

DNA標識を利用した農業水路系における魚類個体群の交流実態の検討—千葉県谷津田域のドジョウ個体群を事例として—

GENETIC VARIATION AND SPATIAL STRUCTURE OF FISH POPULATION IN DRAINAGE CANAL USING MICROSATELLITE DNA MARKER: A CASE STUDY OF LOACH POPULATION IN YATSU PADDY FIELD, CHIBA PREFECTURE

小出水規行¹・竹村武士²・奥島修二³・森 淳⁴・蛭原 周⁵

Noriyuki KOIZUMI, Takeshi TAKEMURA, Shuji OKUSHIMA, Atsushi MORI and Shu EBIHARA

¹正会員 博(農) 農村工学研究所主任研究員(〒305-8609 茨城県つくば市観音台 2-1-6)

²正会員 農修 農村工学研究所主任研究員(〒305-8609 茨城県つくば市観音台 2-1-6)

³正会員 農村工学研究所室長(〒305-8609 茨城県つくば市観音台 2-1-6)

⁴非会員 農村工学研究所主任研究員(〒305-8609 茨城県つくば市観音台 2-1-6)

⁵非会員 日本海洋株式会社 環境調査事業部(〒114-0005 東京都北区栄町 9-2)

We investigated genetic variation and spatial structure of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* population in drainage canals of Yatsu paddy field, Chiba Prefecture using microsatellite DNA markers. Populations in seven drainage canals in the Shitada-gawa River Basin were examined in this study. Population samples of 24 individuals were collected in each canal (a total of 167 individuals) in September 2004. Genotypes of alleles for three microsatellite loci, Mac 23, 43 and 48 for each individual were measured with PCR and electrophoresis techniques. Values of heterozygosity as an index of genetic variation, of populations ranged from 0.41 to 0.57 in all canals, and the null hypotheses of the Hardy-Weinberg equilibrium for most populations were not rejected at the 0.05 level of significance. Results of cluster analyses for F_{st} as an index of spatial genetic structure, among canals suggested that these populations could be divided into three groups, composed of upstream, central and downstream populations.

Key Words: Microsatellite DNA, genetic variation and spatial structure, loach *Misgurnus anguillicaudatus*, drainage canal system, Yatsu paddy field, Chiba Prefecture

1. はじめに

農業水路は魚類をはじめ様々な生物の生息場となっている。これまで魚類生息場の保全に向けて、生息分布の実態や水路環境との応答関係に関する研究が盛んに行われてきた^{1)~5)}。しかし、移動・繁殖に伴う個体群間の交流については外部標識等による一時的な(数ヶ月レベルの)追跡調査しかなく^{6), 7)}、多年の交流によって形成される個体群の地域性については検討されていない。

個体群の地域性を明らかにすることは、圃場整備等の面的な環境整備事業の実施現場において重要である。すなわち、対象個体群の地域性が異なればその地域性を保全しながら、境界となる生息場に頭首工や落差工等の水利施設を配備できる。また、地域性に差がなければ生息場を連続させるように、魚道や魚巢ブロック等を備えた

生物保全型水路の施工が必要となる。個体群の地域性判別は学術だけでなく実務的にも活用でき、その手法としては現在、マイクロサテライト等のDNA標識(マーカ一)が有効と考えられている⁸⁾。

著者らはこれまで千葉県谷津田域における魚類分布と農業水路環境との関係について継続的に調査してきた^{3)~7)}。その結果の1つとして、対象域にはドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* が優占的に生息するが、落差によって各水路は本川から分断化しているため、水路間における個体群の交流はほとんどみられない状態であった。したがって今後、水路間のネットワークを再生させるような整備事業を計画した場合、かつて個体群はどのように交流していたのか、それに応えられるような基礎的知見が必要である。

本報告では以上の背景により、ドジョウ個体群の地域

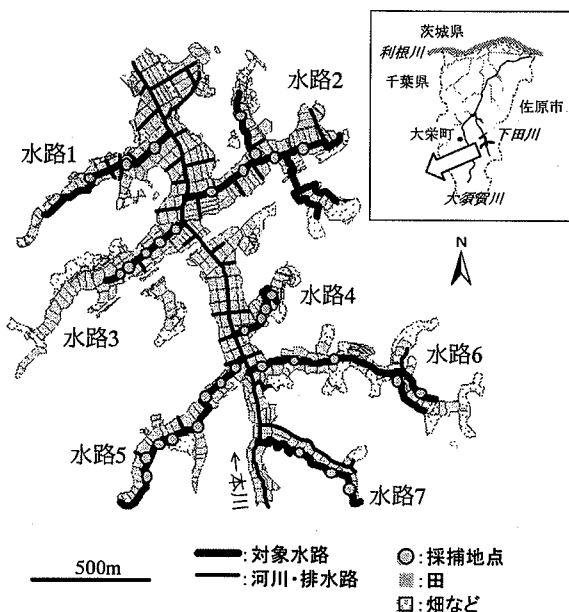


図-1 千葉県下田川流域における調査対象水路

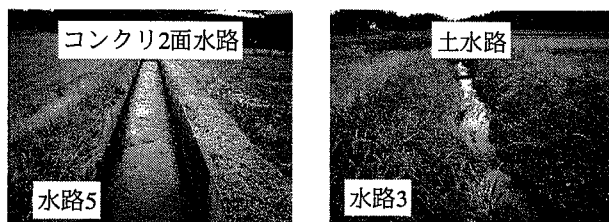


写真-1 コンクリ2面水路 (左) と土水路 (右) の例

性判別に向けて、複数の農業排水路における個体群の交流実態を遺伝的に検討することを試みた。

2. 材料と方法

(1) マイクロサテライト DNA

ドジョウの体細胞の核には 50 本の染色体があり (ヒトの場合は 46 本)⁹⁾、これらはそれぞれ半数ずつ父親と母親から受け継いだものである。DNA は染色体の主要な構成物質であり、2 本の直鎖が対になってらせん状に結合している。DNA の直鎖には A・G・C・T の 4 塩基が数億～数 10 億個配列し、遺伝的機能をもつ塩基配列は全体の 5% 程度に過ぎない。残りのほとんどの配列は遺伝的機能のない‘がらくた’と呼ばれる配列である¹⁰⁾。

マイクロサテライトはがらくた配列のうち、2～5 塩基が数回～数 10 回繰り返している配列を指す¹¹⁾。中でも CA の繰り返し配列は DNA 上に偏りなく、300 千～500 千塩基間隔に存在する。マイクロサテライトはそれぞれ互いに独立 (遺伝的に中立) し、各々が 1 つの遺伝子座として取り扱われている。

マイクロサテライト遺伝子座における繰り返し数は対立遺伝子と呼ばれる。1 つの遺伝子座には父親と母親に由来する 2 つの対立遺伝子があり、これら (繰り返し

表-1 調査対象水路の環境特性

水路	水路材質	水面幅 cm	水深 cm	本川合流水位差 cm	水路総延長 m	採取点数
1	コンクリ2面	67～71	6～8	50	760	3
2	コンクリ2面	84～89	8～9	60	1,882	5
3	土	99～104	14	45	467	5
4	土	52～63	7～5	61	368	4
5	コンクリ2面	101～103	11	55	968	8
6	土	90～92	11～13	0	1,245	5
7	土	41～51	9～6	20	641	3

(2004 年 9 月の計測値)

表-2 対象水路における採取個体の全長サイズ

水路	平均±標準偏差 (最小, 最大) cm	採取数
1	7.9±1.5 (4.9, 10.6)	24
2	6.3±1.2 (4.8, 9.0)	24
3	5.8±2.1 (3.4, 10.0)	24
4	5.9±1.6 (3.3, 9.6)	24
5	7.6±2.4 (3.6, 12.3)	24
6	9.5±1.9 (5.7, 13.4)	24
7	6.5±1.7 (4.6, 12.2)	24
合計	7.1±2.2 (3.3, 13.4)	168

(2004 年 9 月に採取)

数) が互いに異なっている状態をヘテロ接合、同じ状態をホモ接合という¹¹⁾。一般にマイクロサテライトの対立遺伝子は個体間で違いが生じやすいことから、多型 (たけい) に富んでいる。

現在、マイクロサテライトは DNA マーカーとして、種内の系統関係や個体群内の血縁関係を調べる上で、医学、動物育種学、分子生態学等の様々な研究分野に幅広く利用されている¹²⁾。

(2) 調査対象水路とサンプル採取

a) 調査対象水路

利根川下流に位置し、複数の谷津田によって構成される千葉県下田川流域の農業排水路 7 本を調査対象とした (図-1)。対象水路は圃場整備によって改修された 3 本のコンクリ2面水路と 4 本の未改修水路 (土水路) からなる (例えば、写真-1)。水路全体の環境特性として (表-1)、各水路の総延長は 368～1,882m、サンプル採取時に計測した水面幅は 41～104cm、水深は 6～14cm、底質は砂礫であった。ほとんどの水路は下田川本川との合流部に 20～60 cm の水位差をもち、本川から水路への移動経路を確保するような魚道等は設置されていなかった。

b) サンプル採取

対象各水路におけるサンプル採取は特定の場所に偏

表-3 マーカーに利用したマイクロサテライト遺伝子座の塩基配列

[illegible]

らないよう 3~8 定点で行い (図-1), 採取数は個体群解析に最低必要とされる 24 個体に統一した。漁具には電気ショッカー (アメリカ・スミスルート社 12 型) とタモ網 (間口 40cm, 網目 2mm) を利用し, 定点周辺約 5m 区間において水中に直流電圧 400~600V を数 10 秒間流しながら, 麻痺して動けなくなった個体をタモ網ですくい取った。採取個体についてはその場で全長 (mm 単位) を計測後, 尾ヒレの一部を 5mm 四方程度に切除し, 放流した。切除した尾ヒレについては 100%エタノールで固定し, DNA 分析に使用するまで -30℃で保管した。

サンプル採取は2004年9月15～17日に実施し、採取中に降雨はなかった。採取個体の全長サイズは水路全体で3.3～13.4cmの範囲にあり、平均7.1cm、標準偏差2.2cmとなった(表-2)。また各定点の環境情報として、採取後に水面幅、水深(代表横断面の平均)、本川との合流部水位差等を計測した(表-1)。

(3) 分析方法

a) DNA 抽出

サンプル個体（ヒレ）からの DNA 抽出には市販キット（QIAGEN 社 Dneasy Tissue Kit）を利用した。キットのプロトコールにしたがってエタノール固定しているヒレを常温に戻し、約2mm 四方のヒレ断片を試薬で溶解、精製した。分光光度計（GS ヘルスケアバイオサイエンス社 Genequant Pro）で DNA 濃度を計測し、各サンプルの DNA 抽出量は 0.7~9.7mg、平均 4.1mg であった。DNA サンプルは分析に使用するまで 4°C で保管した。

b) マイクロサテライトマーカー

日本 DNA データバンク (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) には1つのマイクロサテライト遺伝子座につき、その前後を合わせて数百塩基配列が登録されている。DNA の全塩基配列が解読されていないため、DNA 上の位置について

は特定できないが、ドジョウについては27個の遺伝子座を検索することができる。本報告ではこれらの遺伝子座について予備的に検討した結果¹³⁾、対立遺伝子に多型性（個体によって繰り返し数が異なること）を確認できた3つの遺伝子座をマーカーとして採用した（表-3）。各マーカーにおける繰り返し配列は遺伝子座Mac 23でCAとCT、Mac 43でCA、Mac 48でCAとCTになっている。

c) 塩基の繰り返し数の読み取り

一般にマイクロサテライト遺伝子座における繰り返し数はその塩基配列を解読するのではなく、マイクロサテライトを挟んだ配列を PCR で増幅させ、その増幅産物の塩基数（長さ）から読み取る¹²⁾。そして PCR による増幅配列の開始と終了には、プライマーと呼ばれる 20 塩基程度の配列を遺伝子座ごとに設計し、PCR の増幅反応に使用する。

本報告ではプライマー設計に市販ソフト（HitachiSoft 社 DNASIS）を利用し、各遺伝子座の増幅開始・終了プライマーを表-3 のように設計した。PCR における試薬の反応組成は 1 検体あたり 10 μ l とし、Taq DNA ポリメラーゼ（タカラバイオ社 TaKaRa Taq）を 0.05 μ l（0.25U）、10 $\times$ PCR バッファーを 1 μ l、dNTP（2.5mM each）を 0.8 μ l、増幅開始・終了プライマー 1 組（5 μ M each）を 2 μ l、H₂O を 5.2 μ l、サンプル DNA を 1 μ l（3.7~48.6ng、平均 20.5ng）混合させた。PCR 機器には BioRad 社 iCycler を使用し、反応条件として 94 $^{\circ}$ C で 2 分間の予備変性を行った後、94 $^{\circ}$ C で 1 分間→55 $^{\circ}$ C で 15 秒間→72 $^{\circ}$ C で 30 秒間のサイクルを 33 回繰り返し、72 $^{\circ}$ C で 7 秒間の伸張反応を行った。

PCRによる増幅産物の塩基数については、キャピラリーシーケンサー (ABI 社 Genetic Analyzer 3100) により電気泳動を行い、その結果を市販ソフト (ABI 社 Gene Mapper) で解析し、塩基の長さを決定した。シーケンサーに用いる試料は一検体あたり 11 μ l とし、HiDi ホルム

表-4 3つのマイクロサテライト遺伝子座に出現したドジョウ個体群の対立遺伝子（塩基数）

水路	Mac23（遺伝子座）		Mac43		Mac48	
	出現数	塩基数（対立遺伝子）	出現数	塩基数	出現数	塩基数
1	14	152, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 190, 192, 196, 220	2	152, 160	3	152, 160, 166
2	17	170, 172, 174, 176, 178, 180, 188, 190, 198, 200, 208, 210, 212, 218, 220, 222, 254	4	152, 154, 156, 160	4	152, 154, 156, 160
3	19	152, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 184, 186, 190, 194, 196, 200, 208, 210, 220, 222, 228, 232	3	152, 154, 160	4	152, 154, 160, 166
4	13	170, 172, 174, 176, 182, 184, 186, 188, 190, 200, 202, 220, 222	5	152, 154, 156, 160, 190	5	152, 154, 156, 160, 190
5	19	150, 152, 154, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 190, 192, 196, 200, 208, 210, 220, 222	4	152, 154, 160, 162	4	152, 154, 160, 162
6	18	152, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 186, 190, 192, 196, 200, 210, 212, 214, 226, 228, 232	3	152, 154, 160	6	138, 152, 154, 160, 164, 166
7	17	150, 152, 154, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 184, 192, 200, 212, 218, 220, 222, 232	5	152, 154, 156, 160, 190	5	152, 154, 156, 160, 190
合計	31		6		9	

アミドを 10μl, サイズスタンダード (ABI 社 Rox 400HG) を 0.15μl, 1/10 に希釈した PCR による増幅産物を 1μl 混合させ, 95℃で 2 分間の熱変性を行って用いた。

3. 分析結果の解析と考察

(1) ドジョウ個体群の遺伝的多型

3 つのマイクロサテライト遺伝子座で確認されたドジョウ個体群の対立遺伝子（プライマーで挟まれた塩基配列を PCR で増幅後, シーケンサーにより決定された塩基数）を表-4 に示す。対立遺伝子数は遺伝子座によって異なり, Mac 23 では合計 31 個からなる数多くの対立遺伝子 appeared。Mac 43, 48 の対立遺伝子数はそれぞれ合計 6, 9 個となり, Mac 23 の 1/3~1/5 程度となった。一般に対立遺伝子数が多い遺伝子座ほど, マイクロサテライトはマーカーとして有効と考えられている¹¹⁾。Mac 23 は極めて多型に富んだ優良マーカーであり, Mac 43, 48 も Mac 23 程でもないが, 多型が認められたことからマーカーとして利用可能であると推察される。

対象水路別の対立遺伝子数は各遺伝子座において顕著な差は認められなかった (表-4)。対立遺伝子としての塩基サイズは異なるが, Mac 23 では 13~19 個, Mac 43 では 2~5 個, Mac 48 では 3~6 個の範囲で対立遺伝子が確認された。

(2) 水路内におけるドジョウ個体群の遺伝的多様性

a) ヘテロ接合度の計算

遺伝的多様性を計る指標には 10 種程度が知られ¹¹⁾, 中でもヘテロ接合度は個体群の遺伝的多様性を評価する指標として幅広く利用されている。ヘテロ接合度はある遺伝子座における対立遺伝子のヘテロ接合型 (マイクロ

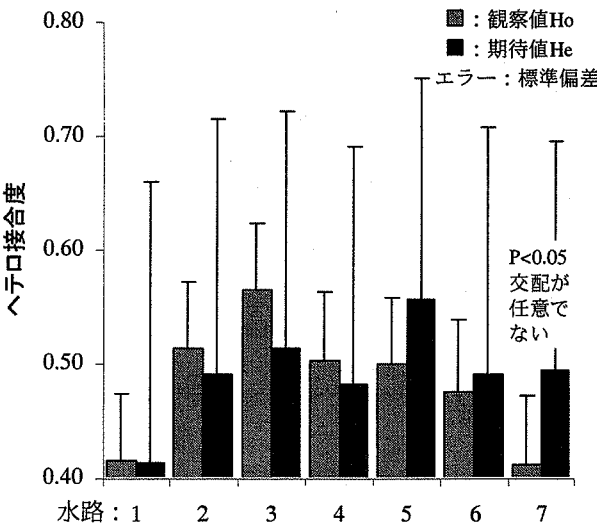


図-2 対象水路におけるドジョウ個体群のヘテロ接合度 Ho (観測値) と He (期待値)

サテライトでは繰り返し数=塩基数が異なっている状態)の頻度に相当し, 一般に健全な遺伝的特性を示す生物集団ではヘテロ接合となる確率が高くなり, 遺伝的多様性が失われた集団ではホモ接合の確率が高くなる¹³⁾。

ヘテロ接合度 H の基本式は式 (1) で与えられ¹¹⁾, ここで, p_i は対象とする 1 つの遺伝子座における対立遺伝子 i ($i=1, \dots, n$) の出現頻度である。

$$H=1-\sum p_i^2 \tag{1}$$

複数の遺伝子座を取り扱う場合は, 各遺伝子座について H を計算し, それらの値を平均してヘテロ接合度の代表値とする。

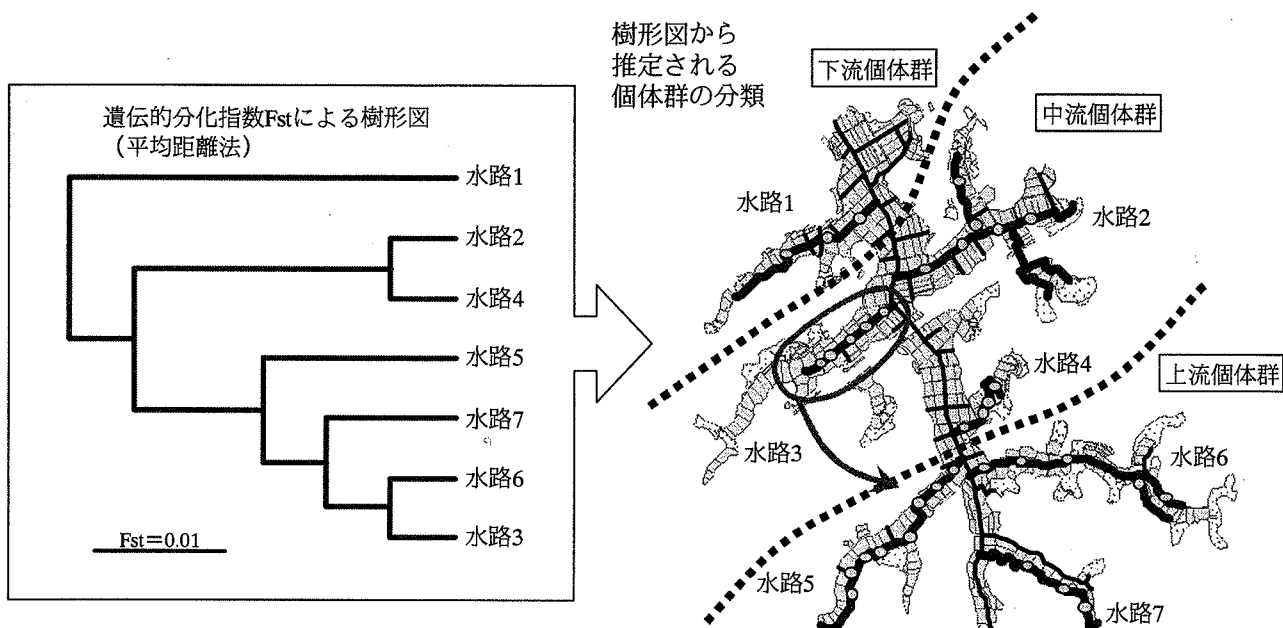


図-3 水路間におけるドジョウ個体群の遺伝的類似性 (平均距離法による樹形図)

本報告では実測データを利用して、3つの遺伝子座からなるヘテロ接合度の代表値を H_o (観測値) とした。さらに個体群の任意交配性 (繁殖期になると各個体は制限されることなく自由に交配する=ハーディ、ワインバーク平衡) について、理論的に計算されるヘテロ接合度の期待値 H_e を算出し、 H_o と H_e との差について統計検定 (マルコフ連鎖検定法: ノンパラメトリック検定的一种) を行った。計算には HP 上で無料公開されているプログラムソフト Excel Microsatellite Tools (<http://animalgenomics.ucd.ie/sdepar/mstoolkit/>) と GenePop (<http://wbimed.curtin.edu.au/genepop/index.html>) を使用した。

b) ヘテロ接合度による多様性評価

ドジョウ個体群のヘテロ接合度について、その一般な値 (例えば、全国や地域、水系レベルでの平均など) は調べられていない。ここでは対象水路に限定した相対的比較により、個体群の遺伝的多様性について考察した。各水路における個体群のヘテロ接合度 H_o (観測値) と H_e (期待値) を図-2 に示す。

対象水路の H_o は 0.41~0.57 の範囲にあり、個体群の遺伝的多様性は水路によって異なった。個体群の多様性は水路 1, 7 で低く (共に $H_o=0.41$)、水路 3 で高くなり ($H_o=0.57$)、残りの水路については同レベルであった ($H_o=0.48\sim0.51$)。また各水路の H_o は水路 7 を除いて、 H_e との間に統計的な有意差は認められなかった ($p>0.05$)。個体群の交配は多くの水路において任意であり、水路 1 の個体群はそもそも遺伝的に単純なものと考えられた。

水路 7 の個体群は遺伝的多様性が低く、交配の任意性も棄却された ($p<0.05$)。このことは水路内において、いくつかの繁殖小集団が存在する、あるいは近親交配し

ている等の本分析では特定できない要因が推察される。さらに分析に使用したサンプル数が少なかったこともその一因として考えられる。したがって、水路 7 の個体群については更なる分析を重ねることにより、その原因を明らかにする必要がある。

概して、ヘテロ接合度からみたドジョウ個体群の遺伝的多様性は水路間で差はあるが、ほとんどの水路において個体群は任意に交配していることから、遺伝的な障壁はないものと考えられた。

(3) 水路間におけるドジョウ個体群の遺伝的分化

a) 遺伝的分化指数 F_{st} の計算

生物個体群間の遺伝的分化 (遺伝的にどの程度異なるか) は遺伝子座における対立遺伝子の出現頻度の相関 F_{st} によってあらわされる¹⁴⁾。 F_{st} は遺伝的分化の尺度となり、 F_{st} が 0 に近いと個体群同士の遺伝的交流 (ここでは繁殖) は盛んであり、1 に近いと交流は乏しく、血縁関係は遠いもの (分化している) と判断される。さらに F_{st} は系統樹解析 (クラスター解析の一種) に利用され、結果は樹形図によって表現される。

本報告では F_{st} の計算に FSTAT (<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>)、系統樹解析には Populations (<http://www.pge.cnrs-gif.fr/bioinfo/wini386/populations.exe>) と TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) を使用した。なお、これらのプログラムソフトは HP 上で無料公開されている。

b) F_{st} による個体群交流の評価

対象水路におけるドジョウ個体群間の遺伝的分化について、 F_{st} を算出後、系統樹解析した結果を図-3 に示す。平均距離法¹⁴⁾による樹形図は個体群を 3 グループに

分けられることを示唆し、グループ1には水路1、グループ2には水路2, 4, グループ3には水路5, 7, 6, 3の個体群がそれぞれ属した。さらに、これらのグループについて地形図上の水路配置に対応させると(図-3), グループ1の個体群は対象域の下流個体群, グループ2は中流個体群, グループ3は上流個体群として分類することができる。

ただしグループ3における水路3の個体群は、その水路配置からグループ2の中流個体群に属してよさそうである。このような結果はサンプル数やマーカーの少なさに関連していることが考えられる。サンプル数については水路1本につき24個体ではなく、50~100個体程度に増やすことや、マーカーについては3遺伝子座ではなく5~10遺伝子座を使用して検討することが必要なのかも知れない。

総じて、得られた結果からはサンプリングや分析方法にいくつかの課題が残された。しかしマイクロサテライトマーカーによるドジョウ個体群の遺伝的解析によって、対象域の個体群は3グループからなることが確認された。現在、本川との合流部水位差によって水路の多くは分断化され、水路間における個体群の移動は閉ざされている。分断化される前は各グループを基準に移動・繁殖が行われていたと推察される。

そして、この考察はある水路を改修する場合、ドジョウを一時的に避難させる水路の選定に活用することができる。また魚道等の移動経路確保を目的とする保全施設を設置するのであれば、グループ内で移動できるような配慮が必要である。遺伝的情報を利用することにより、生物保全に向けた目標を具体化させることができると考えられた。

5. おわりに

本論文では千葉県谷津田域におけるドジョウ個体群の地域性判別に向けて、マイクロサテライトDNAマーカーによる個体群の交流実態について検討した。

下田川流域における農業排水路7本から優占種であるドジョウを24個体ずつ採取し、尾ヒレから平均4.1mgのDNAを抽出した。マイクロサテライトマーカーとして利用可能な3つの遺伝子座を選定し、PCR増幅及びシーケンス処理を通じてマーカーごとに各個体の塩基サイズ(対立遺伝子)を特定した。

水路によって異なるが、個体群にみられた対立遺伝子数は遺伝子座Mac23で13~19個、Mac43で2~5個、Mac48で3~6個となり、マーカーの多型性を確認した。個体群の遺伝的多様性をあらわすヘテロ接合度は各水路において0.41~0.57の範囲にあり、多くの水路で交配の任意性が統計的に支持された($p<0.05$)。遺伝的分化指数Fstによる系統樹解析では、対象域の個体群が3グループ

からなることを示し、各グループの属する水路の空間配置から、個体群は上流、中流、下流の3つに分類できる可能性を示した。

現在、対象水路のほとんどは落差によって本川から分断化されているが、分断化される前は上流、中流、下流の各群を基準に移動・繁殖による交流があったものと推察された。

謝辞：土木研究所主任研究官の村岡敬子氏、農業生物資源研究所主任研究員の加賀秋人博士、畜産草地研究所主任研究員の髙橋秀彰博士にはDNA分析と分析結果の解析において多大なご指導を得た。ここに記して深謝します。本研究はプロジェクト研究「流域圏における水循環・農林水産生態系の自然共生型管理技術の開発」及び科学研究費補助金No.15780167, 18580250, 18380139の一部として行った。

引用文献

- 1) 中村智幸, 尾田紀夫: 栃木県那珂川水系の農業水路における遡上魚類の季節変化, 魚類学雑誌, 50巻, pp.25-33, 2003
- 2) 西田一也, 千賀裕太郎: 都市近郊における農業排水路の環境要因および水田が魚類の生息に及ぼす影響, 農業土木学会論文集, 72巻, pp.477-487, 2004.
- 3) 小出水規行, 竹村武士, 奥島修二, 山本勝利, 蛭原 周: 魚類の生息分布に影響を及ぼす農業排水路の環境要因, 河川技術論文集, 10巻, pp.339-344, 2004.
- 4) 小出水規行, 竹村武士, 奥島修二, 山本勝利, 相賀啓尚: 谷津田域における農業排水路環境と生息魚類の現地調査, 農業工学研究所技報, 203巻, pp.39~46, 2005.
- 5) 小出水規行, 竹村武士, 奥島修二, 相賀啓尚, 山本勝利, 蛭原 周: HEP法による農業排水路におけるタモロコの適性生息場の評価, 河川技術論文集, 11巻, pp.489~494, 2005.
- 6) 竹村武士, 小出水規行, 奥島修二, 山本勝利: 農業水路におけるドジョウの行動範囲に関する基礎研究, 河川技術論文集, 10巻, pp.351-356, 2004.
- 7) 竹村武士, 小出水規行, 奥島修二, 山本勝利, 相賀啓尚: 谷津田域におけるタモロコの移動と分散, 農業工学研究所技報, 204巻, 2006. (印刷中)
- 8) 小出水規行: 農業水路に生息する魚類個体群のマイクロサテライトDNAマーカーの開発, STAFF newsletter, 16巻, pp.7, 2006.
- 9) 青木 宙, 隆島忠夫, 平野哲也: 魚類のDNA, 恒星社厚生閣, 1997.
- 10) 中込弥男: 絵でわかるゲノム・遺伝子・DNA, 講談社, 2002.
- 11) 種植物学会: 森の分子生態学, 文一総合出版, 2001.
- 12) 福田 裕, 渡部終五, 中村弘二: 水産物の原料・産地判別, 恒星社厚生閣, 2006.
- 13) 小出水規行, 村岡敬子, 竹村武士, 奥島修二: マイクロサテライトDNAを用いた農業排水路におけるドジョウ個体群の遺伝的特性の予備的検討, 農業土木学会論文集, 72巻, pp.581-582, 2004.
- 14) Nei, M.: *Molecular evolutionary genetics*, Columbia University Press, 1987.

(2006. 4. 6 受付)