

マルチプレックスPCR法による北海道北部に生息するイカナゴ属魚類の種判別簡易化の検討

後藤陽子^{*1}, 甲斐嘉晃², 堀本高矩¹, 坂口健司³, 美坂 正¹

¹北海道立総合研究機構稚内水産試験場

²京都大学フィールド科学研究教育センター舞鶴水産実験所

³北海道立総合研究機構中央水産試験場

Multiplex PCR-based molecular identification of *Ammodytes* species (Perciformes: Ammodytidae) caught in northern Sea of Japan, Hokkaido, Japan

YOKO GOTO^{*1}, YOSHIKI KAI², TAKANORI HORIMOTO¹, KENJI SAKAGUCHI³ and TADASHI MISAKA¹

¹ Wakkanai Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, *Wakkanai, Hokkaido 097-0001*

² Maizuru Fisheries Research Station, Field Science Education and Research Center, Kyoto University, *Maizuru, Kyoto 625-0086,*

³ Central Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, *Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan*

Japanese sand lances (*Ammodytes* spp.) are among the most important fish resources around northern Hokkaido. In this region, three sand lance species (western sand lance *A. japonicus*, Arctic sand lance *A. hexapterus*, and peaceful sand lance *A. heian*) are known to be sympatrically distributed. Therefore, to accurately evaluate the status of resource distribution of this genus, it is necessary to thoroughly understand their distributional characteristics. In this study, using multiplex PCR, which can easily identify species, as indicated in previous studies, an easier and more rapid method of identifying species belonging to this genus was developed. Using this method, the western and Arctic sand lances could be easily differentiated. However, the precise identification of peaceful sand lance species was slightly difficult with this technique. This technique was shown to be useful for initially screening the species from samples. This study suggested that for understanding the distributional characteristics of these species in Hokkaido, detailed sampling of each area in each season is necessary.

キーワード：イカナゴ *Ammodytes japonicus*, オオイカナゴ *A. heian*, キタイカナゴ *A. hexapterus*, 種判別, マルチプレックスPCR法

北海道周辺海域においてイカナゴ属魚類 (*Ammodytes* spp.) は、宗谷海峡東部で沖合底びき網、利尻・礼文島周辺海域ですくい網、後志周辺海域で稚魚が敷網で漁獲され、各地域における重要な水産資源となっている (星野, 2010; 岡本ら, 2017; 美坂, 2017)。これまで、宗谷海峡に分布するイカナゴ属魚類には、イカナゴ (*A. japonicus*) およびキタイカナゴ (*A. hexapterus*) とさらにそれらのハイブリッドが存在するとされ (田中, 2004)、これらは同時期に混在して漁獲されることから、主に耳石輪紋の形状から2種の判別がなされてきた (田

中, 2004)。

しかし近年、Orr *et al.* (2015) による環太平洋北部隣接海域に分布するイカナゴ類の形態学・分子生物学的研究により、宗谷海峡には前述の2種に加え、オオイカナゴ (*A. heian*) が分布することが明らかとなった。種ごとの資源評価を行うためには、これら3種の分布特性の把握が必要であるが、外部形態による3種の識別は困難とされている (Orr *et al.*, 2015)。甲斐・美坂 (2016) およびTanaka *et al.* (2016) は、ミトコンドリアDNAのCOI領域における塩基配列に着目し、それぞれマルチプレッ

Table 1 List of primer pairs used in this study

Primer name	Sequence 5'-3'	Product size (bp)	Reference
AmjpnF	GTACGGCTCACACAAATAAAGGTCTT	about 500	Kai & Misaka (2016)
AmhexF	AGGGTGGGAGGAGTCAAAGGTC	about 300	Kai & Misaka (2016)
Reverse	GGCACCCCTTTATCTAGTATT		Orr <i>et al.</i> (2015)
L-M-12S	ACAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCC	1,526	Matsui <i>et al.</i> (2012)
H-A-16S	GTTTTTGGTAAACACGCGAGGCTTATGTTTGCCG		Matsui <i>et al.</i> (2012)
F	CTCCTGCAGGGTCAAAGAAG	638	Orr <i>et al.</i> (2015)
R	GGCACCCCTTTATCTAGTATT		Orr <i>et al.</i> (2015)

クスPCR法, PCR-RFLP法によって, 塩基配列の解読が不要なイカナゴ類の種判別法を開発した。

一般に, 資源評価のためには多数の漁獲物標本を生物測定することが必要であり, 北海道のイカナゴ属魚類についても年間千尾以上の生物測定が行われている (坂口, 2016; 美坂, 2017)。そのため, 多数標本の種判別を行う場合は, より簡便・安価に判別可能な手法が望ましい。甲斐・美坂 (2016) では, DNA抽出キットを用いることにより簡便に総DNAの抽出を行っているが, Tanaka *et al.* (2016) ではTruett *et al.* (2000)によるHotSHOT法に基づく組織片のライセート調整法 (Tanaka *et al.*, 2014)を用い, 総DNAを抽出することなく実験を行っている。しかし, Tanaka *et al.* (2016)で行われたPCR-RFLP法では, 0.1 - 2.1%程度, イカナゴとオオイカナゴが判別できないハプロタイプが存在することが示された。そこで本研究では, 簡便且つ安価な種判別法の確立を目指し, 組織片からのダイレクト法およびDNAの簡易抽出法であるライセート調整による, マルチプレックスPCR法の有効性を検討した。

試料及び方法

DNA簡易抽出法の検討

1. 供試標本 甲斐・美坂(2016)により, あらかじめ塩基配列に基づき種が判別されている, 2015年に宗谷海峡において漁獲されたイカナゴ, キタイカナゴおよびオオイカナゴのエタノール保存肉片を用い, 粗DNAの簡易抽出法について検討した。

2. サンプル調整法 ポジティブコントロール用総DNAの抽出には, DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN社製)を用い, プロトコルに従いそれぞれ20-50μgの総DNAを得た。

サンプルには手順をより省略した手法を比較検討することを目的とし, 1:肉片約10mg, 2:肉片約10-50mgをアルカリ溶液で溶解したものを使用した。1については,

肉片を採取しPBSにて2回洗浄してエタノールを除去した後, ホモジナイザーにより手動で軽く肉片を粉碎した。2については, 肉片に50mM NaOH 180μl を添加し, ボルテックスにて攪拌後, 85または95℃のブロックヒーターにて10分インキュベートした。溶解液に1M Tris - HCl (pH 8.0) 20μlを添加し, ボルテックスにて攪拌後, 12,000rpmにて5分遠心し, 上清(粗DNA)をテンプレートとした。本手法は, Takara社によるクルードサンプルからのライセート調整法 (http://lifescience.toyobo.co.jp/user_data/pdf/products/KFX-201.pdf: 2017年10月27日) およびTanaka *et al.* (2014)に準拠した。

PCR用プライマーは, イカナゴおよびキタイカナゴそれぞれに特異的なプライマー (甲斐・美坂, 2016) とポジティブコントロール用魚類共通ユニバーサルプライマー (Matsui *et al.*, 2012) を使用した (Table 1)。マルチプレックスPCRの設計は, 甲斐・美坂 (2016) に準拠し, 以下の通りとした。反応液の組成は, 1.0μlのDNA溶液またはホモジナイズした肉片総量, 5.0μlの KAPA2G Robust HS ReadyMix with dye (KAPA BIOSYSTEMS社), 5pmolに調整した各プライマー (各0.5μlのAmjpnF とAmhexF, 1.0μlのリバースプライマー [Orr *et al.*, 2015], 各0.5μlのL-M-12S とH-A-16S) とし, 1.0μlの超純水を加えて総量を10μlとした。Eppendorf社製PCRマスターサイクラー-nexus gradient によるPCR条件は, 94℃ 5分の熱変成後, 94℃ 15秒, 58℃ 15秒, 72℃ 30秒を30サイクルとし, 最後に72℃ 7分の伸長を行った。得られたPCR産物は1.5% TBEアガロースゲル (ニッポンジーン社 Agarose S) にGelRed (Biotium社) を100mlあたり8μl添加したものを使用して, TBE緩衝液により電気泳動し, 得られた泳動像を観察した。

漁獲物の種判別法の検討

1. 試料の収集 2016年4月から11月にかけて, 北海道のイカナゴ魚類の主産地である後志南部海域 (島牧村沖合), 後志北部海域 (余市町沖合), 利尻島周辺海域, 宗

Table 2 Specimens of *Ammodytes* species examined in this study, caught in 2016

Sampling group	Date	Fishing type	Number of samples	Average body length (mm)	±S.D.	Body length range (mm)		
						min.	max	
Sea of Japan								
South Shiribeshi (Shimamaki)								
	13-Apr	scoop net	50	19.1	3.8	12	25	
	6-May	lift net	50	31.4	6.6	16	45	
	23-May	lift net	50	31.7	2.3	26	38	
North Shiribeshi (Yoichi)								
	2-May	lift net	50	40.4	3.6	30	47	
Rishiri Island								
	23-Apr	dip net	50	183.1	11.3	161	206	
	19-May	dip net	50	209.4	11.1	190	243	
Sea of Okhotsk								
Soya Strait (Off the east of Cape Soya)								
	23-May	sledge net	1	166				
	3-Jun	otter trawl	50	216.4	19.4	181	260	
	12-Jul	otter trawl	50	193.2	14.4	158	216	
	8-Aug	otter trawl	50	199.9	16.4	176	267	
Sarufutsu								
			Mar. total					
	18-Mar	scallop beam trawl	2	43	166.2	16.9	124	198
	23-Mar	scallop beam trawl	6					
	24-Mar	scallop beam trawl	2					
	25-Mar	scallop beam trawl	11					
	26-Mar	scallop beam trawl	11					
	27-Mar	scallop beam trawl	9					
	28-Mar	scallop beam trawl	2					
			Apr. total					
	20-Apr	scallop beam trawl	2	2	121.5	2.1	120	123
			May total					
	6-May	scallop beam trawl	1	14	175.9	19.1	157	224
	16-May	scallop beam trawl	2					
	20-May	scallop beam trawl	1					
	21-May	scallop beam trawl	4					
	23-May	scallop beam trawl	7					
			Jun. total					
	4-Jun	scallop beam trawl	7	29	174.3	18.7	128	212
	6-Jun	scallop beam trawl	4					
	7-Jun	scallop beam trawl	1					
	8-Jun	scallop beam trawl	6					
	14-Jun	scallop beam trawl	1					
	15-Jun	scallop beam trawl	1					
	29-Jun	scallop beam trawl	9					
			Jul. total					
	6-Jul	scallop beam trawl	10	39	174.2	26.0	82	203
	21-Jul	scallop beam trawl	29					
	19-Sep	scallop beam trawl	28	28	161.3	18.2	125	198
	3-Nov	scallop beam trawl	22	22	148.7	29.4	93	185

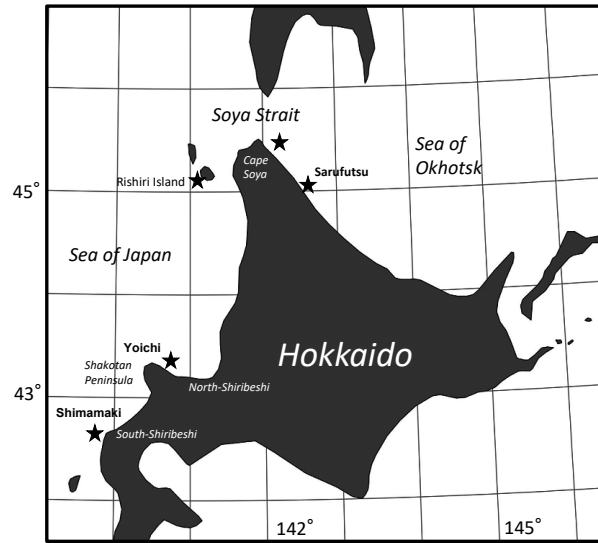


Fig.1 Map of Hokkaido showing sampling localities of *Ammodytes* spp.
★: sampling site

谷海峡東部海域, および猿払村沖合海域 (Fig.1) において漁獲されたイカナゴ属魚類629個体を実験に供した (Table 2)。

収集した試料のうち, 利尻島, 猿払および宗谷海峡東部海域の一標本については, 漁獲後測定時まで冷凍保存とし, 測定前に常温にて解凍した。後志 (余市・島牧) の試料については, デジタルキャリパーで肉体長を0.01mm単位で計測後, 直ちに全身を70%エタノールにて常温保存した。その他海域の試料については, 測定板を用いて1mm単位で肉体長を計測後, 筋肉片1個体につき2g程度採取し, 99.9%エタノール中にて分析時まで常温保存した。

2. 漁獲物の種判別法の検討 前述のDNA簡易抽出法の検討結果を踏まえ, 宗谷海峡東部海域で6月に漁獲された標本50個体について, DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN社) により総DNAを抽出し, 別途10 - 50mg程度の試料についてアルカリ溶液によるライセート調整を行った。総DNAについては, 分析時まで-20℃にて冷凍保存とし, ライセート試料については, 分析時まで4℃にて保存した。これらのPCR条件および泳動法については, 前述のとおりである。

総DNAをテンプレートとした試料のうち, 明瞭なバンドが得られなかった標本について, Orr *et al.* (2015) および甲斐・美坂 (2016) に従い, 塩基配列の解読を行い, 種を決定した。その際の条件は, 以下の通りとした。Orr *et al.* (2015) により設計されたプライマーを使用し (Table 2), COI領域638bpをPCR法により増幅した。DNAテンプレートに1.0μl, 5pmolプライマー各1.0μl, 5.0μl

のKAPA2G Robust HS ReadyMix with dyeに超純水を2.0μl加え, 総量を10μlとした。PCR反応は, 94℃で5分熱変成後, 94℃ 15秒, 62℃ 15秒, 72℃ 30秒を30サイクル後, 72℃で7分の伸長を行った。得られたPCR産物をExoSAP-IT (Affymetrix) を用いてプロトコルに従い精製し, BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) とDNAシーケンサー (310 Genetic Analyzer, アプライドバイオシステムズ) を用いて塩基配列を決定した。MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) を用いてTamura and Nei (1993) の距離を求め, 近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) により系統樹を構築した。各分岐の信頼度の評価には, 同じアルゴリズムを使った1,000回の繰り返しによるブートストラップ法 (Felsenstein, 1985) を用いた。得られた系統樹をもとに, 本研究で用いた個体について種を同定した。

北海道周辺海域における漁獲物の種判別 全標本について, ライセート調整法によって抽出した粗DNAをPCR分析し, 各地の漁獲物を種判別した。PCR条件および泳動法については, 前述のとおりである。

結果

DNA簡易抽出法の検討 DNeasy Blood & Tissue Kit により抽出した総DNA, 肉片およびライセート調整法による粗DNAを試料としたPCRの結果, 総DNAについては, 目的とする位置にバンドが得られたことが確認され, ポジティブコントロールとして使用可能であることが示された (Fig.2)。また, ライセート調整粗DNAについても, ポジティブコントロールと同様の結果が得られたが, 肉片からのダイレクトPCRについては, DNAの増幅が確認されなかった (Fig.2)。

漁獲物の種判別法の検討 宗谷海峡東部海域の6月標本について, ライセート調整法により抽出した粗DNAのマルチプレックスPCR結果を, 総DNA抽出による結果と比較したところ, 両手法において種判別結果が一致したものは, 全50試料中30個体であった (60%)。また, 結果が一致しなかったか, もしくは種が判別できなかった20個体は, 目的とするイカナゴおよびキタイカナゴそれぞれの特異的バンド位置にバンドが確認されたものであった (Fig.3)。これらはユニバーサルプライマーによるバンドと比較して色が薄いことから, アニーリング時における非特異反応の可能性が考えられた。そこで, PCRにおける最初の熱変成温度を93 - 95℃の間に0.1℃ずつ変化させて設計し, その他条件は同様にグラディエントPCRを行ったが, 結果は同様であった。また, テンプレートの濃度について, 2 - 10倍まで希釈し, それぞ

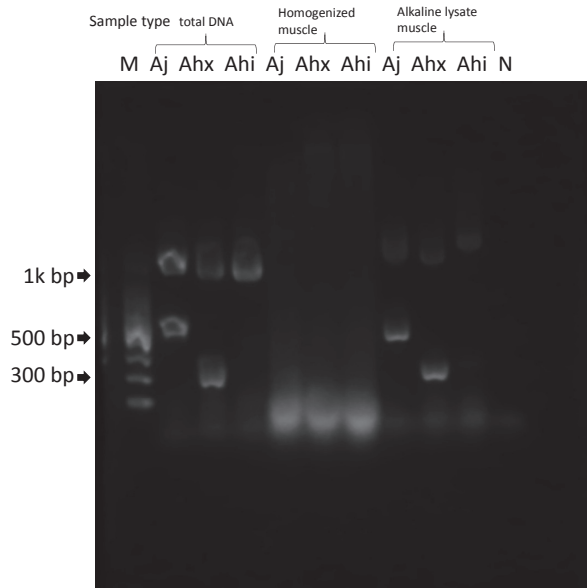


Fig.2 Multiplex PCR amplification of DNA from three *Ammodytes* species, *A. Japonicus*: Aj, *A. hexapterus*: Ahx, and *A. heian*: Ahi. M: molecular-weight size marker for total DNA (isolated from muscles using a kit), homogenized muscles (muscle samples were homogenized manually), alkaline muscle lysate (crude DNA from muscle lysates was extracted with hydroxide and Tris-HCl), N: negative control (UPDW).

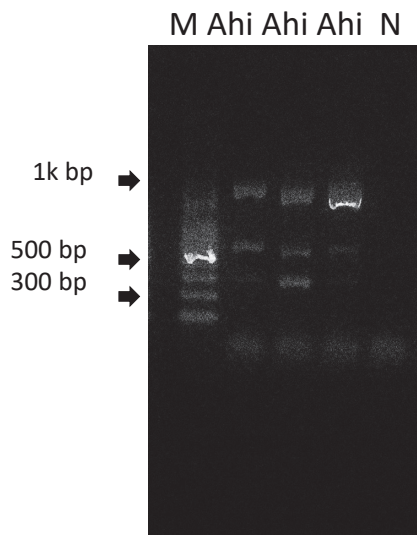


Fig.3 Multiplex PCR amplification of DNA from *Ammodytes heian* (Ahi) showing two nonspecific bands. M: molecular-weight size marker, N: negative control (UPDW). Species identification for these samples was performed by sequencing.

れPCRを行ったが、泳動結果は同様であった。そこで、総DNAをテンプレートとしたPCRにおいて比較的濃色な2本のバンドが見られた7個体について、シーケンスによる種同定を行った結果、これらは全てオオイカナゴ

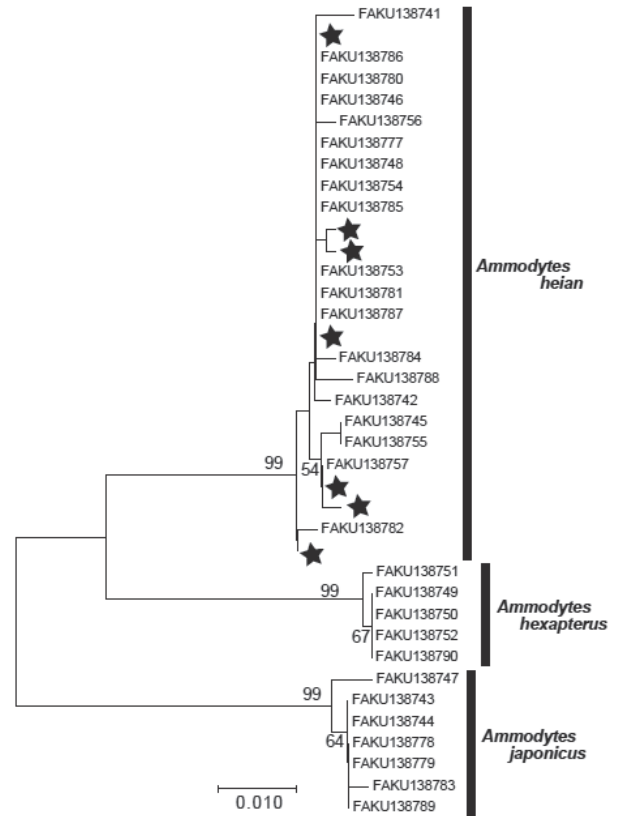


Fig.4 Trees constructed using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) based on sequences of *Ammodytes* spp. Numbers on branches indicate bootstrap support. FAKU13****: specimen registered by Kai and Misaka (2016), ★: unidentified samples analyzed by multiplex PCR

であった (Fig.4)。さらに、ライセート調整試料のテンプレートを超純水にて2倍希釈し、同様にPCRを行ったところ、ほとんどの個体がオオイカナゴの泳動パターンを示した。

通常のオオイカナゴタイプの泳動パターン以外に、バンドが不鮮明もしくは2本みられたものを“オオイカナゴ”と定義した場合、両手法における結果が全て一致した。

北海道北部沿岸域における漁獲物の種判別 全試料について、ライセート調整による粗DNAをテンプレートとしたPCRにより種判別を行った。PCRはそれぞれ全試料について2回以上実施し、同じ結果が2回以上得られたものを種判別結果として採用した。ライセート調整試料については、得られるDNA濃度が一定でないことから、複数回実験を行う必要があった。実験2回のみで種が確定した個体は、全629個体中、229個体 (36.4%) であった (Table 3)。種別にみると、イカナゴおよびキタイカナゴでは、種の確定まで4回以上実験を要した個体は、それぞれ48個体 (18.1%)、2個体 (9.5%) と少なかった

Table 3 Number of times of experiment conduction to identify *Ammodytes* spp. N: number of identified species among the three *Ammodytes* spp. When the same result was obtained more than twice in the experiments with each sample, the species was determined.

Experiment times	<i>A. Japonicus</i>		<i>A. hexapterus</i>		<i>A. heian</i>		un identified
	N	%	N	%	N	%	
	2	137	51.7	9	42.9	83	
3	80	30.2	10	47.6	112	32.9	
≥4	48	18.1	2	9.5	145	42.6	3
total	265		21		340		3

のに対し、オオイカナゴでは145個体(42.6%)と非常に多かった。これは、オオイカナゴの試料を泳動した際に、イカナゴおよびキタイカナゴ特異の位置に非特異のバンドがみられることが多かったことによる。また、使用したテンプレートに含まれるDNA量が少ないかもしくは多かった場合には、魚類共通ユニバーサルプライマー(ポジティブコントロール)による増幅も確認されないうことが多かった。これらについては、テンプレート濃度を調整し、ポジティブコントロール位置にバンドが得られたものについて、オオイカナゴと特定した。最終的に、複数回実験を繰り返しても判別不可能であった個体については、総DNAを抽出して同様の実験を行うことで種判別に至った。これらは全てオオイカナゴであった。また稚魚試料のうち3個体について、魚体が極端に小さかったこともあり、試料が不足したため種判別に至らなかった。

全試料中イカナゴは265個体、キタイカナゴは21個体、オオイカナゴは340個体で、オオイカナゴが最も多かった(Table 3, 4)。海域別にみると、キタイカナゴはオホーツク海の宗谷海峡東部および猿払村沖合海域で得られた標本からのみ出現し、日本海の後志南・北部および利尻島の標本からは出現しなかった(Table 4)。後志南部では、5月6日に得られた標本では、イカナゴ(34%)よりオオイカナゴ(67%)が多かったが、それ以外の時期は同程度であった。後志北部ではイカナゴ(22%)よりオオイカナゴが多かった(78%)。利尻島で得られた標本については、4月標本では、イカナゴ(30%)よりオオイカナゴ(70%)の方が多かったが、5月標本では同数であった。宗谷海峡東部海域については、1個体のみしか得られなかった5月を除き、月別に3種の出現頻度が異なり、キタイカナゴは6月の標本からのみ出現した(8%)。また、8月の標本では、イカナゴの割合が78%と高かった。猿払村沖合海域については、標本収集期間を通じてオオイカナゴの方がイカナゴより多い傾向があったが、9月に漁獲された標本については、キタイカナゴが

Table 4 Number of identified *Ammodytes* species using multiplex PCR

Sampling area	Date/Month	Number of samples	Result of species identification			
			<i>A. Japonicus</i>	<i>A. hexapterus</i>	<i>A. heian</i>	un identified
Sea of Japan						
South Shiribeshi (Shimamaki)						
	13-Apr	50	22		25	3
	6-May	50	17		33	
	23-May	50	27		23	
North Shiribeshi (Yoichi)						
	2-May	50	11		39	
Rishiri Island						
	23-Apr	50	15		35	
	19-May	50	25		25	
Sea of Okhotsk						
Soya Strait (Off the east of Cape Soya)						
	23-May	1			1	
	3-Jun	50	29	4	17	
	12-Jul	50	27		23	
	8-Aug	50	39		11	
Sarufutsu						
	Mar.	43	12	1	30	
	Apr.	2			2	
	May	14	4		11	
	Jun.	29	13		16	
	Jul.	39	11	4	24	
	Sep.	28	6	12	10	
	Nov.	22	7		15	

多く出現した(42.8%)。したがって、同一海域において漁獲された試料についても、採集された日によって種組成が異なることが示された。

考 察

漁獲物の種判別法の検討 本研究の結果、総DNAを抽出することなく、マルチプレックスPCR法により簡易的にイカナゴ属3種を判別する手法が確立された。本手法では、作業の簡素化と時間短縮により、専門的な技術を要しない試料の前処理や大量試料の迅速な診断が可能となった。特にイカナゴおよびキタイカナゴについては、適正な量の肉片を使用することにより、ほぼ正確に判別することが可能であった。したがって、RFLP法において報告されているイカナゴとオオイカナゴの混同(Tanaka *et al.*, 2016)といった誤判別は避けることができる。また、田中(2004)による耳石形状に基づいた種判別法では、キタイカナゴタイプの耳石にもオオイカナゴ、イカナゴがそれぞれ含まれる上、タイプの判別が困難な耳石がみられる(堀本・美坂, 私信)。一方、本手法においては、オオイカナゴに非特異バンドがみられることが多く、判別が困難な場合が多かった。しかし、このような試料については、塩基配列による種判別および総DNAを抽出した試料をテンプレートとした場合の種判別結果から、ほぼオオイカナゴであると考えられた。したがって、本手法により、イカナゴ、キタイカナゴ、「未確定を含むオオイカナゴ」として1次スクリーニングを

ほぼ確実に行うことが可能となった。

後志南部・北部海域の試料については、すべて体長50mmに満たない個体（稚魚）であり、これらは魚体の一部を切除して実験に供したが、骨・内臓などを含んでおり、成体の肉片試料と同じ条件では良好な結果が得られにくかった。要因としてライセート調整試料に含まれるDNA量が比較的少なかったことが考えられたため、PCR時のテンプレート量を2倍にするなど適宜調整する必要があり、稚魚については本手法を用いるより、総DNAを抽出した方がむしろ迅速な判別が可能であると判断された。

北海道北部沿岸域における漁獲物の種判別 本研究の結果、海域や採集日により種組成が異なることが示された。後志南部海域では、5月上旬に得られた標本を除き、イカナゴとオオイカナゴはほぼ同じ割合でみられたが、北部海域で得られた標本は、オオイカナゴがイカナゴより多かった。星野（2010）は、後志周辺海域には、積丹半島先端周辺と寿都～島牧の2海域に本種の主要な産卵場が存在し、北部海域と南部海域で漁獲される稚魚資源の産卵海域が異なる可能性を指摘している。本研究の結果から、これらの産卵場間では親魚の種組成が異なる可能性が考えられた。また、5月上旬の標本では、後志南部海域と後志北部海域で類似した種組成となっていた。後志北部海域については、1標本のみの結果であるため、他の時期の種組成についても検討する必要がある。加えて、星野（2010）による稚魚のふ化日組成および成長についても、種判別結果をもとに再検討することで、両海域における資源動態についてより詳細に把握することが可能となる。

利尻島および宗谷海峡東部海域では、採集時期により種組成が異なっていた。また、日本海の試料からはキタイカナゴは出現せず、イカナゴおよびオオイカナゴの組成比が変化するのみであったが、オホーツク海ではキタイカナゴが優占的に出現する時期があった。本研究から、いずれの海域でも採集日により種組成が変化することが示された。このことは同じ海域内においても種組成が位置や時期に応じて変化することを示唆している。そのため種別に資源評価や生態研究を行うためには、サンプリングの回数をできるだけ多くする必要がある。

謝 辞

標本の収集に際し、稚内機船漁業協同組合、猿払村漁業協同組合、余市郡漁業協同組合、島牧漁業協同組合、宗谷地区水産技術普及指導所利尻支所および後志地区水産技術普及指導所岩内支所により多大なるご協力を賜

た。また、研究の遂行にあたり、稚内水産試験場山口幹人調査研究部長はじめ職員一同ならびに契約職員諸氏には有益な助言および協力を賜った。記して謝意を表す。

引用文献

- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39: 783–791.
- 星野昇. 後志北部海域沿岸におけるイカナゴ稚魚漁業の特徴について. 北水試研報 2010; 78: 51–58.
- 甲斐嘉晃, 美坂正. 日本産イカナゴ属魚類の簡便な遺伝的識別方法の開発. タクサ 2016; 41: 1–7.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 2016; 33: 1870–1874.
- Matsui S, Nakayama K, Kai Y, Yamashita Y. Genetic divergence among three morphs of *Acentrogobius pflaumi* (Gobiidae) around Japan and their identification using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyological Research* 2012; 59: 216–222.
- 美坂正. イカナゴ類（宗谷海峡海域）. 2016年度資源評価書. (<http://www.fishexp.hro.or.jp/exp/central/kanri/SigenHyoka/Kokai/>) 2017 (2017.11.1)
- 岡本俊, 加賀敏樹, 山下紀生, 船本鉄一郎. 平成28 (2016) 年度イカナゴ類宗谷海峡の資源評価. 平成28年度魚種別系群別資源評価. (<http://abchan.fra.go.jp/digests28/details/2851.pdf>) 2017 (2017.10.24)
- Orr JW, Wildes S, Kai Y, Raring N, Nakabo T, Katugin O, Guyon J. Systematics of north Pacific sand lances of the genus *Ammodytes* based on molecular and morphological evidence, with the description of a new species from Japan. *Fishery Bulletin* 2015; 113: 129–156.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987; 4: 406–425.
- 坂口健司. イカナゴ. 「平成27年度道総研中央水産試験場事業報告書」 北海道立総合研究機構水産研究本部, 余市. 2016; 35–36.
- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 1993; 10: 512–526.
- Tanaka C, Shirotori F, Sato M, Ishikawa M, Shinoda A, Aoyama J, Yoshinaga T. Genetic identification method for two subspecies of the Indonesian short-finned eel,

- Anguilla bicolor*, using an allelic discrimination technique. *Zool. Stud.* 2014; 53: 57.
- Tanaka C, Aoki R, Ida H, Aoyama J, Takeya Y, Inada M, Uzaki N, Yoshinaga T. Molecular genetic identification of Japanese sand lances using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit 1 restriction fragment length polymorphism. *Fish. Sci.* 2016; 82: 887-895.
- 田中伸幸. 耳石を用いたイカナゴ属2種の種判別 (短報). 北水試研報 2004; 67: 109-111.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and TRIS (HotSHOT). *Biotechniques* 2000; 29: 52-54.