

クローンヒラメのクローン性の証明と系統判別

第1報 DNAフィンガープリント法による証明と判別

森 立成^{*1}, 齊藤節雄^{*2}

Verification and identification of clonal lines induced by chromosome manipulation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

I. Verification and identification by DNA fingerprintings

Tatsunari MORI^{*1}, Setsuo SAITOH^{*2}

DNA fingerprints were applied for confirmation and identification of clones induced by the suppression of the first cleavage in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. The samples used were 9 homozygous and 3 heterozygous clonal lines. Verification and detection of clonal lines were done by the multilocus DNA fingerprinting and the PCR (polymerase chain reaction)-based DNA fingerprintings, RAPD (random amplified polymorphic DNA) and TREP (tandem repeat primed). All the fragments of multilocus fingerprinting were shared among individuals within the same clonal lines. However, in normal diploids, the pattern of the bands detected were different among individuals. PCR-based fingerprintings were distinguishable between 9 different clonal lines by DNA banding pattern. DNA fingerprinting analyses would be suitable for the application in studies on inbreeding and for the identification of individuals and families.

キーワード：ヒラメ，クローン，DNAフィンガープリント，PCR

はじめに

クローン魚集団は遺伝的に均質であるため，養殖に用いた場合，大きさ，肉質等極めてバラツキの少ない均質な製品が出来上がるというメリットが期待される。一方，増養殖研究における実験魚^{1,2)}としても，遺伝的均一性を確保出来るので，非常に利用価値の高いものである。

染色体操作法を応用して第一卵割阻止型雌性発生二倍体（以下G2と略記）を作出し，その次世代を再び雌性発生を行うことによりクローン魚を作出する試みは，ゼブラフィッシュ³⁾で成功して以来，様々な魚種で取り組まれ，メダカ⁴⁾，アユ⁵⁾，アマゴ⁶⁾，コイ⁷⁾等の淡水魚で成功している。これに対して海産魚における成功例は，ヒラメ⁸⁾とマダイ⁹⁾のみである。

クローン魚の作出にはG2の作出が不可欠であるが，G2魚の生存率は，処理自体の副作用や劣性有害遺伝子の顕在化により，著しく不良であるケースがほとんどであり，僅かに生き残った個体が成熟に達しても，卵質が

不良で，次世代(クローン)作出に至らないことも多い¹⁰⁾。

近年，クローン魚等の遺伝的均一性の確認や系統判別を行うため，通常のマルチローカスフィンガープリント法¹¹⁾の他に，核ゲノム上の変異を迅速かつ簡易に推定するRAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) が開発されてきた。¹²⁾この方法は，従来のフィンガープリント法と同等の多型検出感度を持ち，操作は通常のPCR法と同等に簡便であることから，陸上動植物の集団遺伝学や育種の分野で急速に普及している。一方，TREP-PCR (Tandem Repeat Primed PCR) は，ゲノム中に散在するマイクロサテライトを直接プライマーに用いるPCR法を応用したフィンガープリント法として注目される¹³⁾。

本研究では，道立中央水産試験場において，染色体操作法により作出したホモ型クローンヒラメおよびこれらのかげあわせによるヘテロ型クローン数系統を材料に，DNAフィンガープリント等多型解析法を用いて，クローン性の証明およびクローン系統を判別することを目的とした。

報文番号A377 (2004年7月9日受理)

*1 北海道立中央水産試験場北海道立中央水産試験場 (Hokkaido Central Fisheries Experimental Station, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan)

*2 北海道立栽培漁業総合センター (Hokkaido Institute of Mariculture, Shikabe, Hokkaido 041-1404, Japan)

材料および方法

1. ホモ型クローンの作出

1995年に寿都産天然ヒラメおよび島牧産人工ヒラメ親魚それぞれ5~6個体から搾出した卵および精子を材料に、G2を作出した。1997年および1998年には、これらを再び雌性発生（第二極体放出阻止型）を行うことによりホモ型クローンヒラメ9系統（71, 72, 73, 74, 75, 77, 82, 83, 90）を作出した（Fig 1）。なお、雌性発生方法（染色体操作処理）は、次のとおりである。

(1) 精液の希釈：カレイ用リングル液（pH6.0）で約50倍に希釈したヒラメ精液を、周縁にワセリンを塗ったφ90mmのガラスシャーレに0.1~0.3mmの深さになる様に1.5ml 滴下し、均一に広げた。

(2) 紫外線照射による精子の遺伝的不活化：暗箱の上にUVランプ（東芝GL-15, 2灯）を取り付け、その直下30cmに設置したシェーカー（アイラシェーカーミニ）上に精液を広げたφ90mmのガラスシャーレを置き、振とうさせながら紫外線照射量760ergs/mm²・sec×60sec = 4,560ergs/mm²になるように照射した。

(3) 卵核染色体の倍加：紫外線処理精子媒精後、2分後（第二極体放出阻止）および60分後（第一卵割阻止）に、バイオプレス（大岳製作所）で650kg/cm²の圧力で6分間加圧した。

2. ヘテロ型クローンの作出

遺伝的に雌であるホモ型クローンヒラメの一部の系統を、メチルテストステロン（MT）で処理することにより、性転換雄（偽雄）を作出した。すなわち、所定濃度の性ステロイドを含有する配合飼料を、常法¹⁴により作製し、平均全長15mm~50mmの仔稚魚に、1.0μg/g飼料の濃度のMTを経口投与¹⁵することにより、3系統の偽雄クローン（71, 75, 77）を作出した。これら3系統の精子を、他の系統（72, 77, 90）のホモ型クローン魚の卵に媒精することにより、ヘテロ型クローン（71×90, 75×77, 77×72（♂×♀））を作出した（Fig.1）。

3. DNAフィンガープリント

(1) マルチローカスDNAフィンガープリント

ヒラメの尾柄部から血液を採取し、TNES-Urea buffer¹⁶に保存した。これらから、セバジーン（三光純薬）によりゲノムDNAを抽出し、制限酵素HaeIIIで消化した。DNA断片を0.8%アガロースゲル電気泳動により展開したのち、メンブランフィルターにプロットした。合成オリゴヌクレオチド（GACA）4プローブをジゴキシゲニン標識（Boehringer Mannheim, 米国）した後、標識プローブをメンブランフィルター上のDNAに結合させた。標識プローブのルミノール反応により高感度X線フィルム（Kodak）に感光させ、DNAフィンガープリント像を得た。系統内および個体間のフィンガープリントにおけるバンド数を1.5~20.0Kbpの範囲で計数し、次式により、遺伝的類似度（BSI）を求めた。

$$BSI = 2 NAB / (NA + NB)$$

NA： 個体Aのバンド数

NB： 個体Bのバンド数

NAB： 個体AとBの共通バンド数

(2) PCR法をベースにしたDNAフィンガープリント

カナダのブリティッシュコロンビア大学製（UBC）と和光純薬製（WAB）の10~12塩基のランダムプライマーを用いたRAPD法では、合計42種類のプライマーの中から多型性を示すものを予め選択した。同様にブリティッシュコロンビア大学製（UBS）のマイクロサテライトを直接プライマーとしたTREP法においても、100種類予め選択し用いた。Table 1 に実際に使用したランダムプライマーの塩基配列を示した。PCR増幅は、ゲノムDNA40ngを鋳型に、プライマー20nmol, AmpliTaq Gold（Perkin Elmer）0.5Unitおよび添付のPCR buffer, MgCl₂, dNTPmixtureを加え、最終反応量20μlに調整したものを、サーマルサイクラー（Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer）で行った。RAPD-PCRの場合は、94℃で10分間1サイクルした後、94℃1分間、36℃1分間、

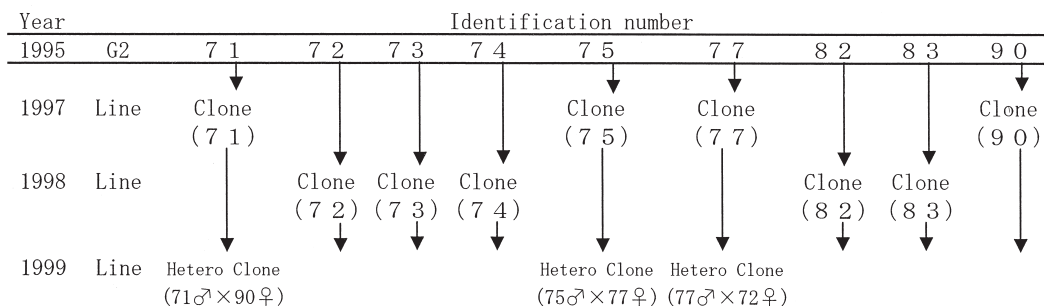


Fig. 1 Schematic diagram for the production of mitotic-gynogenetic diploids and clones.

72℃ 2分間を45サイクルさせた。一方、TREP-PCRの場合は、94℃で10分間加熱した後、94℃ 1分間、56℃ 1分間、72℃ 2分間を45サイクルさせた。PCR産物を1.2%アガロースゲル電気泳動により展開し、ゲルスター (TaKaRa) で染色した後、トランスイルミネーターで可視化像を得た。

Table 1 Nucleotide sequences of the random primers used in this study

Primer	Sequence
UBC106	5' -CGTCTGCCCG-3'
UBC108	5' -GTATTGCCCT-3'
UBC121	5' -ATACAGGGAG-3'
UBC123	5' -GTCTTTCAGG-3'
WAB05	5' -TCGGTGGGAATA-3'
WAB07	5' -CAGGTGTGGGT-3'
UBS840	5' -GAGAGAGAGAGAGAYT-3'
UBS880	5' -GGAGAGGAGAGAGA-3'

UBC: University of British Columbia RAPD Primer
 WAB: Wako DNA Oligomer set B
 UBS: University of British Columbia SSR Primer
 Y=(C, T)

結果

1. クローン性の証明

クローンヒラメ71, 72, 73, 82の4系統および82系統の元親であるG2並びに北海道栽培漁業振興公社羽幌事業所産の人工種苗 (N-CONT) のマルチローカスDNAフィンガープリントの結果をFig.2に示した。クローンヒラメでは、1.5~20.0Kbpの間で、DNAバンドが13~18本得られ、クローン系統内では同一のパターンを示した。一方、羽幌産人工種苗では、12~17本のバンドがみられ、個体間ではほとんどどの個体も同一の電気泳動パターンを示さなかった。82系統について、同一クローンとその元親であるG2のDNAフィンガープリントパターンでは、全て同一のバンドパターンを示し、クローン魚は、G2のコピーであることが示された。

Table 2に、ホモ型クローン系統71 (No.1-3), 72 (No.4-6), 73 (No.7-9), 82 (No.10-12), 82の元親 (G2) (No.16) および羽幌産人工魚 (No.17-20) のDNAフィンガープリント像に基づいて求めた、各個体間の遺伝的類似度 (BSI) と各集団間のBSIの平均を示した。羽幌産人工魚のBSIの平均値は0.30であったのに対して、G2および同一クローン系統内では、検出された断片が全ての個体で共有しているため、BSIの平均は1.00となり、遺伝的に均質であることが示された。

2. クローン系統の判別

Fig.3に、RAPD-PCR法およびTREP-PCR法によるクローン系統判別の電気泳動像を示した。クローンヒラメ9系統について、UBC106, UBC108, UBC121, UBC123, WAB05, WAB07プライマーにより、それぞれ5個 (a~e, UBC106), 3個 (a~c, UBC108), 4個 (a~d, UBC121), 5個 (a~e, UBC123), 1個 (a, WAB05), 3個 (a~c, WAB07) のマーカーが得られた。同様に、UBS840, UBS880の2種類のプライマーについて、それぞれ6個 (a~f, UBS840), 1個 (a, UBS880) のマーカーが認められた。

Table 3にRAPDマーカー及びTREPマーカーによるクローンヒラメの系統判別結果を示した。マーカーの有る無しを、+又は-で表した。この結果、各系統間でマーカーに多型性が認められ、判別が可能であった。

Fig.4に、RAPDプライマーUBC106を用いて、ホモ型クローン間の交配により作出したヘテロ型クローンのバンドパターンを示した。ヘテロ型クローン個体の場合は、供試魚によっては、両親のホモ型個体の保有するマーカーの一部を、保有するものと保有しないものがいた。

考察

1. クローン性の証明

これまでに魚類のクローン性の証明は、鰓蓋片を体側の皮膚下に移植し、拒絶反応の有る無しを判定する組織移植実験により行われていた¹⁷⁾。一方、Jeffreyら¹¹⁾により開発されたDNAフィンガープリント法は、法医学分野での個人識別への利用¹⁸⁾や、家畜¹⁹⁾等を対象とした手法としても用いられ、魚類への応用も盛んになっている²⁰⁻²²⁾。

Hanら²¹⁾は、アユを材料に遺伝的類似度の平均を求めたところ、通常種苗が0.737, G2魚が0.476なのに対し、クローン群では1.0であったことを報告している。すなわちクローン群では、ゲノムDNAの塩基配列が個体間で非常に高い確率で等しいことが示されている。本研究においても、羽幌産人工種苗のBSIが0.30であったのに対し、クローンヒラメでは1.00であり遺伝的に均質であると判断された。

第一卵割阻止型雌性発生二倍体は、体細胞分裂阻止によって卵核染色体を倍化させるため、すべての遺伝子座がホモ接合型の完全同型接合体になり、その次世代を再び雌性発生により作出すると、親と遺伝的に均質なクローンとなる。本研究で、クローンヒラメ82系統とその元親のフィンガープリントパターンが完全に一致したことから、この理論が裏付けられたと考えられる。この

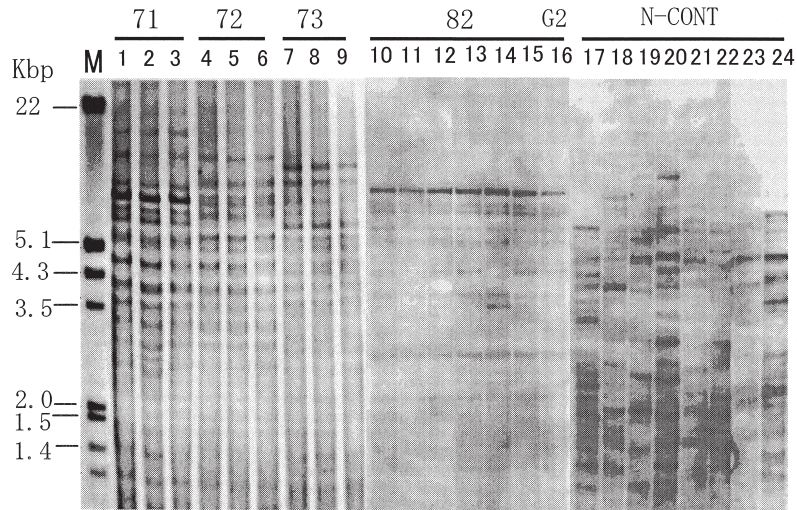


Fig. 2 DNA fingerprints of clonal (71, 72, 73, 82), mitotic-gynogenetic

Table 2 The value of BSI*¹ (Mean) between genetically different groups and between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with (GACA)₄ oligonucleotide DNA probe and HaeIII restriction endonuclease.

No.	No. of bands detected	Homo Clone 71			Homo Clone 72			Homo Clone 73			Homo Clone 82			Mitotic G2N 82		N-CONT		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	16	17	18	19	20
1	18																	
2	18	1.00		1.00														0.27
3	18	1.00	1.00															
4	14	0.75	0.75	0.75														
5	14	0.75	0.75	0.75	1.00		1.00			0.67				0.52				0.27
6	14	0.75	0.75	0.75	1.00	1.00												
7	16	0.65	0.65	0.65	0.67	0.67	0.67											
8	16	0.65	0.65	0.65	0.67	0.67	0.67	1.00		1.00				0.69				0.22
9	16	0.65	0.65	0.65	0.67	0.67	0.67	1.00	1.00									
10	13	0.58	0.58	0.58	0.52	0.52	0.52	0.69	0.69	0.69								
11	13	0.58	0.58	0.58	0.52	0.52	0.52	0.69	0.69	0.69	1.00		1.00					0.30
12	13	0.58	0.58	0.58	0.52	0.52	0.52	0.69	0.69	0.69	1.00	1.00						
16	13	0.58	0.58	0.58	0.52	0.52	0.52	0.69	0.69	0.69	1.00	1.00	1.00					
17	16	0.18	0.18	0.18	0.27	0.27	0.27	0.25	0.25	0.25	0.34	0.34	0.34	0.34				
18	17	0.29	0.29	0.29	0.32	0.32	0.32	0.18	0.18	0.18	0.28	0.28	0.28	0.28	0.24			0.30
19	12	0.27	0.27	0.27	0.15	0.15	0.15	0.21	0.21	0.21	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.29	0.34	
20	16	0.35	0.35	0.35	0.33	0.33	0.33	0.25	0.25	0.25	0.34	0.34	0.34	0.34	0.28	0.36	0.29	

*¹ BSI=2N_{AB}/(N_A+N_B) where N_A and N_B are the total numbers of bands scored in individuals A and B respectively, and N_{AB} is the number of bands shared by both.

ように、マルチローカスDNAフィンガープリント法は集団の遺伝的類縁関係の解析およびクローン性の証明に有力な技術の一つといえる。しかしながら、近年クローン性の証明を行うために、さらに精度の高いマイクロサテライトDNA^{23,24)}の開発もなされてきており、今後はこのようなマーカーによる検討が必要であろう。

2. クローン系統の判別

血液から抽出したDNAを鋳型として、RAPD法およびTREP法を用いてクローンヒラメ9系統につき、系統判別を行うと共に多型性について検討した。RAPDは植物の系統判定に多く用いられており、種子の一部を用いた方法も開発されている²⁵⁾。TREP法はこれまで一般的な

方法ではなかったが、本研究によりクローン系統の判別に十分利用可能であることが示された。

一般に、マルチローカスDNAフィンガープリント等には、比較的多量のDNAを必要とし、DNAの精製度もPCR法に比べると高いものが要求される。しかも、DNAを抽出してからバンドを検出し解析するまでに一週間程度を必要とし、時間のかかるのが難点である。PCR法は、核ゲノムの変異を迅速かつ簡便に推定でき、しかもこれらの方法と同等の多型検出感度を持つ方法として優れている。一方、再現性の点で問題視する向きもあるが、本研究においては、PCRに使用する試薬、サーマルサイクラー、電気泳動後の染色時間等、条件を均一に設定することで、再現性の高い結果を問題なく得ることができ

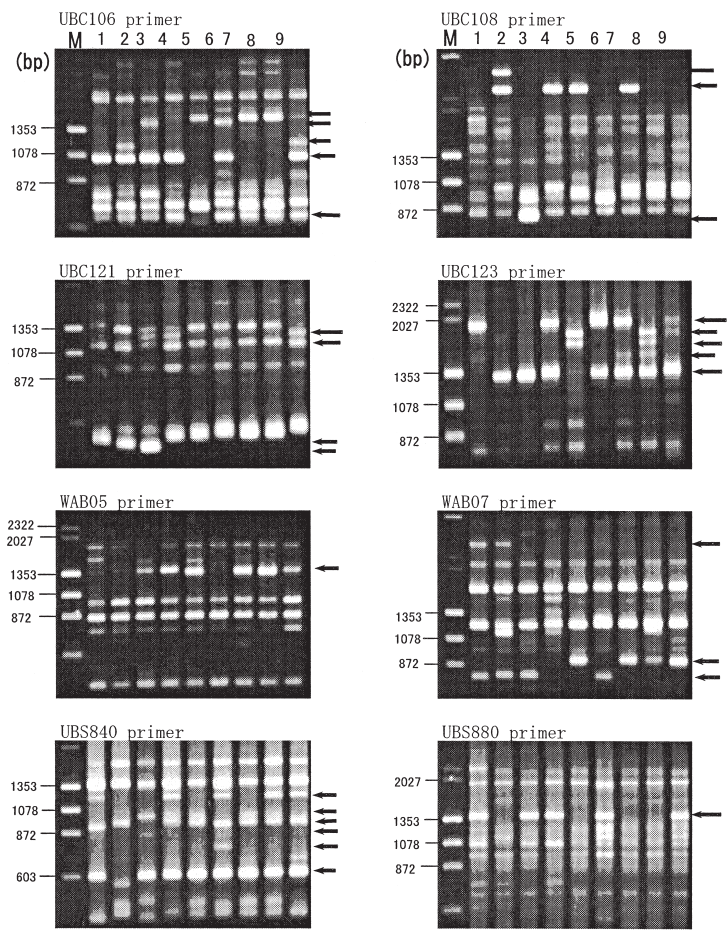


Fig. 3 Electrophoregrams of DNA fragments amplified by RAPD primers (UBC106, 108, 121, 123, WAB05, 07) & TREP primers (UBS840, 880). Lane 1~9 indicate clonal lines 71, 72, 73, 74, 75, 77, 82, 83, 90, respectively. Black arrows indicate the bands specific to each clonal line. M, Size marker (λ HindIII+ ϕ X174).

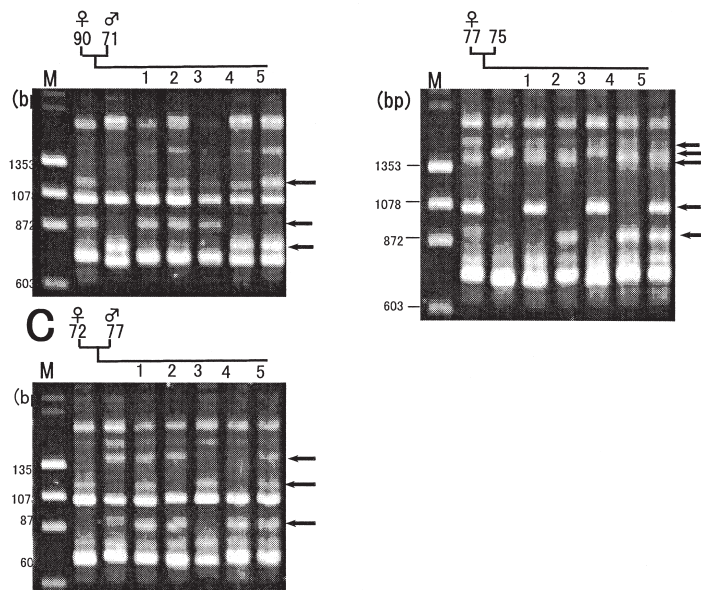


Fig. 4 Electrophoregrams of DNA fragments amplified by RAPD primer (UBC106). Identification of hetero type clonal lines of A (90 \times 71), B (77 \times 75) and C (72 \times 77), lanes 1~5 indicate their progenies, respectively. M, Size marker (λ HindIII+ ϕ X174).

Table 3 Clone Japanese flounder used, and their description by RAPDs and TREPs.

DNA Markers	Clone Japanese flounder strain								
	7 1	7 2	7 3	7 4	7 5	7 7	8 2	8 3	9 0
UBC106a-1840	-	-	-	-	+	-	+	+	-
UBC106b-1780	-	-	+	-	-	+	-	-	-
UBC106c-1330	-	+	-	-	-	-	-	-	+
UBC106d-1100	+	+	+	+	-	+	-	-	+
UBC106e-490	+	+	+	+	-	+	+	+	+
UBC108a-4900	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UBC108b-3900	-	+	-	+	+	-	+	-	-
UBC108c-690	-	-	+	-	-	-	-	-	-
UBC121a-1390	-	+	-	-	+	+	+	+	-
UBC121b-1220	-	-	+	+	-	-	-	-	+
UBC121c-330	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UBC121d-300	-	-	+	-	-	-	-	-	-
UBC123a-2610	+	-	-	+	-	+	+	-	+
UBC123b-2360	-	-	-	-	+	-	-	+	+
UBC123c-2140	-	-	-	-	+	-	-	+	-
UBC123d-1810	-	-	-	-	-	-	+	+	-
UBC123e-1480	-	+	+	+	-	+	+	+	+
WAB05a-1670	-	-	+	+	+	-	+	+	+
WAB07a-4000	+	+	-	-	-	-	-	-	-
WAB07b-840	-	-	-	-	+	-	+	+	+
WAB07c-690	+	+	+	-	-	+	-	-	-
UBS840a-1290	+	-	-	+	-	+	-	+	+
UBS840b-1060	-	-	+	-	-	-	-	-	-
UBS840c-930	-	+	-	+	+	+	+	+	+
UBS840d-870	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UBS840e-670	-	-	-	-	-	+	-	-	-
UBS840f-420	+	-	+	+	+	+	+	+	+
UBS880a-1800	+	-	+	+	-	+	-	-	+

+ and - = Presence and absence of RAPDs or TREPs.

た。

異なるホモ型クローン間の雑種であるヘテロ型クローンは、両親の有用形質を保有するため、ホモクローンよりも成長等が優れていることが報告されており、実際の養殖現場への利用が提唱されている⁸⁾。本研究で作出したヘテロ型クローン3系統の場合、供試魚により両親のホモ型個体の保有するマーカーの一部を、保有するものとしがないものが存在した。理論的には両親が持つバンド全てを保有するはずであるが、この点については更に検討が必要であろう。

クローン系統の特性評価試験を実施する際、飼育環境を均一にするために、数系統の混合飼育を行う場合がある。このとき、孵化仔魚のように、標識装着出来ない位に魚体が小さい時期に混合しても、試験終了後に生残魚のDNA多型解析を行い、系統判別できる可能性が今回の試験から示唆された。

一般に魚類のDNA採取には、血液の他、鱗及び鰭等を利用してはいるが、特にPCR法の利点は、解析に必要なDNAの量が極微量で良いため、個体を殺すことなく個体識別が可能なことである。従って、放流種苗の追跡等にDNA標識を用いることにより、より精度の高い調査が期待できる。

DNA多型解析技術は、水産育種への応用として、個

体識別、染色体操作魚の品種鑑別、系統の同定及び集団の遺伝的管理等に、今後益々の利用が期待されるため、それぞれの目的に応じたマーカー開発が今後の課題である。

要 約

1. ホモ型クローンヒラメ9系統を作出し、その一部を基にヘテロ型クローンヒラメ3系統を作出した。クローン性の証明およびクローン系統の判別を、マルチローカスDNAフィンガープリント法、RAPD-PCR法、TREP-PCR法の3法を用いたDNA多型解析により行った。
2. マルチローカスDNAフィンガープリントの結果、クローン系統内では全て同一のバンドパターンであったのに対して、クローン間および人工種苗では異なっていた。
3. PCR法をベースにしたフィンガープリント法により、RAPDおよびTREPマーカーを見つけ系統判別を行った。6種類のRAPDプライマーと2種類のTREPプライマーにより、それぞれ21種類のRAPD

マーカーと7種類のTREPマーカーが見つかり、クローンヒラメ9系統の判別が可能であった。

4. RAPDプライマー (UBC106) を用いて、ヘテロ型クローンのRAPD解析を行った。異なる系統同士の交配により作出されたヘテロ型クローン系統の場合、個体により両親が持つマーカーの内、両方又は片方のマーカーを持つ場合があった。

謝 辞

第一卵割阻止型雌性発生二倍体の作出に際し、ヒラメ親魚からの採卵、採精にご協力を賜った寿都町小西水産および島牧村役場職員の方々に深謝します。また、ヒラメ人工種苗の受精卵を提供して頂いた北海道栽培漁業振興公社羽幌事業所川下正己所長に感謝します。

本研究の一部は、水産庁の補助事業「地域先端技術共同研究開発促進事業」により実施された。

文 献

- 1) 谷口順彦：クローン魚による遺伝率の推定. 水産育種, 21, 57-66 (1995)
- 2) 青木宙, 廣野育生：ヒラメゲノム. ゲノムの未来, 海洋と生物, 138, 16-22 (2002)
- 3) Streisinger, G., C. Walker, N. Dower, D. Knauber and F. Singer : Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291, 293-296 (1981)
- 4) Naruse, K., K. Ijiri, A. Shima and N. Egami : The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, 236, 335-341 (1985)
- 5) Han, H. S., N. Taniguchi and A. Tsujimura : Production of clonal ayu by chromosome manipulation and confirmation by isozyme marker and tissue grafting. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 825-832 (1991)
- 6) Kobayashi, T., A. Ide, T. Hiasa, S. Fushiki and K. Ueno : Production of cloned amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*. *Fisheries Sci.*, 60, 275-281 (1994)
- 7) Komen, J., A. B. J. Bongers, C. J. J. Richter, W. B. van Muiswinkl and E. A. Huisman : Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio L.*) II. The production of clones of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids. *Aquaculture*, 92, 127-142 (1991)
- 8) Yamamoto, E. : Studies on sex-manipulation and production of cloned population in hirame, *Paralichthis olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*, 173, 235-246 (1999)
- 9) Kato K., R. Hayashi, D. Yuasa, S. Yamamoto, S. Miyashita, O. Murata and H. Kumai. Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation. *Aquaculture*, 207, 19-27 (2002)
- 10) 荒井克俊：染色体操作. 魚類のDNA, 分子遺伝学的方法のアプローチ (青木宙・隆島史夫・平野哲也編), 恒星社厚生閣, 東京, 1997, pp.32-62.
- 11) Jeffrey, A. J., V. Willson and S. L. Thein : Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314, 67-73 (1985)
- 12) Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Linak, S. A. Rafalski and V. Tingey : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.*, 18, 6531-6535 (1990)
- 13) 小林敬典, 中山一郎, 古丸明, 酒井治巳：DNA多型からみた淡水産二枚貝マシジミの遺伝的変異性, DNA多型, 5, 133-237 (1997)
- 14) 山崎文雄：繁殖生理実験法. 江上信雄編, 実験動物としての魚類. ソフトサイエンス社, 東京, 1981, pp.310-337
- 15) Tabata, K. : Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 845-850 (1991)
- 16) Asahida T., T. Kobayashi, K. Saitoh, and I. Nakayama : Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Sci.*, 62, 727-730 (1996)
- 17) 中西照幸：下等脊椎動物における免疫遺伝学的研究の現状. 水産育種, 11, 13-23 (1986)
- 18) Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein (1985) : Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316, 76-79 (1985)
- 19) 万年英之, 辻壮一, 後藤信男：M13ファージを用いたニワトリ核DNAフィンガープリント. 日畜会報, 61, 1057-1062 (1990)
- 20) Harris, A. S., S. Bieger, W. Doyle and J. M. Wright : DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and application to aquaculture genetics. *Aquaculture*, 92, 157-163 (1991)
- 21) Han, H. S., H. Mannen, A. Tsujimura and N. Taniguchi : Application of DNA fingerprint to confirmation of

- clone in Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 2027–2031 (1992)
- 22) 中山一郎：ゲノム解析の水産分野への応用．養殖研
研報, 24, 1–15 (1995)
- 23) 水田 章, 田畑和男, 金尾博和：マイクロサテライ
トDNAマーカーによるホモ型およびクローンヒラ
メ誘起の証明, 平成12年度日本水産学会秋季大会講
演要旨集, pp.55, (2000)
- 24) Morishima K., I. Nakayama and K. Arai.
Microsatellite-centromere mapping in the loach,
Misgurnus anguillicaudatus. *Genetica*, 111, 59–69,
(2001)
- 25) 大坪研一, 藤井剛, 橋野陽一：RAPD法を用いた国
内産精米の品種判別技術, 日本食品科学工学会
誌, 44 (5), 386–390 (1997)