

# PCRを用いたコイとフナ類及びキンギョの雑種F3が 有するゲノムの推定

| メタデータ | 言語: Japanese                                      |  |  |  |  |  |
|-------|---|--|--|--|--|--|
|       | 出版者:  |  |  |  |  |  |
|       | 公開日: 2022-09-26                                   |  |  |  |  |  |
|       | キーワード (Ja):                                       |  |  |  |  |  |
|       | キーワード (En): carp; crucian carp; goldfish; genome; |  |  |  |  |  |
|       | hybrid  |  |  |  |  |  |
|       | 作成者: 正岡, 哲治, 名古屋, 博之, 岡本, 裕之, 荒木, 和男,             |  |  |  |  |  |
|       | 藤原, 篤志, 小林, 敬典                                    |  |  |  |  |  |
|       | メールアドレス:  |  |  |  |  |  |
|       | 所属: 水産研究・教育機構, 水産研究・教育機構(退職),                     |  |  |  |  |  |
|       | 水産研究・教育機構, 水産研究・教育機構(退職),                         |  |  |  |  |  |
|       | 水産研究・教育機構, 水産研究・教育機構                              |  |  |  |  |  |
| URL   | https://fra.repo.nii.ac.jp/records/64             |  |  |  |  |  |

# PCRを用いたコイとフナ類および キンギョの雑種F<sub>3</sub>が有するゲノムの推定

# Estimation of genome composition of $F_3$ hybrids among carp, crucian carp, and goldfish using PCR methods.

正岡哲治<sup>1</sup>,名古屋博之<sup>2</sup>,岡本裕之<sup>1</sup>, 荒木和男<sup>1</sup>,藤原篤志<sup>1</sup>,小林敬典<sup>1</sup>

Tetsuji Masaoka<sup>1</sup>\*, Hiroyuki Nagoya<sup>2</sup>, Hiroyuki Okamoto<sup>1</sup>, Kazuo Araki<sup>1</sup>, Atushi Fujiwara<sup>1</sup> and Takanori Kobayashi<sup>1</sup>

> <sup>1</sup>国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所, <sup>2</sup>元国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所

<sup>1</sup>Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency <sup>2</sup>National Research Institute of Aquaculture, Japan Fisheries Research and Education Agency

\*Corresponding author : Tel : 0596-58-6411. Fax : 0596-58-6413. E-mail : tmasa@fra.affrc.go.jp

# Abstract

Carp (Cyprinus carpio), Carassius fish, and goldfish (Carassius auratus) are popular cyprinid species bred for use in aquaculture as a food source, in aquaria, and biological research in many countries. Hybrids derived from a cross between carp and Carassius fish containing the genome of crucian carp and goldfish have been artificially produced for use as food and aquarium fish. We obtained a third generation of diploid and triploid hybrids (F<sub>3</sub>) derived from crosses between the F<sub>2</sub> hybrid of family 1 [F<sub>1</sub> hybrid (C. *carpio*  $\stackrel{\circ}{\uparrow}$  × *Carassius cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\circ}$ )  $\stackrel{\circ}{\uparrow}$  × *C. carpio*  $\stackrel{\circ}{\circ}$ ]  $\stackrel{\circ}{\uparrow}$  and *C. auratus*  $\stackrel{\circ}{\circ}$  and cross between the F<sub>2</sub> hybrid of family 2 [F<sub>1</sub> hybrid (*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{\uparrow} \times C.$  *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\sigma}$ )  $\stackrel{\circ}{\uparrow} \times C.$ *cuvieri*  $\mathcal{J} \supseteq \mathcal{A}$  and *C. auratus*  $\mathcal{J}$ . However, it is difficult to estimate the genome composition of the F<sub>3</sub> hybrids by morphological measurement. We previously developed three methods of species distinction between carp and *Carassius* fish : (1) analysis by PCR amplification using carp- and crucian carp-specific primers targeting the IGF-1 gene region, (2) PCR-RFLP analysis of the TGF-beta gene region, and (3) PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene region. In this study, we estimated the genome composition of eight F<sub>3</sub> hybrids by these methods. We estimated that five F3 hybrids contained the genomes of C. carpio, C. cuvieri, and C. auratus. Thus,

the five  $F_3$  hybrids are considered to be allotriploids and include the genomes of three fish species. We estimated that two  $F_3$  hybrids contained the genomes of *C. carpio* and *C. auratus*. We also estimated that one  $F_3$  hybrid contained the genomes of *C. cuvieri* and *C. auratus*. Thus, these three  $F_3$  hybrid types are considered to be diploid hybrids. Moreover, all the eight  $F_3$  hybrids were estimated to contain the mitochondrial DNA derived from *C. carpio* as the maternal species.

#### Key words

carp, crucian carp, goldfish, genome, hybrid

#### はじめに

日本をはじめとする温暖な地域の湖沼 や河川に分布しているコイ科のコイ (Cyprinus carpio) やフナ属 (Carassius) 魚種は,食用だけでなく観賞魚,生物学 の実験生物等として利用されている (Nelson 2006)。さらに、選抜育種によ りコイからニシキゴイ、フナ属魚種からキ ンギョ(Carassius auratus)も開発され, 観賞魚,生物学の実験生物等として利用 されている (Nelson 2006)。また, 育種 の観点から新しい優良家系を作出するた め、コイとフナ属魚種は人為的に属間交 雑されてきた (Anil et al. 2016, Cherfas et al. 1994, Delomas et al. 2016, Gomelsky and Schneider 2012, Hamaguchi 1961, Liu et al. 2001, Liu 2010, 名古屋ら 2016, 小 島1983, Ojima et al. 1975, Takayama et al. 1961)。このうち、名古屋ら (2016) はフローサイトメトリーによる1細胞あ たりのDNA量の測定から、コイ雌とゲ ンゴロウブナ (Carassius cuvieri) 雄の 交雑後代F1 が2倍体(2n)であったの に対し、この交雑後代F1 雌とコイ雄ま たはゲンゴロウブナ雄とを交雑した交雑 後代F2は, 全て3倍体(3n)であった と報告している (Figure 1)。これから、 コイ雌とゲンゴロウブナ雄の交雑後代F 1雌は、コイのゲノム1個とゲンゴロウ ブナのゲノムを1個有する2倍性(2n)

の卵を産生すると推測されている(名古 屋ら 2016)。さらに、名古屋ら (2018) は、 コイとゲンゴロウブナの交雑後代F1の雌 とコイ雄またはゲンゴロウブナ雄とを交 雑した交雑後代F2 と, キンギョの雄を 交雑して交雑後代F3 を作出し、これら の倍数性をフローサイトメトリーによっ て調査したところ、2倍体(2n)と3倍 体(3n)が混在していることを報告して いる (Figure 1)。また,名古屋ら (2018) は、このことから上記交雑後代F2は2倍 性(2n)の卵と半数性(n)の卵を産生し たと推測している。異種間交雑を利用す る交雑育種や3倍体(3n)および4倍体 (4n)に代表される倍数性育種においては, 妊性等の生物学的特性を推測するため、<br /> 倍数性だけでなく、ゲノムの組成も把握 することが重要となる。しかし、交雑後 代F<sub>3</sub>の外部形態やフローサイトメトリー 等によるDNA量の測定では、ゲノムの組 成を推測することはできなかった。

一方,様々な生物種でPCRを用いた種 判別手法が開発されており,魚介類では雑 種の判別にも利用されつつある(Kednapat et al. 2018, Masaoka et al. 2015, 2018, McKeown et al. 2015, Schmidt et al. 2015)。著者らも各遺伝子のDNA多型を用 いて,コイと在来のフナ属魚種(ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*),ゲンゴ ロウブナ,ニゴロブナ(*Carassius auratus*  grandoculis)、ナガブナ (Carassius auratus subsp. 1))(以降「フナ類」)とを判別でき るpolymerase chain reaction (PCR) およ *V* PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) のDNAマー カーを開発し、これらが人工交配で作出した コイとフナ類の雑種F1の判別にも利用できる ことを確認した(正岡ら 2013, 2014, 2015, 2016)。また、屋外飼育池を用いてコイと フナ類の自然産卵試験を実施し、上記 DNAマーカーの一部を用い, 自然産卵に より得られた仔魚に雑種が存在することを 確認した(正岡ら 2017, 2018)。さらに、上 記PCR解析とPCR-RFLP解析から、キン ギョはコイと異なるバンドパターンが得ら れることを確認した(正岡ら 2019)。

そこで、上記PCR解析とPCR-RFLP解 析を用いて、名古屋ら(2018)が作出し た、上記コイとゲンゴロウブナおよびキ ンギョの交雑後代F<sub>3</sub>のゲノム組成を推定 した。また、交雑後代F<sub>3</sub>が受け継いでい るミトコンドリアDNAの種類について も確認した。

# 材料と方法

# 供試魚

親魚種としてコイとゲンゴロウブナお よびキンギョ(リュウキン)をそれぞれ 1個体用いた(Figure 1, Table 1)。また, コイの雌とゲンゴロウブナ雄を人工交雑 して作出した交雑後代F<sub>1</sub>(以降, F<sub>1</sub>)を 1個体と,このF<sub>1</sub>雌とコイ雄を人工交雑



Figure 1. Formation scheme for F<sub>3</sub> hybrids among *C. carpio*, *C. cuvieri*, and *C. auratus* (ryuukin).

-29-

Table 1. Cyprinid species and hybrids examined

| Species or Hybrid   |   |  |
|---|---|--|
| Carp (Cyprinus carpio)  | 1 |  |
| Crucian carp ( <i>Carassius cuvieri</i> )   | 1 |  |
| Goldfish (Ryuukin) (Carassius auratus)  | 1 |  |
| $F_1$ hybrid (C. carpio $\mathfrak{P} \times C.$ cuvieri $\mathfrak{G}$ )   | 1 |  |
| $F_2$ hybrid of family 1 ( $F_1$ hybrid (C. carpio $\mathfrak{P} \times C.$ cuvieri $\mathfrak{F}$ ) $\mathfrak{P} \times C.$ carpio $\mathfrak{F}$ )   | 1 |  |
| $F_2$ hybrid of family 2 ( $F_1$ hybrid ( <i>C. carpio</i> $\mathfrak{P} \times C.$ <i>cuvieri</i> $\sigma$ ) $\mathfrak{P} \times C.$ <i>cuvieri</i> $\sigma$ )  | 1 |  |
|   |   |  |
| $F_3 \text{ hybrid of family 1 } (F_2 \text{ hybrid } (F_1 \text{ hybrid } (C. \ carpio \ \ \heartsuit \times C. \ cuvieri \ \ \sigma \ ) \ \heartsuit \times C. \ carpio \ \ \sigma \ ) \ \heartsuit \times C. \ auratus \ \ \sigma \ )$ | 6 |  |
| $F_3 \text{ hybrid of family 2 } (F_2 \text{ hybrid } (F_1 \text{ hybrid } (C. \ carpio \ \heartsuit \times C. \ cuvieri \ \sigma') \ \heartsuit \times C. \ cuvieri \ \sigma') \ \heartsuit \times C. \ auratus \ \sigma')$              | 2 |  |

して作出した交雑後代F<sub>2</sub>(以降,家系1 のF<sub>2</sub>)およびF<sub>1</sub>雌とゲンゴロウブナ雄を 人工交雑して作出した交雑後代F<sub>2</sub>(以降, 家系2のF<sub>2</sub>)を各1個体用いた(Figure 1, Table 1)。さらに,家系1のF<sub>2</sub>雌とリュ ウキン雄を人工交雑して作出した交雑後 代F<sub>3</sub>(以降,家系1のF<sub>3</sub>)を6個体と,家 系2のF<sub>2</sub>雌とリュウキン雄を人工交雑して 作出した交雑後代F<sub>3</sub>(以降,家系2のF<sub>3</sub>) を2個体用いた(Figure 1, Table 1)。

#### DNA抽出

家系1と2のF<sub>3</sub>以外の個体は,エタノー ル固定または冷凍保存した筋肉や鰭組織 からDNAを抽出した。また,家系1と2 のF<sub>3</sub>は孵化仔魚の全身からDNAを抽出し た。組織片または孵化仔魚を500 $\mu$ lの TNES-6M Urea緩衝液(Asahida et al. 1996)に投入後,20mg/mlのProteinase K.10 $\mu$ lを加えて37℃で一晩反応した。次に, フェノール・クロロホルムでDNAを抽出し, エタノール沈殿した(Asahida et al. 1996)。これを300 $\mu$ lの0.1倍に希釈した Tris-EDTA(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)に溶解してDNAサンプルとした。

# コイとフナ類およびキンギョの判別用PCR

IGF-1遺伝子のDNA多型を利用したコ

イのDNAを特異的に増幅するコイ判別用 (for carp) プライマーセットまたはフナ類 およびキンギョのDNAを特異的に増幅す るフナ類判別用 (for Carassius) のプラ イマーセットをそれぞれ用いて、PCRに よりIGF-1遺伝子の増幅を行った。PCR反 応液は、1µlのDNA溶液、2µlの2.5 mM dNTPおよび10×緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % gelatin),  $0.1 \,\mu \, l \mathcal{O} \, 100 \, \text{pmol/ul} \, \mathcal{T}$ ライマー,  $0.1\mu$ lのTaKaRa EX Taq Hot Start Versionポリメラーゼ5U/ulに超純水 を加えて総量を20µlとした。プライマー配列 は前報(正岡ら 2013)と同じ(for carpプラ イマーセットは, Forward primer (5'-3'): CAAAGCAAATAGGCACCTTG, Reverse primer (5'-3') : GCATTGTGGTTCA CCTACAG, for Carassiusプライマーセット lt, Forward primer (5'-3') : CAAAG CAAATAGGCACCTTG, Reverse primer (5'-3') : AACGCACAACTAGGCTAT GC)である。PCR反応では、94℃で5分間加 熱後,94℃で30秒,57℃で30秒,72℃で30 秒間のサイクルを30回行い,最後に72℃で 7分間の伸長を行った。このPCR反応液 3μlをとり、3%アガロースゲルとTAE (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA) 緩衝 液による100Vで約2時間の電気泳動を

行った。その後,ゲルをエチジウムブロ マイドで染色(ゲル染色)し,紫外線照 射下で撮影した。

# コイとフナ類およびキンギョの判別用 PCR-RFLP

TGF- $\beta$ 遺伝子とミトコンドリアDNA の16S ribosomal RNA(16S rRNA) 遺 伝子領域を用いたPCR-RFLP解析により、 供試魚間でバンドパターンを比較した。 これらのPCR反応液は、プライマー以外 はコイとフナ類およびキンギョの判別用 PCRと同じである。なお、TGF-β遺伝子 のプライマーは前報(正岡ら 2015)と同 じ (Forward primer (5'-3'): TGTACA ACACGCTGAACCCC, Reverse primer (5'-3') : TACAAATCCCTAAAGTGA CA) である。また、16SrRNA遺伝子は ユニバーサルプライマー(16SAR-L (5'-3'): CGCCTSTTKMHYAAAAACAT. 16SBR-H (5'-3') : CCGGTYTGAACTCAG ATCAYGT) を用いた (Palumbi et al. 1991)。TGF-*B*遺伝子のPCR反応では、 94℃で5分間加熱後,94℃で30秒,58℃ で30秒,72℃で30秒間のサイクルを35回 行い,最後に72℃で7分間の伸長を行っ た。また、ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子のPCR反応では、94℃で5 分間加熱後,94℃で30秒,55℃で30秒, 72℃で30秒間のサイクルを35回行い,最 後に72℃で7分間の伸長を行った。

TGF- $\beta$ 遺伝子のPCR-RFLP解析では、 PCR産物を2Uの制限酵素*Afa*I (Rsa I) (TaKaRa), または*Hpy*CH4 IV (New England Biolabs)を用いて切断した。 ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子 のPCR-RFLP解析では、PCR産物を2Uの 制限酵素*Tsp*EI (TOYOBO)を用い て切断した。また、制限酵素処理は総量 10ulで行い、PCR産物3 $\mu$ Iを各酵素の至  適温度(Afa I, HpyCH 4 IVは37℃, TspE Iは65℃)で16~18時間かけて切 断した。得られたPCR-RFLP反応液5µ1 を用いて電気泳動を行った。その後、ゲ ルをエチジウムブロマイドで染色(ゲル 染色)し、紫外線照射下で撮影した。

#### バンドパターンの確認とゲノムの推定

各PCRとPCR-RFLPの電気泳動像か ら,目視によりバンドパターンを確認し た。なお,コイ,ゲンゴロウブナ,キン ギョのバンドパターンから,交雑後代の バンドパターンを判定した。また,コイ とフナ属のゲノムあるいはそれぞれの種 のゲノムを表していると考えられる上記 3種のバンドパターンから,交雑後代の ゲノム組成を推測した。

#### 結果

IGF-1遺伝子のPCRを行った結果. コ イはコイ判別用プライマーでのみ増幅産 物(バンドパターンA)が見られ、ゲン ゴロウブナとキンギョはフナ類判別用プ ライマーでのみ増幅産物(バンドパター ンB) が見られた (Figure 2a, 2b, コ イはレーン1,ゲンゴロウブナはレーン 2, キンギョはレーン3)。これに対し, コイとゲンゴロウブナのF1と家系1と 2のF2は、上記2種類のプライマーをそ れぞれ用いたPCRで増幅産物(バンドパ ターンAおよびB)が得られた (Figure 2a, 2b, F<sub>1</sub>はレーン4, 家系1のF<sub>2</sub>はレー ン5, 家系2のF2はレーン6)。家系1 のF3では、6個体全てで上記2種類のプ ライマーをそれぞれ用いたPCRで増幅産 物 (バンドパターンAおよびB) が得ら れた (Figure 2a, 2b, 家系1のF<sub>3</sub>の No.  $1 \sim 6 \ \text{lt} \ \nu - \nu \ 7 \sim 12$ , Table 2). これに対し、家系2のF3では、No.1は 上記2種類のプライマーをそれぞれ用い

たPCRで増幅産物(バンドパターンAお よびB)が得られたのに対し、No. 2はフ ナ類判別用プライマーでのみ増幅産物 (バンドパターンB)が見られた(Figure 2a, 2b, 家系2のF<sub>3</sub>のNo. 1と2はレー ン13, 14, Table 2)。

TGF-β遺伝子における*Afa* I (*Rsa* I) を用いたPCR-RFLP解析では、コイは約 250bpの長さのバンドと約380bpの長さ のバンドを含むコイ特異的なバンドパ ターンA(レーン1)が見られ、ゲンゴ ロウブナとキンギョは約620bpの長さの バンドを含むフナ類およびキンギョ特異 的なバンドパターンB(レーン2.3) が見られた (Figure 3)。また, F<sub>1</sub>と家 系1と2のF2は、両者のバンドを合わせ たバンドパターンAB (レーン4~6) が見られた (Figure 3)。家系1のF<sub>3</sub>の No. 1~6と、家系2のF<sub>3</sub>のNo. 1にお いても、両者のバンドを合わせたバンド パターンAB(レーン7~13)が見られ た (Figure 3)。これに対し、家系2の F<sub>3</sub>のNo. 2は、フナ類およびキンギョ特 異的なバンドパターンB(レーン14)が 見られた (Figure 3)。

一方, *Hpy*CH4 IVを用いたPCR-RFLP
解析では、コイは約280bpの長さのバンド
(塩基配列からほぼ同じ長さ (277bpと
280bp)の2本のDNA断片から成ると推
測される)を含むコイ特異的なバンドパ
ターンA (レーン1)が見られた (Figure
4)。ゲンゴロウブナは約120bpの長さの

バンドと約160bpの長さのバンドおよび 約280bpの長さのバンドを含むゲンゴロ ウブナ特異的なバンドパターンB(レー ン2)が見られた (Figure 4)。キンギョ は約170bpの長さのバンドと約440bpの 長さのバンドを含むキンギョ特異的なバ ンドパターンC(レーン3)が見られた (Figure 4)。ゲンゴロウブナのバンドパ ターンBに対し、コイのバンドパターン Aのみに見られるバンドがなかったた め,  $F_1$ と家系1と2の $F_2$  (レーン4~6) は、バンドパターンBであるのか、ある いはバンドパターンAとバンドパターン Bを合わせたバンドパターンABである のか確認できなかった (Figure 4)。家 系1の $F_3$ のNo. 1, 2, 4, 6 (レーン7, 8, 10, 12) と, 家系2のF<sub>3</sub>のNo.1と 2 (レーン13, 14) は、上記と同様にゲ ンゴロウブナのバンドパターンBとキン ギョのバンドパターンCを合わせた.バ ンドパターンBCであるのか. これにコ イのバンドパターンAも含めたバンドパ ターンABCであるのか確認できなかっ た (Figure 4)。家系1のF<sub>3</sub>のNo. 3と5 (レーン9と11)は、コイとゲンゴロウ ブナに共通の約280bpの長さのバンドは 見られたが,約120bpのゲンゴロウブナ 特異的バンドは見られず、キンギョ特異 的な約440bpの長さのバンドが見られた (Figure 4)。これから、コイのバンドパ ターンAとキンギョのバンドパターンC を合わせたバンドパターンACと確認で

Table 2 Estimation of genome composition in hybrid F3 among carp (C carpio), crucian carp (C curvieri), and goldfish (Ryuukin) (C auratus)

|   | Sample<br>No. | IGF-1 gene              |                                  | TGF-β gene                            |            |                                  |
|---|---------------|-------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|------------|----------------------------------|
| F <sub>3</sub> hybrids  |               | PCR                     | PCR                              | PCR-RFLP PCR-R<br>Afa I(Rsa I) Hpy CE | PCR-RFLP   | Estimated genome composition     |
|   |               | carp-specific<br>primer | erucian carp-<br>specific primer |                                       | Hpy CH4 IV |                                  |
|   | 1             | Δ*1                     | в                                | AB                                    | ABC*3      | earp, erucian carp, and goldfish |
|   | 2             | А                       | в                                | AB                                    | ABC        | carp, crucian carp, and goldfish |
| F <sub>3</sub> hybrid of family 1   | 3             | А                       | в                                | AB                                    | AC         | carp and goldfish                |
| $[F_2 \text{ hybrid } (F_1 \text{ hybrid } (C, carpio \ \mathfrak{Q} \times C, cuvieri \ \sigma) \ \mathfrak{Q} \times C, carpio \ \sigma) \ \mathfrak{Q} \times C, auratus \ \sigma]$  | 4             | A                       | в                                | AB                                    | ABC        | carp, crucian carp, and goldfish |
|   | 5             | Α                       | в                                | AB                                    | AC         | carp and goldfish                |
|   | 6             | А                       | В                                | AB                                    | ABC        | carp, crucian carp, and goldfish |
| F <sub>3</sub> hybrid of family 2   | 1             | Α                       | в                                | AB                                    | ABC        | carp, crucian carp, and goldfish |
| $[F_2 \text{ hybrid } (F_1 \text{ hybrid } (C. carpio \ \mathfrak{P} \times C. cuvieri \ \sigma) \ \mathfrak{P} \times C. cuvieri \ \sigma) \ \mathfrak{P} \times C. auratus \ \sigma]$ | 2             | _*2                     | в                                | в                                     | BC         | crucian carp and goldfish        |

\*<sup>3</sup>: Fragment types of *Hpy* CH4 IV for TGF-β gene identified on the basis of fragment type by PCR amplification using carp- and crucian carp-specific primers targeting IGF-1 gene and by PCR-RFLP analysis using *Afa* 1(*Rsa* 1) for TGF-β gene











Figure 2. PCR amplification using carp- and crucian carp-specific primers targeting the IGF-1 gene region from *C. carpio*, *C. cuvieri*, *C. auratus*, and their hybrids. Lane 1, *C. carpio*; Lane 2, *C. cuvieri*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ); Lane 5, F<sub>2</sub> hybrid of family 1[F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]; Lane 6, F<sub>2</sub> hybrid of family 2[F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ] $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ] $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ] $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]No. 1-6; Lane 13, 14, F<sub>3</sub> hybrid of family 2 [F<sub>2</sub> hybrid(F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]No. 1-6; Lane 13, 14, F<sub>3</sub> hybrid of family 2 [F<sub>2</sub> hybrid(F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ] $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *auratus*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]No. 1, 2; M, 100-bp DNA size ladders. Arrows indicate 500 bp; A, B, Fragment types; -, Not detect.

Figure 3. Restriction analysis of DNA amplified by PCR of TGF- $\beta$  gene digested with *Afa* I(*Rsa* I) from *C. carpio*, *C. cuvieri*, *C. auratus*, and their hybrids.

Lane 1, *C. carpio*; Lane 2, *C. cuvieri*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{-}$ ); Lane 5, F<sub>2</sub> hybrid of family 1[F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{-}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *carpio*  $\stackrel{\circ}{-}$ ]; Lane 6, F<sub>2</sub> hybrid of family 2[F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{-}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{-}$ ]; Lane 7-12, F<sub>3</sub> hybrid of family 1[F<sub>2</sub> hybrid(F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{-}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *auratus*  $\stackrel{\circ}{-}$ ]No. 1-6; Lane 13, 14, F<sub>3</sub> hybrid of family 2 [F<sub>2</sub> hybrid(F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{-}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{-}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *auratus*  $\stackrel{\circ}{-}$ ]No. 1, 2; M, 100-bp DNA size ladders. Arrows indicate 500 bp; A, B, Fragment types; -, Not detect.

Figure 4. Restriction analysis of DNA amplified by PCR of TGF- $\beta$  gene digested with *Hpy*CH4 IV from *C. carpio*, *C. cuvieri*, *C. auratus*, and their hybrids.

Lane 1, *C. carpio*; Lane 2, *C. cuvieri*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ); Lane 5, F<sub>2</sub> hybrid of family 1[F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *carpio*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]; Lane 6, F<sub>2</sub> hybrid of family 2[F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]; Lane 7-12, F<sub>3</sub> hybrid of family 1[F<sub>2</sub> hybrid(F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *auratus*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]No. 1-6; Lane 13, 14, F<sub>3</sub> hybrid of family 2 [F<sub>2</sub> hybrid(F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C$ . *auratus*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]No. 1, 2; M, 100-bp DNA size ladders. Arrows indicate 500 bp; A, B, Fragment types; -, Not detect.



ABBAAAAAAAAAAAA

きた (Figure 4)。

ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子 のTspE Iを用いたPCR-RFLP解析では、 コイは約120bpと約310bpの長さのバンドを 含むコイ特異的なバンドパターンA(レー ン1)が見られ、ゲンゴロウブナとキンギョ は約245bpの長さのバンドを含むゲンゴロ ウブナとキンギョ特異的なバンドパターン B(レーン2.3)が見られた (Figure 5)。 また, コイを雌親としているF1(レーン4) や. Fiを雌親としている家系1と2のF2 (レーン5.6) および家系1と2のF<sub>2</sub>をそ れぞれ雌親としている家系1と2のF3 (レーン7~14)は、コイ特異的な約120bp と約310bpの長さのバンドが見られ、ゲン ゴロウブナとキンギョ特異的は約245bpの 長さのバンドは見られなかったため、バン ドパターンAと確認できた (Figure 5)。

# 考察

コイとゲンゴロウブナの $F_1$ と家系1と 2の $F_2$ は、IGF-1遺伝子のコイ判別用プ ライマーを用いたPCRとフナ類判別用プ ライマーを用いたPCRでそれぞれ増幅産 物(バンドパターンAとバンドパターン B)が見られた(Figure 2a, 2b, レー ン4~6)。 $F_1$ と家系1と2の $F_2$ におい て、このバンドパターンAはコイのゲノ ム、バンドパターンBはゲンゴロウブナ Figure 5. Restriction analysis of DNA amplified by PCR of 16S rRNA gene digested with TspE I from *C. carpio*, *C. cuvieri*, *C. auratus*, and their hybrids.

Lane 1, *C. carpio*; Lane 2, *C. cuvieri*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C.$  *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ); Lane 5, F<sub>2</sub> hybrid of family 1[F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C.$  *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C.$  *carpio*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]; Lane 6, F<sub>2</sub> hybrid of family 2[F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C.$  *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C.$  *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]; Lane 7-12, F<sub>3</sub> hybrid of family 1[F<sub>2</sub> hybrid(F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C.$  *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C.$  *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C.$ *auratus*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]No. 1-6; Lane 13, 14, F<sub>3</sub> hybrid of family 2 [F<sub>2</sub> hybrid(F<sub>1</sub> hybrid(*C. carpio*  $\stackrel{\circ}{+} \times C.$  *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C.$ *cuvieri*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ) $\stackrel{\circ}{+} \times C.$  *auratus*  $\stackrel{\circ}{\rightarrow}$ ]No. 1, 2; M, 100-bp DNA size ladders. Arrows indicate 500 bp; A, B, Fragment types; -, Not detect.

> のゲノムを示していると考えられる。ま た, Afa I (Rsa I)を用いたPCR-RFLP解 析においても、F1と家系1と2のF2は、 コイとゲンゴロウブナのバンドを合わせ たバンドパターンAB (Figure 3. レー ン4~6)が見られた。Fiと家系1と2の F2において、このバンドパターンAはコイ のゲノム、バンドパターンBはゲンゴロウ ブナのゲノムを示していると考えられる。 TGF-β遺伝子におけるHpyCH4 IVを用い たPCR-RFLP解析だけでは、Fiと家系1と 2のF<sub>2</sub> (Figure 4, レーン4~6) は、ゲ ンゴロウブナのバンドパターンBである か, コイとゲンゴロウブナのバンドを合 わせたバンドパターンABであるか確認で きない (Figure 4)。しかし, 上記IGF-1 遺伝子のPCRとTGF-*B* 遺伝子における Afa I (Rsa I) を用いたPCR-RFLPの結果 から、HpyCH4 IV を用いたPCR-RFLP解 析においても,F1と家系1と2のF2(Figure 4. レーン4~6)は、コイとゲンゴロウ ブナのバンドを合わせたバンドパターン ABであると考えられた。また、これまで にコイとゲンゴロウブナの交雑後代Fiは 雑種2倍体であり、一部の雌が成熟して コイとゲンゴロウブナのゲノムを1個ずつ 持つ2nの非還元卵を産生することが報告 されている(名古屋ら 2016. 小島1983. Ojima et al. 1975)。このため、F1は、コ

イとゲンゴロウブナのゲノムを1個ずつ 持つ雑種2倍体であると推測される。ま た,F1の雌がコイとゲンゴロウブナのゲ ノムを1個ずつ持つ2nの非還元卵を産 生していた場合,これとコイ雄とを交雑 して作出した家系1のF2は,コイのゲノ ムを2個とゲンゴロウブナのゲノムを1 個持つ雑種3倍体(異質3倍体)である と推測される。一方,F1の雌とゲンゴロ ウブナ雄とを交雑して作出した家系2の F2は,コイのゲノムを1個とゲンゴロウ ブナのゲノムを2個持つ雑種3倍体(異 質3倍体)であると推測される。

家系1のF2のNo. 1, 2, 4, 6 (Figure 4, レーン7,8,10,12)と、家系2のF<sub>3</sub>の No. 1 (Figure 4,  $\nu - \nu 13$ ) においても, 上記と同様にHpyCH4 IVを用いたPCR-RFLP解析だけでは、 ゲンゴロウブナの バンドパターンBとキンギョのバンドパ ターンCを合わせた. バンドパターンBC であるのか. これにコイのバンドパター ンAも含めたバンドパターンABCである のか確認できなかった (Figure 4)。し かし、上記F<sub>3</sub>は、IGF-1遺伝子のコイ判 別用プライマーを用いたPCRとフナ類判 別用プライマーを用いたPCRでそれぞれ 増幅産物(バンドパターンAとバンドパ ターンB) が見られた (Figure 2a, 2b,  $\nu - \nu$  7, 8, 10, 12, 13, Table 2). また、Afa I (Rsa I) を用いたPCR-RFLP解 析では、上記F3はコイとフナ属魚種のバンド を合わせたバンドパターンAB(Figure 3, レーン7,8,10,12,13, Table 2) が 見られた。これらのバンドパターンAは コイのバンドパターンを示している。 よって, HpyCH4 IVを用いたPCR-RFLP 解析において、家系1のF3のNo.1,2,4, 6と、家系2のF<sub>3</sub>のNo.1は、コイとゲン ゴロウブナおよびキンギョのバンドを合 わせたバンドパターンABCであると考 えられた (Table 2)。また, 家系1のF<sub>3</sub> のNo. 1, 2, 4, 6 と, 家系 2 のF<sub>3</sub>の No. 1 は, コイとゲンゴロウブナおよび キンギョの3種類のゲノムを持つと推測 された (Table 2)。

家系1のF<sub>3</sub>のNo.3と5は, IGF-1遺伝 子のコイ判別用プライマーを用いたPCR とフナ類判別用プライマーを用いたPCR でそれぞれ増幅産物(バンドパターンA とバンドパターンB) が見られた (Figure 2a, 2b,  $\nu - \nu 9 \ge 11$ , Table 2).  $\pm c$ , Afa I (Rsa I) を用いたPCR-RFLP解析 では、バンドパターンAB(Figure 3, レー ン9と11. Table 2) が見られた。上記 PCR解析とPCR-RFLP解析において、ゲ ンゴロウブナとキンギョは同じバンドパ ターンBとなる (Figure 2a, 2bおよび Figure 3,  $\nu - \nu 2 \geq 3$ , Table 2)<sub>o</sub>  $\gtrsim$ のため,家系1のF3のNo.3と5におい ては, バンドパターンAはコイを示して いるが、バンドパターンBがゲンゴロウ ブナかキンギョ或いは両者を示している かは分からなかった。一方, HpyCH4 IVを用いたPCR-RFLP解析において、家 系1のF<sub>3</sub>のNo. 3と5 (Figure 4, レー ン9と11)は、コイとゲンゴロウブナに 共通の約280bpの長さのバンドと、キン ギョ特異的な約440bpの長さのバンドは 見られたが、約120bpのゲンゴロウブナ 特異的バンドが見られなかった。このた め、コイのバンドパターンAとキンギョ のバンドパターンCを合わせたバンドパ ターンACと確認できた(Figure 4, レー ン9と11, Table 2)。これらのPCR解析 とPCR-RFLP解析の結果から、家系1の F<sub>3</sub>のNo. 3と5は、コイとキンギョのゲ ノムを持つと推測された(Table 2)。

家系2のF₃のNo.2は, IGF-1遺伝子の コイ判別用プライマーを用いたPCRでは 増幅産物が見られず,フナ類判別用プラ

イマーを用いたPCRでのみ増幅産物(バ ンドパターンB)が見られた (Figure 2a, 2b, レーン14, Table 2)。また, Afa I (Rsa I) を用いたPCR-RFLP解析では、家系2の F<sub>3</sub>のNo. 2はバンドパターンB (Figure 3, レーン14, Table 2) が見られた。上記 PCR解析とPCR-RFLP解析において、ゲ ンゴロウブナとキンギョは同じバンドパ ターンBとなる (Figure 2a. 2bおよび Figure 3,  $\nu - \nu 2 \geq 3$ , Table 2)<sub>o</sub>  $\geq$ のため、家系2のF3のNo.2においては、 バンドパターンBがゲンゴロウブナかキ ンギョあるいは両者を示しているかは分 からなかった。一方, HpyCH4 IVを用 いたPCR-RFLP解析において、家系2の F<sub>3</sub> $\mathcal{O}$ No. 2 (Figure 4,  $\mathcal{V} - \mathcal{V}$ 14)  $\mathcal{I}$ t, コイとゲンゴロウブナに共通の約280bp の長さのバンドと、キンギョ特異的な約 440bpの長さのバンドおよび約120bpの ゲンゴロウブナ特異的バンドが見られ た。これらから, HpyCH4 IVを用いた PCR-RFLP解析においては、ゲンゴロウ ブナおよびキンギョのバンドを合わせた バンドパターンBCであると考えられた (Table 2)。よって, 家系2のF<sub>3</sub>のNo. 2 は、ゲンゴロウブナとキンギョのゲノム を持つと推測された(Table 2)。

名古屋ら(2018)はフローサイトメト リーによる倍数性の調査で、本研究と同 じ交配区のF<sub>3</sub>は、2倍体(2n)と3倍 体(3n)が混在していることを報告し ている。これと本研究結果から、F<sub>3</sub>のう ち、家系1のF<sub>3</sub>のNo.1、2、4、6と、 家系2のF<sub>3</sub>のNo.1は、コイとゲンゴロ ウブナおよびキンギョの3種類のゲノム を持つ完全異質3倍体で、家系1のF<sub>3</sub>の No.3と5は、コイとキンギョのゲノム を持つ雑種2倍体、家系2のF<sub>3</sub>のNo.2 は、ゲンゴロウブナとキンギョのゲノム を持つ雑種2倍体であると推測された。 これにより, 家系1のF2の雌は, コイと ゲンゴロウブナのゲノムを持つ2倍性 (2n)の卵とコイのゲノムを持つ半数性 (n)の卵を産生したと考えられた。また, 家系2のF2の雌は, コイとゲンゴロウブ ナのゲノムを持つ2倍性(2n)の卵と ゲンゴロウブナのゲノムを持つ半数性 (n)卵を産生したと考えられた。

ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝 子におけるTspE Iを用いたPCR-RFLP解 析では、コイは個体変異があり、約430bp の長さのバンドを含むコイ特異的なバン ドパターンが見られる個体(正岡ら 2019)の他に、約310bpの長さのバンドを 含むコイ特異的なバンドパターンが見られ る個体がある (Figure 6) (正岡ら データ 未公表)。これは1塩基置換によりGATT (Accession No. AB741887)がTspEIの認 識 部 位 で あ るAATT(Accession No. FJ655285) になったことから、約430bpの DNAが切断され、約310bpと約120bpの長 さの2本のバンドとして検出されたため と考えられた。本研究のF1は、約310bpの 長さのバンドを含むコイ特異的なバンド



Figure 6. Schematic diagram of restriction analysis of DNA amplified by PCR of mitochondrial 16S rRNA gene digested with *Tsp*E I.

Lanes 1, 2, *C. carpio*; Lane 3, *C. auratus*; Lane 4, *C. auratus langsdorfii*; Lane 5, *C. cuvieri*; Lane 6, *C. auratus* grandoculis; Lane 7, *C. auratus* subsp. 1; M, 100-bp DNA size ladders.

パターンAであるコイを雌親としていた (Figure 5, レーン1)。これに対し, ゲン ゴロウブナとキンギョは約245bpの長さの バンドを含むフナ属特異的なバンドパ ターンBが見られた (Figure 5, レーン2, 3)。コイを雌親に持つF<sub>1</sub>とこのF<sub>1</sub>を雌親 に持つ家系1と2のF<sub>2</sub>, さらにこれらのF<sub>2</sub> を雌親に持つ家系1と2のF<sub>3</sub>は, バンド パターンAであった (Figure 1, Figure 5, レーン4~14)。このため, ミトコンドリ アDNAは母系遺伝するという理論通り, これらの交雑後代はコイのミトコンドリア DNAを受け継いでいると考えられた。

魚類の交雑育種では, 倍数性やゲノム 組成により, 交雑後代の妊性等の生物学 的特性が大きく変わる (荒井ら 2017)。特 に異なるゲノムを有する雑種や3倍体が 不妊であれば, 高成長が期待されること がある (荒井 1989, 荒井ら 2017, Suzuki and Fukuda 1971, 1973)。また, コイやキ ンギョ等のフナ属魚種は,移植先の在来 生物に悪影響を及ぼす問題が指摘されて いるが (Arthington 2006, Costedoat et al. 2005, 2007, Crossman 1991, Hänfling et al. 2005, Holčík 1991),雑種が不妊で あれば繁殖や交雑を通じた悪影響を軽減 できる。このため、交雑後代の倍数性や ゲノム組成を推測することは重要となる。 今後もDNAの多型に基づくPCRを用いた 手法は,簡便なゲノム組成を推測できる 手法として利用できると考えられる。

# 謝辞

本研究の実施にあたり貴重な助言,便 宜を図って頂いた国立研究開発法人水産 研究・教育機構増養殖研究所育種研究セ ンターの方々に深謝する。本研究は国立 研究開発法人水産研究・教育機構の支援 を受けた。

# 文献

- Anil A, Gomelsky B, Schneider KJ (2016) Variability in microsatellite DNA markers in gynogenetic and backcross progenies obtained from ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio* L.)× goldfish (*Carassius auratus* L.) hybrid females. Aquaculture Res 47:1150-1155
- 荒井克俊 (1989) 8 異質倍数体「水産増養殖と染色体操作」, 鈴木亮編, 水産学シリーズ, 75, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 82-94.
- 荒井克俊,藤本貴史,山羽悦郎(2017)第10章 交雑と育種「水産遺伝育種学」,中嶋 正道・荒井克俊・岡本信明・谷口順彦編,東北大学出版会,仙台, pp 171-186.
- Arthington AH (2006) Ecological and genetic impacts of introduced and translocated freshwater fishes in Australia. Can J Fish Aquat Sci 48 : 33-43
- Asahida T, Kobayashi T, Saitoh K, Nakayama I (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. Fish Sci 62 : 727-730
- Cherfas NB, Gomelsky BI, Emelyanova OV, Recoubratsky AV (1994) Induced diploid gynogenesis and polyploidy in crusian carp, *Cyprinus carpio.*, hybrids. Aquac Fish Manag 25 : 943-954

- Costedoat C, Pech N, Salducci, MD, Chappaz R, Gilles A (2005) Evolution of mosaic hybrid zone between invasive and endemic species of Cyprinidae through space and time. Biol J Linn Soc Lond 85 : 135-155
- Costedoat C, Pech N, Chappaz R, Gilles A (2007) Novelties in hybrid zones : crossroads between population genomics and ecological approaches. PLOS ONE 4 : e357
- Crossman EJ (1991) Introduced freshwater fishes : A review of the North American perspective with emphasis on Canada. Can J Fish Aquat Sci 48 : 46-57
- Delomas TA, Gomelsky B, Anil A, Schneider KJ Warner JL (2016) Spontaneous polyploidy, gynogenesis and androgenesis in second generation (F2) koi *Cyprinus carpio* × goldfish *Carassius auratus* hybrids. J Fish Biol doi : 10.1111/jfb.13157
- Gomelsky B, Schneider KJ (2012) Koi x Goldfish hybrid female produce triploid progeny when backcross to koi male. N Am J Aquac 74 : 449-452
- Hamaguchi A (1961) Morphological investigations in the carp, the funa and their hybrids. Hyogo Suisan Jigyo Hohkoku : 121-141
- Hänfling B, Bolton P, Harley M, Carvalho GR (2005) A molecular approach to detect hybridization between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*). Freshw Biol 50 : 403-417
- Holčík J (1991) Fish introductions in Europe with particular reference to its central and eastern part. Can J Fish Aquat Sci 48 : 13-23
- Kednapat S, Uthairat NN, Sirawut K (2018) Species identification of non-hybrid and hybrid Pangasiid catfish using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Agri Natural Resources 52:99-105
- Liu S, Liu Y, Zhou G, Zhang X, Luo C, Feng H, He X, Zhu G, Yang H (2001) The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. Aquaculture 192 : 171-186

Liu SJ (2010) Distant hybridization leads to different ploidy fishes. Sci China 53:416-425 正岡哲治,名古屋博之,岡本裕之,荒木和男,藤原篤志,小林敬典(2013)コイとフナ類 における種判別用DNAマーカーの開発. DNA多型 21:94-98

- 正岡哲治,名古屋博之,岡本裕之,荒木和男,藤原篤志,小林敬典(2014)DNAマーカー によるコイとフナ類の雑種判別.DNA多型 22:80-83
- 正岡哲治,名古屋博之,岡本裕之, 荒木和男,藤原篤志,小林敬典(2015) PCRを利用したコイとフナ類の判別手法の開発. DNA多型 23:79-83
- Masaoka T, Oku H, Okamoto H, Araki K, Nagoya H, Yanagimoto T, Fujiwara A, Kobayashi T (2015) Distinction of hybrids between *Salvelinus leucomaenis* and *Salmo salar* using aromatase gene. DNA Testing 7: 27-35
- 正岡哲治,名古屋博之,岡本裕之, 荒木和男,藤原篤志,小林敬典(2016) PCRを利用したコイとフナ類の雑種判別. DNA多型 24:23-26
- 正岡哲治,名古屋博之,岡本裕之,荒木和男,藤原篤志,小林敬典(2017)産卵を誘発す る人為的環境におけるコイとフナ類の自然交雑の確認.DNA多型 25:11-15
- 正岡哲治,名古屋博之,岡本裕之,荒木和男,藤原篤志,小林敬典(2018)屋外大型飼育

池におけるコイとフナ類の自然交雑の確認. DNA多型 26:25-29

- Masaoka T, Okamoto H, Araki K, Nagoya H, Fujiwara A, Kobayashi T (2018) Distinction between non-native and Japanese native cyprinid fishes based on mitochondrial 16S ribosomal RNA gene regions. DNA Testing 10: 30-42
- 正岡哲治,名古屋博之,岡本裕之,荒木和男,藤原篤志,小林敬典(2019) DNAマーカー を用いたコイとキンギョの雑種判別. DNA鑑定 11:19-30
- McKeown NJ, Robin J, Sha, PW (2015) Species-specific PCR-RFLP for identification of early life history stages of squid and other applications to fisheries research. Fish Res 167: 207-209
- 名古屋博之,野村和晴,伊東尚史,正岡哲治, 荒木和男(2016)コイとゲンゴロウブナ の交雑と戻し交雑個体について.平成28年度日本水産学会秋季大会講演要旨:17
- 名古屋博之,野村和晴,正岡哲治(2018)コイとフナ類の交雑個体の妊性と倍数性-3 4 倍体作出の試みと3倍体F2の成熟.平成30年度日本水産学会秋季大会講演要旨:30
- Nelson JS (2006) Fishes of the World fourth edition. John Wiley & Sons, Hoboken : 139-143
- 小島吉雄(1983)魚類細胞遺伝学. 緑書房, 東京
- Ojima Y, Hayashi M, Ueno K (1975) Triploidy appeared in the back-cross offspring from Funa-carp crossing. Proc Jpn Acad 51 : 702-706
- Palumbi SR, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G (1991) The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu
- Schmidt BF, Amorim AF, Hilsdorf AWS (2015) PCR-RFLP analysis to identify four ray species of the genus Dasyatis (Elasmobranchii, Dasyatidae) fished along the southeastern and southern coast of Brazil. Fish Res 167 : 71-74
- Suzuki R, Fukuda Y (1971) Survival potential of F<sub>1</sub> hybrids among salmonid fishes. Bulletin of Freshwater Fisheries Research Laboratory, 21 : 69-83
- Suzuki R, Fukuda Y (1973) Sexual maturity of F<sub>1</sub> hybrids among salmonid fishes. Ibid, 24 : 11-31
- Takayama S, Hamaguchi A, Ojima Y, Kusa M (1961) On the mosaic organization of cortical alveoli in eggs of Carp-funa hybrids. Annot Zool 34 : 128-131

# 【連絡著者】

正岡哲治 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所 養殖部門育種部育種基盤グループ 〒519-0423 三重県度会郡玉城町昼田224-1 電話:0596-58-6411 FAX:0596-58-6413 E-mail:tmasa@fra.affrc.go.jp

Tetsuji Masaoka

Japan Fisheries Research and Education Agency, Fisheries Technology Institute, Aquaculture Research Department, Aquatic Breeding Division 224-1 Hiruta, Tamaki, Mie 519-0423, JAPAN Phone : +81-(0)596-58-6411, FAX : +81-(0)596-58-6413 E-mail : tmasa@fra.affrc.go.jp

# [Running title]

Estimation of composition of genome in hybrid F<sub>3</sub>

# [Abbreviations]

水産機構水技研