

2) ニゴロブナにおける放流魚と天然魚の遺伝的変異性の比較

小林 徹・小林敬典(水産庁養殖研)

【目的】放流事業の進展によって、閉鎖水域である琵琶湖のニゴロブナ資源に占める放流魚の割合が増えている。放流魚は琵琶湖全体から見ると比較的少数の集団を親とし、近交度が高いことが予想される。このことから放流魚が天然魚に比べて環境の変化に弱くないか、あるいはもともとの琵琶湖のフナ類の遺伝的なばらつき(遺伝的多様性)に影響しないかということが懸念される。そこでDNA分析によって、放流種苗および天然資源の遺伝的多様性を把握し、琵琶湖のフナ資源の遺伝的多様性を保全するための指標とすることを試みた。

【方法】放流魚は1996年秋放流用に水産試験場で養成したニゴロブナ18尾を、また天然魚は1996年1月下旬に竹生島付近で採捕されたニゴロブナのうちALC耳石標識のないもの18尾を分析に供した。各個体の遺伝的変異性の検出はRAPD-PCR法によった。すなわち、血液約20 μ lからフェノールクロロホルム法によって粗全DNAを抽出し、これを鋳型として10mer塩基の5'末端にCy5蛍光標識した4種のDNA断片(表1)をプライマーとしてそれぞれ表2の組成で図1のサイクルを用いたPCRを行った。PCR産物のDNA断片の解析はALFexpress DNAシーケンサを用いて、ポリアクリルアミド電気泳動で分離した断片の蛍光標識をレーザー光励起によって自動検出した。遺伝的変異量は群内の各個体の遺伝的近交度としてBSI値を下記の計算式で求め、放流魚と天然魚とで比較した。

$$\text{BSI値} = \frac{2 \cdot \text{Nab}}{\text{Na} + \text{Nb}}$$

Na, 個体aに検出されたバンド数; Nb, 個体bに検出されたバンド数; Nab, 個体aと個体bとが共有するバンド数

【結果】表3に各プライマーで検出した断片長多型から計算した各個体間のBSI値の群内平均値を示した。OPA10Fの場合は明らかに放流魚の遺伝的近交度が高かったが、他のプライマーを使った場合は両者には差がなかった。従って、今回分析した放流魚群は天然魚に比較して遺伝的変異量がやや少ないことが推定されるが、今回の天然魚は一定の地先のみを代表する可能性もあり、今後全湖的な規模での天然魚集団との比較や、多種のプライマーの検討も必要である。

表1, RAPD-PCRに用いたプライマーとその塩基配列

プライマー	塩基配列
OPA-10F	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA-12F	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA-15F	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA-16F	5'-AGCCAGCGAA-3'

表2, RAPD-PCRのためのPCR反応液の組成

	μl
サンプル	2
10×PCR Buffer	2.5
10×dNTPs	2.5
ポリメラーゼ	0.2
16SAR-L	0.5
D W	17.3
合計	25

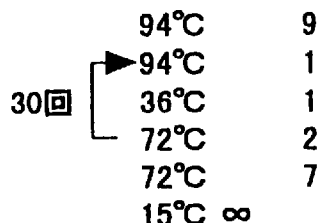


図1, mt16S領域増幅のためのPCRサイクル

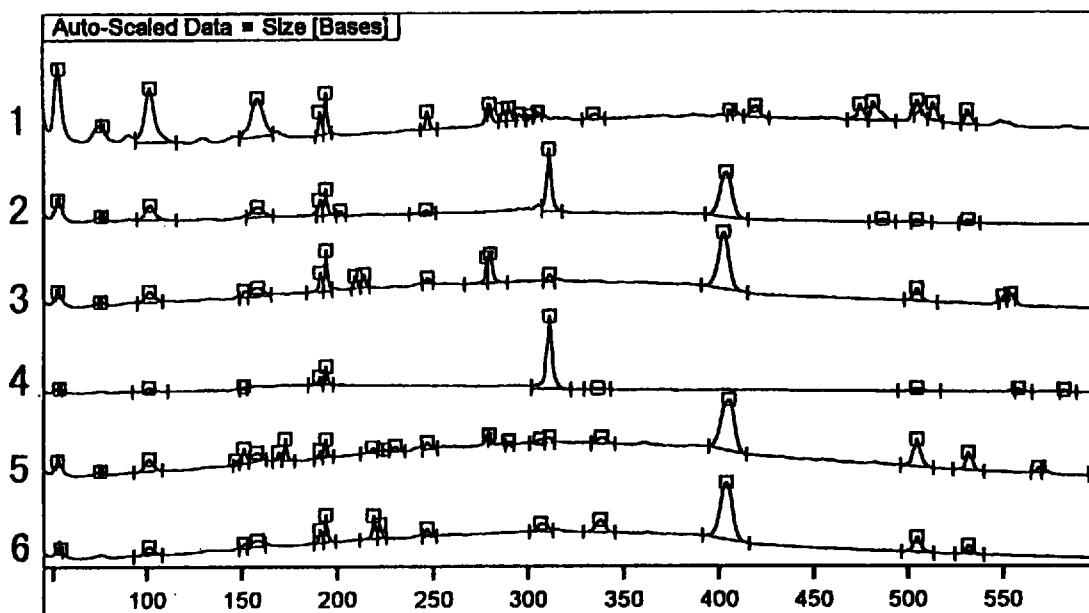


図2, DNAシーケンサで検出したRAPD-PCRのピークパターン
 □印はDNA増幅断片として検出したピークを示す。
 1-3, 放流魚; 4-6 天然魚. プライマーはOPA-12Fを使用した。
 下の数字は増幅DNA断片長を塩基数 (bp) で表している。

表3, RAPD-PCRによるニゴロブナの放流魚と天然魚の遺伝的近交度 (BSI値) の群内平均値の比較

プライマー	BSI値				T検定
	放流魚		天然魚		
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
OPA-10F	0.488	± 0.106	0.371	± 0.133	P<0.01
OPA-12F	0.282	± 0.104	0.283	± 0.107	NS
OPA-15F	0.155	± 0.133	0.145	± 0.121	NS
OPA-16F	0.236	± 0.104	0.234	± 0.094	NS

NS, 有意差なし