

## 継代選抜された帯紋型青色アサリの遺伝的多様性減少

酒井治己<sup>\*1</sup>・土川陽子<sup>\*1</sup>・出射邦明<sup>\*1</sup>・鬼頭 鈞<sup>\*1</sup>・  
岸岡正伸<sup>\*2, \*3</sup>・松野 進<sup>\*2</sup>・立石 健<sup>\*2</sup>・井手尾 寛<sup>\*2</sup>

### Loss of Genetic Diversity in the Banded Purple Shell Breeds of the Japanese Littleneck Clam, *Ruditapes philippinarum*, Selected for Several Generations

Harumi Sakai<sup>\*1</sup>, Yoko Dogawa<sup>\*1</sup>, Kuniaki Idei<sup>\*1</sup>, Hitoshi Kito<sup>\*1</sup>,  
Masanobu Kishioka<sup>\*2, \*3</sup>, Susumu Matsuno<sup>\*2</sup>, Takeshi Tateishi<sup>\*2</sup>,  
and Hiroshi Ideo<sup>\*2</sup>

Loss of genetic diversity in the banded-purple shell breeds of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*, selected for 6 generations was analyzed in terms of allozyme indices. Heterozygosity decreased and the inbreeding coefficient increased substantially from generation to generation. The calculated mean effective population size was far less than the mean actual number of parental clams.

#### 1 緒 言

アサリ *Ruditapes philippinarum* は、貝殻の紋様と色彩の変異の極めて多い二枚貝であり、古くから研究者の興味を引いて来た<sup>1)</sup>。紋様はおおまかに斑紋型、帯紋型、波紋型および白色型に分類されるが、それらの中には、色彩との組み合わせで自然界の中ではごく稀にしか見られないパターンも存在する<sup>1)</sup>。山口県水産研究センター内海研究部では、放流用の標識貝作成の目的で、自然界では通常1%以下の比率でしか出現しない帯紋型青色アサリ（以下アオアサリと呼ぶ）を数代に亘って集団選抜交配することにより、種苗にお

ける出現率を90%以上にまで上昇させることに成功し、アサリの紋様・色彩が遺伝的形質であることを明らかにした<sup>2)</sup>。

一方、1993年に批准された生物多様性条約は、種苗の生産に伴う遺伝的多様性低下とそれを放流した場合の影響を検討事項の一つとしている<sup>3)</sup>。アオアサリでも、継代選抜を行っているため担当の遺伝的多様性低下が懸念される。このたび、アオアサリの選抜育種を始めてから2~6代めの種苗について、アロザイムを支配する遺伝子座の対立遺伝子を用いてその多様性低下過程を検討したので報告する。

水産大学校研究業績 第1636号, 2000年7月3日受付.

Contribution from National Fisheries University, No. 1636. Received Jul. 3, 2000.

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

\*2 山口県水産研究センター (Yamaguchi Prefectural Fisheries Research Center) .

\*3 現所属 : 山口県栽培漁業センター (Yamaguchi Prefectural Sea Farming Center) .

Table 1. Wild population and banded purple shell breeds (Generation 2-6) of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*

Generation	Bred month	Number of	
		parents	offsprings surveyed*
Wild**	Apr 1995***	-	213****
2	Sep 1993	420	192
3	Oct 1994	307	171
4	Oct 1995	957	88
5	Oct 1996	224	48
6	Oct 1997	820	48

\*Mean number. \*\*Wild clams from off Onoda City, Yamaguchi Prefecture.

\*\*\*Collected month. \*\*\*\*Number of wild individuals surveyed

Table 2. Enzymes, enzyme numbers, loci, tissues, and buffer system used

Enzyme	Enzyme number	Locus	Tissue	Buffer
Aspartate aminotransferase	2.6.1.1.	<i>AAT-1*</i>	AM	TC
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42.	<i>IDHP*</i>	Mgg	TC
Malate dehydrogenase	1.1.1.37.	<i>MDH-1*</i>	Am	TC
		<i>MDH-2*</i>	Am	TC
Phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44.	<i>PGDH*</i>	Am	TC

AM: Adductor muscle. Mgg: Mid gut gland. TC: Tris-citrate buffer (pH 8.0, diluted 1:9 for the gel), 4 mA/cm<sup>2</sup> for 4 hr.

## 2 材料と方法

本研究に使用した材料をTable 1に示した。母集団(集団1)は、山口県小野田市沖の天然貝で、潜水漁によって捕獲されたものである。集団2~4は、岸岡ら<sup>2)</sup>の報告と同じ種苗で、アオアサリの選抜交配を始めてからそれぞれ2~4代目のものである。集団5, 6は、それぞれ同様に1996年と1997年に交配させた5, 6代目である。1991年に山口湾で採捕されたアサリ230個体を交配させたアオアサリ初代の種苗はすでになく、残念ながら調査できなかった。種苗は、1年飼育の後、殻長約10mmに成長した段階でアロザイム分析実験に供した。また、種苗のうちTaki<sup>1)</sup>の分類に従って明確に帯紋型青色のアサリと判定され、かつ殻長約30mm前後に成長した大型の個体のみを選びだし、次世代のための親貝とした。選びだした親貝は、岸岡ら<sup>2)</sup>に従い、温度刺激と生殖腺懸濁液添加によって産卵誘発し、集団で交配させた。受精卵と幼生の培養、および仔稚貝の飼育についても岸岡ら<sup>2)</sup>の方法に従った。

実験貝は、-70°Cで凍結保存し、適宜解凍してアロザ

イム分析を行った。分析は、常法のデンブングル電気泳動法とザイモグラム法によった<sup>1)</sup>。使用した緩衝液は、トリスクエン酸緩衝液(T-C buffer, pH8.0)である<sup>5)</sup>。調査した酵素および遺伝子座は、すべての標本に亘って比較的安定して検出できた*AAT-1\**, *IDHP\**, *MDH-1\**, *MDH-2\**および*PGDH\**の5遺伝子座である(Table 2)。対立遺伝子名については、より陽極側に泳動されたものから順にアルファベットを付した。

検出された遺伝子型から平均ヘテロ接合体率観察値(Ho)と遺伝子頻度を求め、さらに遺伝子座当りの平均対立遺伝子数および平均ヘテロ接合体率期待値(He)を計算した。また、野生集団(母集団, 集団1)におけるヘテロ接合体率観察値(How)と交配種苗集団のそれ(Hob)との比較から、近交係数( $F=1-Hob/How$ )<sup>6)</sup>を算出した。アオアサリ6代目における世代平均繁殖有効個体数(Ne)を、酒井ら<sup>7)</sup>の検討結果に従い、種苗における野生集団からのアロザイム対立遺伝子頻度の分散から計算した<sup>8-10)</sup>。

Table 3. Allele frequencies at 5 loci in wild population and banded purple shell breeds (generation 2-6) of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*, surveyed

Locus	Generation					
	Wild	2	3	4	5	6
<i>AAT-1*</i>						
a	.011	-	-	-	-	-
b	.030	-	-	-	-	-
c	.109	.100	.120	.097	.177	.073
d	.768	.895	.880	.903	.792	.906
e	.077	.005	-	-	.031	.021
f	.002	-	-	-	-	-
g	.002	-	-	-	-	-
<i>IDHP*</i>						
a	.005	-	-	-	-	-
b	.007	-	-	-	-	-
c	.535	.765	.850	.864	.906	.938
d	.433	.235	.150	.136	.094	.062
e	.018	-	-	-	-	-
f	.002	-	-	-	-	-
<i>MDH-1*</i>						
a	.097	.005	.020	.028	.010	-
b	.900	.995	.980	.972	.990	1.000
c	.002	-	-	-	-	-
<i>MDH-2*</i>						
a	.002	-	-	-	-	-
b	.985	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
c	.013	-	-	-	-	-
<i>PGDH*</i>						
a	.018	-	-	-	-	-
b	.935	.985	.995	.997	.990	.938
c	.047	.015	.005	.023	.010	.062

### 3 結果

調査した5遺伝子座における対立遺伝子頻度をTable 3に示した。野生集団では合計22対立遺伝子が検出されたが、アオアサリ種苗集団では9~10対立遺伝子に減少した。遺伝子座*AAT-1\**では、3代目において一度検出できなくなった対立遺伝子eが、5, 6代目において再び出現した。

遺伝子座当りの対立遺伝子数 (Allele/locus) や平均ヘテロ接合体率 (Ho, He) においても、種苗においてかなりの低下が認められた (Table 4)。特にヘテロ接合体率は世代を重ねるごとに減少した (Fig.1)。

Table 4. Allele per locus, mean observed (Ho) and expected (He) heterozygosity, inbreeding coefficient (F) and number of parents used for breeding (N) in wild population and banded purple shell breeds (generation 2-6) of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*

Generation	Allele/locus	Ho	He	Ho/He	F	N
Wild	4.4	.245	.250	.980	-	-
2	2.0	.142	.118	1.203	.420	420
3	1.8	.098	.103	.951	.600	307
4	1.8	.091	.102	.892	.629	957
5	2.0	.047	.046	1.022	.808	224
6	1.8	.032	.034	.941	.869	820

なお、ヘテロ接合体の観察値と期待値の比を求めた結果では、世代によってヘテロまたはホモ接合体過剰状態 ( $Ho/He > 1$  または  $< 1$ ) を示していたが、どの集団もハーディ・ワインベルグの平衡状態からは逸脱してはいなかった (カイニ乗検定,  $P > 0.05$ )。

近交係数 (F) では、世代を重ねるごとに顕著な上昇が認められた (Fig.2)。

アオアサリ6代目における世代平均繁殖有効個体数 ( $Ne \pm SD$ ) を推定した結果、 $Ne = 38.3 \pm 13.4$ であった。

### 4 考察

アオアサリ2~6代目の平均親貝数は545.6個体で、FAO<sup>11)</sup>が示した継代飼育の場合の遺伝的多様性の低下をおよぼさないための必要数500を満たした親貝数でありながら、世代を重ねるごとにヘテロ接合体率は大きく低下し、近交係数はかなり上昇していた (Table 4, Figs. 1,2)。その程度は、使用親貝数の少なかった世代において特に顕著のようであった。アサリの場合、産卵誘発に対して個体による時間的な反応差があり<sup>12)</sup>、たとえ多くの親貝を用いても、実際に仔貝を残せる個体数が限られてしまう可能性がある<sup>1)</sup>。世代平均有効個体数を求めた結果でも (38.3) 使用した親貝数よりもはるかに少ない数であった (平均545.6)。

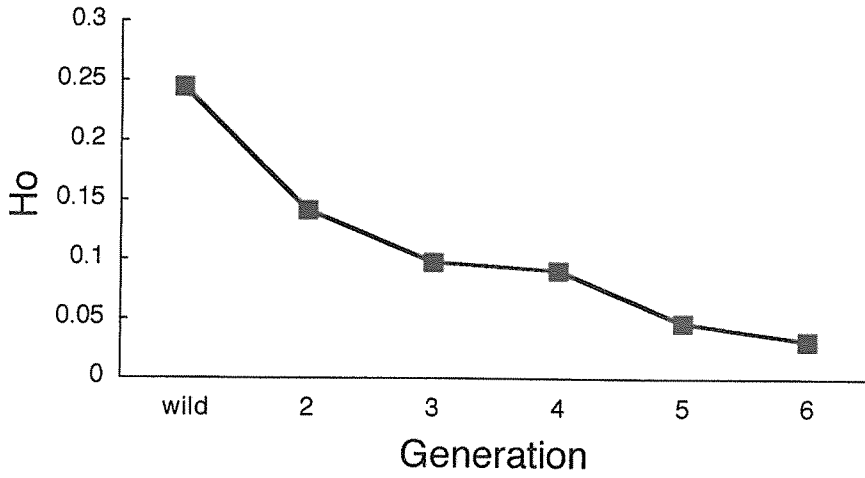


Fig. 1. Decrease of observed mean heterozygosity ( $H_o$ ) from 2nd to 6th generations of banded-purple shell breeds of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*.

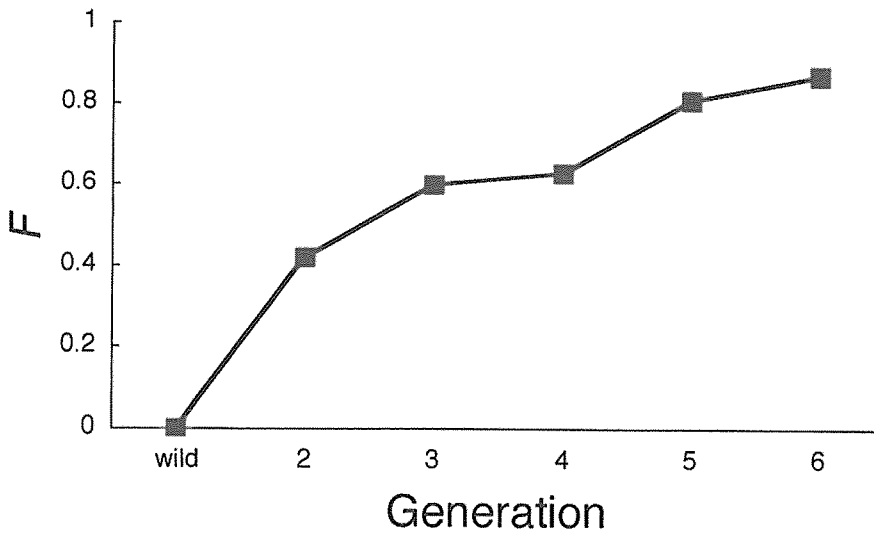


Fig. 2. Increase of inbreeding coefficient ( $F$ ) from 2nd to 6th generations of banded-purple shell breeds of the Japanese littleneck clam, *Ruditapes philippinarum*.

このまま同様にアオアサリ系統を選抜交配させて世代を重ねると、近い将来にはアロザイム遺伝子についてほとんど均質な集団になってしまうことが予想される。当初の目的<sup>2)</sup>のようにアオアサリの系統を放流用標識貝として利用するためには、この遺伝的均質化は大きな問題となろう。今後もアオアサリを継代選抜して行く上では、毎代天然のアオアサリを交配に加えることや、なるべく多くの個体を使用し、あらに産卵誘発に対する反応の同調性を高める努力が必要であろう。

## 文 献

- 1) I. Taki : *Venus*, 11, 70-89 (1941) .
- 2) 岸岡正伸・立石 健・酒井治己・鬼頭 鈞・井手尾 寛・松野 進 : 水産育種, 25, 91-97 (1997).
- 3) 中前 明 : 水産振興, 30 (10), 1-46 (1993).
- 4) R. W. Murphy, J. W. Sites, D. G. Buth and C. H. Haufler : in "Molecular Systematics" (ed. by D.M.Hillis and C.Moritz), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1990, pp.45-126.
- 5) C. R. Shaw and R. Prasad : *Biochem. Genet.*, 4, 297-320 (1970).
- 6) 向井輝美 : 集団遺伝学, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1980, pp.274.
- 7) 酒井治己・樋口順一・渡辺智久・鬼頭 鈞・松野進・岸岡正伸・中野義久・高見東洋 : 水産大研報, 49, 23-27 (2000).
- 8) M. Nei and F. Tajima : *Genetics*, 98, 625-640 (1981).
- 9) E. Pollak : *Genetics*, 104, 531-548 (1983).
- 10) D. Hedgecoch and F. Sly : *Aquaculture*, 88, 21-38 (1990).
- 11) FAO : Fisheries Report No.491 (谷口順彦, 訳), 水産育種, 22, 83-10 (1995).
- 12) 鳥羽光晴・深山義文 : 水産増殖, 40, 303-311 (1992).