統 (Type AF) が 16 尾、人工種苗 (Type HH) が 8 尾となった (Fig. 3)。このように、友釣りおよび刺し網で採集されたアユは、DNA マーカーによる尤度比分析から、採捕魚は琵琶湖産系統 (Type LB)、天然海産系統 (Type AF)、人工種苗 (Type HH) の 3 型にタイプ分けされた。

耳石 Sr/Ca 比分析 尤度比分析により海産系統 (Type A) と判別された標本群には 5 つの耳石 Sr/Ca 比のチャートパターンが認められた。具体的には耳石中心部から 500 μm 前後まで比が 3~6 を示し、その後、減少するパターンを A、中心部から縁辺部にかけて終始 Sr/Ca 比が低く (0~2) 大きな変動がないパターンを L、中心部から 300 μm 前後まで比が 4~10 を示し、直ちに減少するパターンを H-1、中心部から 300 μm 前後まで比が 4~10 を示し、緩やかに減少するパターンを H-2、耳石が結晶化し中心部から縁辺部まで Sr/Ca 比が 0~2 を示すパターンを H-3 とした。また、基準集団として入手した人工種苗 (HH-R) の耳石 Sr/Ca 比は、中心から 300 μm 前後まで 3~7 を示し、以後、急に減少するパターン H-1 と緩やかに減少する H-2 が認めら

Fig. 3 Assignment tests using seven microsatellite loci for two reference strains (a), for samples captured by angling and gill net at the Nariwa River (b), and for samples identified by strain separation markers (c). Each axis indicates minus the decimal logarithm of the likelihood distance using two reference strains, the amphidromous and hatchery populations. For strain abbreviations, refer to Table 1.

Fig. 4 Patterns of life history scan using Sr/Ca concentration ratio from core to edge of sagittal otolith. The concentration ratios were multiplied by 10^3 . Six typical chart patterns A, L, H-1 and 2, H-3 and HH-R are derived from the transplanted amphidromous form, landlocked form, hatchery form, hatchery with crystallized otolith form, and reference hatchery form, respectively. For strain abbreviations, refer to Table 1.

れた (Fig. 4)。

成羽川で採集されたアユのうち、DNA マーカーによる尤度比解析で天然海産系統と判別された個体の多くは L 型であった。既報^{3,8,9)}にもあるようにパターン L を有するアユは一生を淡水中で生活していると考えられるため、これらはダム湖から遡上したダム湖産と判別され、それらの創始集団は海産種苗である。パターン A を示す個体は人工種苗より海水生活時期が長いと考えられ、既報^{3,8,9)}の天然海産アユのチャートと酷似していることから天然海産種苗と判別した。パターン H-1 や H-2 を示す個体は基準集団として入手した人工種苗のパターンと類似しているため人工種苗と判別した。また、パターン H-3 は耳石が透明化した異常形態で、このような耳石は結晶化と呼ばれており、人工種苗において頻繁に出現することが報告がされているため人工種苗と判別した。^{20,21)}

友釣りにより採集した 60 尾のうち、尤度比解析によって海産系統 (Type A) と判別された 23 尾に認められたチャートは、パターン L が 17 尾、A が 1 尾、H-1 が 2 尾、H-2 が 1 尾、H-3 が 2 尾であった。よって、海産系統 (Type A) 23 尾は耳石 Sr/Ca 比分析によってダム湖産が 17 尾、天然海産種苗が 1 尾、人工種苗が 5 尾に判定された。

一方、刺し網で採集した 58 尾のうち、尤度比解析によって海産系統 (Type A) と判定された 24 尾のチャートは、パターン L が 2 尾、A が 0 尾、H-1 が 13 尾、

Fig. 5 Frequencies of the number of scales above the lateral line and the pores on the lower jaw in reference strains (a) and (c), and captured strains (b) and (d). For strain abbreviations, refer to Table 1.

H-2 が 6 尾、H-3 が 3 尾となった。よって海産系統 (Type A) 24 尾はダム湖産が 2 尾、天然海産種苗が 0 尾、人工種苗が 22 尾と判定された。なお、友釣りおよび刺し網で採集された検体で、優先的に実施した尤度比分析によって琵琶湖産系統と判別した集団 (Type LB) から 36 検体を任意抽出し、耳石 Sr/Ca 比分析に供したところ、全てがパターン L を示した。このことから尤度比分析で琵琶湖産系統と判別された個体に人工種苗や天然海産種苗が混入している可能性は無かったものとし、琵琶湖産系統 71 尾を琵琶湖産種苗と判別した。

側線上方横列鱗数と下顎側線孔数 基準集団である琵琶湖産、福岡県天然海産、人工種苗の側線上方横列鱗数および下顎孔数 (左右合計) を計数し、基準データを作成した。側線上方横列鱗数の範囲は琵琶湖産で 19~24 枚、福岡県天然海産で 18~22 枚となったが、両者と人工種苗 (12~16 枚) では重複が認められなかった (Fig. 5a)。下顎孔数は琵琶湖産で 7 もしくは 8 孔で、79% が 8 孔であった。同様に福岡県天然海産も 7 もしくは 8 孔が多く、86% が 8 孔だった。一方、人工種苗は 2~8 孔が観察され、8 孔の出現個体は 14% と少なかった (Fig. 5c)。

友釣りで採集した 60 尾において側線上方横列鱗数が 18 枚以上は 52 尾、16 枚以下は 5 尾、中間値である 17 枚は 3 尾となった。刺し網で採集した 58 尾において側線上方横列鱗数が 18 枚以上は 35 尾、16 枚以下は 21 尾、17 枚は 2 尾であった。下顎孔数においては、友釣りで採集した 60 尾のうち 8 孔以上が 35 尾で 8 未満は 25 尾、刺し網で採集した 58 尾のうち 8 孔以上は 29 尾、8 孔未満は 29 尾であった。

基準集団の計数値を参考すれば、下顎孔数は天然アユで 8 孔未満の欠損個体が出現し、逆に、人工種苗でも

正常個体が出現するため、単独では確実な系統判別ツールとして使用できないことになる。これに対して側線上方横列鱗数は18枚以上が天然海産種苗、琵琶湖産種苗、ダム湖産、17枚は不明、16枚以下は人工種苗と判別できる。側線上方横列鱗数による判別を行った結果、友釣りで採集した60検体は天然アユが52尾、人工種苗が5尾、3尾は不明であった。刺し網で採集した58検体は天然アユが35尾、人工種苗が21尾で、2尾は不明であった。

系統判別 友釣りおよび刺し網で採集した個体の判別は、DNA マーカーによる尤度比解析と耳石 Sr/Ca 比分析の組み合わせによる判定法で検討した。まず、友釣りで採集した60尾は1回目の尤度比解析から琵琶湖産系統 (Type LB=LB) が37尾、海産系統 (Type A) が23尾に類別された (Fig. 2)。海産系統 (Type A) 23尾を対象とした2回目の尤度比解析から、人工種苗 (Type HH=HH-A) が3尾、天然海産系統 (Type AF) が20尾となった (Fig. 3)。耳石 Sr/Ca 比分析から、天然海産系統 (Type AF) と判定した20尾のうち16尾はパターン L を示すダム湖産アユ (LN) と判別され、1尾はパターン A であったため天然海産種苗 (AM) に判別した。残りの3尾はパターン H-1~3 であったため人工種苗と判別した。ただし、この系統は尤度比分析を用いて判別した人工種苗 (以下、人工種苗 A (HH-A)) とは違う系統であるため、人工種苗 B (HH-B) とした (Fig. 4)。さらに尤度比分析において人工種苗 (Type HH) と判別した3尾のうち、1尾は耳石 Sr/Ca 比で L パターンを示したためダム湖産 (LN) と再判別した。よってダム湖産 (LN) は17尾、人工種苗 A (HH-A) は2尾となった (Fig. 3c)。

刺し網で採集した58尾は、1回目の尤度比分析により琵琶湖産系統 (Type LB=LB) が34尾、海産系統 (Type A) が24尾となった (Fig. 2)。海産系統 (Type A) 24尾を対象とした2回目の尤度比解析では、人工種苗 A (Type HH=HH-A) が8尾、天然海産系統 (Type AF) が16尾となった (Fig. 3a, b)。天然海産系統 (Type AF) に判別した16尾は、耳石 Sr/Ca 比分析によりダム湖産 (LN) が2尾で、14尾はパターン H-1~3 であったため別系統の人工種苗 B (HH-B) と判別した (Fig. 6)。

DNA マーカーによる尤度比解析と耳石 Sr/Ca 比分析によって琵琶湖産種苗 (LB) と判別されたアユの側線上方横列鱗数は18~24枚 (1尾のみ15枚が確認された)、ダム湖産 (LN) は17~22枚、天然海産種苗 (AM) は17枚、人工種苗は13~17枚 (人工種苗 A (HH-A) は13~16枚、人工種苗 B (HH-B) は14~17枚) の範囲となった。側線上方横列鱗数は天然種苗 (琵琶湖産種苗およびダム湖産) で多く、人工種苗では少な

くなる点は概報^{10,11)}と一致した (Fig. 5b)。また、DNA マーカーを用いた尤度比解析と耳石 Sr/Ca 比分析の判別結果は、側線上方横列鱗数と照合しても矛盾は認められないことが明らかとなった。個体レベルの系統判別結果と判定基準の詳細は Appendix Table 1 および 2 に示す。

系統判別結果をまとめれば、7月中旬から8月に友釣りで採集した60尾は、琵琶湖産種苗 (LB) 37尾 (61.7%)、ダム湖産 (LN) 17尾 (28.3%)、天然海産種苗 (AM) 1尾 (1.7%)、人工種苗 A (HH-A) 2尾 (3.3%)、人工種苗 B (HH-B) 3尾 (5.0%) と判別された。刺し網で採集した58尾は、琵琶湖産種苗 (LB) 34尾 (58.6%)、ダム湖産 (LN) 2尾 (3.5%)、人工種苗 A (HH-A) 8尾 (13.8%)、人工種苗 B (HH-B) 14尾 (24.1%) と判別された (Table 3)。

系統の集団遺伝学的分析 DNA マーカーによる尤度比解析および耳石 Sr/Ca 比分析によって系統判別された集団 (天然海産種苗を除く) について遺伝学的解析を

Typing by MS-DNA		Sr/Ca ratio pattern		
Analysis 1	Analysis 2	L	H -1~3	A
LB		LB(71) Landlocked form from lake Biwa		
A	HH	LN(1) Landlocked form from Nariwa Dam lake	HH-A(10) Released hatchery population A	
	AF	LN(18) Landlocked form from Nariwa Dam lake	HH-B(17) Released hatchery population B	AM(1) Amphidromous form from Miyazaki

Fig. 6 Two-dimensional diagram for strain identification of recaptured individuals based on likelihood test using seven microsatellite DNA markers plotted on the vertical axis, and otolith Sr/Ca ratio on the horizontal axis. Numbers in parentheses are individuals identified from the fish recaptured in the Nariwa River.

Table 3 Strain composition of specimens collected by angling and gill net at the Nariwa River

	LB		LN		AM		HH			
							A		B	
	ind.	per.	ind.	per.	ind.	per.	ind.	per.	ind.	per.
Angling (n=60)	37	61.7	17	28.3	1	1.7	2	3.3	3	5.0
Gill net (n=58)	34	58.6	2	3.5	0	0.0	8	13.8	14	24.1
Total (n=118)	71	60.2	19	16.1	1	0.9	10	8.5	17	14.4

ind., individual; per., percentage

行った。基準集団としての琵琶湖産 (LB-R) と琵琶湖産種苗と判別された集団 (LB) の有効アリル数は、それぞれ 4.9 と 5.2, 平均ヘテロ接合度 (期待値) は共に 0.62 で、基準集団とよく一致した。基準集団としての人工種苗 (HH-R) と人工種苗 A (HH-A) もしくは人工集団 B (HH-B) と判別された集団の有効アリル数は、それぞれ 4.0 と 4.3 もしくは 5.7 で、平均ヘテロ接合度の期待値は 0.57 と 0.67 もしくは 0.61 となり、両値ともにやや低かった。基準集団としての福岡県天然海産 (AF-R) の有効アリル数と平均ヘテロ接合度は 6.2 および 0.68 で、ダム湖産と判別された集団 (LN) では 5.5 および 0.65 を示したことから、人工種苗の遺伝的多様性がわずかに低下していることが確認された (Table 2)。

AMOVA 分析を行ったところ、標本間に由来する変異は変異全体の 10.03% となった ($F_{ST} = 0.1003$, $P < 0.0001$)。ペアワイズ F_{ST} では、複数の集団の組み合わせで有意差が認められた (Table 4)。例えば、琵琶湖産基準集団 (LB-R) は琵琶湖産種苗鑑定集団 LB を除いた集団間、福岡県天然海産基準集団 (AF-R) はダム湖産鑑定集団 (LN) と人工種苗 B 鑑定集団 (HH-A) を除いた集団間、人工種苗基準集団 (HH-R) は人工種苗 A 鑑定集団 (HH-A) を除いた集団間で有意差が認められた。他方、琵琶湖産基準集団 (LB-R) と琵琶湖産種苗鑑定集団 (LB), 福岡県天然海産基準集団 (AF-R) とダム湖産鑑定集団 (LN) と人工種苗 B 鑑定集団 (HH-B), 人工種苗基準集団 (HH-R) と人工種苗 A 鑑定集団 (HH-A) の間には有意な差が認められなかった ($P = 0.002$, Bonferroni 補正後, $k = 21$)。

標本間の遺伝的類似性を評価するため 7 マーカー座のアリル頻度を基に標本間の遺伝的距離を算出し、遺伝的類似性を示すデンドログラムを作成した (Fig. 7)。琵琶湖産基準集団 (LB-R) と琵琶湖産種苗鑑定集団 (LB) と判別された 2 つの集団で 1 つのクラスターが形成された。また、福岡県天然海産基準集団 (AF-R), 人工種苗 B 鑑定集団 (HH-B), ダム湖産鑑定集団 (LN) が別のクラスターを形成し、人工種苗基準集団 (HH-R) と人工種苗 A 鑑定集団 (HH-A) が別のクラスターを形

成した。よって、認められた 3 つのクラスターは、未知標本として系統判別された集団が基準集団と類縁関係を有していたことを支持した。

系統別混入率と体サイズの比較 友釣りおよび刺し網で採集された系統毎の体長と体重を、個体数が 10 以上の系統を対象に、かつ、人工種苗 (HH-A と HH-B) は 1 つの系統とし、系統間の比較を行った (Fig. 8)。なお、各系統の体長と体重は F 検定により等分散とみな

Fig. 7 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance between each pair of reference and identified strains using seven microsatellite loci. For strain abbreviations, refer to Table 1.

Fig. 8 Histogram of standard length (upper) and body weight (under) distributions of strains captured by angling (Ang.) and gill net (Gil.). For strain abbreviations, refer to Table 1.

Table 4 Pairwise F_{ST} values (below diagonal) and P values (above diagonal) for all possible combinations

Strains	LB-R	AF-R	HH-R	LB	LN	HH-A	HH-B
LB-R	—	*	*	<i>ns</i>	*	*	*
AF-R	0.0791	—	*	*	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>
HH-R	0.1966	0.0793	—	*	*	<i>ns</i>	*
LB	-0.0014	0.0840	0.1971	—	*	*	*
LN	0.0520	0.0082	0.1317	0.0522	—	*	<i>ns</i>
HH-A	0.1844	0.0643	0.0033	0.1829	0.1042	—	*
HH-B	0.0997	0.0037	0.0909	0.1014	0.0203	0.0839	—

ns, not significant; *, significant at $P < 0.00238$ following Bonferroni correction

されたため、等分散を仮定した多重比較検定もしくは t 検定を行った。その結果、友釣りで採集した系統では、琵琶湖産種苗 (LB(Ang): $n=37$) の平均体長は 15.9 ± 1.5 cm, 体重は 58.0 ± 24.4 g であり、ダム湖産 (LN(Ang): $n=17$) の体長は 16.3 ± 1.4 cm, 体重は 62.7 ± 17.5 g で、両者の体長と体重ともに有意な差は認められなかった ($P>0.05$)。刺し網で採集した系統では、琵琶湖産種苗 (LB(Gil): $n=34$) の体長は 16.0 ± 1.5 cm, 体重は 62.8 ± 17.5 g であり、人工種苗 (HH-A + B(Gil): $n=22$) の体長は 17.9 ± 1.3 cm, 体重は 85.0 ± 20.4 g であり、体長と体重とも人工種苗は琵琶湖産種苗より有意に大きかった ($P<0.05$)。

友釣りと刺し網で採集された系統毎の体長と体重を一括すると、琵琶湖産種苗 (LB(Ang+Gil): $n=71$) の体長は 16.0 ± 1.5 cm, 体重は 60.3 ± 21.4 g, ダム湖産 (LN(Ang+Gil): $n=19$) の体長は 16.2 ± 1.4 cm, 体重は 63.2 ± 17.3 g, 人工種苗 (HH-A + B(Ang+Gil): $n=27$) の体長は 17.4 ± 1.8 cm, 体重は 78.2 ± 24.9 g となった。琵琶湖産種苗とダム湖産の間には体長と体重ともに有意な差は認められなかったが ($P>0.05$)、人工種苗は琵琶湖産種苗やダム湖産より体長と体重ともに有意に大きかった ($P<0.05$)。

考 察

DNA マーカーと履歴形質による系統判別 広島県成羽川には系統や履歴が異なる種苗が放流されているが、DNA マーカーと履歴形質の併用により個体レベルの系統判別が可能であることが判明し、放流効果の系統別評価が可能であることが明らかとなった。

海産系統アユ (両側回遊型) と琵琶湖産系統アユ (陸封型) は DNA マーカーによる尤度比分析によって個体レベルの判別が可能であることが知られており,⁶⁾ 本研究でも海産系統と琵琶湖産系統が混在する未知標本の判別に DNA マーカーによる尤度比分析の有効性が確認された。尤度比分析において海産系統の人工種苗が天然海産アユと重なりを示したことも分析の信頼性の傍証と考えられる。

1 回目の尤度比分析において海産系統と判別された標本に対し、福岡天然海産と人工種苗を基準標本とした 2 回目の尤度比分析を実施したところ、人工種苗 (HH-A) と判定されるものと天然海産系統に判別される個体に分別された。このうち人工種苗 (HH-A) と判別された集団は基準集団と同様にアリル数や有効アリル数が相対的に低く、ヘテロ接合体率においても顕著な低下が認められた。遺伝的多様性低下の原因としては、有効親魚数が少ない場合や継代人工種苗を親魚として使用している場合が考えられた。放流集団の遺伝型単純化とアリル頻度の変化が集団の遺伝的分化をもたらし,²²⁾ 人工種苗集団

が尤度比分析において識別されたものと考えられる。

尤度比分析において福岡県天然海産側にプロットされた人工種苗 B (HH-B) は、耳石 Sr/Ca 比分析および側線上方横列鱗数においても人工種苗と判別され、遺伝的類縁性においては天然海産系統と同一クラスターに含まれた。また、ペアワイズ F_{ST} においても人工種苗 A (HH-A) とは有意に異なり、この集団は天然海産アユに由来する F1 種苗である可能性が示唆された。既報²³⁾ においても親魚に天然海産アユを使用した F1 集団は親魚集団と遺伝的類似性が高いものの、継代数の増加につれて遺伝的多様性が低くなる傾向が示されている。その他、人工種苗に遺伝的に異なる二つの標本群がみとめられた原因については、採卵日の違う人工種苗の混在の可能性も考えられる。

各地の種苗生産機関では天然の海産アユが親魚として使用されているケースが多い。¹⁾ それらが放流されている河川に天然海産アユが遡上したり、天然海産アユが移植放流されている場合には、尤度比分析だけでは本研究と同様に系統判別ができない可能性がある。このようなケースに対しては、生育環境履歴を反映する耳石 Sr/Ca 比は有効な判別方法と考えられる。耳石中のカルシウム含量は生息環境水の塩分濃度に関係なくほぼ一定であるのに対して、ストロンチウム含量は海域から淡水域への移動に伴い減少する。そのため淡水域だけの生活履歴を持つ琵琶湖産もしくはダム湖産アユの耳石 Sr/Ca 比はほとんど変化しないのに対し、遡上した海産天然アユと海水飼育履歴を持つ人工種苗では比が変化する。^{3,8,9)} 本研究でも耳石 Sr/Ca 比を用いて天然海産種苗、人工種苗、湖産アユを判別することが可能であった。しかしながら、耳石 Sr/Ca 比による琵琶湖産アユとダム湖産アユの判別は不可能で、唯一、DNA マーカーによる尤度比解析による判別が有効であった。系統判別を通じて放流効果の全容を明らかにするには本研究のように履歴形質や計数形質を併用することが必要不可欠と考えられる。

側線上方横列鱗数と下顎側線孔数 アユの場合、計数形質の違いにより系統判別できる可能性が示唆されており,²⁴⁾ 側線上方横列鱗数においては人工種苗、天然海産アユ、琵琶湖産アユの順に鱗数が多くなることが知られている。^{10,11)} 本研究でも同様な傾向が認められた。また、琵琶湖安曇川産アユの鱗数は 20~25 枚、宮城県吉田川及び鹿児島県天降川の海産天然アユは 17~23 枚という既報¹⁰⁾ と、本研究の基準集団である琵琶湖産の 19~24 枚、福岡県産天然海産の 18~22 枚はほぼ一致した。成羽川で採集されたアユのうち、天然海産種苗とダム湖産と判定された天然アユに側線上方横列鱗数 17 枚の個体がみられた。この違いは宮城県、福岡県、広島県といった生息湖沼の環境条件の違いに起因した地理的差

異かもしれない。さらに、琵琶湖産種苗と判定された1尾が鱗数15枚であった。この個体は琵琶湖産の長期育成種苗²⁵⁾である可能性が考えられる。以上のことから側線上方横列鱗数は本調査において多様な種苗が混在しているため、DNAマーカーおよびSr/Ca比分析の判別結果を立証する程度の効力しかなかった。しかし、天然アユと人工アユを判別するツールとしての有用性は高く、また、DNAマーカーやSr/Ca比分析と比べて利便性が高かった。

天然海産アユの下顎孔数は左右4対に対し、人工種苗では欠損個体が多く出現する。²⁶⁾しかし、本研究では成羽川で採集した琵琶湖産種苗やダム湖産は36.8～40.9%の欠損率を示したことや、人工種苗AとBの欠損率が60.0～70.6%に留まったため、判別ツールとしての有用性は低かった。琵琶湖産種苗と判別されたアユの欠損率が琵琶湖安曇川産より高かったことは、成羽川に放流された琵琶湖産種苗に長期畜養種苗が混入している可能性は否定できない。

成羽川ではダム湖産アユに加え、人工種苗、天然海産種苗、琵琶湖産種苗といった多系統の種苗が放流されていたにもかかわらず、DNAマーカー解析、耳石Sr/Ca比分析、計数形質を駆使することにより、個体レベルで系統を断定する事ができた。ただし、アユの計数形質は発育段階に応じた生息環境や飼育環境の影響を受ける可能性もある。系統判別に計数形質を利用する場合には、種苗放流に先立って当該河川において放流種苗を事前に入手することはもとより、照合のための基準集団として天然遡上アユを採集・確保し、指標形質を精査しておく必要がある。

系統の評価 琵琶湖産種苗の混入率は、友釣りでは61.7%、刺し網で58.6%、全体で60.2%に達し、資源貢献は多大であった。このことは、調査河川における放流量が1,500 kgと多かったうえ、調査年における放流後の生残率が高かったためと考えられる。また、成羽ダムで琵琶湖産起源の子孫が自殖している場合には、琵琶湖産種苗と判定された個体数が過大に推定される可能性がある。

天然海産種苗は放流量の割には全体の混入率が0.9%と低く、調査年における生残率が著しく低かったと考えられる。また、天然海産として持ち込まれた種苗に継代されたもの（他県の人工種苗）が含まれていれば、天然海産種苗の混入率を過小評価することになる。DNAマーカー解析により、海産系統に由来すると鑑定されたダム湖産の混入率は、友釣りにおいて28.3%で、琵琶湖産種苗に続く高い貢献度を示した。成羽川における陸封アユ（ダム湖産）の友釣りに対する貢献は、今後の自律的資源の活用事例として意義が大きい。他方、琵琶湖産種苗と同量放流された人工種苗の混入率は全体の

22.9%と低く、調査年における生残率（定着率）が低かった可能性がある。しかし、人工種苗の混入率は友釣りでは8.3%と低いのにに対し、刺し網では37.9%と相対的に高く、採集方法による違いが明らかとなった。これは、高く人工種苗が友釣りにおいてはやや釣れにくく、終漁期まで生残したために網漁における混入率が高くなった可能性が高い。このことは、人工種苗が網漁の資源として貢献度が高いだけでなく、友釣りの釣獲圧が低いため産卵期まで生き残る個体が多くなり、結果的にダム湖へのアユ資源添加の役割を担っていると考えられた。

ダム湖再生産アユについて ダム上流河川である成羽川では、放流種苗の生産的効果だけでなく、ダム湖内での自律的繁殖による新しい資源の添加効果が認められた。その資源は適切な資源管理が実施されれば、人工種苗を放流することと同程度の漁獲効果が期待され、今後のアユ資源の持続的利用への道を拓くものと考えられる。日本の河川において数多くのダムが建設されており、その上流区は種苗放流以外でアユを呼び戻すことは不可能と考えられてきた。ダム湖由来の再生産アユを適正に管理・活用することでダム上流区におけるアユの漁獲や遊漁を活性化させることが期待される。ただし、新成羽ダムでは調査の翌年にはダムの改修工事が行われ陸封集団は消失した可能性があるという。

ダム湖再生産アユは人工種苗と変わらない大きさまでに成長しており、友釣り資源としても大きく貢献していたことが本研究で確認された。これは、ダム湖産アユが早い時期に縄張りを保持し、大きく成長できたためと推察される。ダム湖産アユは生息する場所と遡上時期の条件次第で大きく成長することが期待される。今後、ダム湖陸封集団のアユの持続的資源利用に向けて、稚魚の生態や成長に関わる調査、さらには発生した稚魚の上流区への移植放流実施調査が必要と考えられる。

愛媛県野村ダム湖や広島県八田原ダム湖で再生産しているダム湖産アユは、琵琶湖産アユと海産アユの交雑集団であるとの報告がある。¹⁾成羽川においても、琵琶湖産アユと海産アユの両系統が放流されており、交雑の可能性は否定できない。成羽ダム陸封アユの遺伝的特性を含む資源・生態調査などの管理面からの調査も必要と考えられる。

今後の種苗放流の在り方 近年、琵琶湖産種苗の移植放流量は冷水病蔓延の影響により減少してきている。¹⁾さらに、各県におけるアユ人工種苗の生産量が年々増加しつつあり、琵琶湖産種苗への依存度は低いままで推移している。本研究においては、冷水病の影響が収束に至っていない中で、琵琶湖産種苗の放流効果が相対的に高く、漁業資源として貢献していることがわかった。また、人工種苗の採集率は刺し網では高いが、友釣りでは

低かった。人工種苗は群れを作りやすく縄張形成能が弱い可能性があり、このような人工種苗の特性を天然アユに近づけるために種苗生産技術の改良が試みられている。²⁷⁾ 一方、人工種苗が終漁期の9月まで多く生残しており、遺伝的特性を加味すれば人工種苗がダム湖産アユの再生産に関与した可能性が高い。幸いにもダム湖産アユの遺伝的多様性は比較的高かったが、本研究の遺伝解析で明らかになったような人工集団Aが再生産に多く関与することで遺伝的多様性を低下させることもある。次世代を見据え、遺伝的多様性を維持した人工種苗を放流していくことが重要な課題となる。

全国でのアユの放流尾数は1億3千万尾²⁾にも達し、種苗の生産コストは多大である。そのため、遺伝的多様性の保全に配慮したダム湖再生産アユの活用や天然アユの再生産促進のための産卵場造成など、自然サイクルを成り立たせることに力を注ぐことは意義深いと考えられる。

謝 辞

アユの標本採集にあたり、成羽川については東城川漁業協同組合の生熊剛士氏、琵琶湖産アユについては岐阜県河川環境研究所下呂支所の大原健一博士、福岡県産海産アユについては福岡県海洋技術センター内水面研究所の篠原直哉氏のご協力をいただいた。この場を借りて、厚く御礼申し上げる。

波長分散型電子線マイクロアナライザーに分析は広島大学自然科学研究支援センターの支援で行った。耳石の元素分析にあたり、ご協力頂いた同センターの柴田恭宏氏に謝意を表する。

文 献

- 1) 谷口順彦, 池田 実. アユ—アユの遺伝的多様性の利用と保全. 築地書館. 東京. 2009.
- 2) 2008年漁業サンサス. 農林水産省統計部. 東京. 2010.
- 3) 海野徹也, 柴 智久, 剣崎仁美, 柴田恭宏, 長澤和也. 耳石 Sr/Ca 比による広島県芦田川水系における陸封アユの確認. 広大院生物圏科紀要 2007; **46**: 35–42.
- 4) 片野 修, 海野徹也, 谷口順彦. アユの科学と釣り—美しい川とアユを願って—. 学報社. 東京. 2011.
- 5) 谷口順彦, 中嶋正道, 池田 実, 谷口道子, 高木秀蔵. アユの健苗性の促進に関する研究—人工種苗の遺伝的多様性と生態的特性の保全を目指して—. 高知県内水面種苗センター. 2005.
- 6) 野口大毅, 董 仕, 谷口順彦. 血縁度を用いたアユの両側回遊型および陸封型の個体判別. 水産増殖 2003; **51**: 219–224.
- 7) 久保田仁志, 手塚 清, 福富則夫. マイクロサテライト DNA マーカーによる釣獲されたアユの由来判別と種苗放流効果の評価. 日水誌 2008; **74**: 1052–1059.
- 8) Otake T, Uchida K. Application of Otolith Microchemistry for distinguishing between amphidromous and non-amphidromous stocked ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.* 1998; **64**: 517–521.
- 9) 清家 暁, 岡部正也, 佐伯 昭, 海野徹也, 大竹二雄, 中川平介. 耳石 Sr/Ca 比による高知県伊尾木川および物部川産アユの由来判別. 日水誌 2002; **68**: 852–858.
- 10) 石田力三. アユの生態と釣り. つり人社, 東京. 1988.
- 11) 廣瀬 充, 鈴木 信. 側線上方横列鱗数と下顎側線孔数からの人工アユと天然アユとの判別. 平成15年度福島県内水面水産試験場事業報告書 2003: 47–48.
- 12) Piotr C, Karol M, Roman D, William W. DNAzol®: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Bio Techniques* 1997; **22**: 550–553.
- 13) Takagi M, Shoji E, Taniguchi N. Microsatellite DNA Polymorphism to reveal genetic divergence in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.* 1999; **64**: 507–512.
- 14) Hara M, Sakamoto T, Sekino M, Ohara K, Matsuda H, Kobayashi M, Taniguchi N. Characterization of novel microsatellite DNA markers in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.* 2006; **72**: 208–210.
- 15) Banks MA, Eichert W. WHICHRUN (version 3.2): a computer program for population assignment of individuals based on multilocus genotype data. *J. Hered.* 2000; **91**: 87–89.
- 16) Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 1995; **86**: 485–486.
- 17) Excoffier L, Laval G, Schneider S. ARLEQUIN (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bio. Online* 2005; **1**: 47–50.
- 18) Rice WR. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 1989; **43**: 223–225.
- 19) Nei, N. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 1972; **106**: 283–292.
- 20) Tao M, Kuroki M, Michael JM, Ishida R, Tsukamoto K. Morphology and microchemistry of abnormal otoliths in the ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Env. Biol. Fish.* 2008; **83**: 155–167.
- 21) 井塚 隆. 海産アユと人工採苗アユの耳石形態の差異について. 神水研研報 2001; **6**: 11–19.
- 22) 池田 実, 高木秀蔵, 谷口順彦. マイクロサテライト DNA 分析によるアユ継代種苗の遺伝的変異性と継代数の関係. 日水誌 2005; **71**: 768–774.
- 23) 谷口順彦. 魚類の遺伝的多様性の保全と利用に関する研究. 日水誌 2007; **73**: 408–420.
- 24) Nishida M, Sawashi Y. Geographic differences in the number of longitudinal scales of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; **53**: 2089.
- 25) 渡辺健一, 保正竜哉. 吉野川における海産アユの資源尾数の推定. 日水誌 2003; **51**: 257–262.
- 26) 清田季義. 海産人工生産アユの下顎側線孔の欠損について. 熊本県水産研究センター研報 2002; **5**: 39–41.
- 27) 余語 滋. 天然魚を目指したアユ種苗生産. 日水誌 2010; **76**: 417–418.

Appendix Table 1 The typing records for each strain identification tool, and the results of strain identification for individuals sampled by angling from late July to mid August

No.	MS-DNA	PLJ	SALL	Sr/Ca	Result
1	LB	8	20		LB
2	A HH	8	13	H-3	HH-A
3	A AF	3	16	H-1	HH-B
4	LB	5	19	L	LB
5	LB	8	20		LB
6	LB	9	22	L	LB
7	LB	5	20	L	LB
8	LB	7	19	L	LB
9	LB	8	21		LB
10	LB	8	24		LB
11	A AF	8	21	L	LN
12	A AF	7	21	L	LN
13	A HH	8	22	L	LN
14	A AF	9	18	L	LN
15	LB	8	21		LB
16	LB	8	21	L	LB
17	A AF	10	20	L	LN
18	LB	8	24	L	LB
19	A AF	8	19	L	LN
20	LB	7	21		LB
21	A AF	8	19	L	LN
22	LB	7	24		LB
23	LB	7	22		LB
24	LB	7	20		LB
25	LB	6	24		LB
26	A AF	8	20	L	LN
27	LB	7	21		LB
28	A AF	8	18	L	LN
29	LB	6	22	L	LB
30	LB	9	21		LB
31	LB	8	24		LB
32	A AF	8	16	H-2	HH-B
33	LB	6	22	L	LB
34	LB	8	24	L	LB
35	LB	7	22	L	LB
36	LB	8	23	L	LB
37	LB	8	24		LB
38	A AF	8	17	A	AM
39	LB	8	21		LB
40	A HH	5	16	H-1	HH-A
41	A AF	4	14	H-3	HH-B
42	A AF	8	21	L	LN
43	LB	8	22		LB
44	A AF	8	20	L	LN
45	LB	8	22		LB
46	LB	8	24	L	LB
47	LB	7	20	L	LB
48	A AF	7	20	L	LN
49	A AF	7	20	L	LN
50	LB	8	23		LB
51	LB	7	21		LB
52	LB	8	22		LB
53	LB	8	20	L	LB
54	A AF	6	19	L	LN
55	A AF	5	17	L	LN
56	LB	8	20	L	LB
57	A AF	7	17	L	LN
58	A AF	8	19	L	LN
59	LB	7	22	L	LB
60	LB	7	22	L	LB

MS-DNA, Microsatellite DNA; PLJ, Pit organs on lower jaw; SALL, Scales above the lateral line; Sr/Ca, Sr/Ca concentration ratio from core to edge of sagittal otolith; Result, final identification considering all results of strain identification tools.

Appendix Table 2 The typing records for each characteristic and the results of strain identification for individuals sampled by gill net

No.	MS-DNA	PLJ	SALL	Sr/Ca	Result
1	LB	8	22		LB
2	A HH	8	16	H-1	HH-A
3	A AF	3	17	H-1	HH-B
4	LB	8	20	L	LB
5	LB	9	18	L	LB
6	LB	8	22		LB
7	A HH	5	16	H-3	HH-A
8	A AF	5	17	H-1	HH-B
9	LB	8	22		LB
10	LB	7	22		LB
11	LB	5	23	L	LB
12	LB	7	22		LB
13	LB	5	18	L	LB
14	LB	6	22	L	LB
15	LB	8	21		LB
16	LB	8	15	L	LB
17	LB	9	18		LB
18	LB	7	20	L	LB
19	A HH	6	15	H-3	HH-A
20	LB	9	23	L	LB
21	A AF	8	21	L	LN
22	LB	8	22	L	LB
23	LB	8	20		LB
24	LB	8	21	L	LB
25	LB	8	24		LB
26	LB	9	21		LB
27	LB	4	18	L	LB
28	A HH	8	16	H-3	HH-A
29	LB	8	22		LB
30	A AF	6	16	H-1	HH-B
31	A HH	4	15	H-1	HH-A
32	A HH	4	15	H-1	HH-A
33	A AF	7	15	H-2	HH-B
34	LB	4	21		LB
35	A AF	5	15	H-1	HH-B
36	A AF	6	15	H-2	HH-B
37	A AF	8	15	H-2	HH-B
38	A HH	7	13	H-1	HH-A
39	A HH	8	16	H-2	HH-A
40	LB	7	19	L	LB
41	A AF	2	16	H-1	HH-B
42	A AF	8	16	H-2	HH-B
43	A AF	8	15	H-1	HH-B
44	A AF	4	15	H-1	HH-B
45	A AF	6	16	H-1	HH-B
46	A AF	5	15	H-1	HH-B
47	A AF	6	22	L	LN
48	LB	5	21	L	LB
49	LB	8	24	L	LB
50	LB	6	21	L	LB
51	LB	9	21		LB
52	LB	8	22		LB
53	A AF	8	16	H-2	HH-B
54	LB	8	22	L	LB
55	LB	8	22	L	LB
56	LB	6	24	L	LB
57	LB	6	21		LB
58	LB	8	24	L	LB

MS-DNA, Microsatellite DNA; PLJ, Pit organs on lower jaw; SALL, Scales above the lateral line; Sr/Ca, Sr/Ca concentration ratio from core to edge of sagittal otolith; Result, final identification considering all results of strain identification tools.