

# AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism : 増幅断片長多型) 解析による3倍性ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*) に特徴的な ゲノムマーカーの探索

*Isolation and Characterization of Genomic DNA Markers from the Gynogenetic Triploid  
Ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*) by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis*

高瀬 有加里、藤谷 英男、村上 賢

麻布大学獣医学部分子生物学研究室、神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

Yukari TAKASE, Hideo FUJITANI, Masaru MURAKAMI

Laboratory of Molecular Biology, School of Veterinary Medicine, Azabu University,  
1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

**Abstract.** The Japanese silver crucian carp (so-called ginbuna, *Carassius auratus langsdorfi*) has two reproduction systems; one is a sexual reproduction practiced by diploid individuals and the other is gynogenetic reproduction by triploid individuals. In this study, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analysis was carried out to isolate and characterize genomic DNA markers for triploid ginbuna, as a step toward revealing the genomic makeup and origin of triploid ginbuna. Two valuable DNA markers were isolated from 14 fragments cloned from 3 AFLP fragments in the triploid ginbuna genome. Specific PCR analyses to these DNA markers and their sequencing analyses allowed us to divide the triploid ginbuna DNA into 6 genomic types (type A~F). The PCR products from many triploid ginbuna individuals comprising type A, C, D and E were shared with those from diploid ginbuna and those from the continental silver crucian carp, *C. a. gibelio*. The triploid ginbuna of type B appears to be derived from the gibelio crucian carp. These data provide additional evidence for the multiple origins of the triploid ginbuna and the genomic contribution made by the diploid ginbuna and the gibelio crucian carp to the triploid hybrid ginbuna.

**Key words:** AFLP, triploid, ginbuna, crucian carp, gynogenesis

## 1. はじめに

日本のいわゆるギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*) には、通常の有性生殖をして繁殖する2倍体 (2n) の他に、天然で雌性生殖をしてクローン繁殖をする多くの3倍性 (3n) 集団が存在していることが知られている。3n フナのゲノム起源について

はミトコンドリアDNA (mtDNA) のD-loop領域による解析<sup>1)</sup> から、多くの3倍性ギンブナの母系起源は2倍体ギンブナであり、一部の3倍性ギンブナが大陸産フナ (キンギョの祖先種である普通フナ *C. auratus auratus* またはギベリオブナ *C. auratus gibelio*) を母系起源とすると考えられている。またmtDNAのNADH5やCytbの遺伝子領域の配列解析において

も同様の結果を得ている（未発表データ）。さらに、ゲノムサブトラクション法（RDA法）による解析から、3nギンブナゲノム構成への2nギンブナと大陸産フナの関与が指摘されている<sup>2)</sup>。しかし3nギンブナの起源の詳細については未だ不明な点が多く、日本産フナと大陸産フナの系統学的関係などを解明するためには、さらに多くの核ゲノム由来のマーカーを必要とする。

AFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism、増幅断片長多型）解析は、ゲノムDNAを制限酵素で切断し、その断片をPCR法により選択的に増幅して多型を検出する新しいDNAフィンガープリント法である<sup>3,4)</sup>。すなわち、2種類の制限酵素で処理をしたDNA断片に配列既知のオリゴヌクレオチドアダプターを付加し、選択的に増幅されたDNA断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析する技術である。この方法は、従来のゲノムDNA多型解析で用いられていたRFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）解析<sup>5)</sup>やRAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）法<sup>6)</sup>と比べて、検出できる多型マーカーの数が多く優れており、植物の多型解析ではよく利用されている<sup>7-9)</sup>。また、魚類のティラピア（*Oreochromis niloticus*）や<sup>10)</sup>、最近では豚<sup>11)</sup>などの哺乳類への応用も行われている。

そこで、本研究ではAFLP解析を用いて3nギンブナに特徴的なゲノムマーカーの探索を行い、得られたマーカーから、雌性生殖する3nギンブナのゲノム構成とその起源について検討した。

## 2. 材料と方法

### 2-1 フナ材料

国内各地域から採集した2nギンブナ10尾、3nギンブナ54尾、4nギンブナ5尾（山口県大屋川；2n：4尾、3n：3尾、山口県阿武川；2n：4尾、3n：13尾、神奈川県平塚市小出川；2n：2尾、3n：7尾、4n：3尾、神奈川県平塚市渋田川4n：2尾、山梨県八代町笛吹川；3n：25尾、長野県諏訪湖；3n：6尾）を用いた。倍数性の判定は、PI染色した各赤血球核の蛍光量をフローサイトメトリーで測定することにより行った<sup>12)</sup>。また、ゲンゴロウブナ2尾、ニゴロブナ4尾、キンブナ2尾、中国普通

ブナ5尾、ギベリオブナ1尾、キンギョ2尾、そしてオランダ産ヨーロッパブナ2尾とコイ2尾を用いた。サンプルに用いたフナは形態的特徴<sup>13)</sup>によって分類した。

### 2-2 DNAの抽出

DNAの抽出は肝臓または血液から行った。肝臓からの抽出はAsahidaら<sup>14)</sup>の方法に従い、TNES-6M尿素緩衝液中でプロテイナーゼK処理を行い、フェノール-クロロホルム抽出により行った。血液からの抽出にはGenとるくん血液用（宝酒造）を用い、添付のマニュアルに従って抽出した。DNA溶液の濃度は波長260 nmでの吸光度から求めた。

### 2-3 AFLP法

AFLP Ligation and Preselective Amplification Module Kit（Applied Biosystems, USA）を使用し、添付のプロトコールに従い実施した。2nギンブナ2尾と3nギンブナ3尾（いずれも山口県大屋川産）のゲノムDNAを*EcoR* Iと*Mse* Iの制限酵素で消化した。制限酵素処理した各ゲノムDNA500ngにキット添付の*EcoR* Iアダプターと*Mse* Iアダプターをリガーゼで結合させ、添付のpreselectiveプライマーセットを用いて、2分間熱変性、94℃20秒、56℃30秒、72℃2分を30サイクル、最後に60℃30分間伸長の条件でPCR増幅を行った。続いて、このpreselective PCR増幅産物を鋳型とし、3種類の選択的プライマーセット（selective primer set 1；GAC TGC GTA CCA ATT CAC TとGAT GAG TCC TGA GTA ACT T、selective primer set 2；GAC TGC GTA CCA ATT CAA CとGAT GAG TCC TGA GTA ACT A、selective primer set 3；GAC TGC GTA CCA ATT CAC AとGAT GAG TCC TGA GTA ACT G）を用いて以下の条件でPCR増幅した。94℃2分間の熱変性の後、94℃20秒、66℃～57℃（66℃から57℃まで1サイクルごとに1℃温度を下げる）30秒、72℃2分を10サイクル、さらに94℃20秒、56℃30秒、72℃2分を20サイクル行い、最後に60℃30分間の伸長反応を行った。これらの増幅産物の多型をゲル電気泳動（3% Nusieve GTG agarose）により解析した。

### 2-4 DNA断片のクローニングと配列解析

ゲル電気泳動により選択した3nギンブナに特徴的と考えられるDNA断片をWizard SV gel and PCR Clean-Up System（Promega, U.S.A.）を用いて抽出し、

pGEM-T Easy Vector System II (Promega) を使用して、TA クローニングを行った。目的のインサートサイズをもつコロニーを選別し、BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を使用してシーケンス反応を行い、ABI PRISM 3100 DNA Analyzer によりインサートの塩基配列を調べた。配列解析は、GENETYX-MAC ver.12 遺伝情報処理ソフトウェア (ソフトウェア開発(株)) で行った。

#### 2-5 特異的 PCR と配列解析

得られたインサートの塩基配列情報をもとに、OLIGO 6.5 Primer Analyzing Software (National Biosciences, Inc.) により 14 組以上の特異的プライマーを設定し、各ゲノム DNA (100 ~ 600 ng) を鋳型として、初期熱変性 95 °C 3 分間行った後、95 °C 30 秒、50 °C 30 秒、72 °C 30 秒を 30 サイクル、最後に 72 °C 10 分間の伸長反応の条件で PCR を行った。

3n ギンブナに特徴的な増幅断片を示すプライマーセットは Y2-2 primer set (TCT CAC TTG CTG CAT TTG AA と ATA GCA CTG ATA CCT CCC AC) および Y2-16 primer set (GAG CTT CCC AGC ATG ACA TC と AAG GTT TCT CTA TGA GAC CG) の 2 組であった。これらのプライマーセットで増幅された断片の塩基配列は上述のように決定した。また、Clustal W によるアラインメントを行い<sup>15)</sup>、近隣結合法 (NJ 法)<sup>16)</sup> により系統樹を作成した。作図には Tree View を用い<sup>17)</sup>、信頼性は 1,000 回くり返した場合のブー

トストラップ値により評価した<sup>18)</sup>。

### 3. 結果

3 種類の選択的プライマーセットを用い、山口県大屋川産の 2n ギンブナ 2 尾と 3n ギンブナ 3 尾に対して AFLP 解析を行った。selective primer set 1 では 400 bp 付近に、selective primer set 2 では約 350 bp において、selective primer set 3 では、約 380 bp において 3n ギンブナに特徴的なバンドが見られた (図 1)。続いて、これらの 3 つの特徴的なバンドを切り出し、クローニングを行った。

各選択的プライマーセットにより得られた 400 bp、350 bp、380 bp のサイズからなるインサートをもつコロニーの塩基配列をそれぞれ 52 個、43 個、34 個調べたところ、用いた 3n ギンブナ 3 尾に共通して存在すると考えられる断片は、それぞれ 5 個、4 個、5 個であった。これら 14 個の配列について、それぞれを特異的に増幅できるように少なくとも 14 対のプライマーセットを設定し、数多くの 3n ギンブナおよびその他のフナ個体について増幅産物のバンドパターンを予備的に確認した。その結果、selective primer 3 から得られた 380 bp の断片について設定した Y2-2 プライマーセットと Y2-16 プライマーセットの 2 組のプライマーセットにおいて、3n ギンブナに特徴的な多型が得られた。これらの 2 組による増幅産物につ

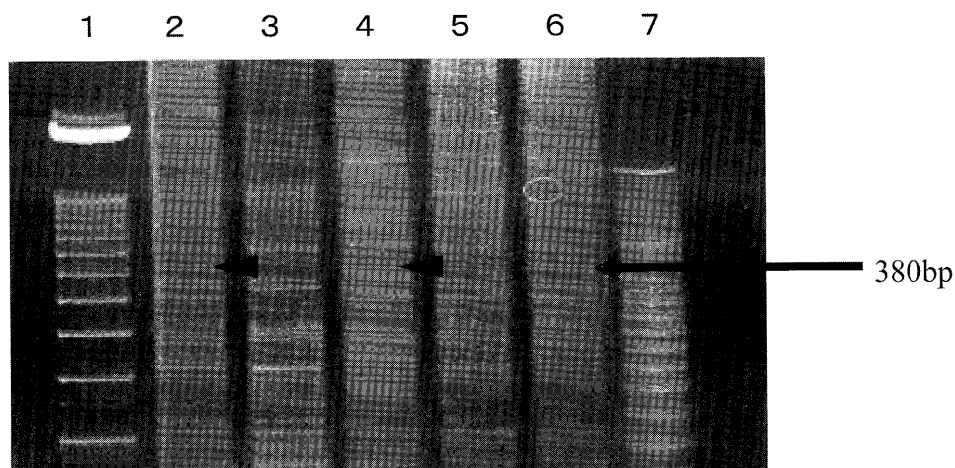


図 1. selective primer set 3 による PCR 産物の電気泳動像

- レーン 1 : 50 bp ラダー分子量マーカー
- レーン 2, 4, 6 : 3n ギンブナ
- レーン 3, 5 : 2n ギンブナ
- レーン 7 : 20 bp ラダー分子量マーカー

表1. AFLP マーカーによる増幅断片パターンと mtDNA 解析による母系起源

種類	AFLP Y2-2 プライマーによる増幅産物				AFLP Y2-16 プライマーによる増幅産物				タイプ	出現頻度 (%)	mtDNA による母系起源※		
	2倍体 ギンブナ 由来 356bp	ギベリオ ブナ 由来 306bp	その他の 亜種由来 約 300bp	2倍体 ギンブナ 由来 253bp	ギベリオ ブナ 由来 256bp	ギベリオ ブナ 由来 267bp	その他の 亜種由来 267bp	2倍体 ギンブナ 由来			中国普通 ブナ 由来	ギベリオ ブナ 由来	
2倍体 ギンブナ (n = 10)	○			○					90	○			
	○		○	○					10	○			
3倍性 ギンブナ (n = 54)	○	○		○		○		A	43.5	○			
		○			○			B	4.4			○	
		○		○		○		C	8.7	○			
	○			○		○		D	13	○			
	○	○			○			E	21.8	○			
			○	○				F	8.6	○			
4倍性 ギンブナ (n = 5)	○	○		○		○		A'	20	○			
		○			○			B'	80			○	
ギベリオブナ		○			○	○			100			○	
中国普通ブナ			○				○		100		○		
キンギョ			○				○		100		○		

※ mtDNA の D-loop 領域の塩基配列を解析することにより、母系起源を求めたり。

いて詳細に解析した。

Y2-2 と Y2-16 の 2 組のプライマーセットにより得られた増幅断片のパターンを表 1 に示した。これらのパターンの組合せにより、3n ギンブナはタイプ A ~ F の 6 種類に分類された。

Y2-2 プライマーによる PCR 産物では、2n ギンブナからは約 350 bp バンドが主だったのに対し、多くの 3n ギンブナ (約 65 % ; タイプ A と E) からは約 350 bp の他に約 300 bp のバンドも見られた。また、ギベリオブナおよび中国普通ブナ、キンギョは約 300 bp バンドのみであった。これらの増幅産物の塩基配列を決定したところ、3n ギンブナの 356 bp 断片は 2n ギンブナの 356 bp 断片と同一配列であり、3n ギンブナの 306 bp バンドは、356 bp バンドと比べて 7 箇所の部位で欠失が見られ、ギベリオブナの 306 bp バンドと同一であった。一方で、306 bp 断片のみ、または 356 bp 断片のみしかもたない 3n ギンブナも、それぞれ約 22 % (タイプ B, C, F) と 13 % (タイプ D) 存在した。また、4n ギンブナでは、多くが 306 bp のみの断片をもっている個体 (80 % ; タイプ B') であったが、306 bp と 356 bp の両方の断片をもつ個体 (20 % ; タイプ A') も認められた。なお、ニゴロブナは 350 bp バンドのみをもっており、2n ギンブナの 356 bp 断片と高い相同性 (97.5 %) を示し

た。

それぞれの Y2-2 断片の塩基配列をもとに系統樹を作成した (図 2)。ギンブナ 356 bp バンドのクラスター、オランダ産ヨーロッパブナとゲンゴロウブナの約 300 bp バンドのクラスター、ギンブナ、ギベリオブナ、中国普通ブナの約 300 bp バンドのグループの 3 つのクラスターが見られた。

Y2-2 プライマーによって増幅された各ブナの約 300 bp と約 350 bp バンドの配列は、どれも遺伝子コード領域を含まず、AT-rich な塩基配列であった。

Y2-16 による PCR 産物では、2n ギンブナからは 253 bp バンドのみであったのに対し、3n ギンブナの多くは 253 bp と 267 bp の 2 本のバンドをもつ集団 (約 65 % ; タイプ A, C, D) であり、その他に 256 bp のバンドのみを持つ集団 (約 26 % ; タイプ B と E) および 253 bp 断片のみをもつ集団 (8.6 % ; タイプ F) の 3 種類が存在した。ギベリオブナは 256 bp と 267 bp の 2 本のバンドをもち、中国普通ブナとキンギョは 267 bp バンドのみであった。253 bp と 267 bp の 2 本のバンドをもつ 3n ギンブナ (タイプ A, C, D) の 253 bp バンドは、2n ギンブナの 253 bp バンドと同一の配列であり、267 bp バンドはギベリオブナの 267 bp バンドと高い相同性 (98.5 %) があつた。また、小出川で採取された 3n と 4n ギンブナ、長野県

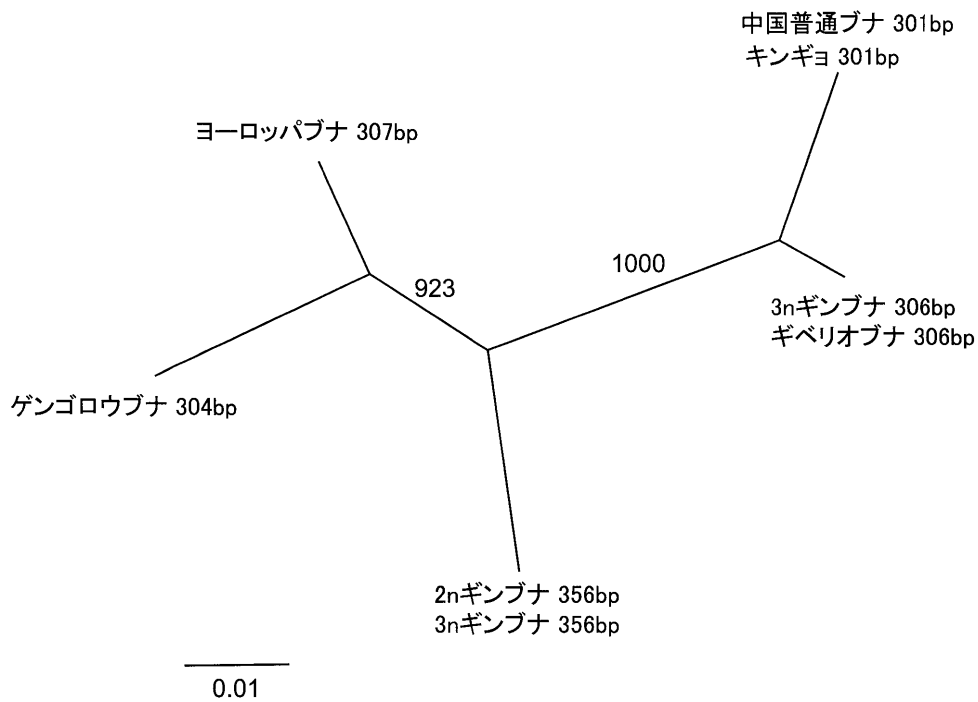


図2. Y2-2断片の塩基配列に基づくNJ法による系統樹  
各枝の数字はブートストラップ値 (試行回数1000回) を示す。  
各塩基配列はDDBJ/EMBL/GenBank国際塩基配列データベースにおけるアクセッション番号  
AB379644 ~ AB379648 に登録された。

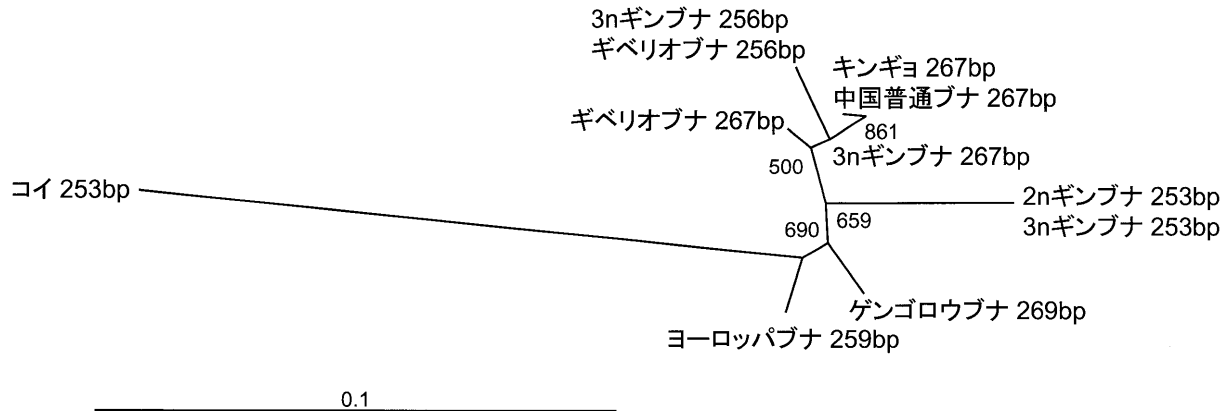


図2. Y2-2断片の塩基配列に基づくNJ法による系統樹  
各枝の数字はブートストラップ値 (試行回数1000回) を示す。

諏訪湖で採取された3nギンブナには256 bpのバンドのみをもつ個体がみられ、これらのフナの256 bpバンドはギベリオブナの256 bpバンドと同一な配列であった。

それぞれのY2-16断片の塩基配列をもとに系統樹を作成した (図3)。オランダ産ヨーロッパブナおよびゲンゴロウブナは、その他のフナとは離れて分岐していた。3nギンブナと2nギンブナの253 bpは1つのクラスターに、3nギンブナの256 bpと267 bpバン

ドはそれぞれ対応するギベリオブナのクラスターに含まれた。また、キンギョの267 bpバンドは3n中国普通ブナのクラスターに含まれた。なお、コイでも243 bpバンドが認められたが、その塩基配列は2nギンブナの253 bpバンドとは異なるもの (相同性82.7%) であった。

Y2-16プライマーによって増幅されたいずれの断片も、Y2-2プライマーによって増幅された断片と同様に、どれも非遺伝子コード領域と考えられた。

#### 4. 考 察

AFLP解析は、従来のRFLP解析やRAPD法に比べ多数のDNA多型マーカ―を検出できるため、連鎖地図作成などのマーカ―として利用されている<sup>19,20)</sup>。本研究ではAFLP法を単なるDNA多型を検出する手段としてではなく、特異的DNA断片を得る方法として利用した。雌性生殖する3nフナと有性生殖する2nフナのゲノムDNAを制限酵素で切断し、3種類のAFLP用選択的プライマ―を用いてPCR増幅した断片をゲル電気泳動により比較解析した。続いて、3倍性DNAに特徴的な増幅断片の回収、クローニング、塩基配列の決定を行い、さらにそれらの塩基配列に基づいて設定した特異的プライマ―でPCRを行うことにより、3nフナに特徴的な2組のDNA増幅産物(Y2-2とY2-16のプライマ―セットによるPCR産物)を得た。このようにAFLP解析法を利用して3nギンブナを特徴付けるゲノムDNAマーカ―を検出した。

今回検出したY2-2とY2-16の2つのゲノムマーカ―による解析の結果から、3nギンブナはタイプA～Fの6種類に分類された(表1)。本研究で使用した3nギンブナの約43.5%は、いずれのマーカ―においても2nギンブナとギベリオブナ由来の両方の断片をもっていた(タイプA)。また、タイプC、D、EもY2-2またはY2-16のいずれかで2nギンブナとギベリオブナ由来の両方の断片をもっていた。このように、国内に生息する3nギンブナの約87%(タイプA、C、D、E)は、2nギンブナとギベリオブナに由来すると考えられた。これは、多くの3nギンブナが2nギンブナとギベリオブナ由来であるとするこれまでの我々の仮説を支持した。mtDNAの解析からこれらのギンブナの母系起源は2nギンブナであることから(表1)、父系起源は大陸産の複数のギベリオブナと考えられた。一方で、ギベリオブナのみ由来すると考えられるタイプB(出現頻度4.4%、母系起源もギベリオブナタイプ;表1)や日本の亜種間交配によって生じたと考えられる3nギンブナ(タイプF、出現頻度8.6%)の存在も認められた。DNA断片の塩基配列解析から、ギベリオブナ由来または2nギンブナ由来と考えられる他に、未知の魚種由来と考えられるものもあり、2nギンブナやギベリオブナ以外のフナに由来する3nギンブナが存在することが示唆

された。3nギンブナの起源は単一ではなく複数あること<sup>21)</sup>が支持された。なお、4nギンブナも多起源であると考えられた。雌性生殖をするフナが産出する3n卵の中には、本来排除されるはずの精子核(n)が取り込まれて4nとなることがあることが知られており<sup>22)</sup>、ゲノム構成は様々であると考えられる。

ゲンゴロウブナとヨーロッパブナ(オランダ産)で認められたY2-2での304と307bpの断片およびY2-16での269と259bp断片は、いずれの場合も他のフナ由来のものとは離れて位置した(図2, 図3)。mtDNAのD-ループ領域の塩基配列に基づく解析結果(1)と同様に、今回のAFLPマーカ―からもゲンゴロウブナが他のフナ亜種とは系統的に離れていることを支持した。ゲンゴロウブナの祖先型と考えられる化石は、50万年前の更新世の土層から発見されている<sup>23)</sup>。ゲンゴロウブナは大陸から移動してきたフナの祖先からいち早く環境に適応し、分化した可能性がある。

Y2-16マーカ―で見られた中国普通ブナとキンギョの高い相同性(99.3%)は、中国普通鰻がキンギョの祖先であるという説<sup>24)</sup>と一致しており、そのゲノム構成が近縁であることが確認された。

以上、AFLP解析により3nギンブナに特徴的な2種類の新たなDNAマーカ―を検出し、倍数体フナが多起源性とその由来を部分的に明らかにした。3nギンブナの特徴である雌性生殖の起源を明らかにするためには、ギベリオブナ(大陸産フナ)とのゲノムDNAをさらに詳細に比較するとともに、遺伝子領域からのアプローチも必要である。

#### 5. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、フナのサンプル収集にご協力いただきました以下の方々へ深く感謝致します; 北海道大学大学院水産科学研究科・荒井克俊教授、山梨県立富士湧水の里水族館・羽田幸司氏、茨城県内水面水産試験場・渡辺直樹氏、Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Zoology・Zhang Ya-Ping教授, Jing Luo博士、University of Helsinki・松葉周子博士。

文 献

- 1) Murakami M., Matsuba C., Fujitani H. The maternal origins of the triploid gimbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing. *Genes Genet. Syst.* 76, 25-32 (2001).
- 2) Murakami M., Matsuba C., Fujitani H. Characterization of DNA markers isolated from the gynogenetic triploid gimbuna (*Carassius auratus langsdorfi*) by representational difference analysis. *Aquaculture* 208, 59-68 (2002).
- 3) Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans B., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23, 4407-4414 (1995).
- 4) Mueller U. G. and Wolfenbarger L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14, 389-394 (1999).
- 5) Reilly J. G. and Thomas C. A. Jr. Length polymorphisms, restriction site variation, and maternal inheritance of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. *Plasmid* 3, 109-115 (1980).
- 6) Williams J. G., Kubelik A. R., Lick K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18, 6531-6535 (1990).
- 7) Sharbel T. F., Haubold B., Mitchell-Olds T. Genetic isolation by distance in *Arabidopsis thaliana* biogeography and postglacial colonization of Europe. *Mol. Ecol.* 9, 2109-2118 (2000).
- 8) Larson S. R., Cartier E., McCracken C. L., Dyer D. Mode of reproduction and amplified fragment length polymorphism variation in purple needlegrass (*Nassella pulchra*): utilization of natural germplasm sources. *Mol. Ecol.* 10, 1165-1177 (2001).
- 9) Zawko G., Krauss S. L., Dixon K. W., Sivasithamparan K. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Mol. Ecol.* 10, 2389-2396 (2001).
- 10) Kocher T. D., Lee W. J., Sobolewska H., Penman D. A genetic linkage map of a cichlid fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148, 1225-1232 (1998).
- 11) Kim K. S., Yeo J. S., Kim J. W. Assessment of genetic diversity of Korean native pig (*Sus scrofa*) using AFLP markers. *Genes Genet. Syst.* 77, 361-368 (2002).
- 12) Zhang Q. and Arai K. Flow cytometry for DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach. *Fisheries Sci.* 62, 870-877 (1996).
- 13) 中村守純 (1982) 原色淡水魚類検索図鑑 北隆館 pp. 140-142.
- 14) Asahida T., Kobayashi T., Saitoh K., Nakayama I. 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).
- 15) Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 11, 4673-4680 (1994).
- 16) Saitou N. and Nei M. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425 (1987).
- 17) Page R. D. Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358 (1996).
- 18) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791 (1985).
- 19) Young W. P., Wheeler P. A., Coryell V. H., Keim P., Thorgaard G. H. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics* 148, 839-850 (1998).
- 20) Nakamura K., Ozaki A., Akutsu T., Iwaki K., Sakamoto T., Yoshizaki G., Okamoto N. Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Genet. Genomics* 265, 687-693 (2001).
- 21) Iguchi K., Yamamoto G., Matsubara N., Nishida M. Morphological and genetic analysis of fish of a *Carassius* complex (Cyprinidae) in Lake Kasumigaura with reference to the taxonomic status of two all-female triploid morphs. *Biol. J. Linnean Soc.* 79, 351-357 (2003).
- 22) Zhou L. Z., Wang Y., Gui J. F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* bloch) as revealed by RAPD assays. *J. Mol. Evol.* 51, 498-506 (2000).
- 23) 琵琶湖自然史研究会 (1986) 琵琶湖南西岸の古琵琶湖層群の淡水化石群集、瑞浪市化石博物館研究報告 13, 57-103.
- 24) Ojima Y. and Takai A. (1979) Further cytogenetical studies on the origin of the Gold-fish. *Proc. Jpn. Acad.* 55 Ser B, 346-350.