

種特異的プライマーを用いたゴリ種判別方法の開発

幡野 真隆・亀甲 武志・中山 耕至（京大院農）

1. 目的

琵琶湖のハゼ科稚魚である“ゴリ(ウロリ)”の種判別方法として、PCR-RFLP法¹⁾による種判別を行ったが、PCR-RFLP法では出現頻度の低いハプロタイプは種判定ができない問題がみられた。また、より簡便な判別手法を開発するため、種特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCR法によるゴリ種判別方法の開発を行った。

2. 方法

ミトコンドリア DNA の調節領域の前半部分を対象として、仔稚魚期の形態判別が困難である、オウミヨシノボリ、ビワヨシノボリ、ヌマチチブの成魚をそれぞれ 27、29、34 個体塩基配列の解析を行った。種間、種内の配列の多型を考慮し、増幅産物の長さが異なるような種特異的ナリバース側プライマーを設計した。フォワード側は共通プライマー(L15924)とした。また、2015年6月9日～10月15日に琵琶湖北湖(彦根市薩摩地先の4、7、10、13m 地点、彦根市松原地先、近江八幡市沖島地先)で採捕したゴリの一部の個体をエタノール保存し、Chelex 樹脂により DNA を粗抽出して、各地点最大 24 個体ずつ種特異的プライマーによるマルチプレックス PCR 法で種判別を行った。種特異的増幅物が認められなかった個体は、形態判別を併用して種判別した。

3. 結果

設計した種特異的プライマーと共通プライマーの組み合わせにより、オウミヨシノボリでは約 250bp、ビワヨシノボリでは約 350bp、ヌマチチブでは約 450bp の種特異的な PCR 産物が得られた(図 1)。上記 3 種と同時に出現

する可能性のあるイサザやウキゴリでは非特異的な PCR 産物は得られなかったことから、PCR により種判別が可能になった。また、PCR-RFLP 法ではマイナーハプロタイプを種判別できなかったが、本プライマーを用いることで、種判別が可能であった。2015 年の琵琶湖で採捕したゴリの種判別を行ったところ、6 月から 7 月上旬にかけてはオウミヨシノボリの割合が多く、7 月下旬以降はビワヨシノボリが多くみられた(図 2)。2014 年は 9 月には薩摩地先の多くの地点でヌマチチブの割合が多かったが、2015 年 9 月は薩摩地先の 4m 地点のみでヌマチチブの割合が多かったことから、ヌマチチブの発生傾向には年変動の存在が示唆された。

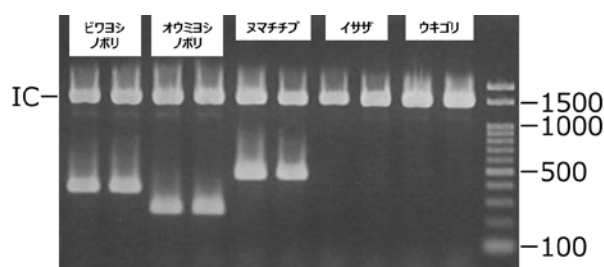


図 1 種特異的プライマーによる PCR 産物の泳動像 (IC は PCR 増幅確認のための内部標準)

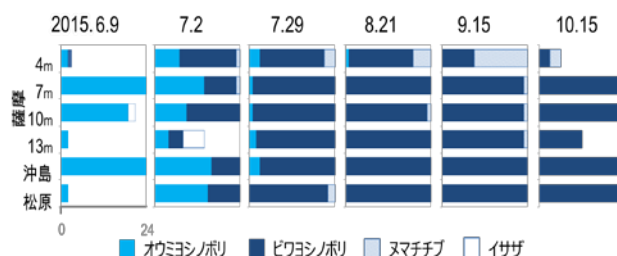


図 2 ゴリの種判別結果