

東北地方におけるコイ科エゾウグイとアブラハヤの属間雑種

酒井治己^{1†}, 齊藤貴行¹, 竹内基², 杉山秀樹³, 桂和彦⁴

Cyprinid inter-generic hybridization between *Tribolodon sachalinensis* and *Rhynchocypris lagowskii* in Tohoku District

Harumi Sakai^{1†}, Takayuki Saitoh¹, Motoi Takeuchi²,
Hideki Sugiyama³, Kazuhiko Katsura⁴

Thirty-seven cyprinid inter-generic hybrids between *Tribolodon sachalinensis* and *Rhynchocypris lagowskii* were identified electrophoretically from a total of 385 individuals including *T. hakuensis*, *T. sachalinensis*, *R. lagowskii*, F₁ and later hybrids collected from five rivers in Tohoku District. The reason being ambiguous, no congeneric hybrid between *T. hakuensis* and *T. sachalinensis* was detected. Mitochondrial DNA analysis revealed that the maternal parent of hybrids was *R. lagowskii* in most cases. Meristic counts of hybrids were intermediate between their parental species. Gonad in hybrids smaller than in parental species suggests an occurrence of hybrid breakdown.

Key words: freshwater fish, hybridization, electrophoresis, allozymes, mtDNA, morphology

緒 言

日本に分布するコイ科ヒメハヤ型魚類 (phoxinin minnow) には, アブラハヤ属にタカハヤ *Rhynchocypris oxycephlus* (Sauvage and Dabry), アブラハヤ *R. lagowskii* (Dybowski), ヤチウグイ *R. perenurus sachalinensis* (Berg) の3種, ウグイ属にウグイ *Tribolodon hakuensis* (Günther), エゾウグイ *T. sachalinensis* (Nikolsky), マルタ *T. brandtii* (Dybowski), ウケクチュウグイ *T. nakamurai* (Doi and Shinzawa) の4種が知られている^{1,2)}. そのうち, ウグイとマルタ, およびマルタとエゾウグイ間で雑種が確認され^{3,4)}, アブラハヤとタカハヤ間でも交雑が示唆されている⁵⁾.

これらの魚類は, 食用とされるばかりでなく, サケ科魚類の卵を食害することでも知られており¹⁾, 河川生態系の中では重要な地位を占めている. 河川生物調査や資源調査においても必ず出現するグループで, 元来, それぞれの種

が良く似ているため同定が難しく, さらにそれらの雑種の存在がそのような調査における種分けをますます困難にしている^{3,4)}. 雑種を含めたこれら魚類の識別形質を明らかにすることが望まれるところである.

この両属は, 互いに極めて近縁であることが判明しているが²⁾, 現在まで属間雑種の存在は報告されていない. いっぽう, ウグイ属4種すべておよびアブラハヤの生息する東北地方において, エゾウグイとアブラハヤの属間雑種と思われる個体が出現することが推測された(竹内, 予備調査). しかし, その実証や, 雑種個体の形態, 出現頻度, 母系などの詳しい調査は行われていない.

そこで本研究では, 東北地方で採集したウグイ (Fig. 1A), エゾウグイ (Fig. 1B), アブラハヤ (Fig. 1C) について核遺伝子情報であるアロザイム等のタンパクを支配する遺伝子座の対立遺伝子組成を解析する事により雑種個体 (Fig. 1D) を検出し, そのミトコンドリア遺伝子 (16S rRNA 前半領域) の塩基配列分析を行う事により雑

2006年8月17日受付. Received August 17, 2006.

1 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

2 岩手県立久慈東高等学校 (Kuji Higashi High School, Iwate Prefecture)

3 秋田県水産振興センター (Fisheries Promotion Center, Akita Prefecture)

4 山形県水産試験場 (Yamagata Prefectural Fisheries Experimental Station)

† 別刷り請求先 (corresponding author): sakaih@fish-u.ac.jp

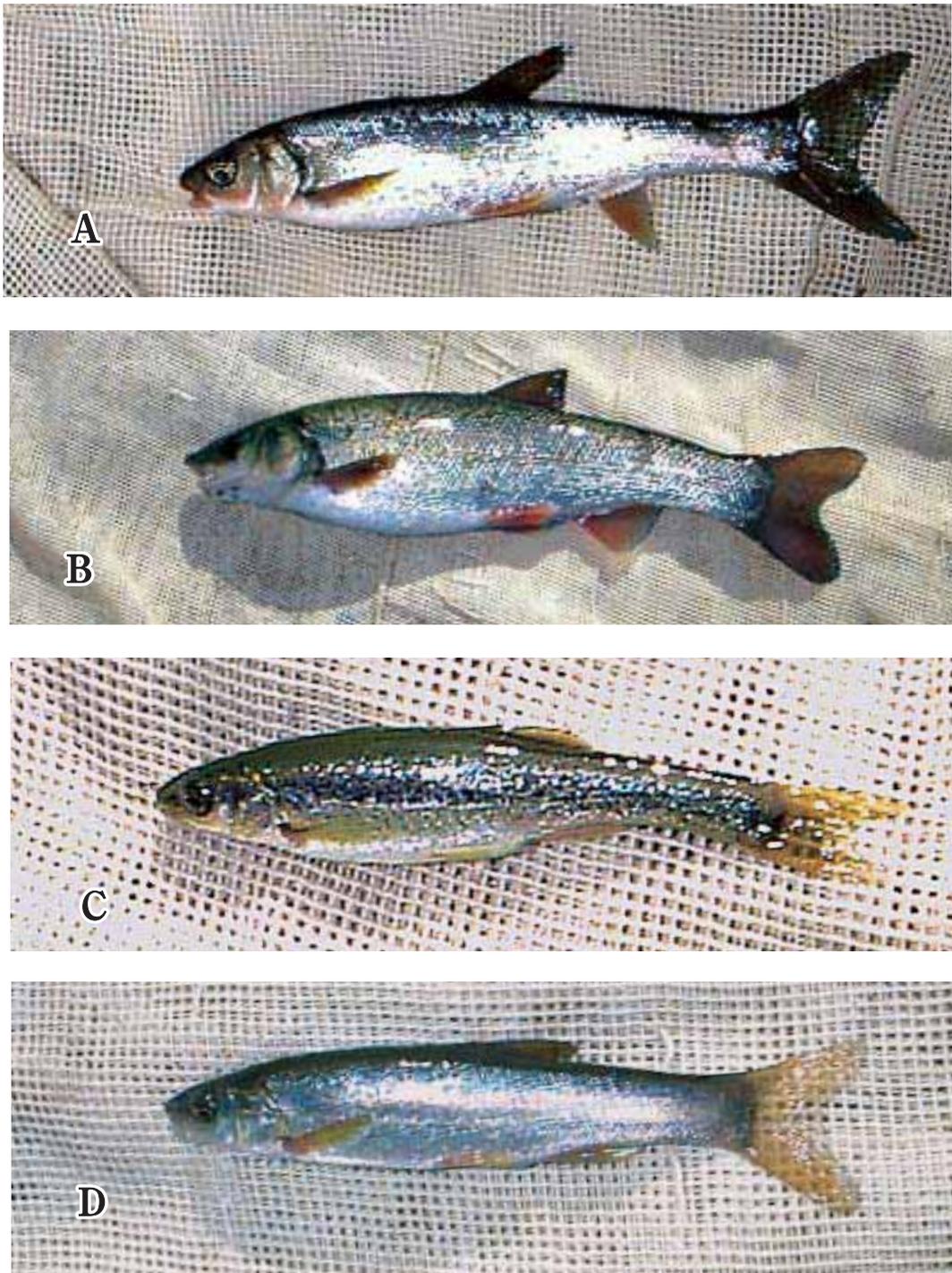


Fig. 1. A: *Tribolodon hakuensis*, 13.7 cm SL, Nagaki River, Yoneshiro River Basin. B: *T. sachalinensis*, 22.2 cm SL, Uge River. C: *Rhynchocypris lagowskii*, 6.8 cm SL, Uge River. D: Presumed F₁ hybrid between *T. sachalinensis* and *R. lagowskii*, Uge River.

種個体の母系を判別することを試みた。さらに、雑種個体の形態的特徴を観察し、エゾウグイ、アブラハヤ、ウグイの形態的特徴との差異について比較検討したので報告する。

材料と方法

標 本

本研究で調査したウグイ属およびアブラハヤ属魚類は、

1997年10月または、2001年10月に米代川水系長木川、雄物川水系院内川と黒沢川、最上川水系月布川、および有家川の5地点で採集されたもので (Fig. 2, Table 1), ドライアイスで直ちに凍結し持ち帰ったものを -80°C で保存し、適宜解凍し実験試料とした。

アロザイム分析

アロザイム分析による交雑個体の検出は, Sakai et al.

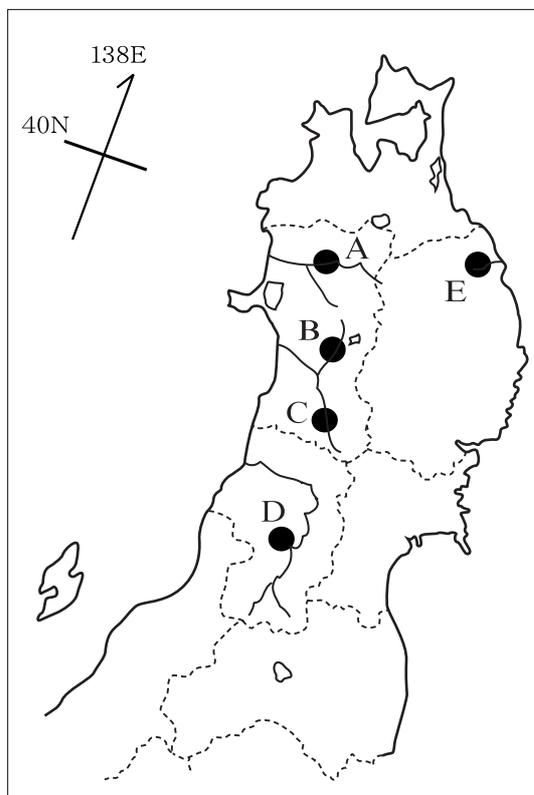


Fig. 2. Map showing five sampling localities in Tohoku District. A: Nagaki River, Yoneshiro River Basin. B: In-nai River, Omono River Basin. C: Kurosawa River, Omono River Basin. D: Tsukinuno River, Mogami River Basin. E: Uge River. See also Table 1.

(2002)⁶⁾に従い、常法の水平デンプンゲル電気泳動法(12%ゲル)で行った。泳動は、デンプンゲル断面積 1cm^2 あたり 0.4mA の定電流でRidgewayらの緩衝液⁷⁾の場合2時間30分、C-APM緩衝液⁸⁾の場合3時間、T-C緩衝液⁹⁾の場合4時間の通電による。

アブラハヤは、ウグイおよびエゾウグイとそれぞれ酵素などタンパクを支配する14および12遺伝子座(調査した22遺伝子座中)において明瞭に異なった対立遺伝子を有しており、識別が可能であるが⁶⁾、今回はそのうち安定して検出できた7遺伝子座を調査した (Table 2)。遺伝子座及び対立遺伝子の名称も, Sakai et al. (2002)⁶⁾に従った。

調査したすべての遺伝子座において各々の種のパターンを示した個体を純粋な種、すべての遺伝子座においてヘテロパターンを示した個体を雑種第一代(F_1)、いくつかの遺伝子座についてヘテロパターンを示した個体を戻し交配など雑種後代として判定した。

ミトコンドリア DNA 分析

Sakai et al. (2006)²⁾に従い、アロザイム分析により検出した雑種個体の体側筋から、常法のフェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出し行った。抽出したDNAをテンプレートとして、GeneAmp System 2400 (Perkin Elmer)を用いてPCR法¹⁰⁾によりmtDNAの16S rRNA前半領域を増幅した。増幅には、L1854 (5'-AAACCTCGTACCTTTTGCAT-3') および H2582 (5'-ATTGCGCTACCTTTGCACGGT-3') のプライマーセットを用いた¹¹⁾。PCR産物を精製、ターミネーター反応の後、自動シーケンサー 310 Genetic Analyzer (ABI) によって、L鎖とH鎖双方の塩基配列を解読し、整列させギャップを含む722bpを決定した。

調査した雑種個体の塩基配列を、DDBJ/EMBL/GenBank (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcom-j.html>) に登

Table 1. Sampling locality and date

Locarity	River	Date
A Ohdate, Akita Prefecture	Nagaki River, Yonesiro River Basin	2001.10.29
B Tazawako, Akita Pref.	In-nai R., Omono R. B.	1997.10.11
C Inakawa, Akita Pref.	Kurosawa R., Omono R. B.	2001.10.29
D Nishikawa, Yamagata Pref.	Tsukinuno R., Mogami R. B.	2001.10.25
E Ohno, Iwate Pref.	Uge R.	2001.10.27

Table 2. Enzymes and protein, E. C. number, loci, tissues, buffers assayed, and diagnostic alleles of *Tribolodon hakuensis*, *T. sachalinensis* and *Rhynchocypris lagowskii*

Enzymes and protein	E. C.	Locus	Tissue	Buffer	Diagnostic alleles		
					<i>Tribolodon hakuensis</i>	<i>Tribolodon sachalinensis</i>	<i>Rhynchocypris lagowskii</i>
Asparate aminotransferase	2.6.6.1	<i>Aat-2*</i>	Muscle	C-APM pH 7.0	* <i>100</i>	* <i>90</i>	* <i>80</i>
Glucosephosphate isomerase	5.3.1.9	<i>Gpi-1*</i>	M	Ridgway	* <i>100</i> , * <i>86</i>	* <i>100</i> , * <i>86</i>	* <i>92</i>
		<i>Gpi-2*</i>	M	Ridgway	* <i>67</i> , * <i>100</i>	* <i>30</i> , * <i>67</i> , * <i>100</i>	* <i>25</i>
Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	<i>Ldh-1*</i>	M	T-C	* <i>100</i> , * <i>54</i>	* <i>100</i>	* <i>65</i>
		<i>Ldh-2*</i>	M	T-C	* <i>100</i>	* <i>43</i>	* <i>60</i>
		<i>Ldh-3*</i>	Liver	C-APM pH 7.0	* <i>100</i>	* <i>155</i>	* <i>190</i>
General protein		<i>Prot-2*</i>	M	Ridgway	* <i>100</i>	* <i>117</i>	* <i>130</i>

See text for bufferes and diagnostic alleles.

録されたウグイ (AB162634), エゾウグイ (AB162632), およびアブラハヤ (AB162639) それぞれの 16S rRNA の配列と比較することにより, 母系を推定した. なお, 16S rRNA 前半領域 722bp においては, ウグイ属 2 種間で約 20bp アブラハヤとそれら 2 種間で約 50bp の塩基置換が存在し, 各々の種のハプロタイプを明瞭に識別できる.

生殖腺重量指数

標準体長 (Standard Length) 約 60mm 以上の一部の大型の個体については, 生殖腺の発達が認められ, 雌雄の判別も可能であったことから, 生殖腺重量指数 (GSI, $100 \times \text{Gonad weight} / (\text{Body weight} - \text{Gonad weight})$) を求め, 種および雑種間の比較を行った.

形態分析

アイソザイム分析により検出した雑種個体 (37 個体) と, ウグイ, エゾウグイ, アブラハヤ各 20 個体について, 標本をエタノール固定し, 種間差異の比較的大きい事が分かっている¹⁾ 脊椎骨数 (Vertebrae), 鰓耙数 (Gill rakers), 側線鱗数 (Lateral line scales), 上部・下部横列鱗数 (Upper transverse scales, Lower transverse scales), および背鰭前部鱗数 (Predorsal Scales) の 6 形質を計測した. 側線鱗数は下尾軸骨の後端までの鱗を数えた. 背鰭前部鱗数は背鰭起部から後頭部に至る正中線上の全ての鱗を数えた. 脊椎骨数は魚体の右側を脊椎骨に沿ってメスで切り開き, 尾部棒状骨を 1 個として数を数えた. 鰓耙数は第一鰓弓の外側を数えた.

結 果

雑種個体の検出結果とその母系判定

純粋種のウグイ (99 個体), エゾウグイ (167 個体), ならびにアブラハヤ (82 個体) と考えられた個体の他に, 調査した 7 遺伝子座全てにおいてエゾウグイとアブラハヤのヘテロ接合体パターンを示し, 明らかに属間 F₁ 雑種と考えられる個体 (29 個体), およびそれらの戻し交配の可能性のある個体 (6 個体) が出現した (Table 3). ウグイとエゾウグイ間の属内雑種は 1 個体も検出されなかった. ウグイとの交雑個体は, 雄物川水系黒沢川で出現したエゾウグイおよびアブラハヤの他にウグイの対立遺伝子を有する 2 個体以外は検出されなかった.

ミトコンドリア遺伝子 (16S rRNA 前半領域) のハプロタイプから, 検出された F₁ 雑種 29 個体の母系を判定した結果, 6 個体がエゾウグイを (*T. sachalinensis* x *R. lagowskii*), 23 個体がアブラハヤを (*R. lagowskii* x *T. sachalinensis*) 雌親とする雑種であった (Table 3). 比較的多くの F₁ 雑種個体が検出された長木川, 院内川, および有家川について, F₁ がそれぞれの生息地におけるエゾウグイおよびアブラハヤの出現個体数に比例してランダムに交雑をしたと仮定し, F₁ における母系出現の期待値を求め, 観察値との間で二項検定を行った結果, 院内川では差は有意ではなかったが ($0.05 < p < 0.10$), 長木川および有家川では母系がアブラハヤに有意に片寄っていた ($0.02 < p < 0.05$).

戻し交雑 6 個体の各遺伝子座の接合体型 (Table 4) か

Table 3. Number of individuals identified by diagnostic allozyme alleles

	<i>Tribolodon hakuensis</i>	<i>Tribolodon sachalinensis</i>	<i>Rhynchocypris lagowskii</i>	F ₁ (F _x M) <i>T.s.xR.l.</i>	F ₁ (F _x M) <i>R.l.xT.s.</i>	Back cross F ₁ x <i>T.s.</i>	Back cross F ₁ x <i>R.l.</i>	Other cross	Total
A: Nagaki River	49	53	11	0	7	0	1	0	121
B: In-nai R.	0	12	11	1	5	1	1	0	31
C: Kurosawa R.	50	9	24	0	1	0	0	2	86
D: Tsukinuno R.	0	62	13	1	0	1	0	0	77
E: Uge R.	0	31	23	4	10	0	2	0	70
Total	99	167	82	6	23	2	4	2	385

Table 4. Genotypes of 8 hybrids later than F₁ among *Tribolodon hakuensis* (*T. h.*), *T. sachalinensis* (*T. s.*), and *Rhynchocypris lagowskii* (*R. l.*)

Localities	<i>Aat-2*</i>	<i>Gpi-1*</i>	<i>Gpi-2*</i>	<i>Ldh-1*</i>	<i>Ldh-2*</i>	<i>Ldh-3*</i>	<i>Prot-2*</i>	Presumed cross type	MtDNA
A:Nagaki River	*-80/*-80	*92/*92	*25/*-100	*65/*65	*60/*60	*-190/*-190	*130/*117	F ₁ x <i>R. l.</i>	<i>T. s.</i>
B:In-nai R.	_-80/*-90	*86/*86	*-100/*-100	*100/*100	*-43/*-43	*-155/*-155	*130/*117	F ₁ x <i>T. s.</i>	<i>T. s.</i>
	-80/-80	*92/*86	*25/*-100	*65/*65	*60/*60	*-190/*-190	*130/*130	F ₁ x <i>R. l.</i>	<i>R. l.</i>
C:Kurosawa R.	*-90/*-100	*86/*86	*-100/*-100	*100/*100	*-43/*-43	*-155/*-155	*130/*117	(<i>T.s.xR.l.</i>)x(<i>T.s.xT.h.</i>)	<i>T. s.</i>
	-80/-90/*-100	*92/*86	*25/*-100	*100/*65	*60/*-43	*-155/*-190	*130/*117	Trisomy(?)	<i>R. l.</i>
D:Tsukinuno R.	*-90/*-90	*92/*86	*25/*-100	*100/*100	*-43/*-43	*-155/*-155	*130/*117	F ₁ x <i>T. s.</i>	<i>T. s.</i>
E:Uge R.	*-80/*-90	*92/*86	*25/*25	*100/*65	*60/*-43	*-155/*-190	*130/*117	F ₁ x <i>R. l.</i>	<i>R. l.</i>
	-80/-90	*92/*92	*25/*-100	*65/*65	*60/*60	*-190/*-190	*130/*130	F ₁ x <i>R. l.</i>	<i>T. s.</i>

ら戻し交配の方向性を検討した結果、2個体はエゾウグイとの、4個体はアブラハヤとの戻し交配個体であり、それらの母系は4個体がエゾウグイ、2個体がアブラハヤであった。

黒沢川で検出されたエゾウグイおよびアブラハヤに加えてウグイの遺伝子も受け継ぐ個体については、1個体は*Aat-2**においてウグイとエゾウグイの、*Prot-2**においてはエゾウグイとアブラハヤのヘテロ接合体パターンを示したことから (Table 4)、ウグイとエゾウグイ、およびエゾウグイとアブラハヤのそれぞれのF₁雑種が交配した個体と判定された。いっぽう他の1個体は、*Aat-2**においてそれぞれ3種の対立遺伝子を発現したパターンを示した (三染色体性, トリソミー)。なお、この個体は、他の雑種判定には用いな

かった*Pgm** (phosphoglucumutase, 5.4.2.2) 遺伝子座においても三本バンドパターンを示していた。

生殖腺重量指数

ウグイ 18 個体 (61.3-124.5mmSL), エゾウグイ 10 個体 (70.0-119.8mmSL), アブラハヤ 13 個体 (63.7-101.3mmSL), および F₁ 雑種 5 個体 (58.3-133.1mmSL) の生殖腺重量指数 (GSI) を Table 5 に示した。交雑個体では生

Table 5. Gonadosomatic Index (GSI, %) in *Tribolodon hakuensis*, *T. sachalinensis*, *Rhynchocypris lagowskii*, and their hybrids

	GSI in Mean±SD (N)	
	Female	Male
<i>Tribolodon hakuensis</i>	2.73±0.61(N=6)*	0.97±0.53(N=12)
<i>T. sachalinensis</i>	3.53(N=2)	0.84±0.37(N=7)
<i>Rhynchocypris lagowskii</i>	2.87±1.11(N=6)*	0.72±0.18(N=8)
Hybrids	1.15±0.37(N=3)	0.50(N=2)

*Significantly different from hybrid GSI (*t*-test, *p*<0.05)

殖腺を確認できたのは 39 個体中 8 個体, 重量測定できたのが 5 個体で, 体長 60mm 以上でも生殖腺が未発達な個体が多く存在した. 交雑個体の GSI は, 他の魚種に比べて雌雄とも小さい値であったが, 調査が産卵期ではないことおよび調査できた個体数が少なかったこともあり, 有意差 (t 検定, $p < 0.05$) が認められたのはウグイならびにアブラハヤの雌個体との間のみであった.

戻し交配個体においても, 院内川で検出された 103.6mmSL のエゾウグイ方向への戻し交配雌個体 1 個体のみで 2.4% という純粋種なみの GSI を示すものがあった.

形態測定結果

エゾウグイ, アブラハヤ, ウグイ, F_1 (エゾウグイ母系・アブラハヤ母系), 戻し交配個体 (エゾウグイ方向・アブラハヤ方向) および, その他の個体の 8 群における 6 計数形質の測定結果を Table 6 に示した. エゾウグイとアブラハヤ間では上部横列鱗数以外のすべての形質において有意差 (t 検定, $p < 0.001$) が認められた (Table 7). これらの形質において, F_1 は両種の間値を示したが, 両種間との間で検定を行った結果, エゾウグイとアブラハヤ両種との間ともに差異が認められたのは脊椎骨数, 鰓耙数, 背鰭前部鱗数, 上部横列鱗数であり ($p < 0.05$, $p < 0.003$ または $p < 0.001$), アブラハヤとの間では側線鱗数においても差異が認められた ($p < 0.001$). そのうち, 脊椎骨数, 鰓耙数はエゾウグイの方に, 上部横列鱗数, 背鰭前部鱗数はアブラハヤの方に近い値を示した.

母系別に見ると, 側線鱗数においてはそれぞれの反対の母系に近い値を示していたが, その他の脊椎骨数, 鰓耙数, 上部横列鱗数, 背鰭前部鱗数においては, それぞれの母系により近い値を示し, 母系相関が認められた (Table 6). しかし, 母系間で有意差が認められたのは, 鰓耙数のみであった ($p < 0.05$, Table 7).

考 察

今回の研究で, 東北地方のエゾウグイは, 同属のウグイとではなく, 別属のアブラハヤと属間雑種を作っていることが再確認された. また, 雑種の中にもわずかながら生殖腺を発達させた個体があり, 実際に戻し交配個体も検出された. さらに, 雑種個体同士の掛け合わせによると考えられる個体, および 3 種間交雑によると考えられる 3 対立遺伝子を発現した三染色体性個体 (トリソミー) も存在した. しかしながら, 雑種個体の GSI はいずれも純粋種よ

り低く, またトリソミーと考えられる個体もいることから, なんらかの雑種崩壊現象により両種が融合してしまう可能性は小さいと考えられる.

F_1 個体はエゾウグイとアブラハヤの中間的形態を示していた. 特に背鰭前部鱗数においてエゾウグイが 37~45 (平均 40) 枚, アブラハヤで 53~61 (平均 57) 枚であったのに対し, F_1 では 45~56 (平均 51) 枚で, 29 個体の F_1 のうち 18 個体は両親種のレンジとまったく重なっていなかった. 下部側線鱗数を除くほかの形質を含めて総合的に判断することにより, これら計数形質によってかなりの確度で少なくとも F_1 雑種の判定は可能と考えられる. さらに, 魚体の色彩パターンも雑種は両親種の中間的様相を示し (Fig. 1), 採集時に雑種個体の目星をつけることもできるであろう.

中村¹⁾によると, ウグイはほぼ日本全域, エゾウグイは東北の一部と北海道全域, アブラハヤは日本海側では福井県から青森県, 瀬戸内海・太平洋側では岡山県から青森県に分布し, 東北地方において 3 種は共存している. 産卵期も, ウグイで 2 月~7 月, エゾウグイで 6 月~8 月, アブラハヤで 4 月~7 月下旬以降と産卵期も重複している. 従って, 3 種が同じ河川内で同時期に成熟している可能性はあるのだが, エゾウグイは同属のウグイとではなく, 別属のアブラハヤと交雑していた. Sakai⁴⁾によると, 北海道においてもウグイもエゾウグイもそれぞれマルタとは交雑してもお互いは交雑しないらしく, 同属の両種間に何らかの生殖的隔離機構が存在する可能性がある. 一方, 中村¹⁾によれば, 別属のアブラハヤとエゾウグイは, 産卵行動においては淵等の流れの緩やかな砂礫底で, 大型の雌 1 個体の後に雄数十個体が群がり, 雌が礫の間隙に直角にきりもみ状に激しく体を振りつつ突入し放卵, 同時に雄が放精するといった類似した産卵行動を行う事が知られている. さらに両種は, 雌の吻端が円錐形に前下方に突出するといった産卵行動に役立つと考えられる共通の形態的特徴をもっている. ウグイにはその様な形態的特徴は発達しないし, また主に流れの速い瀬で産卵し, 淵等の砂礫中には産卵しないらしい¹⁾. おそらく, そのような行動およびそれに関連した形態的特徴の類似から, それぞれの産卵群に混入して放卵または放精する個体が出現する事により交雑が起こっているものと考えられる. その際, 理由は不明ながら, アブラハヤの雌と交雑するエゾウグイの雄の例の方が, その逆の例よりも多いらしい.

さらに, 交雑個体の出現率の高かった有家川については, アブラハヤが移入種である事が判っている (竹内, 未

Table 7. Results of student's *t*-test of 6 meristics among *Tribolodon sachalinensis* (*T. s.*), *Rhynchocypris lagowskii* (*R. l.*), and their F₁ hybrids

	<i>T. s.</i> vs. <i>R. l.</i>	F ₁ vs. <i>T. s.</i>	F ₁ vs. <i>R. l.</i>	<i>T.s.xR.l.</i> vs. <i>R.l.xT.s.</i>
Vertebrae	$p < 0.001$ ($t=8.4$)	$p < 0.003$ ($t=3.2$)	$p < 0.001$ ($t=4.9$)	not significant
Gill rakers	$p < 0.001$ ($t=13.8$)	$p < 0.05$ ($t=2.2$)	$p < 0.001$ ($t=10.1$)	$p < 0.05$ ($t=2.3$)
Lateral line scales	$p < 0.001$ ($t=5.5$)	not significant	$p < 0.001$ ($t=6.7$)	not significant
Upper transverse scales	$p < 0.001$ ($t=15.4$)	$p < 0.001$ ($t=13.0$)	$p < 0.001$ ($t=5.4$)	not significant
Lower transverse scales	not significant	not significant	not significant	not significant
Predorsal scales	$p < 0.001$ ($t=22.6$)	$p < 0.001$ ($t=13.7$)	$p < 0.001$ ($t=7.2$)	not significant

発表資料). 従って, 交雑個体の出現には人為的影響が少なからず関わっている可能性が考えられる. その他の河川においては, 詳しい状況は不明であるが, 近年の河川開発や道路工事などによる生息環境の変化が, 両種の交雑しやすい背景をつくっている可能性もあろう.

謝 辞

標本採集に御協力して頂いた, 当時学生の北川慎介, 木村純治, 佐藤仁泉の各氏に感謝する.

文 献

- 1) 中村守純: 日本のコイ科魚類. 資源科学研究所, 東京 (1969)
- 2) Sakai H, Ito Y, Shedko SV, Safronov SN, Frolov SV, Chereshev IA, Jeon SR, Goto A: Phylogenetic and taxonomic relationships of northern Far Eastern phoxinin minnows, *Phoxinus* and *Rhynchocypris* (Pisces, Cyprinidae), as inferred from allozyme and mitochondrial 16S rRNA sequence analyses. *Zool Sci*, **23**, 323-331 (2006)
- 3) Sakai H, Hamada K: Electrophoretic discrimination of *Tribolodon* species (Cyprinidae) and the occurrence of their hybrids. *Japan J Ichthyol*, **32**, 216-224 (1985)
- 4) Sakai H: Life-histories and genetic divergence in three species of *Tribolodon* (Cyprinidae). *Mem Fac Fish Hokkaido Univ*, **42**, 1-98 (1995)
- 5) 樋口文夫, 渡辺勝敏: 横浜市を流れる河川におけるアブラハヤの遺伝的多様性と交雑. *魚類学雑誌*, **52**, 41-46 (2005)
- 6) Sakai H, Goto A, Jeon SR: Speciation and dispersal of *Tribolodon* species (Pisces, Cyprinidae) around the Sea of Japan. *Zool Sci*, **19**, 1291-1303 (2002)
- 7) Ridgeway GL, Sherburne SW, Waples RS: Polymorphism in the esterases of Atlantic herring. *Trans Amer Fish Soc*, **119**, 2-15 (1970)
- 8) Clayton JW, Tretiak DN: Amine-citrate buffer for pH control in starch gel electrophoresis. *J Fish Res Bd Canada*, **29**, 1169-1172 (1972)
- 9) Shaw CR, Prasad R: Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochem Genet*, **4**, 297-320 (1970)
- 10) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491 (1988)
- 11) Watanabe K, Iguchi K, Hosoya K, Nishida M: Phylogenetic relationships of the Japanese minnows, *Pseudorasbora* (Cyprinidae), as inferred from mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Ichthyol Res*, **47**, 43-50 (2000)