

課題名 4RFd-1201 希少種の人為的導入による、在来種への交雑を介した遺伝子浸透  
－愛媛県タナゴ類の事例

課題代表者名 畑 啓生（愛媛大学 大学院理工学研究科 環境機能科学専攻 生態環境科学分野）

研究実施期間 平成24～26年度

累計予算額 5,896千円（うち26年度1,997千円）  
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 希少種、保全、国内外来種、交雑、遺伝子浸透

#### 研究体制

（1）希少種の人為的導入による、在来種への交雑を介した遺伝子浸透  
－愛媛県タナゴ類の事例（愛媛大学）

#### 研究概要

##### 1. はじめに(研究背景等)

近年の河川環境の人為的な改変により、日本の淡水域では、水生生物にとっての生息場所が質、量ともに損なわれてきた。一方で、日本各地の淡水域には国内外から様々な外来生物が導入され、在来生物に、捕食や競争、また時に遺伝子浸透を介して、強い攪乱を与えている。その結果、多くの在来淡水魚類は希少種となり、その保護が急務である。特に国内の他地域からもたらされる国内外来種の問題は、導入先で定着しやすく、また検出しにくいという特徴があり、私たちが気付かぬ間に在来の生態系を蝕む恐れがある。実際日本の淡水魚においては少なくとも6目13科58種・亜種、日本の在来淡水魚の20%が国内外来種化しているとされ(日本魚類学会自然保護委員会, 2013)、これらの国内外来魚がどこからもたらされ、導入先でどのように定着し、在来の生態系にどのような影響を及ぼしているのか、その実体を把握して、対策を講じる必要がある。

そこで、本申請研究では、愛媛県松山平野で在来希少種のヤリタナゴと、国内外来種の可能性が高いアブラボテ(図1)を対象に、形態学的観察と分子遺伝学的手法、さらに野外と実験室における生態

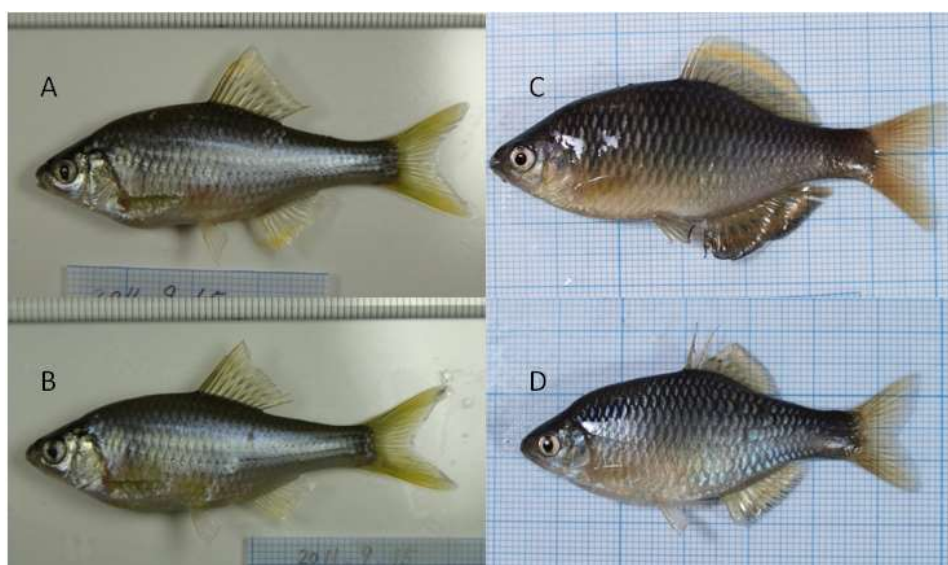


図1。Aヤリタナゴ雄、Bヤリタナゴ雌、Cアブラボテ雄、Dアブラボテ雌。

観察を同時に行って、両種の競争関係や、交雑、遺伝子浸透について明らかにする。ヤリタナゴとアブラボテは、松山平野では二つの小河川のわずか数kmにわたる流程と、それに繋がる4つの泉にしか生息しておらず、ともに絶滅危惧種Ⅰ類に指定されている(愛媛県, 2003)。しかし、ミトコンドリア遺伝子の解析により、このアブラボテが福岡からの移入であることが示唆され、しかも在来のヤリタナゴと交雑を生じているらしい(Hashiguchi et al., 2006)。このまま放置すれば、在来のヤリタナゴの、長い時間をかけ、この地に適応して形成された遺伝的固有性が永遠に失われてしまいかねない。そのため、事例研究の一つとして、この松山平野のタナゴ類を対象に、国内の他地域からもたらされる国内外来種が、導入先でどのように定着し、在来の生態系にどのような影響を与えているか、それをどのように検出すれば良いかについて研究を行う。さらに本研究から得られる科学的知見を用いて実際にどのような対策を講じることが可能か検討し、行政や地元住民と協働し、自然再生地など半自然水域を適切に用いて在来の希少種ヤリタナゴの保全区を作成することを検討したい。

## 2. 研究開発目的

本研究は、愛媛県松山平野において、人為的に国内他地域からもたらされたと考えられるアブラボテの起源を明らかにすること、この国内外来魚アブラボテが導入先の松山平野でどのように定着しているのか、在来の生態系、特に近縁種の在来希少種ヤリタナゴにどのような影響を及ぼしているのかを明らかにすることを目的とする。さらに得られた科学的知見をもとに、行政と地域住民と協働して、自然再生事業により作られた半自然水域を用いて、ヤリタナゴの保全区を策定し、ヤリタナゴ保全のシステムの構築を目指す。この松山のタナゴ類を事例研究の一つとし、国内の他地域からもたらされる国内外来種が、導入先でどのように定着し、在来の生態系にどのような影響を与えているか、それをどのように検出すれば良いか、どのような対策を講じることができるか、これらについて私たちの理解を深めることを目的とする。

## 3. 研究開発の方法

### (1) 希少種の人為的導入による、在来種への交雑を介した遺伝子浸透

松山平野を流れる重信川水系、国近川水系、長尾谷川、大谷川水系の4水系59地点及び湧水池42地点にてアブラボテの採集を試みた。42地点の湧水池においては潜水調査もを行い、アブラボテの在/不在を確認した。また、香川県、広島県、兵庫県、京都府、山口県、大分県、福岡県、佐賀県、鹿児島県及び熊本県においてアブラボテの採集を行った。

採集しエタノール固定した各試料より右腹鰭の一部を切り出し、DNAを抽出した。mtDNAのcytochrome *b* (cytb) 領域についてPCRを行い増幅し、塩基配列を決定した。得られたcytb領域の塩基配列データに加えて、DDBJからアブラボテのcytb遺伝子塩基配列として登録されている全データを引用して使用した。これらの塩基配列データをもとに系統樹を作製した。

上記のミトコンドリア遺伝子は母系遺伝するため、この配列のみに基づいて交雑個体の判定をすることはできない。形態型とミトコンドリア遺伝子型の不一致により、明らかに交雑由来と分かる個体が判定できるに止まる。そのため、より高い精度で交雑由来の個体を検出するため、マイクロサテライトマーカーを用いることとした。マイクロサテライト解析は先行研究に従い計6つのマーカーを用いて行った。STRUCTUREを用いて各個体の帰属性について解析を行い、ヤリタナゴ、アブラボテ、交雑個体に分類した。

またこれらのタナゴ類について、識別形質として知られる側線有孔鱗数と臀鰭分岐軟条数を計数した。これらのデータを用いて、二種の形態的な差異と、交雑個体の形態的特徴を明らかにした。

国近川水系3河川、長尾谷川水系1河川に合計58地点の調査地点を設定し、タナゴ類の産卵床となる二枚貝の分布調査を行った。採集した生貝はマーキングを行い、実験室に持ち帰って殻長を計測し、育児嚢内の卵及び幼生の有無を記録し、その後河川の採集した場所に再び放流した。

国近川、神寄川、長尾谷川の3河川において、二枚貝が高密度で生息する地点に調査地を一つずつ設定し、2013年4月から10月にかけて、毎週タナゴ卵が産みこまれた二枚貝を採集し、水槽内で稚魚を孵化させ、この稚魚について核DNAのマイクロサテライトマーカー分析を行った。STRUCTURE解析によって、各仔魚個体がアブラボテ純系か、ヤリタナゴ純系か、または交雑個体かどうかを判定した。

国近川、神寄川、長尾谷川において、2014年6月、10月にヤリタナゴとアブラボテ、交雑個体の採集を行った。同時に各地点において懸濁態有機物、ペントス(ミズムシ、ヌマエビ、マツカサガイ)、デトリタス、底生藻類、水草を採集した。これらにつき、安定同位体比質量分析計を用い炭素・窒素

安定同位体比を測定した。

10%中性ホルマリンで固定したタナゴ魚体サンプルの標準体長（SL）を測定後、腸管を取り出し、Intersecting Point（IP値）と腸管長（Intestine length, IL）を測定した。得られた結果につきヤリタナゴとアブラボテ間で比較を行い、これらの二種のニッチの重複について検討した。

またヤリタナゴとアブラボテの自然分布域で二種が共存している西日本各地の調査地、熊本県緑川、佐賀県嘉瀬川、佐賀県六角川、福岡県遠賀川、福岡県今川、大分川駅館川、山口県厚東川、広島県芦田川、兵庫県武庫川、京都府淀川の10の河川で、ヤリタナゴとアブラボテの採集を行い、標本からDNA抽出し、核遺伝子の6つのマイクロサテライトマーカを用いた集団遺伝解析を行い、各調査地において採集された各個体につき、ヤリタナゴ純系、アブラボテ純系、交雑個体のいずれに当たるか判定を行った。松山平野では、国近川水系において2014年6月、8月、10月に河川上流から300 mおきに採集を行った。マイクロサテライト解析には上記と同様計6つのマーカを用いて行った。

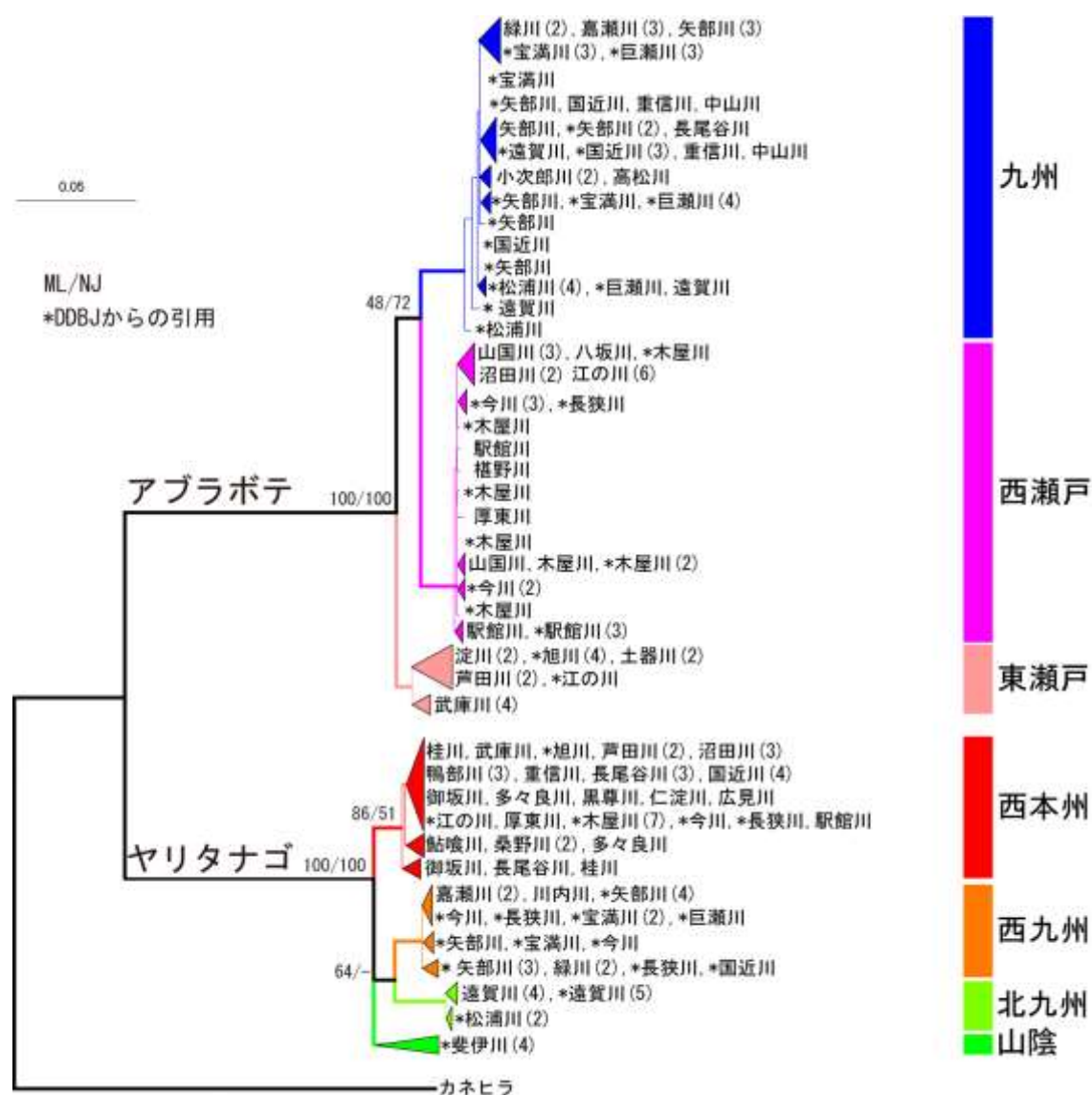


図2. ヤリタナゴとアブラボテのミトコンドリア遺伝子cytochrome *b* 領域を用いた分子系統樹。最尤法により構築。枝上の値は最尤法/近隣結合法によるブートストラップ値。括弧内の数字は同一配列を持つ個体数。\*は、その配列がDDBJからの引用であることを示す。

#### 4. 結果及び考察

##### (1) 希少種の人為的導入による、在来種への交雑を介した遺伝子浸透

湧水池における分布調査の結果、アブラボテは全湧水池42地点のうち、国近川水系、長尾谷川水系周辺の松前区域に位置する4地点と重信川中流の東温区域に位置する2地点の合計6地点に出現した。1979年に重信川中下流域で初確認された松山平野のアブラボテは、湧水池における過去との魚類相比較から分布域を拡大していることが明らかとなった。

合計216個体から得られたcytb領域1016塩基対を用いて系統解析を行ったところ、塩基置換によって区別される87種類のmtDNAハプロタイプが検出された。アブラボテは東瀬戸内グループ、西瀬戸内グループ、西九州グループの3グループに分けられた(図2)。松山平野のアブラボテの分布は、湧水池が集中する松山平野沿岸部の松前区域と重信川水系中流の東温区域の2区域に限られていた。この2区域で採集したアブラボテは全てmtDNAの系統において西九州グループに含まれた。松山平野では湧水池に加え、河川で採集した全てのアブラボテ個体が福岡県西部の矢部川水系に見られるアブラボテ個体群とハプロタイプを共有した(図3)。愛媛県と隣接する香川県、広島県芦田川以東では東瀬戸内グループの個体群が、山口県、広島県沼田川以西、大分県、福岡県東部の豊前地域(中島 et al., 2006)は西瀬戸内グループの個体群が生息していた。そのため、松山平野で採集されたアブラボテ個体群が、福岡県西部の矢部川のみでみられるハプロタイプを持つのは不自然であり、三郡山地・英彦山地の地理的隔離を越えて人為的にもたらされた個体群である可能性が極めて高い。

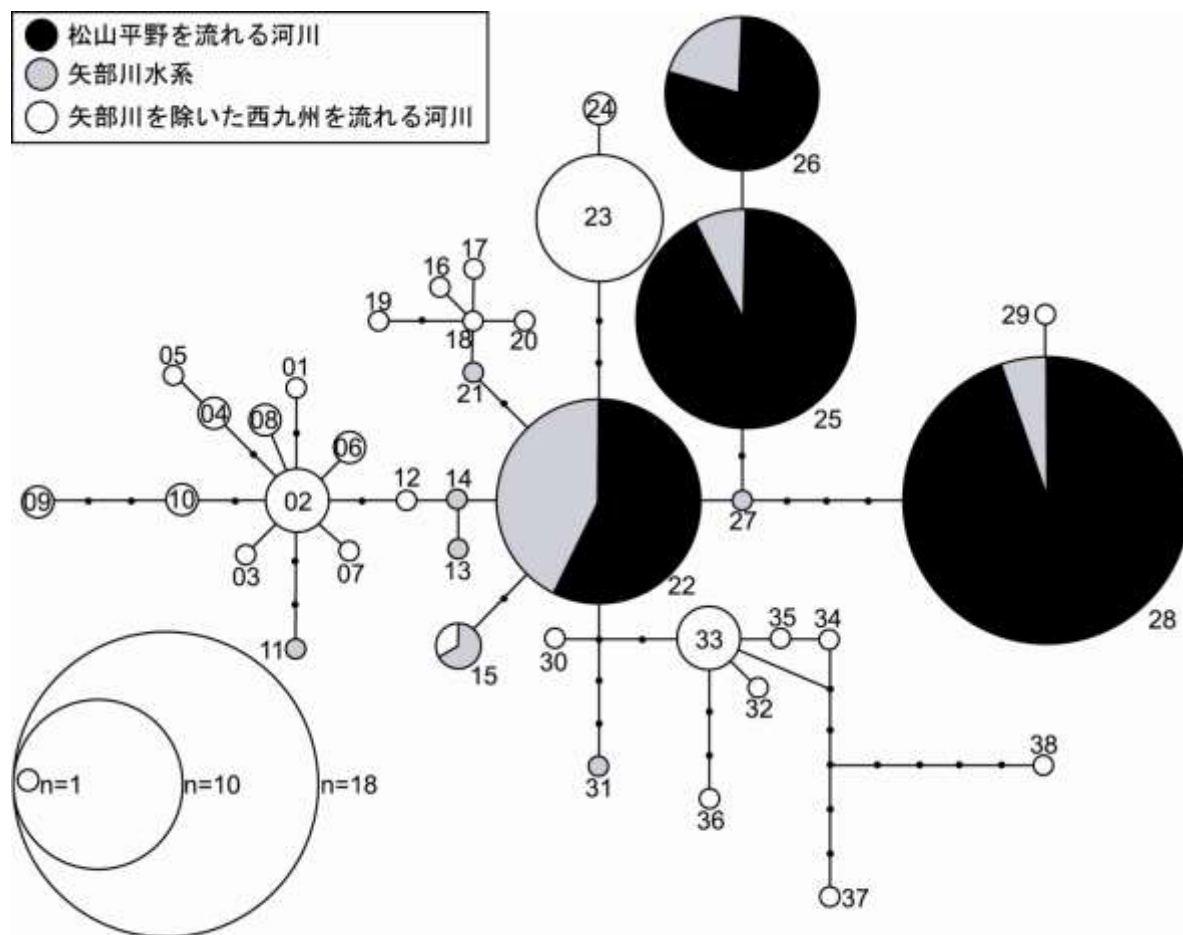


図3. アブラボテの九州グループのcytochrome *b* 遺伝子領域のハプロタイプネットワーク図。円グラフの黒は松山平野で採集した個体、灰色は福岡県矢部川で採集した個体、白は矢部川以外の九州の河川で採集した個体を示す。円の大きさは個体数に対応する。トッドは検出されなかったハプロタイプを示し、各ハプロタイプを結ぶ線は一塩基の変異を示す。

各遺伝子のマイクロサテライト6マーカーに基づき、ヤリタナゴとアブラボテ純系、二種の交雑由来



の個体を判定したところ、調査した松山平野全体では22.5%（40/178個体）交雑個体が見られた。松山平野における交雑個体の分布は、国近川、神寄川、長尾谷川ともに上流ほどアブラボテの割合が高く、特に湧水池においては出作新泉、福德泉ともにアブラボテの割合が高かった（図4）。つまり、流速が早く河川幅のある国近川河口付近にはヤリタナゴが分布し、湧水池から近く流速が遅い地点にはアブラボテが分布しており、2種は棲み分けていることが分かった。しかし、交雑個体は湧水池から河口付近まで幅広く分布し、松山平野で広く見られることが明らかになった。また、両種とも浸透交雑が進んでいることが明らかとなった。

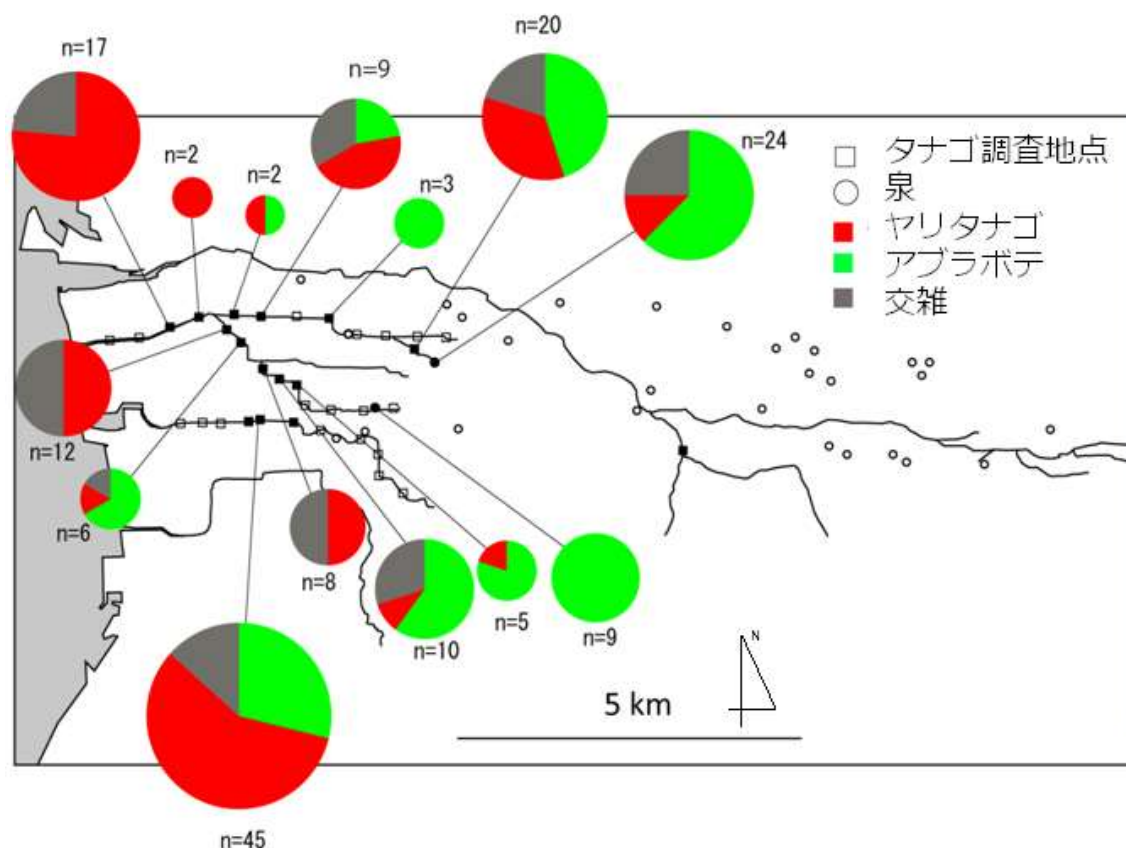


図4. マイクロサテライト解析により判定したヤリタナゴ純系（赤）、アブラボテ純系（緑）、ヤリタナゴアブラボテ交雑（灰）個体の松山平野における分布。

松山平野において二枚貝類の分布を調査したところ、松山平野にはマツカサガイが最も優占していたが、その分布は局所的であった（図5）。イシガイ類の生息密度を説明する環境要因を選択したところ、底質材料中の砂の割合が37.3%より大きい場所で密度が有意に高く、堰堤より下流に生息域があることが分かった。イシガイ類は自身の体を底質中に埋没させて生活しており、マツカサガイは一般に砂礫から砂質の底質を好むことが知られており、松山平野の湧水性河川でも、マツカサガイは砂質の底質を好むことが示唆された。また堰堤がイシガイ類のグロキディウム幼生の宿主となる魚類の遡上を妨げ、マツカサガイの分布が河川堰の下流側に制限されていることが示唆された。さらに、今回採集された生貝は、殻長組成のピークが一つしかなく、いずれも成貝であった（図6）。メスの貝は繁殖期に妊卵していることと、シマヨシノボリでマツカサガイのグロキディウム幼生の寄生がみられることが確認された。そのため、これらの成貝は全て再生産に参加できるにも関わらず、少なくとも過去数年間は新規加入した個体は存在しない、その理由としてはグロキディウム幼生の生残率、着底率、稚貝の生残率が低いことなどが考えられた。

採集した二枚貝を飼育し、得られたタナゴ稚魚について、6つのマイクロサテライトマーカーの解析を行なった。その結果、3河川ともに交雑由来の仔魚が確認でき、交雑仔魚の割合は、国近川で3.0%（4/135個体）、神寄川で11.2%（20/178個体）、長尾谷川で14.4%（34/235個体）であった。アブラボテ

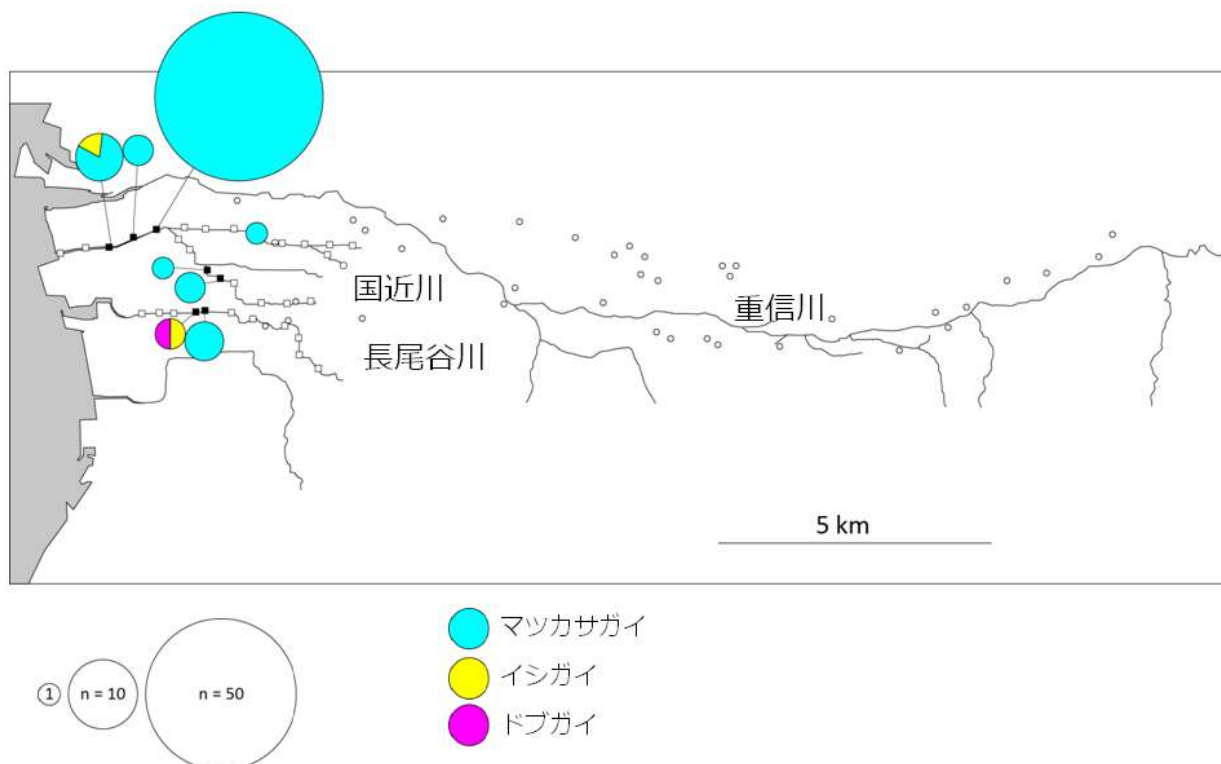


図5. 松山平野における淡水二枚貝の分布。円の大きさは個体数を表す。

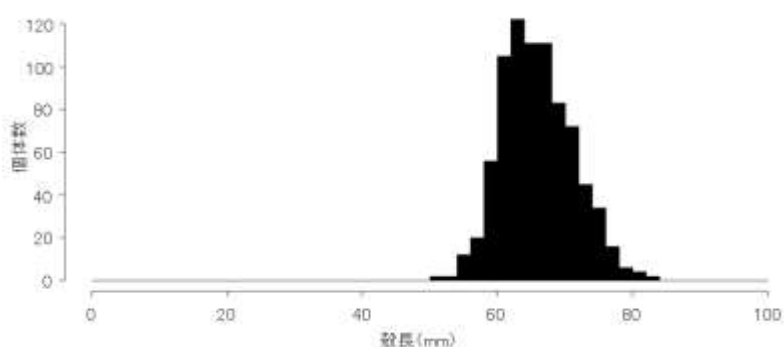


図6. 愛媛県松山平野におけるマツカサガイの殻長のサイズ分布。

とヤリタナゴの産卵期は、3河川で6月中旬から8月下旬にかけて重なっていた。アブラボテとヤリタナゴの交雑個体は3河川で確認でき、いずれも2種の孵出した時期が重なった期間に交雑個体が孵出した傾向にあるため、2種の産卵期が重なっている時期に交雑が起こっていることが示唆された。神寄川と長尾谷川では交雑個体の割合が高かった。これはこれらの河川でマツカサガイの密度が低く、マツカサガイ一個体に産卵されていたタナゴ類の卵が多いためと考えられる。

消化管形態は、ヤリタナゴでアブラボテより腸管長が長く複雑であった。窒素安定同位体比分析からも、ヤリタナゴは藻類食が強く、アブラボテは動物食が強いことが示唆された。しかし、繁殖期には二種の栄養段階は重複し、餌資源に重複が生じることがわかった。

松山平野と西日本各地で採集したヤリタナゴ、アブラボテのマイクロサテライト遺伝子解析の結果、西日本のヤリタナゴ、アブラボテの共存域11地点のうち8地点で交雑個体が確認された(図7)。交雑個体からはヤリタナゴ、アブラボテ双方のmtDNA型が見つかり、交雑は双方向に生じることがわかった。多くの地点で交雑個体が確認されたことから、交雑は自然下でも生じていることが示唆された。

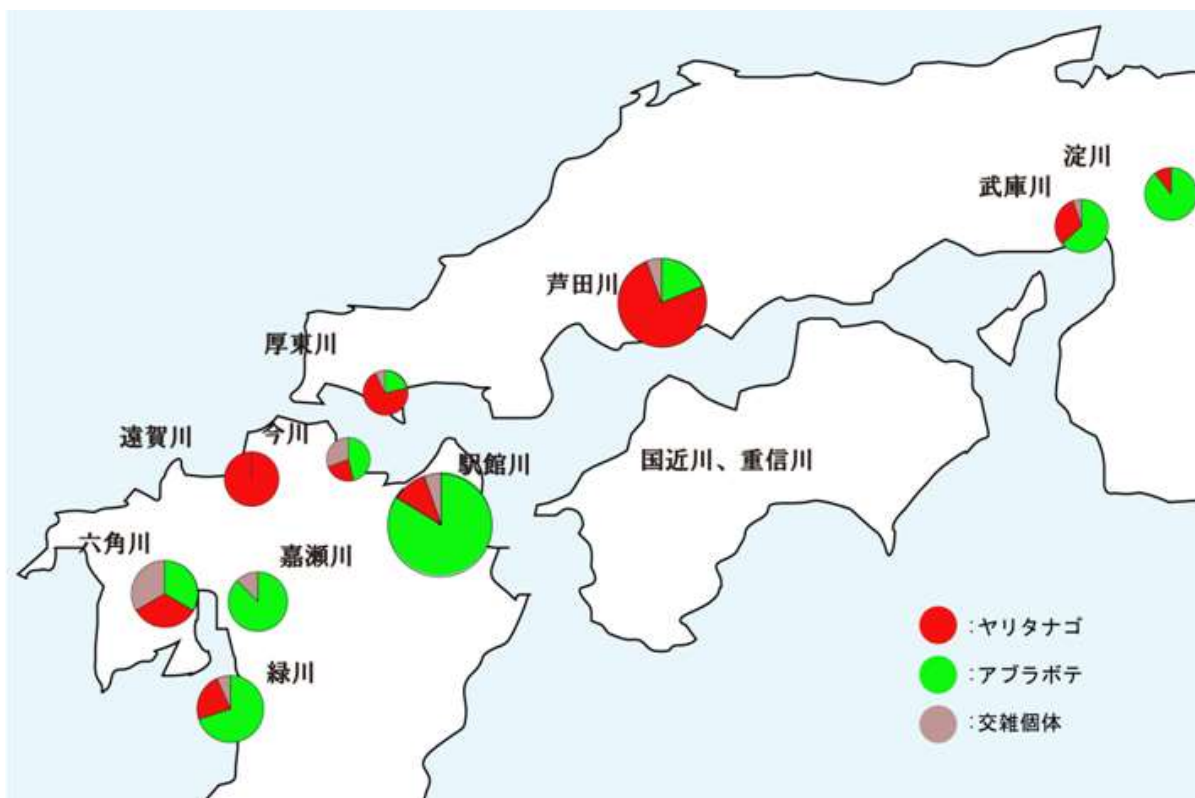


図7. 西日本各地のヤリタナゴ、アブラボテ共存域における、ヤリタナゴ純系、アブラボテ純系、交雑個体の割合。核のマイクロサテライトマーカー6遺伝子座に基づいて判定した。

松山平野において、ヤリタナゴとアブラボテの間で流程分布に差が見られ、季節を通してヤリタナゴは河川の下流側、アブラボテは河川上流から下流側にかけて分布が集中していた。また、交雑個体は河川上流から下流にかけて分布していた。ヤリタナゴに関しては愛媛県松山平野において近年急速に数を減らしている。アブラボテとの交雑により生じた交雑個体が季節を通して河川全体に出現していることから、遺伝子浸透の進行や餌資源・繁殖資源をめぐる競争により、更にヤリタナゴの絶滅に拍車をかけているものと考えられる。

これらの結果より、愛媛県の絶滅危惧種ヤリタナゴを保全するためには、まずヤリタナゴ純系の保全区を策定する必要があること、その保全区はヤリタナゴの生息適地であるだけでなく、タナゴの産卵床となるマツカサガイの生育に適した砂地をもち、さらにマツカサガイのグロキディウム幼生の宿主となるヨシノボリ類が生育していることが必要であることがわかった。私たちの調査によって、自然再生事業で松山平野に作られている自然再生地がこの条件に適していることがわかり、この自然再生地を用いて、官民学がヤリタナゴ保全区を策定し、維持していく必要性を提言した。

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

本研究では、ミトコンドリア遺伝子を用いて系統地理解析を行うことで、愛媛県松山平野に分布するアブラボテは、福岡県矢部川水系からの移入集団である可能性が高いことを明らかにした。また核のマイクロサテライト遺伝子マーカーを用いることで、在来のヤリタナゴと交雑が生じており、特に産卵床となるマツカサガイの密度が低い場所で交雑個体が多く生じることが分かった。松山平野ではヤリタナゴのみが生育する場所はすでになく、松山平野で広くアブラボテとの交雑個体が生育しており、両種の遺伝子浸透も双方向に進んでいるという危機的実態が明らかになった。また松山平野に共存する在来のヤリタナゴと国内移入種のアブラボテとで、消化管の形態を比較し、ヤリタナゴが藻食に適応し、アブラボテは雑食性であることを明らかにし、さらに炭素、窒素安定同位体比をマーカーとして用いることで、やはりアブラボテの方がより高い栄養段階を占めるが、繁殖期には両種が同様な餌資源を利用して競合関係にある可能性を示した。松山においては、マツカサガイの分布は極めて局所的で、その密度も低かった。さらに、マツカサガイの稚貝や幼貝が見られないことから、数年に亘って再生産していないものと考えられる。そのため、愛媛県の絶滅危惧種ヤリタナゴを保全するた

めに、ヤリタナゴのみならず、その産卵床となるマツカサガイ、さらにマツカサガイのグロキディウム幼生の寄主となるヨシノボリ類、これらを含んだ保全区を策定する必要があることを示した。

さらにヤリタナゴとアブラボテが共存する西日本各地の調査地において、核のマイクロサテライトマーカーを用いた集団解析により、松山平野以外にも高い交雑率を示す河川があることを明らかにした。松山のみならず、複数の地点で何らかの理由によって二種間の生殖隔離機構が損なわれている可能性があるため、その原因を突き止め、準絶滅危惧種である両種の保全にあたる必要があることを示唆した。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

本研究の成果に基づき愛媛県レッドデータブックの執筆を行い、ヤリタナゴを絶滅危惧IA (CR) に格上げ、アブラボテを情報不足 (DD) に格下げを行った。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

本研究の成果について、行政（国土交通省四国地方整備局、愛媛県、松山市、伊予市、松前町、砥部町、東温市）と10のNPO、地域の大学（愛媛大学）、高校（伊予農業高校）が集まった重信川の自然を育む会第16会総会（2015年2月2日開催）において「自然再生地を用いたヤリタナゴ保全の提案」という議題で話題提供し、この会の合意を得て、官民学が協働してヤリタナゴ保全区を策定し、ヤリタナゴの保全にあたる計画が進行している。

## 6. 研究成果の主な発表状況

### (1) 主な誌上発表

#### <査読付き論文>

- 1) 松葉成生、吉見翔太郎、井上幹生、畑啓生：分子系統地理が示す愛媛県松山平野におけるアブラボテの人為移入起源、魚類学雑誌、61, 89-96 (2014).

### (2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 松葉成生、畑啓生：日本生態学会（2013）  
「愛媛県における在来種ヤリタナゴと国内移入種アブラボテの交雑」
- 2) 松葉成生、久保田菜々、黒川真帆、畑啓生：四国魚類研究会（2013）  
「松山平野における在来種ヤリタナゴと国内移入種アブラボテの交雑実態及びそれらの分布把握」
- 3) 松葉成生、大内魁人、吉見翔太郎、畑啓生：日本魚類学会（2013）  
「松山平野における在来種ヤリタナゴと移入種アブラボテの交雑と遺伝子浸透」
- 4) 吉見翔太郎、畑啓生：四国魚類研究会（2014）  
「DNAで探るアブラボテ属タナゴ2種の系統地理」
- 5) 桑原明大、畑啓生：四国魚類研究会（2014）  
「愛媛県松山平野の湧水性河川における希少イシガイ類の生息環境」
- 6) 大内魁人、畑啓生：四国魚類研究会（2014）  
「産卵床の二枚貝を共有する在来種ヤリタナゴと国内移入種アブラボテの交雑」
- 7) 大内魁人、畑啓生：第42回四国魚類研究会（2015）  
「松山平野における在来種ヤリタナゴと国内移入種アブラボテの交雑」
- 8) 桑原明大、畑啓生：第42回四国魚類研究会（2015）  
「愛媛県松山平野の湧水性河川におけるマツカサガイの分布と再生産」
- 9) 畑啓生、松葉成生、大内魁人、桑原明大、吉見翔太郎、石井麻友、井上幹生：日本生態学会（2014）  
「国内外来種が引き起こす在来種との交雑と遺伝子浸透：松山平野の在来種ヤリタナゴと移入種アブラボテの事例」

## 7. 研究者略歴

課題代表者：畑 啓生

京都大学大学院人間・環境学研究科博士後期課程修了、博士（人間・環境学）、現在、愛媛大学院理工学研究科 環境機能科学専攻 生態環境科学分野助教



## 4RFd-1201 希少種の人為的導入による、在来種への交雑を介した遺伝子浸透 ー愛媛県タナゴ類の事例

愛媛大学 大学院理工学研究科

環境機能科学専攻 生態環境科学分野

畑 啓生

平成24～26年度累計予算額：5,896千円

(うち、平成26年度予算額：1,997千円)

予算額は、間接経費を含む。

### [要旨]

日本の淡水域には国内外から様々な外来生物が導入され、在来生物に、捕食や競争、また時に遺伝子浸透を介して、強い攪乱を与えている。特に国内の他地域からもたらされる国内外来種の問題は、導入先で定着しやすく、また検出しにくいという特徴があり、私たちが気付かぬ間に在来の生態系を蝕む恐れがある。実際日本の淡水魚においては少なくとも20%が国内外来種化しているとされ、これらの国内外来魚がどこからもたらされ、導入先でどのように定着し、在来の生態系にどのような影響を及ぼしているのか、その実体を把握して、対策を講じる必要がある。本研究では、松山で国内外来種と疑われるヤリタナゴについて、松山平野における網羅的採集と、西日本各地における採集を行い、それら標本について遺伝子マーカーを用いた系統地理解析を行うことで、松山平野のアブラボテが福岡県からの人為移入起源を持つことを明らかにした。さらに、松山平野では近年この国内外来種アブラボテが急速に分布を広げる一方、在来近縁種のヤリタナゴがその分布を急速に縮小していることが分かった。さらに両種が同じマツカサガイを産卵床として初夏から夏にかけてほぼ同じ時期に利用し、この二枚貝の分布が松山平野では極めて局所的で密度も低いため、二種が産卵床を巡って競争関係にあることが示唆された。さらに核遺伝子のマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝解析により、松山平野ではヤリタナゴとアブラボテとの交雑が生じていること、交雑は雑種第二世代以降も進行し、両種への浸透交雑が生じていることが明らかとなった。これらの結果に基づき、ヤリタナゴは愛媛県レッドデータブックで絶滅危惧IA(CR)に指定された。さらに松山平野ではヤリタナゴのみが生育する生息地は見つかっておらず、広くアブラボテとの交雑が見られるため、早急にヤリタナゴの保全区を策定する必要があり、自然再生地を用いた官民学協働の保全を提言した。

[キーワード] 希少種、保全、国内外来種、交雑、遺伝子浸透

### 1. はじめに

近年の河川環境の人為的な改変により、日本の淡水域では、水生生物にとっての生息場所が質、

量ともに損なわれてきた。一方で、日本各地の淡水域には国内外から様々な外来生物が導入され、在来生物に、捕食や競争、また時に遺伝子浸透を介して、強い攪乱を与えている。その結果、多くの在来淡水魚類は希少種となり、その保護が急務である。特に国内の他地域からもたらされる国内外来種の問題は、導入先で定着しやすく、また検出しにくいという特徴があり、私たちが気付かぬ間に在来の生態系を蝕む恐れがある。実際日本の淡水魚においては少なくとも6目13科58種・亜種、日本の在来淡水魚の20%が国内外来種化しているとされ(日本魚類学会自然保護委員会, 2013)、これらの国内外来種がどこからもたらされ、導入先でどのように定着し、在来の生態系にどのような影響を及ぼしているのか、その実体を把握して、対策を講じる必要がある。



図1。Aヤリタナゴ雄、Bヤリタナゴ雌、Cアブラボテ雄、Dアブラボテ雌。

そこで、本申請研究では、愛媛県松山平野で在来希少種のヤリタナゴと、国内外来種の可能性が高いアブラボテ(図1)を対象に、形態学的観察と分子遺伝学的手法、さらに野外と実験室における生態観察を同時に行って、両種の競争関係や、交雑、遺伝子浸透について明らかにする。ヤリタナゴとアブラボテは、松山平野では二つの小河川のわずか数kmにわたる流程と、それに繋がる4つの泉にしか生息しておらず、ともに絶滅危惧種I類に指定されている(愛媛県, 2003)。しかし、ミトコンドリア遺伝子の解析により、このアブラボテが福岡からの移入であることが示唆され、しかも在来のヤリタナゴと交雑を生じているらしい(Hashiguchi et al., 2006)。このまま放置すれば、在来のヤリタナゴの、長い時間をかけ、この地に適応して形成された遺伝的固有性が

永遠に失われてしまいかねない。そのため、事例研究の一つとして、この松山平野のタナゴ類を対象に、国内の他地域からもたらされる国内外来種が、導入先でどのように定着し、在来の生態系にどのような影響を与えているか、それをどのように検出すれば良いかについて研究を行う。さらに本研究から得られる科学的知見を用いて実際にどのような対策を講じることが可能か検討し、行政や地元住民と協働し、自然再生地など半自然水域を適切に用いて在来の希少種ヤリタナゴの保全区を作成することを検討したい。

## 2. 研究開発目的

本研究は、愛媛県松山平野において、人為的に国内他地域からもたらされたと考えられるアブラボテの起源を明らかにすること、この国内外来魚アブラボテが導入先の松山平野でどのように定着しているのか、在来の生態系、特に近縁種の在来希少種ヤリタナゴにどのような影響を及ぼしているのかを明らかにすることを目的とする。さらに得られた科学的知見をもとに、行政と地域住民と協働して、自然再生事業により作られた半自然水域を用いて、ヤリタナゴの保全区を策定し、ヤリタナゴ保全のシステムの構築を目指す。この松山のタナゴ類を事例研究の一つとし、国内の他地域からもたらされる国内外来種が、導入先でどのように定着し、在来の生態系にどのような影響を与えているか、それをどのように検出すれば良いか、どのような対策を講じることができるか、これらについて私たちの理解を深めることを目的とする。

## 3. 研究開発方法

松山平野を流れる重信川水系、国近川水系、長尾谷川、大谷川水系の4水系59地点及び湧水池42地点（愛媛県立博物館，1994，1995）にて2011年5月から2013年10月に手網、電気漁具もしくはモンドリ罟を用いてアブラボテの採集を試みた。そのうち、3水系11地点及び湧水池3地点の計14地点において計45個体のアブラボテが採集された。また比較サンプルとして香川県、広島県、兵庫県、京都府、山口県、大分県、福岡県、佐賀県、鹿児島県及び熊本県においてもアブラボテの採集を行った（表1）。なお、これらの地域のアブラボテの多くは各県のレッドデータブックに掲載されているため、採集個体数を10個体以下とした。採集した個体は直ちに99.9%エタノールで固定した。種同定は中坊（2013）に従った。また、42地点の湧水池においては潜水調査も行い、アブラボテの在／不在を確認した。この調査は、2012年12月から2013年7月の期間に、各池につき1回、Uchida and Inoue（2010）に準拠してベルトトランセクトを設けて行った。そして、湧水池の魚類相が記載されている文献（Uchida and Inoue，2010；愛媛県立博物館，1994，1995）からタナゴ類の分布記録を抽出し、本調査の結果と比較した。なお、湧水池の概況や潜水調査の方法についてはUchida and Inoue（2010）及び藤原 et al.（2014）に記述されている。

表1。アブラボテの採集地、採集日、採集個体数。灰色の網掛けは交雑と推定された個体を示す。

水系 略称	産地	<i>n</i>	採集日	アクセッション番号
愛媛県				
国近川	KN	松前	29	2011年5、9月 AB907119 - 31
国近川	KN	松前	2	2011年5月 AB920290 - 91
国近川	KN	松前	1	2011年5月 AB920289
国近川	KN		3	*AB108980 - 82
長尾谷川	NDe	松前	6	2011年9月 AB907133 - 35
重信川	SGf	東温	7	2012年6月 AB907145 - 48
香川県				
土器川	DK	丸亀	5	2011年10月 AB907110 - 11
京都府				
淀川	YD	亀岡	9	2013年5月 AB907114 - 15
兵庫県				
武庫川	MK	尼崎	5	2013年12月 AB907104 - 07
岡山県				
旭川	AH		4	*AB108968 - 71
広島県				
芦田川	AD	福山	8	2012年8月 AB907102 - 03
			2	2013年6月 AB907102 - 03
沼田川	NT	三原	2	2013年6月 AB907108 - 09
島根県				
江ノ川	GN		8	*AB108972 - 79
山口県				
樫野川	FS	山口	5	2013年10月 AB907160 - 61
厚東川	KT	宇部	3	2013年10月 AB907162 - 63
木屋川	KY	下関	8	2013年9月 AB907164 - 66
			10	*AB108958 - 67
大分県				
山国川	YM	中津	10	2013年2月 AB907139 - 42
駅館川	YK	宇佐	4	2013年2月 AB907136 - 38
			5	*AB108953 - 57
八坂川	YS	杵築	10	2013年10月 AB907143 - 44
福岡県				
遠賀川	OG		3	*AB108935 - 37
今川	IM		5	*AB108938 - 42
長狭川	NG		3	*AB108943 - 45
筑後川	CGhm		5	*AB108921 - 25
	CGks		9	*AB108926 - 34



表1。 続き

River system	Abbreviation	Locality	<i>n</i>	Date	Accession number
福岡県					
矢部川	YB		8		*AB108913 - 20
		八女	10	2013年2月	AB907153 - 59
佐賀県					
松浦川	MT		7		*AB108946 - 52
嘉瀬川	KS	佐賀	6	2013年2月	AB907149 - 52
熊本県					
緑川	MD	熊本	4	2013年10月	AB907116 - 18
鹿児島県					
小次郎川	KJ	出水	5	2013年10月	AB907112 - 13
高松川	TM	阿久根	5	2013年10月	AB907132

\*はDDBJからの引用を示す。

#### mtDNA分析

エタノール固定した各試料より右腹鰭の一部を切り出し、Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いてDNAを抽出した。mtDNAのcytochrome *b* (cytb) 領域についてプライマーセットForward: NEW-FOR, 5' - AGCCTACGAAAAACACACCC - 3' (Gilles et al., 2001)、Reverse: cytb - Rev, 5' - GATCTTCGGATTACAAGACC - 3' (Hashiguchi et al., 2006) を用いてPCRを行い増幅した。目的領域が増幅されたPCR産物についてはABI 3130 (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。得られた配列はDNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した。

得られたcytb領域の塩基配列データに加えて、DDBJのウェブサイトからアブラボテのcytb遺伝子塩基配列として登録されている全データを引用して使用した。外群には国近川 (AB108912、AB108906)、矢部川水系 (YB、AB108852)、遠賀川 (OG、AB108874)、旭川 (AH、AB108894)、島根県斐伊川 (AB108903) のヤリタナゴを用い、Clustal W (Thompson et al., 1994) により多重整列をおこなった。これらの塩基配列データをもとに、MEGA5 (Tamura et al., 2011) によりモデル選択を行い、ベイズ情報量基準により選択されたTamura - Nei + G modelを用い、最尤法による系統樹を作製した。また各枝について近隣結合法、最尤法、それぞれで1,000回のランダム・サンプリングによるブートストラップ確率を求めた。松山平野で確認されたハプロタイプを含むクレードについて、統計学的最節約法に基づくハプロタイプネットワークをTCS1.21 (Clement et al., 2000) により作製した。

#### マイクロサテライトマーカーを用いた交雑個体の特定

上記のミトコンドリア遺伝子は母系遺伝するため、この配列のみに基づいて交雑個体の判定をすることはできない。形態型とミトコンドリア遺伝子型の不一致により、明らかに交雑由来と分かる個体が判定できるに止まる (Hashiguchi et al., 2006; 松葉 et al., 2014)。そのため、より高い精度で交雑由来の個体を検出するため、マイクロサテライトマーカーを用いることとした。

DNAは魚体から切り取ったヒレの一部を用いてGenomic DNA Purification Kit (Promega)により抽出した。マイクロサテライト解析にはShirai et al. (2009) で*Rhodeus ocellatus*に用いられたRC363、RC317AとDawson et al. (2003) で*Rhodeus sericeus*に用いられたRser02、Rser03、Rser07、Rser10の計6つのマーカーを用いて行った。各マーカーにつき、得られたアレルサイズを用いてMicroChecker v. 2.2.3によりヌルアレルの有無を確かめた。結果、全てのマーカーにおいてヌルアレルの存在が確認されなかったため全てのマーカーを解析に用いた。この結果に基づき、STRUCTURE version 2.3.4を用いて各個体の帰属性について解析を行った。Structure Harvester v. 0.6.93を用いて最適なKを推定した結果、K=2で最も高い $\Delta K$ を示した。これに従い、各個体の帰属性をヤリタナゴ、アブラボテ、交雑個体に分類した。交雑個体は、ヤリタナゴとアブラボテのそれぞれの遺伝的要素を2:8から8:2まで併せ持つ個体と定義した(Vähä and Primmer, 2006)。

またこれらのタナゴ類について、識別形質として知られる側線有孔鱗数と臀鰭分岐軟条数を計数し、また魚体輪郭にランドマークを設定し、幾何学的形態測定法にて形態計測を行った。これらのデータを用いて、二種の形態的な差異と、交雑個体の形態的特徴を明らかにした。

#### イシガイ類の分布調査

国近川水系3河川、長尾谷川水系1河川に合計58地点の調査地点を設定し、2013年6月から11月にかけて調査を行った。国近川と長尾谷川は河口から300 m毎に調査地点を設定した。また、神寄川は国近川に、大井手川は神寄川にそれぞれ接続しているため、その接続地点から上流に向け300 m毎に調査地点を設定した。

各調査地点では水路幅×流路に沿った特定の長さ（水路幅が10 m未満であれば5 m、10 m以上15 m未満であれば3 m、15 m以上であれば1 m）の長方形の調査区を設置し、その中でイシガイ類を網羅的に徒手採集した。採集したイシガイ類は生貝、合弁死貝ともに調査区内の左岸側、流央側、右岸側のいずれで採集できたかを記録した。その後、生貝はマーキングを行い、実験室に持ち帰って殻長の計測し、育児嚢内の卵及び幼生の有無を記録し、その後河川の採集した場所に再び放流した。種同定は、(近藤, 2008)にしたがって形態で分類を行った。なお、ドブガイにはヌマガイとタガイの2種が含まれるが(田部 et al., 1994)、中間的な形態が現れるため、殻形態からの2種の同定は困難である。本研究の調査地では生息密度が非常に低く、本研究ではドブガイ *Anodonta* sp. として扱った。

#### イシガイ類への産卵数調査

国近川、神寄川、長尾谷川の3河川において、二枚貝が高密度で生息する地点に調査地を一つずつ設定し、2013年4月から10月にかけて、毎週タナゴ卵が産みこまれた二枚貝を採集し、水槽内で稚魚を孵化させ、この稚魚について核DNAのマイクロサテライトマーカー分析を行った。DNAは魚体または卵を用いてGenomic DNA Purification Kit (Promega)により抽出した。マイクロサテライト解析には上記と同様、計6つのマーカーを用いて行った。各マーカーにつき、得られたアレルサイズを用いてMicroChecker v. 2.2.3によりヌルアレルの有無を確かめた。結果、全てのマーカーにおいてヌルアレルの存在が確認されなかったため全てのマーカーを用い、STRUCTURE version 2.3.4によって各個体の帰属性について解析を行った。それにより、産卵されていた卵数を計数し、各仔魚個体がアブラボテ純系か、ヤリタナゴ純系か、または交雑個体かどうかを判定した。

## 炭素、窒素安定同位体比を用いたヤリタナゴとアブラボテの餌資源解析

国近川、神寄川、長尾谷川において、2014年6月、10月にヤリタナゴとアブラボテ、交雑個体の採集を行った。同時に各地点において水20 L、ベントス（ミズムシ、ヌマエビ、マツカサガイ）、デトリタス、底生藻類、水草を採集した。ベントスはタモ網を用いて採集し、ミズムシとヌマエビは5個体以上、マツカサガイは1個体採集した。デトリタスは流下物を網で採取した。底生藻類は石に付着している藻類をブラシでこすり落として採集した。得られた標本から筋肉片を取り出し、窒素、炭素安定同位体比を用いて食物網解析を行った。安定同位体解析に用いるためにベントスは採集後24時間無給餌で放置し、消化管内容物を排出させた。ミズムシを除くベントスとタナゴ類は、骨や殻を除いた筋肉組織のみを切り出した。デトリタス、底生藻類は不純物を除いた。水草は超純水で洗浄した。ソーティングしたサンプルは、電気オーブンにて60°Cで24時間以上乾燥した後、それぞれメノウ鉢で粉末状に粉碎した。550°Cで3時間焼き、有機物を除去したGF/Fガラスフィルターを用いて、水20 Lを濾過し、懸濁態有機物（POM）を採集した。濾過したフィルターは、電気オーブンにて60°Cで24時間乾燥させた。フィルターは乾燥後、フィルター上の濾過捕集物の付着した部分を全てピンセットで剥離し、メノウ鉢で粉末状に粉碎した。また、炭素安定同位体比を測定するフィルターは、無機炭酸塩を除去するために、乾燥後12N 塩酸溶液10 mlをシャーレに入れ、底部にセットしたデシケーター内へ、フィルターを時計皿にのせて入れ24時間処理し、再び乾燥させた。その後同様に剥離し、粉碎した。粉碎したサンプルをスズカップに量りとり円柱状に包み込んだ。スズカップに包み込んだサンプルを安定同位体比質量分析計

(ANCA-SL, SerCon, PDZ Europe, Ltd) にセットし、炭素・窒素安定同位体比を測定した。スタンダードとしてヒスチジンを使用した。炭素・窒素安定同位体比は標準試料（Cは矢石の化石中の炭酸カルシウム、Nは大気中の窒素）の炭素・窒素安定同位体比に対する千分率として以下の式によって表される。

$$\delta X = [(R \text{ sample}/R \text{ standard}) - 1] \times 1,000 (\text{‰})$$

Xは $^{13}\text{C}$ または $^{15}\text{N}$ 、R sampleはサンプルの $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比または $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比を、R standardは標準試料の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比または $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比をそれぞれ表す。

解析するサンプルを選定するための予備解析として、タナゴ類とマツカサガイ、ヌマエビ、ミズムシ、底生藻類、デトリタスを解析し、その結果からタナゴ類と濾過食者であるマツカサガイ、餌資源と考えられる一次生産者（POM、底生藻類、水草）、デトリタス、ミズムシを解析に用いた。ヌマエビはタナゴ類と $\delta^{15}\text{N}$ 値と $\delta^{13}\text{C}$ 値において同様の値を示したため、予備解析以降の解析を行わなかった。

10%中性ホルマリンで固定したタナゴ魚体サンプルの標準体長（SL）をノギスで測定後、解剖バサミとピンセットを用いて腸管を取り出し、Intersecting Point（IP値, (Yamaoka, 1985)）と腸管長（Intestine length, IL）を測定した。IP値は腸管の巻き方の複雑さの指標である。取り出した腸管をほどこきながら巻き方をスケッチし、腸管の巻きと交点が最も多くなり、前後軸と垂直な直線を引き、交点数を数えることで算出した。腸管長はデジタルカメラで腸管を撮影し、Image Jを用いて測定した。また、腸長比（Intestine length rate, ILR）を腸管長と標準体長から以下のように算出した。

$$\text{ILR} = \text{IL (mm)}/\text{SL (mm)}$$

得られた結果につきヤリタナゴとアブラボテ間で比較を行い、これらの二種のニッチの重複について検討した。

#### 交雑個体率の地域変異

またヤリタナゴとアブラボテの自然分布域で二種が共存している西日本各地の調査地、熊本県緑川、佐賀県嘉瀬川、佐賀県六角川、福岡県遠賀川、福岡県今川、大分川駅館川、山口県厚東川、広島県芦田川、兵庫県武庫川、京都府淀川の10の河川で、ヤリタナゴとアブラボテの採集を行い、標本からDNA抽出し、核遺伝子の6つのマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝解析を行い、各調査地において採集された各個体につき、ヤリタナゴ純系、アブラボテ純系、交雑個体のいずれに当たるか判定を行った。得られた交雑個体率について松山とその他調査地との間で比較を行った。愛媛県松山平野では、国近川水系において2014年6月、8月、10月に河川上流から300 mおきにエレクトロフィッシャーを用いて採集を行った。サンプリングによる攪乱を極力少なくするために採集したタナゴは目視で種同定した後、尾ヒレの一部を切り取って99%エタノールで固定し、その場で放流した。DNAは魚体から切り取ったヒレの一部を用いてGenomic DNA Purification Kit (Promega)により抽出した。マイクロサテライト解析には上記と同様計6つのマーカーを用いて行った。各マーカーにつき、得られたアレルサイズを用いてMicroChecker v. 2.2.3によりヌルアレルの有無を確かめた。結果、全てのマーカーにおいてヌルアレルの存在が確認されなかったため全てのマーカーを解析に用いた。この結果に基づき、STRUCTURE version 2.3.4を用いて各個体の帰属性について解析を行った。100,000回のburn-inの後、1,000,000回のMCMCシミュレーションを繰り返すことによりLnP (D) を求めるという作業を1から20の各クラスター数 (k) について各10回繰り返すことにより行った。そして、Structure Harvester v. 0.6.93を用いて最適なKを推定した。その結果、K = 2で最も高い $\Delta K$ を示した。これに従い、各個体の帰属性をヤリタナゴ、アブラボテ、交雑個体に分類した。交雑個体は、ヤリタナゴとアブラボテのそれぞれの遺伝的要素を2:8から8:2まで併せ持つ個体と定義した(Vähä and Primmer, 2006)。

#### 4. 結果及び考察

湧水池における分布調査の結果、アブラボテは全湧水池42地点のうち、国近川水系、長尾谷川水系周辺の松前区域に位置する4地点と重信川中流の東温区域に位置する2地点の合計6地点に出現した。一方、1994年、1995年、2000年に魚類相が記録されている29地点の湧水池（うち2地点の湧水池が2012年12月までに消失）では、そのいずれでもアブラボテは確認されていない（愛媛県立博物館, 1994, 1995 ; Uchida and Inoue, 2010）。本研究で2013年にアブラボテを確認したこれらの6地点の湧水池は松前区域の1地点を除いて上記29地点の湧水池に含まれる（表2）。また、2000年にはヤリタナゴの生息が確認されていた東温区域の1地点 (Uchida and Inoue, 2010) では2013年にはヤリタナゴは見られず、アブラボテが確認された。cytb領域の塩基配列を決定したアブラボテ146個体にDDBJから引用した70配列を加え、合計216個体から得られた1016塩基対を相同領域として解析に用いた。この領域において挿入や欠損による塩基配列長の多型はなく、塩基置換によって区別される87種類のmtDNAハプロタイプが検出された。アブラボテはHashiguchi et al. (2006) と同じ東瀬戸内グループ、西瀬戸内グループ、西九州グループの3グループに分けられた



(図2)。それぞれのグループは高いブートストラップ値を示して単系統性が支持された。西九州グループと西瀬戸グループとの境界はHashiguchi et al. (2006) が示した結果と一致するものであったが、鹿児島県を流れる高松川と小次郎川、熊本県緑川が西九州グループに含まれることや愛媛県とは豊後水道をまたいで近接する大分県で、国東半島を南に流れる八坂川が西瀬戸グループに含まれることが新たに明らかとなった。また、Hashiguchi et al. (2006) ではやや不明瞭であった西瀬戸、東瀬戸グループの境界が瀬戸内海側では広島県沼田川と芦田川との間にあることが示された。一方で、松山平野で採集された42個体は全て西九州グループに包括された。この西九州グループにおいて統計学的最節約法によるハプロタイプネットワークを作成したところ、愛媛県でみられた4種類のハプロタイプは、そのすべてが福岡県矢部川水系でのみみられる11種のハプロタイプの中に含まれた (図3)。遺伝的な分化を示す $F_{st}$ 値は、長尾谷水系と重信川水系との間では $F_{st} = 0.280$ 、国近川水系と重信川水系間では $F_{st} = 0.227$ 、国近川と長尾谷川水系間では $F_{st} = -0.846$ となり、いずれの集団間においても有意な遺伝的分化は見られなかった (長尾谷川 - 重信川、 $P = 0.018$  ; 国近川 - 重信川、 $p = 0.027$  ; 国近川 - 長尾谷川、 $p = 0.802$  ; いずれもボンフェローニ補正後有意でない)。

表2。松山平野の湧水池におけるヤリタナゴとアブラボテの分布

調査年	湧水池数			引用
	ヤリタナゴ生息	アブラボテ生息	不在	
1994, 1995	2	0	23	愛媛県立博物館 (1994, 1995)
2000	9 (9)	0	4	Uchida and Inoue (2010)
2013	4(2)<9>	6(6)	37	本研究

( )内の数は過去の記録に加えて新たに見つかった湧水池数、<>内の数は過去の記録から見られなくなった湧水池数

松山平野のアブラボテの分布は、湧水池が集中する松山平野沿岸部の松前区域と重信川水系中流の東温区域の2区域に限られていた。この2区域で採集したアブラボテは全てmtDNAの系統において西九州グループに含まれた。1979年に重信川中下流域で初確認された松山平野のアブラボテ (愛媛県, 1979) は、湧水池における過去との魚類相比較から分布域を拡大していることが明らかとなった。松前区域には水田が多くみられ、灌漑用の複雑な水路網により、湧水池と河川が結ばれている (愛媛県立博物館, 1994, 1995)。また、1979年にアブラボテが初確認された重信川の地点もこの区域に含まれる。この区域のアブラボテが確認された湧水池では、接続する周辺河川に多くのアブラボテ個体や、産卵床となるイシガイ科二枚貝が生息しているため、アブラボテはこの水路網を介して分布を広げたと考えられる。一方、松山平野においてアブラボテが確認された松前区域と東温区域の間には連続的な分布が見られず、この分布域の拡大には人為的な移植の関与が疑われる。

松山平野では湧水池に加え、河川で採集した全てのアブラボテ個体が福岡県西部の矢部川水系に見られるアブラボテ個体群とハプロタイプを共有した。これらは西九州グループに属する。愛

媛県と隣接する香川県、広島県芦田川以東では東瀬戸内グループの個体群が、山口県、広島県沼田川以西、大分県、福岡県東部の豊前地域（中島 et al., 2006）は西瀬戸内グループの個体群が生息していた。瀬戸内西部は、約2万年前まで陸化した瀬戸内海を豊後水道へ流れていたとされる古瀬戸内川水系を共有していたと考えられている（桑代, 1972; 日本第四紀学会, 1987）。

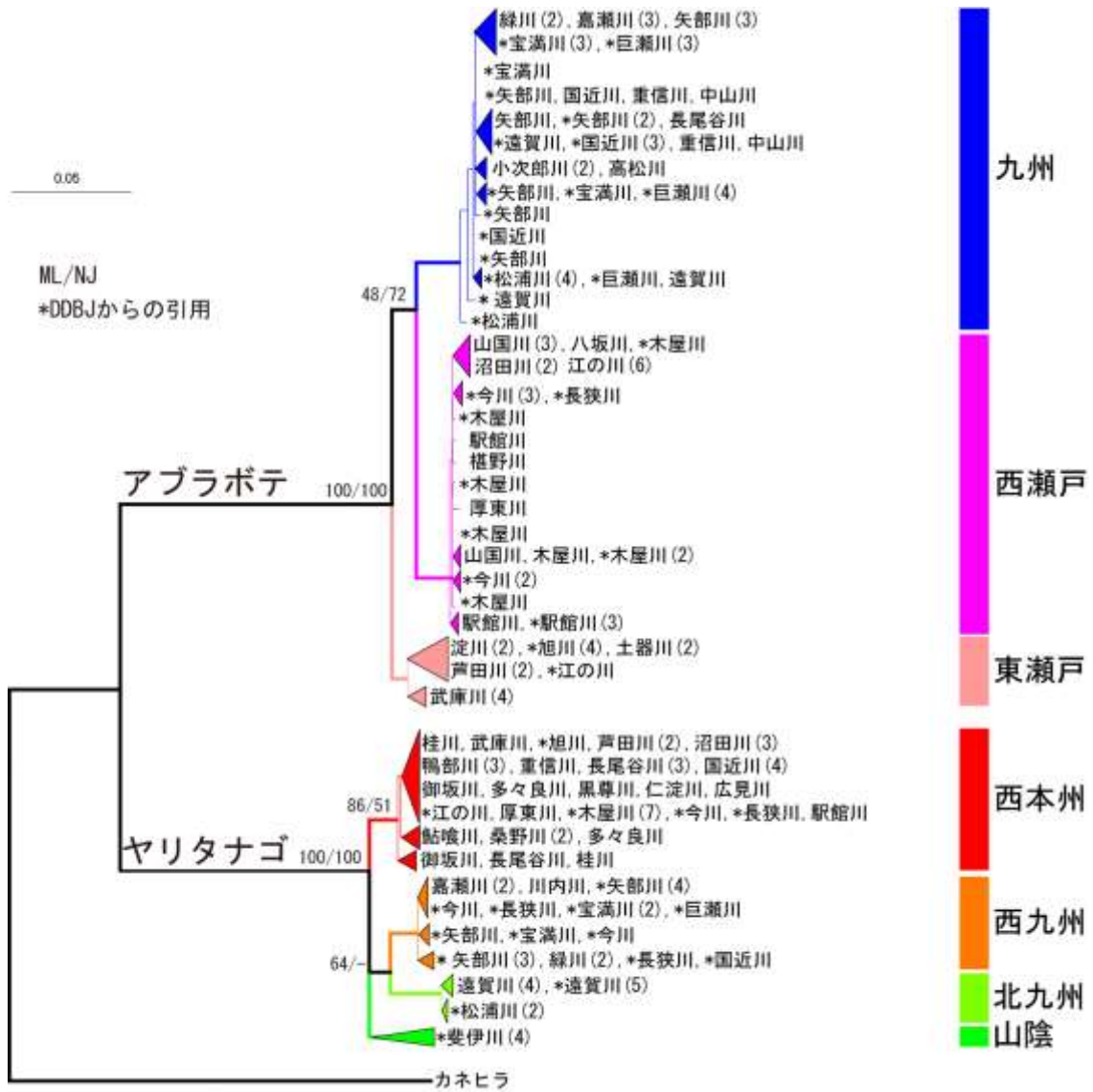


図2。ヤリタナゴとアブラボテのミトコンドリア遺伝子cytochrome *b*領域を用いた分子系統樹。最尤法により構築。枝上の値は最尤法/近隣結合法によるブートストラップ値。括弧内の数字は同一配列を持つ個体数。\*は、その配列がDDBJからの引用であることを示す。

一方、九州北部は三郡山地・英彦山地の東西で魚類相が異なり（中島 et al., 2006）、本研究や Hashiguchi et al. (2006) でもこの両山地東西でアブラボテが遺伝的に別グループに分かれることが示されている。三郡山地・英彦山地が障壁となってその間で遺伝的分化が生じている例は他魚種にも見られ、メダカでは愛媛県に生息する個体群は山口県や大分県の個体群と同一のグループに属する一方で、有明海沿岸諸河川の個体群はそれらと大きく隔たったグループに属することが系統地理解析で明らかになっている（Takehana et al., 2003）。そのため、松山平野で採集されたアブラボテ個体群が、福岡県西部の矢部川のみでみられるハプロタイプを持つのは不自然であり、三郡山地・英彦山地の地理的隔離を越えて人為的にもたらされた個体群である可能性が極めて高い。

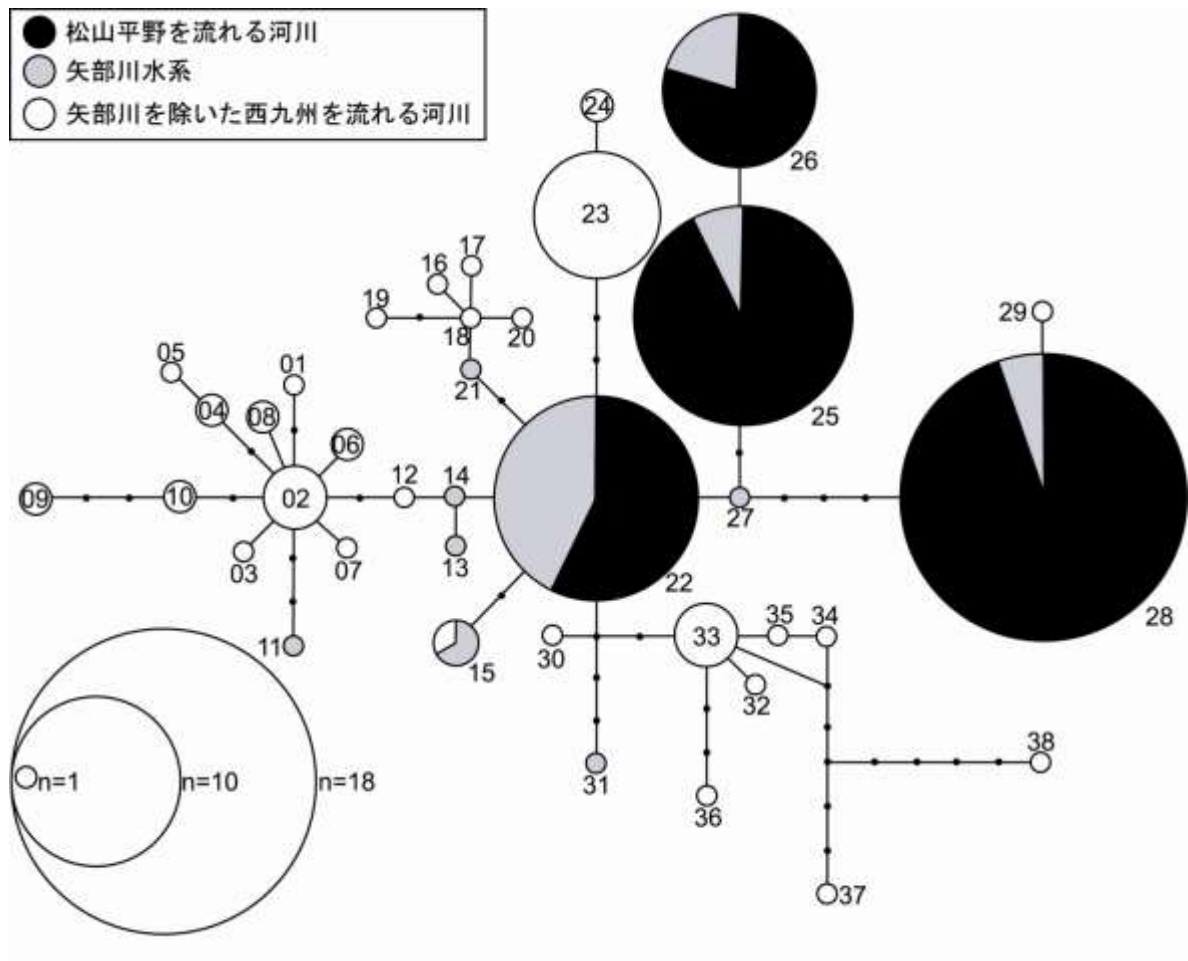


図3。アブラボテの九州グループのcytochrome *b* 遺伝子領域のハプロタイプネットワーク図。円グラフの黒は松山平野で採集した個体、灰色は福岡県矢部川で採集した個体、白は矢部川以外の九州の河川で採集した個体を示す。円の大きさは個体数に対応する。トッドは検出されなかったハプロタイプを示し、各ハプロタイプを結ぶ線は一塩基の変異を示す。

ヤリタナゴとアブラボテが同所的に生息している九州北部では、アブラボテはヤリタナゴに比べ川幅の狭い場所を好むことが知られている (Onikura et al., 2012)。松山平野は規模が小さく、平野部で湧出して生じた河川は比較的細いまま海に流れ込む。このような小河川はアブラボテにとって潜在的な生息適地であり、アブラボテの分布域拡大を容易にしている要因なのかもしれない。

各遺伝子のマイクロサテライト6マーカーに基づき、ヤリタナゴとアブラボテ純系、二種の交雑由来の個体を判定したところ、調査した松山平野全体では22.5% (40/178個体) 交雑個体が見られた。交雑個体のうち、ヤリタナゴとアブラボテどちらかの計数形質を示した個体が80.0% (32/40個体) であり、両種の間接型の個体が15.0% (6/40個体) であった。採集したタナゴ類のうち、計数形質がヤリタナゴ型であるものの、ミトコンドリア遺伝子型がアブラボテである個体は1.9% (1/53個体) 見られ、一方計数形質はアブラボテ型でヤリタナゴのミトコンドリア遺伝子型を持つ個体は14.3% (12/84個体) であった。

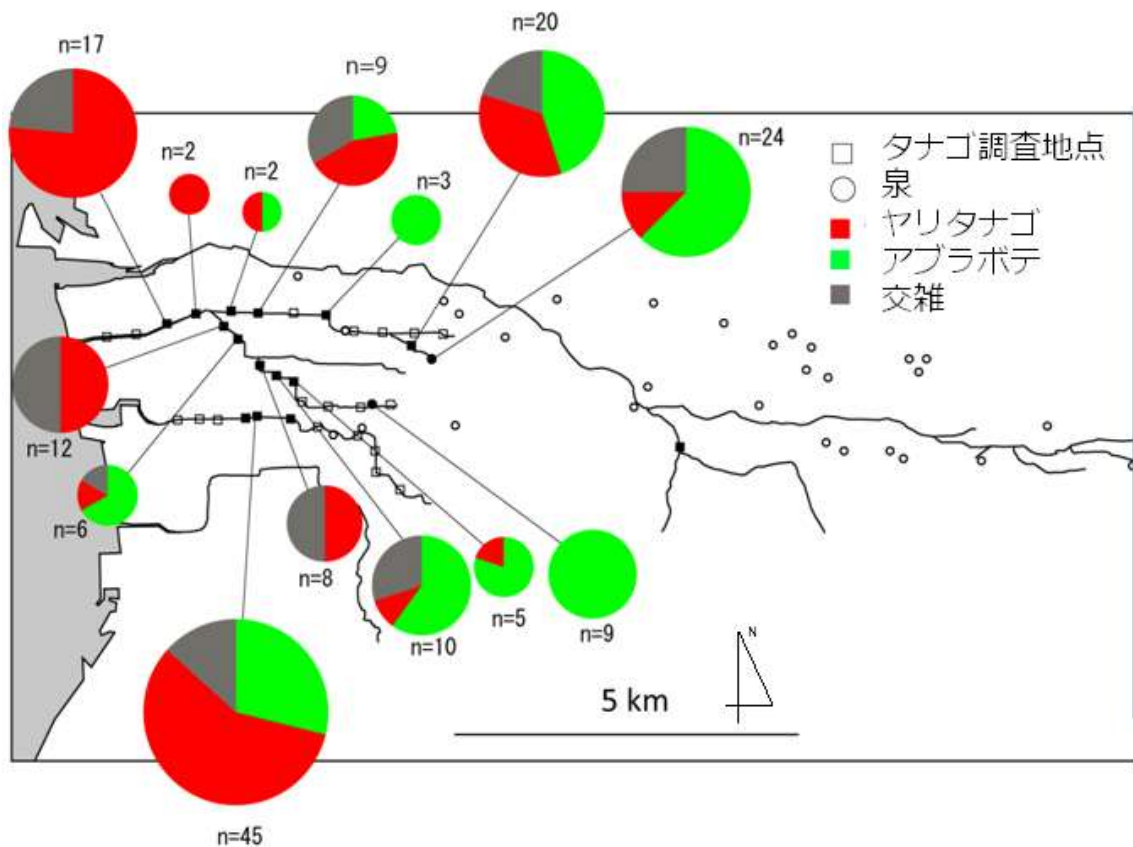


図4. マイクロサテライト解析により判定したヤリタナゴ純系 (赤)、アブラボテ純系 (緑)、ヤリタナゴ-アブラボテ交雑 (灰) 個体の松山平野における分布。



核遺伝子のマイクロサテライト解析で、これらの13個体のうち12個体はヤリタナゴとアブラボテの交雑個体であることが明らかとなった。また、これら12個体以外にも、ミトコンドリア遺伝子型、計数形質ともにヤリタナゴだが、核遺伝子型からは交雑個体と考えられる個体は19.2% (10/52個体) 見られ、ミトコンドリア遺伝子型、計数形質ともにアブラボテだが、核遺伝子型は交雑個体である個体は12.5% (9/72個体) であった。一方、計数形質がヤリタナゴ-アブラボテ中間型の個体では73.3% (22/30個体) がヤリタナゴの核遺伝子型を持ち、6.7% (2/30個体) がアブラボテの核遺伝子型、20.0% (6/30個体) が交雑個体であった。

松山平野における交雑個体の分布は、国近川、神寄川、長尾谷川ともに上流ほどアブラボテの割合が高く、特に湧水池においては出作新泉、福德泉ともにアブラボテの割合が高かった(図4)。つまり、流速が早く河川幅のある国近川河口付近にはヤリタナゴが分布し、湧水池から近く流速が遅い地点にはアブラボテが分布しており、2種は棲み分けていることが分かった。しかし、交雑個体は湧水池から河口付近まで幅広く分布し、松山平野で広く見られることが明らかになった。また、両種とも浸透交雑が進んでいることが明らかとなった。これらの結果から、ヤリタナゴとアブラボテはそれぞれのニッチに適応していると考えられること、それにより、本来交雑個体は適応度のピークから外れたものが生じていると考えられ、普通はそれによって両者の生殖隔離が獲得されていると考えることができる。しかし松山平野では交雑由来の個体が極めて多いことが分かり、また雑種第二世代以降の交雑も進んでいた。このことは、松山平野では、雑種由来の個体がどのような生態を示し、どのようなニッチを占めているのかを調べることの必要性が示唆された。

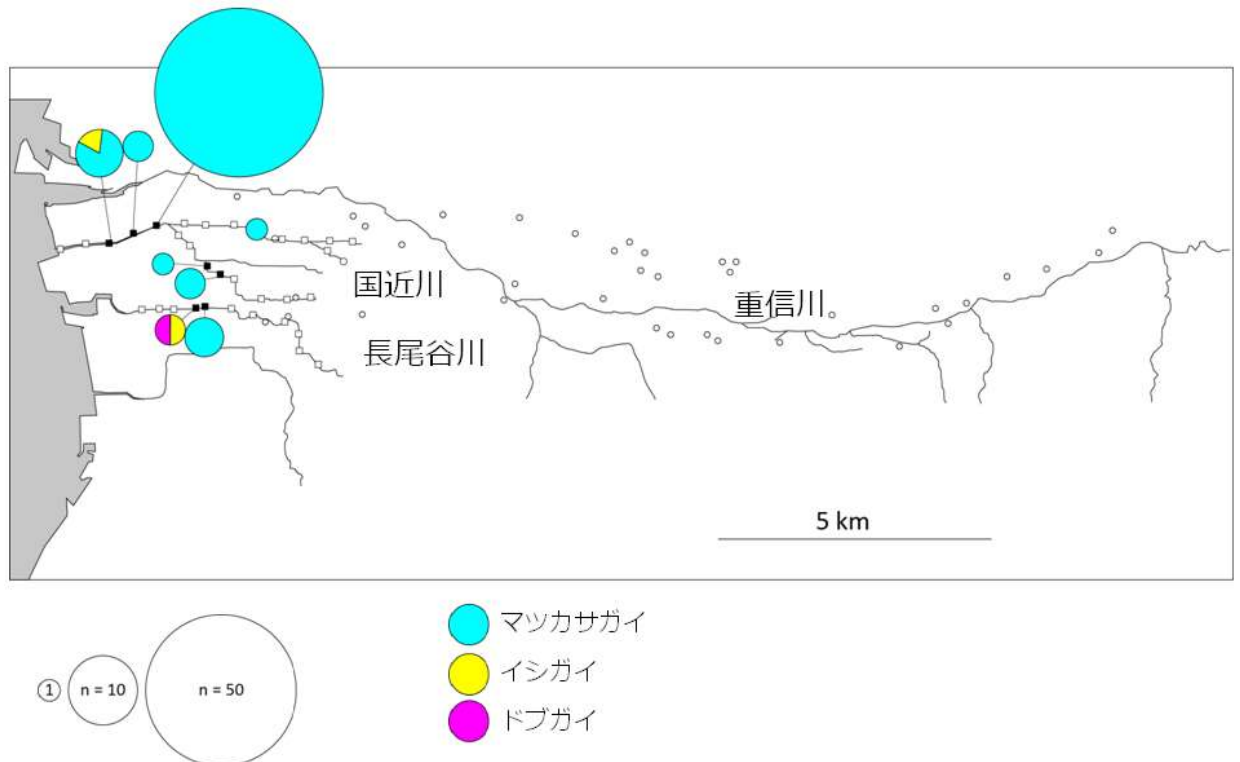


図5. 松山平野における淡水二枚貝の分布。円の大きさは個体数を表す。

ヤリタナゴとアブラボテとは、二枚貝の鰓に産卵し、そこで受精が起こるといった特異な繁殖生態を持つことでも知られている。そのため、二種の交雑には産卵床となる二枚貝の生息状況が重要な役割を果たしているに違いない。松山平野において二枚貝類の分布を調査したところ、松山平野にはマツカサガイが最も優占していたが、その分布は局所的であった（図5）。

回帰木分析によってイシガイ類の生息密度を説明する要因を選択したところ、底質材料中の砂の割合が37.3%より大きい場所では密度が有意に高いという結果が得られた（図6A）。また、分類木分析によってイシガイ類の在不在を説明する要因を選択したところ、マツカサガイが生育している地点はほぼ全てが堰堤より下流であることが分かった（図6B）。イシガイ類は自身の体を底質中に埋没させて生活しており、マツカサガイは一般に砂礫から砂質の底質を好むことが知られている（近藤，2008）。松山平野の湧水性河川でも、マツカサガイは砂質の底質を好むことが示唆された。また、分類木分析の結果から、河川堰の下流側に集中して分布していることが分かった。

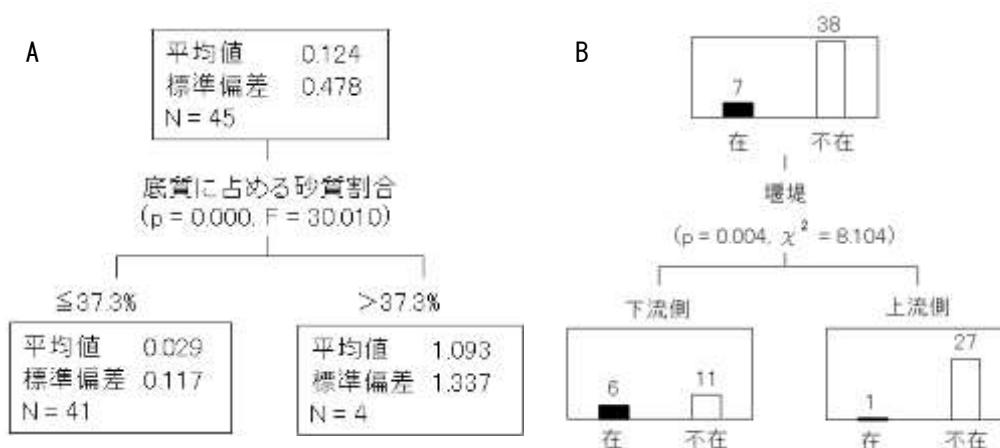


図6。 マツカサガイ密度を目的変数に、底質、流速、溶存酸素量、水温、水深、河川（国近川/神寄川/長尾谷川）、堰堤の上流/下流を説明変数とした回帰木分析の結果(A)と、マツカサガイの在/不在を目的変数に、回帰木分析と同様の説明変数を用いた分類木分析の結果(B)。

Watters (1996) はアメリカのオハイオ州やミシガン州、インディアナ州、ウェストヴァージニア州を流れる5河川について調査しており、1~17 mの高さの河川堰が宿主となる魚類*Aploidinotus grunniens*の遡上を妨げるため、二枚貝の分布が堰の下流側に制限されていると考えている。松山平野の湧水性河川においても、河川堰がオイカワなどの宿主となりえる魚類の遡上を妨げ、マツカサガイの分布が河川堰の下流側に制限されていると考えられる。一方で、堰の上流側においてもマツカサガイのグロキディウム幼生の宿主となりえる魚類やタナゴ類が生息している。また、今回の調査では神寄川の河川堰のすぐ上流側でわずかだが生貝が採集され、国近川の河川堰の上

流側、及び大井手川でも合弁死貝が採集された。このことは、国近川と大井手川でも河川堰の上流域にイシガイ類が育成していた、または現在でも生息している可能性を示唆している。また、しかし、河川堰の上流側にはマツカサガイが選好する砂質が37.3%以上を占める底質をもつ場所が少なく、マツカサガイの上流域の生息密度が低いと考えられる。また、国近川では砂質の底質の場所が少なく、マツカサガイの生貝は全て神寄川との合流地点より下流で、かつ底質に占める砂の割合が37.3%より低い場所で採集された。これらのことから、国近川のマツカサガイは神寄川から流されて供給されているが、適した生息場所が少なく、生息密度が低いと考えられる。さらに、今回採集された生貝は殻長より全て性成熟していると考えられ、殻長組成のピークは一つしかなかった（図7）。

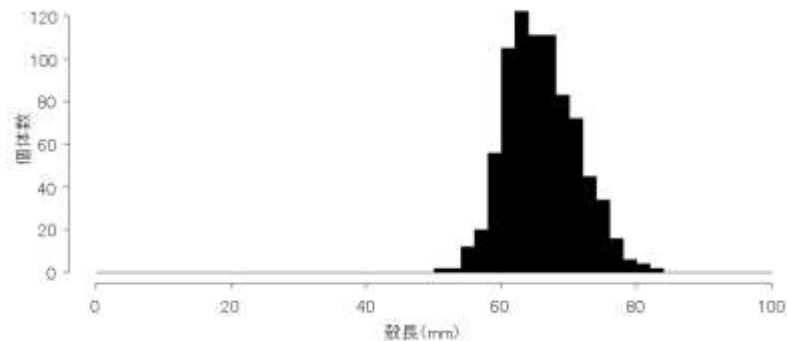


図7。 愛媛県松山平野におけるマツカサガイの殻長のサイズ分布。

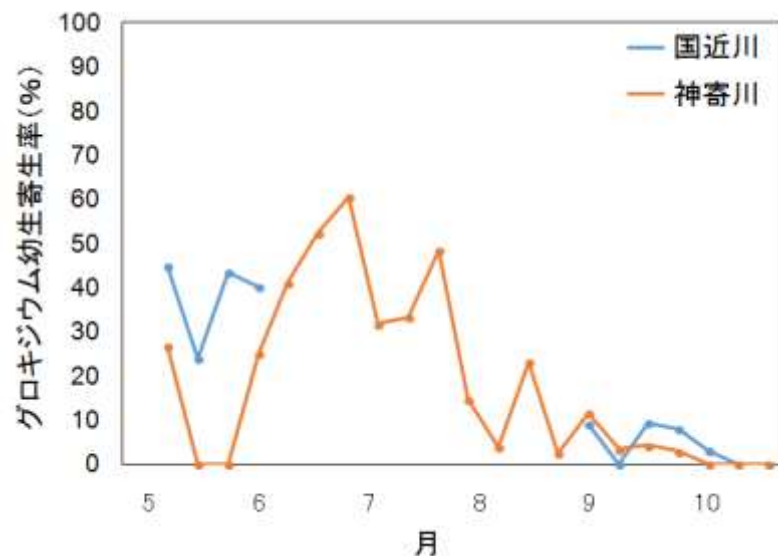


図8。 愛媛県松山平野におけるマツカサガイのグロキディウム幼生保有率の季節変化

カナダに生息するイシガイ科の一種 *Elliptio complanata* では、生貝の生息密度が10個体/m<sup>2</sup>を下回ると受精がほぼ成功しないという報告がある (Downing et al., 1993)。本研究での生息密度は最も高い地点で2.73個体/m<sup>2</sup>であり、この値を下回った。しかし、マツカサガイは調査区内で集中分布しており、局所的にみるとこの密度を上回るパッチもあった。メスの貝の妊卵率は、他地域と同様に7月をピークに高い値を示した (図8)。先行研究で調査された岡山県の祇園用水に生息しているマツカサガイの妊卵率はおよそ40~50%であるが (近藤, 1987)、それと比較しても本研究でのマツカサガイの妊卵率は高い値であった。また、グロキディウム幼生の寄生も、シマヨシノボリにおいて高い割合で確認することができた (図9)。これらのことから、採集された生貝は全て再生産に参加できるにも関わらず、少なくとも過去数年間は新規加入した個体は存在しないと推察できる。つまり、松山平野の湧水性河川のマツカサガイでは過去数年間新規加入が起こっておらず、その理由としてはグロキディウム幼生の生残率、着底率、稚貝の生残率が低いことなどが考えられる。このように、本研究により、松山平野の湧水性河川ではマツカサガイが河川堰の下流域に局所的に分布しており、複数年にわたって再生産が行われていないことが分かった。このことから、松山平野の湧水性河川に生息するマツカサガイの保全は早急に行われなければならないことが示唆される。そのためには、マツカサガイの繁殖生態を明らかにして繁殖を妨げる要因を解明し、それを取り除く必要がある。たとえば、松山平野には田畑や市街地が広がっており、そこから河川への泥の流入が繁殖を妨げる要因の一つとなっている可能性が考えられる。泥底上ではイシガイ類の成長率や採餌効率が低下するなどの海外の事例が報告されており (Downing and Downing, 1993; Ellis, 1936)、日本国内でも泥質の底質ではマツカサガイを含むイシガイ類の個体数が減少することが知られている (近藤, 1998)。

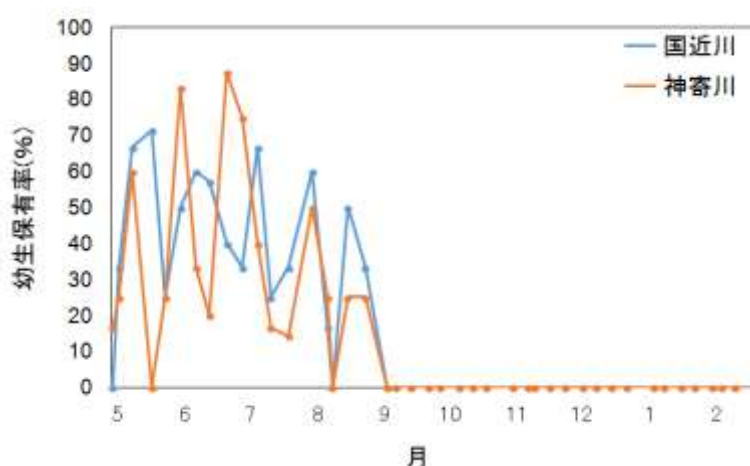


図9. 愛媛県松山平野における、シマヨシノボリへのマツカサガイグロキディウム幼生寄生率の季節変化



そのため、松山平野の湧水性河川でも泥の流入による底質の泥質化によってマツカサガイを含むイシガイ類の個体数が減少し、またグロキディウム幼生の生残や、着底、稚貝の生残に影響を及ぼしている可能性がある。松山平野には各所に湧水池が点在している。これらの湧水池群は人工的に管理されており、環境の改変も起こりにくいと考えられる。また、それらの湧水池群にはグロキディウム幼生の宿主となるヨシノボリ類も生育している(愛媛県立博物館, 1994, 1995)。松山平野の自然再生地や湧水池群を利用したヤリタナゴの保全を検討するためには、イシガイ類を同時に保全する必要がある。そのために、保全区の選定には、イシガイ類の生息適地かどうかという観点からの湧水池の調査が必要である。

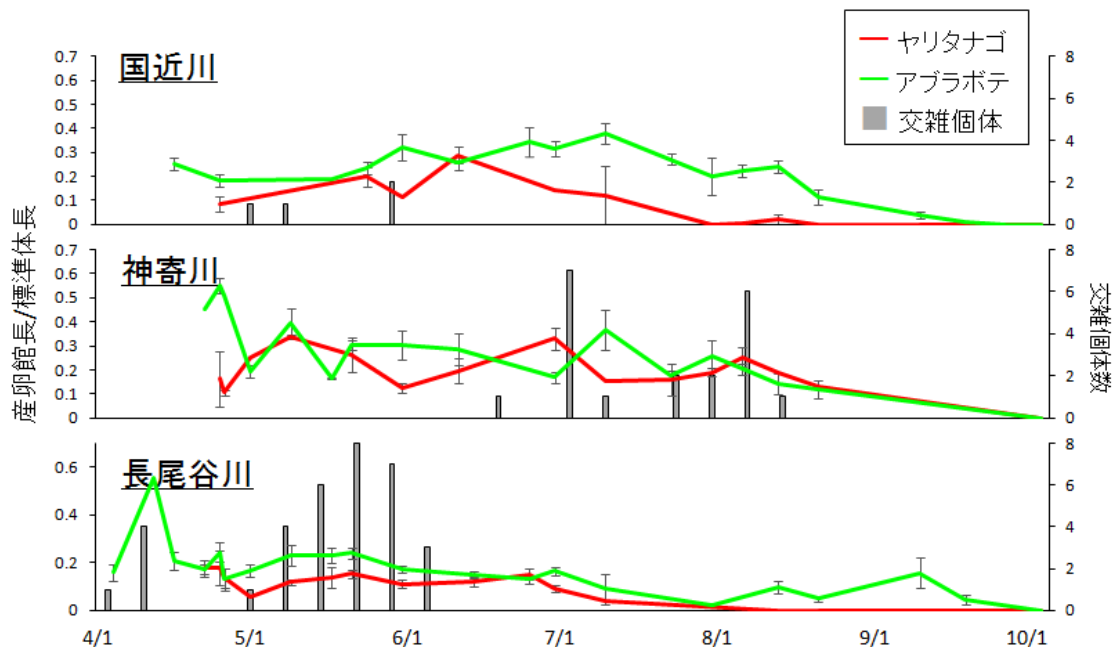


図10. 愛媛県松山平野の3河川における、ヤリタナゴとアブラボテの標準体長に対する産卵管長と、交雑個体出現数の季節変化。

産卵管長、卵保有率から判断したヤリタナゴの産卵期は国近川、神寄川では7月下旬にピークを迎え、そこから減退していった(図10)。しかし、長尾谷川では調査開始4月から7月上旬にかけてピークを迎え、国近川、神寄川より産卵期のピークが早かった。一方アブラボテの産卵期は3河川で同様に、調査開始4月が最も盛んで、以降徐々に減退した。採集した二枚貝を飼育し、得ら

れたタナゴ稚魚について、6つのマイクロサテライトマーカーの解析を行なった。その結果、3河川ともに交雑由来の仔魚が確認でき、交雑仔魚の割合は、国近川で3.0% (4/135個体)、神寄川で11.2% (20/178個体)、長尾谷川で14.4% (34/235個体)であった (図11)。

アブラボテとヤリタナゴの産卵期は、3河川で6月中旬から8月下旬にかけて重なっていた。アブラボテとヤリタナゴの交雑個体は3河川で確認でき、いずれも2種の孵出した時期が重なった期間に交雑個体が孵出した傾向にあるため、2種の産卵期が重なっている時期に交雑が起こっていることが示唆された。神寄川と長尾谷川では交雑個体の割合が高かった。これはこれらの河川でマツカサガイの密度が低く、マツカサガイ一個体に産卵されていたタナゴ類の卵が多いためと考えられる。

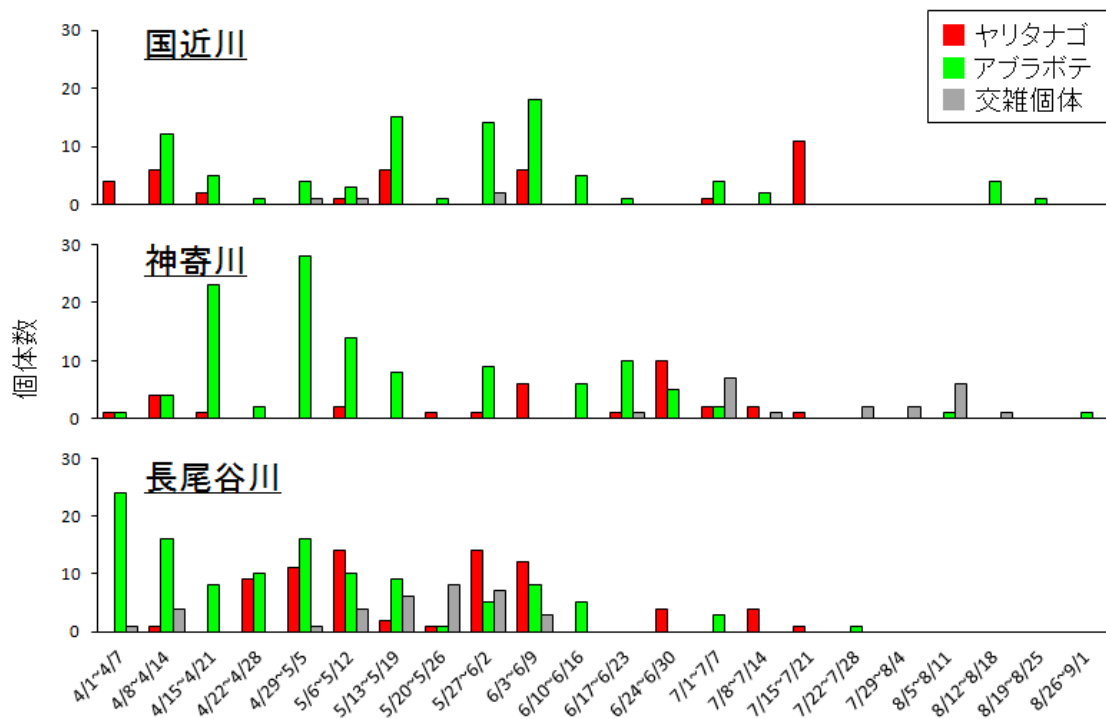


図11. 愛媛県松山平野の3河川における、ヤリタナゴとアブラボテ、および交雑個体の出現数の季節変化。

九州北西部の事例（福原 et al., 1998）に示されるようにアブラボテとヤリタナゴが同所に生息する地域では2種は一日のうちの異なる時間帯に産卵を行い、接合前生殖隔離を発達させていることや、タナゴ亜科バラタナゴ属の亜種間では、求愛行動の選好性が異なり、交雑が起きにくくなっていることが知られており、タナゴ類には異種間の交雑を避けるメカニズムが存在するとされている。それにも関わらず松山平野において2種が交雑している背景には、地理的な隔離により、長期にわたってアブラボテと産卵床を共有する事のなかった松山平野のヤリタナゴの雌には、求愛行動が同種のものか異種のものかを見分ける生殖的隔離機構が失われ、人為的に移入されたアブラボテの雄との交雑が起きている可能性が考えられる。今後は行動学的観点からも2種の交雑メカニズムをさらに研究する必要がある、アブラボテとヤリタナゴの交雑が生じる原因を明らかにして、それを防ぎ、ヤリタナゴの松山地域個体群を守っていかなければならない。

ヤリタナゴとアブラボテの消化管長の違いと、安定同位体比を用いた餌資源の違いについて次に述べる。各地点での採集数は、国近川上流（KT19）で21個体（6月ヤリタナゴ2個体、アブラボテ14個体；10月アブラボテ5個体）、国近川下流（KT8）で56個体（6月ヤリタナゴ14個体、アブラボテ13個体；10月ヤリタナゴ16個体、アブラボテ13個体）、神寄川（KY6）で48個体（6月ヤリタナゴ5個体、アブラボテ17個体；10月ヤリタナゴ12個体、アブラボテ12個体）、長尾谷川（NG6）で52個体（6月ヤリタナゴ3個体、アブラボテ19個体；10月ヤリタナゴ13個体、アブラボテ17個体）であった。6月のIP値はヤリタナゴで、9から21、アブラボテで5から13の範囲であった。10月のIP値は、ヤリタナゴで15から25、アブラボテで7から17の範囲であった。IP値は6月、10月ともに種間で有意差が見られ、ヤリタナゴがアブラボテより有意に高かった（二元配置分散分析,  $p < 0.01$ ）。

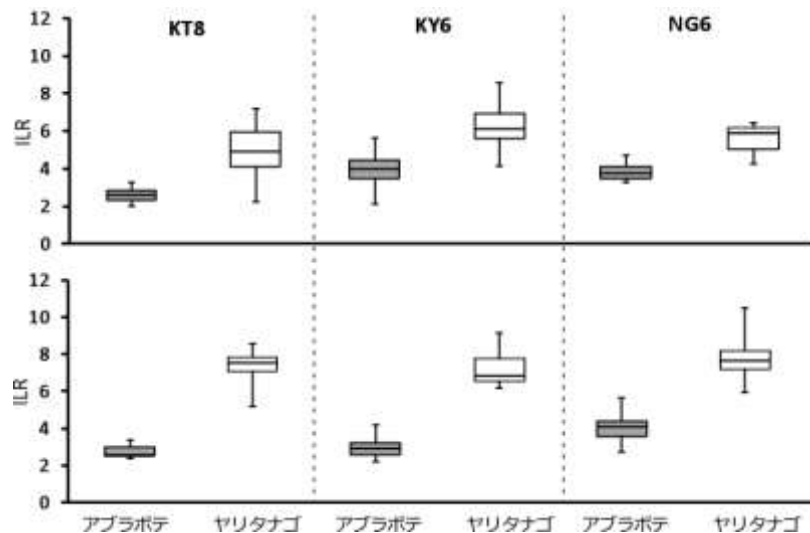


図12. 6月と10月の国近川（KT8）、神寄川（KY6）、長尾谷川（NG6）におけるヤリタナゴとアブラボテの標準体長に対する消化管長の割合。

また、6月ではKT8で最も高く、10月ではNG6が最も高かった ( $p < 0.05$ )。6月のILRはヤリタナゴで、2.28~7.22、アブラボテで1.43~3.78の範囲であった(図12)。10月のILRは、ヤリタナゴで5.21~10.98、アブラボテで2.03~5.93の範囲であった。ILRでも6月、10月ともに種間で有意差が見られ、ヤリタナゴがアブラボテより有意に高かった(二元配置分散分析,  $p < 0.01$ )。また、6月ではKT8で有意に高く、10月ではNG6で有意に高かった(Tukey,  $p < 0.05$ )。つまり、ヤリタナゴは長く複雑な腸をもち、アブラボテは短く単純な腸を持つことが示された。

ヤリタナゴとアブラボテの筋肉組織における炭素・窒素安定同位体比( $\delta^{13}\text{C}$ 値、 $\delta^{15}\text{N}$ 値)を地点、季節ごとにそれぞれ比較した(図13)。種間の差は、 $\delta^{13}\text{C}$ 値において6月ではKT8でヤリタナゴがアブラボテより高く、KY6では逆にアブラボテがヤリタナゴより高かった。(t-検定,  $p < 0.05$ )。10月ではKT8とNG6の $\delta^{15}\text{N}$ 値でアブラボテがヤリタナゴより高く、KT8とKY6の $\delta^{13}\text{C}$ 値で、ヤリタナゴの方が高い値を示した。(t-検定,  $p < 0.05$ )。

また、ヤリタナゴとアブラボテの $\delta^{13}\text{C}$ 値、 $\delta^{15}\text{N}$ 値を季節間でそれぞれ比較すると、KT19を除く地点で $\delta^{13}\text{C}$ 値または $\delta^{15}\text{N}$ 値のいずれかに有意差が見られた。KT8では両種とも $\delta^{15}\text{N}$ 値が6月で高く、 $\delta^{13}\text{C}$ は両種とも10月で高かった。KY6ではアブラボテで、 $\delta^{15}\text{N}$ 値、 $\delta^{13}\text{C}$ 値共に6月で高かった(t-検定,  $p < 0.05$ )。NG6では $\delta^{15}\text{N}$ 値のみ両種ともに6月で高かった(t-検定,  $p < 0.05$ )。

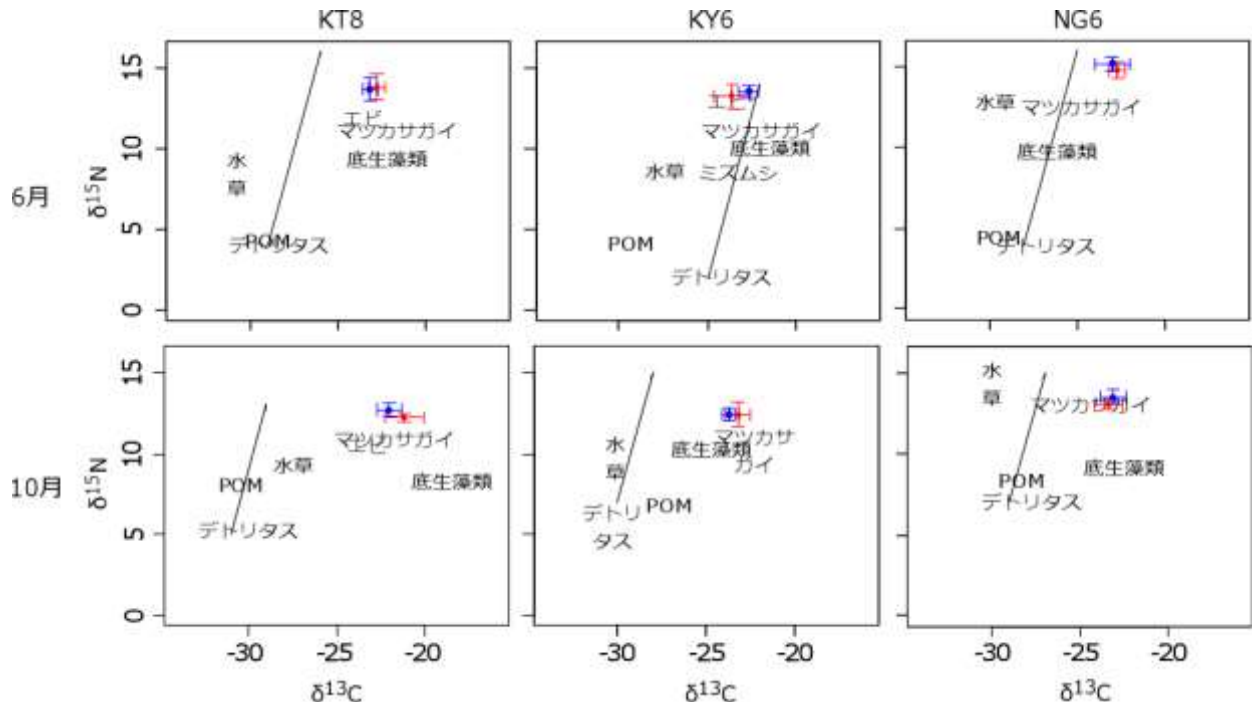


図13. 6月と10月の国近川 (KT8)、神寄川 (KY6)、長尾谷川 (NG6) における、ヤリタナゴ (赤●) とアブラボテ (青■)、および潜在的な餌資源の炭素、窒素安定同位体比。図中の直線はデトリタスを基点とする傾き4の線。

一般線形モデル (GLM) を用いて、ヤリタナゴとアブラボテの標準体長と窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$  値) を検定したところ、6月では、いずれの地点においても有意差は見られなかった。10月では、KY6とNG6でアブラボテがヤリタナゴより高かった。両地点で交互作用が見られ、ヤリタナゴは成長によって $\delta^{15}\text{N}$ 値が増加していたが、アブラボテでは成長による $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化はなかった。

腸管長と $\delta^{15}\text{N}$ 値を検定したところ、6月ではKY6でアブラボテがヤリタナゴより高く、ヤリタナゴは腸管長の伸長によって $\delta^{15}\text{N}$ 値が増加したが、アブラボテでは伸長による変化は見られなかった ( $p < 0.05$ )。KT8、NG6では有意差が見られなかった。10月では、KT8でアブラボテがヤリタナゴより高く、ヤリタナゴは腸管長の伸長によって $\delta^{15}\text{N}$ 値が増加したが、アブラボテでは伸長による変化は見られなかった。

安定同位体比解析の結果、6月ではヤリタナゴの $\delta^{13}\text{C}$ 値、 $\delta^{15}\text{N}$ 値の平均値は各地点でそれぞれ、 $-23.1\text{‰}$ 、 $12.9\text{‰}$  (KT19)、 $-22.8\text{‰}$ 、 $13.8\text{‰}$  (KT8)、 $-23.6\text{‰}$ 、 $13.2\text{‰}$  (KY6)、 $-22.7\text{‰}$ 、 $14.8\text{‰}$  (NG6) であった。アブラボテは、 $-23.6\text{‰}$ 、 $13.0\text{‰}$  (KT19)、 $-23.2\text{‰}$ 、 $13.7\text{‰}$  (KT8)、 $-22.7\text{‰}$ 、 $13.5\text{‰}$  (KY6)、 $-23.1\text{‰}$ 、 $15.2\text{‰}$  (NG6) であり、両種の値は地点間で同様であった。マツカサガイの値は $-25.6\sim-22.5\text{‰}$ 、 $11.3\sim12.7\text{‰}$ であった。POMは、KT8、KY6、NG6で $\delta^{13}\text{C}$ 値、 $\delta^{15}\text{N}$ 値共に同様の値であったが、KT19では $\delta^{13}\text{C}$ 値が高かった。底生藻類は、KT8、KY6で同様の値を示した。デトリタスの値は各地点でばらついており、 $\delta^{13}\text{C}$ 値で $-29.1\sim-25.0\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 値で $0.7\sim4.2\text{‰}$ であった。水草はKT19、KT8、KY6で同様の値を示したが、NG6では $\delta^{15}\text{N}$ 値が他の3地点よりも高かった ( $12.9\text{‰}$ )。ミズムシはKT19とKY6でのみ採集され、 $\delta^{13}\text{C}$ 値はKY6の方が低く ( $-23.8\text{‰}$ )、 $\delta^{15}\text{N}$ 値はKT19の方が低かった ( $7.4\text{‰}$ )。

10月においては、ヤリタナゴの $\delta^{13}\text{C}$ 値、 $\delta^{15}\text{N}$ 値の平均値は各地点でそれぞれ、 $-21.2\text{‰}$ 、 $12.2\text{‰}$  (KT8)、 $-23.2\text{‰}$ 、 $12.4\text{‰}$  (KY6)、 $-23.4\text{‰}$ 、 $13.1\text{‰}$  (NG6) であった。アブラボテは、 $-22.8\text{‰}$ 、 $12.7\text{‰}$  (KT19)、 $-22.1\text{‰}$ 、 $12.7\text{‰}$  (KT8)、 $-23.7\text{‰}$ 、 $12.4\text{‰}$  (KY6)、 $-23.2\text{‰}$ 、 $13.6\text{‰}$  (NG6) であり、両種の値は地点間で同様であった。マツカサガイの値はKT8とKY6では同様であったが、NG6は $\delta^{13}\text{C}$ 値が低く ( $-25.4\text{‰}$ )、 $\delta^{15}\text{N}$ 値は高かった ( $13.2\text{‰}$ )。POMの値は各地点でばらついており、 $\delta^{13}\text{C}$ 値で $-30.4\sim-25.0\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 値で $6.8\sim8.4\text{‰}$ であった。底生藻類の値も各地点でばらついており、 $\delta^{13}\text{C}$ 値で $-24.7\sim-22.6\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 値で $8.4\sim10.4\text{‰}$ であった。デトリタスでは $\delta^{13}\text{C}$ 値は同様の値であったが、 $\delta^{15}\text{N}$ 値はKT19とKT8、KY6とNG6が同等の値であり、KY6とNG6の方が高かった。水草の値は各地点でばらついており、 $\delta^{13}\text{C}$ 値で $-33.8\sim-28.1\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 値で $9.5\sim15.4\text{‰}$ であった。ミズムシはKT19でのみ採集された ( $\delta^{13}\text{C}$ 値 $-23.6\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 値 $7.4\text{‰}$ )。季節間で、陸生由来のPOMとデトリタスで $\delta^{15}\text{N}$ 値が約3‰、水草で約1‰高かった。

これらの結果より、ヤリタナゴとアブラボテの腸形態は異なることが明らかとなった。腸形態は一般に、摂食生態、系統発生、体長に相関するとされており (Yamano et al., 2012)、腸形態の違いは、食性の違いを示唆する。本研究で観察された、ヤリタナゴでより腸管長が長く複雑であるという違いは、食性に関する知見と一致しており (Karachle and Stergiou, 2010; 中村, 1969)、ヤリタナゴは藻類食が強く、アブラボテは動物食が強いことが示唆された。松山平野では遺伝子型と形態形質が一致しない個体が存在することから、2種が交雑していることが示唆され、地点ごとに両種の交雑率が異なっていることから、地点間で見られた違いは、交雑個体が異なる割合で含まれているためであると考えられる。また、季節によって、有意に高い地点が異なっていたのは、採集した両種の標準体長の違いによると考えられる。

ヤリタナゴとアブラボテの窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ 値) については、地点や季節によりアブラボテがヤリタナゴより有意に高いか、または差がないかであった。炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ 値) については、季節、地点によりヤリタナゴがアブラボテより有意に高い、アブラボテがヤリタナゴより有意に高いまたは差がないかのいずれかであった。このことから、地点や季節によって両種が利用している餌資源が重複することが分かった。6月は種間に差がなく、両種とも10月より  $\delta^{15}\text{N}$ 値が高かったため、6月は餌資源を共有し、両種ともに水生無脊椎動物や水生昆虫を多く摂食している可能性が示唆された。両種の  $\delta^{15}\text{N}$ 値の差は約1‰であり、栄養段階が異なるほど食性に違いはないものの、アブラボテがヤリタナゴより有意に高いことから腸形態の観察と同様にアブラボテで動物食が強く、ヤリタナゴで藻類食が強いことが示唆された。

また、(奥田, 2012) では種内にみられる栄養段階における幅は、食性の個体差を反映すると述べられている。標準体長の増加による  $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化が、ヤリタナゴで見られ、ヤリタナゴは成長に伴い栄養段階が上昇することが分かった。一方で、腸管長の増加による  $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化は特に見られなかった。デトリタスを始点とした傾き4の直線よりも  $\delta^{13}\text{C}$ 値が高い位置に両種の値が存在することから、両種が陸上植物由来と考えられるデトリタスと底生藻類の両方の生産物に依存していることが分かった。10月では6月よりも  $\delta^{13}\text{C}$ 値が高くなっており、底生藻類の高い  $\delta^{13}\text{C}$ 値に依存している可能性が示唆された。これらのことから、6月でよりデトリタス起源の炭素を多く利用し、10月では底生藻類起源の炭素を多く利用していると考えられる。季節間で見られた安定同位体比の変化は、農業や工業排水といった人為的な栄養塩の付加の季節変化の影響が一つの原因と考えられる。溶存態無機窒素 (DIN) の脱窒やアンモニアの揮散といった窒素除去プロセスによって有機物の  $\delta^{15}\text{N}$ 値が高くなること、また、水生植物の  $\delta^{13}\text{C}$ 値は光合成基質である溶存態無機炭素 (DIC) の安定同位体比とその供給速度を支配する環境因子に強く影響されることが知られている(永田 and 宮島, 2008)。調査地周辺では、春から夏にかけて農業による水利用、排水により、河川水が濁り、水量が増加している。このことから、DIN、DICの同位体比が変化し、これらを利用している河川内の一次生産者の値も変化したと考えられる。ただし、本研究では、環境調査を行っていないため、同位体比に影響を与えられようとする要因を特定することはできない。また、(諸澤 and 藤岡, 2007) はアカヒレタビラやタナゴが半年間で少なくとも2~3 km移動することを示していることから、松山平野においてもヤリタナゴとアブラボテが移動していると考えられる。そのため、地点間、季節間で見られた安定同位体比の違いは、人為的な影響だけでなく、調査地外から移動してきたものが含まれている可能性もある。今後、両種と交雑個体の餌資源の利用に関して、より正確なデータを得るためには、遺伝子解析により交雑個体の判別を行う必要がある。また、安定同位体解析は、魚類の移動追跡に効果的であることが琵琶湖水系におけるトウヨシノボリで示されている(Maruyama et al., 2001)ため、安定同位体比と移動を合わせて考えることでより明確な結果が得られると思われる。これらの結果から、繁殖期である6月に両種が類似した食物網上の位置にあることが明らかとなり、ヤリタナゴは産卵床に加えて餌資源をめぐってもアブラボテと競争関係にあることがわかった。ヤリタナゴの保全を行う際には餌資源の量と質にも留意して実施する必要があると考えられる。

松山平野と西日本各地で採集したヤリタナゴ、アブラボテのマイクロサテライト遺伝子型を用いたSTRUCTUREによるクラスター解析の結果、各サンプルをヤリタナゴ、アブラボテ、交雑個体に



分類することができた。その結果、交雑個体率は芦田川 (5.7%)、緑川 (6.7%)、駅館川 (5.4%)、嘉瀬川 (12.5%)、厚東川 (7.1%)、今川 (30.8%)、武庫川 (5.3%)、六角川 (33.3%)、国近川 (17.7%) であった (図14)。また、マイクロサテライトによる種判定の結果とmtDNAのCytochrome *b*領域の解析結果を合わせて見ると、交雑個体に判定された個体からヤリタナゴ、アブラボテ双方のmtDNA型が見つかった。また、松山平野においては6月ではヤリタナゴは河川下流側と国近川の水源である最上流部で見られた (図15)。一方アブラボテは河川全体に広く分布していた。また、交雑個体は河川上流から下流にかけて分布していた。8月も6月と同様に河川の下流側にヤリタナゴは分布が集中しており、アブラボテは6月に比べると下流部での出現率は低くなっているものの河川全体に広く分布していた。また、交雑個体は6月と同様に河川上流から下流にかけて分布していた。10月も6、8月同様にヤリタナゴは下流側に集中しアブラボテは河川全体に広く分布していた。

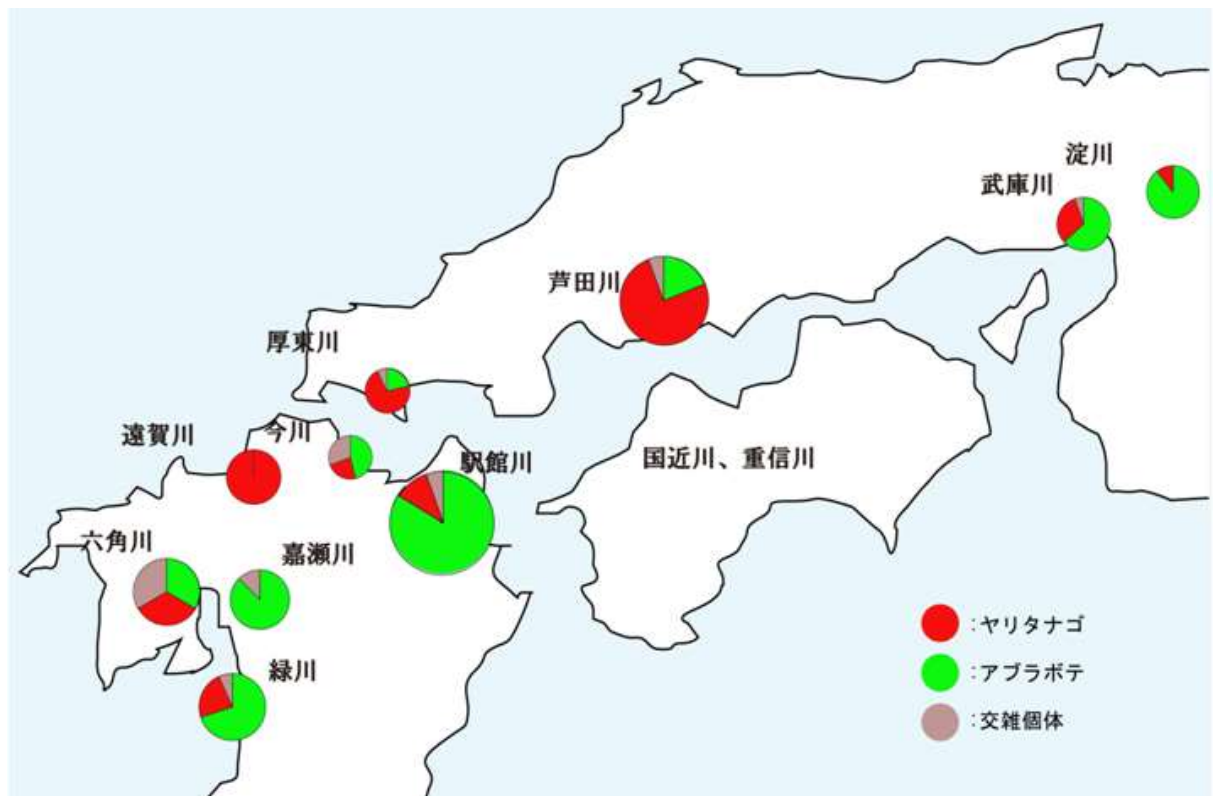


図14. 西日本各地のヤリタナゴ、アブラボテ共存域における、ヤリタナゴ純系、アブラボテ純系、交雑個体の割合。核のマイクロサテライトマーカー6遺伝子座に基づいて判定した。

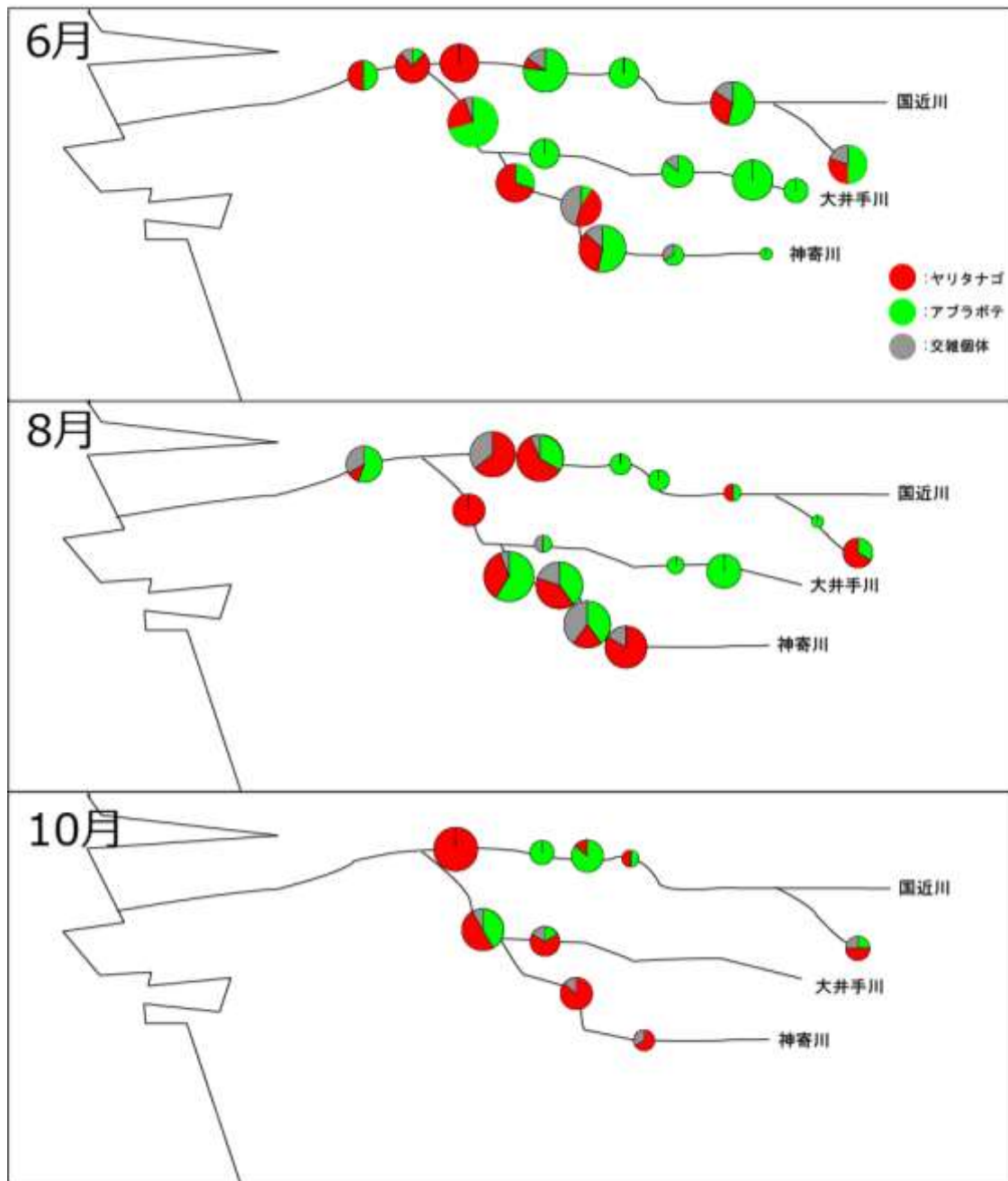


図15。松山平野における6月、8月、10月のヤリタナゴ純系、アブラボテ純系、交雑個体の割合。核のマイクロサテライトマーカー6遺伝子座に基づいて判定した。

このように、西日本のヤリタナゴ、アブラボテの共存域11地点のうち8地点で遺伝子解析によって交雑個体が確認された。多くの地点で交雑個体が確認されたことから、交雑は自然下でも生じていることが示唆された。中でも、今川（30.8%）、六角川（33.3%）、国近川（17.7%）の3河川では交雑個体率が他の河川に比べて高かった。また、これらの地点と比較すると交雑個体の割合は低下するが、六角川に隣接する嘉瀬川でも（12.5%）という交雑個体率が明らかとなった。このことに関して、福岡県の今川については本河川に生息しているアブラボテ個体群は九州クレードに属するのに対し、ヤリタナゴ個体群は西九州クレードと西本州クレードに属する個体から形成されている。このように同所的に異なるクレードの個体群が生息していることから本河川に生息するヤリタナゴの一部は人為的に導入されたと考えられる (Hashiguchi et al., 2006)。従って、愛媛県と同じく移入の影響により今川では高い交雑個体率を示していると考えられる。佐賀県の六角川および嘉瀬川については、ヤリタナゴもしくはアブラボテの人為的な導入を裏付ける根拠はない。

この二河川の特徴として、広大な平野において支流間が網の目状に分布する無数のクリーク網でつながっている。このクリークでは護岸工事の度合いにより水生生物の生息に影響を与えたとされている (鬼倉 et al., 2006)。また、これらタナゴ二種の産卵床となるイシガイ類の減少が理由として推測される。そのため、今後これらの地点において交雑の発生原因と環境要因との関係について調査していく必要がある。交雑はヤリタナゴ、アブラボテ間では双方向に生じていることが示唆された。

松山平野において、ヤリタナゴとアブラボテの間で流程分布に差が見られ、季節を通してヤリタナゴは河川の下流側、アブラボテは河川上流から下流側にかけて分布が集中していた。また、交雑個体は河川上流から下流にかけて分布していた。本来、ヤリタナゴとアブラボテが共存している河川ではアブラボテは河川沿岸部に分布しヤリタナゴは河川全体に広く分布するとされている (Kitamura, 2007)。しかし、本研究ではヤリタナゴの分布は河川の最上流部と下流側への集中的な分布がみられ、アブラボテは河川全体に広く分布していた。また、ヤリタナゴに関しては愛媛県松山平野において近年急速に数を減らしている。このことから、ヤリタナゴの急速な減少により、導入されたアブラボテがその個体数を増やし河川全体でみられるようになったと考えられる。また、アブラボテとの交雑により生じた交雑個体が季節を通して河川全体に出現していることから、遺伝子浸透の進行や餌資源・繁殖資源をめぐる競争により、更にヤリタナゴの絶滅に拍車をかけているものと考えられる。そのため、在来ヤリタナゴ個体群を保全するために早急な対策を行う必要があると考えられる。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

本研究では、ミトコンドリア遺伝子を用いて系統地理解析を行うことで、愛媛県松山平野に分布するアブラボテは、福岡県矢部川水系からの移入集団である可能性が高いことを明らかにした。また核のマイクロサテライト遺伝子マーカーを用いることで、在来のヤリタナゴと交雑が生じており、特に産卵床となるマツカサガイの密度が低い場所で交雑個体が多く生じることが分かった。

松山平野ではヤリタナゴのみが生育する場所はすでになく、松山平野で広くアブラボテとの交雑個体が生育しており、両種の遺伝子浸透も双方向に進んでいるという危機的実態が明らかになった。また松山平野に共存する在来のヤリタナゴと国内移入種のアブラボテとで、消化管の形態を比較し、ヤリタナゴが藻食に適応し、アブラボテは雑食性であることを明らかにし、さらに炭素、窒素安定同位体比をマーカーとして用いることで、やはりアブラボテの方がより高い栄養段階を占めるが、繁殖期には両種が同様な餌資源を利用して競合関係にある可能性を示した。松山においては、マツカサガイの分布は極めて局所的で、その密度も低かった。さらに、マツカサガイの稚貝や幼貝が見られないことから、数年に亘って再生産していないものと考えられる。そのため、愛媛県の絶滅危惧種ヤリタナゴを保全するために、ヤリタナゴのみならず、その産卵床となるマツカサガイ、さらにマツカサガイのグロキディウム幼生の寄主となるヨシノボリ類、これらを含んだ保全区を策定する必要があることを示した。

さらにヤリタナゴとアブラボテが共存する西日本各地の調査地において、核のマイクロサテライトマーカーを用いた集団解析により、松山平野以外にも高い交雑率を示す河川があることを明らかにした。松山のみならず、複数の地点で何らかの理由によって二種の間での生殖隔離機構が損なわれている可能性があるため、その原因を突き止め、準絶滅危惧種である両種の保全にあたる必要があることを示唆した。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

本研究の成果に基づき愛媛県レッドデータブックの執筆を行い、ヤリタナゴを絶滅危惧IA (CR) に格上げ、アブラボテを情報不足 (DD) に格下げを行った。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

本研究の成果について、行政（国土交通省四国地方整備局、愛媛県、松山市、伊予市、松前町、砥部町、東温市）と10のNPO、地域の大学（愛媛大学）、高校（伊予農業高校）が集まった重信川の自然を育む会第16会総会（2015年2月2日開催）において「自然再生地を用いたヤリタナゴ保全の提案」という議題で話題提供し、この会の合意を得て、官民学が協働してヤリタナゴ保全区を策定し、ヤリタナゴの保全にあたる計画が進行している。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文（査読あり）>

- 1) 松葉成生, 吉見翔太郎, 井上幹生, 畑 啓生. 2014. 分子系統地理が示す愛媛県松山平野におけるアブラボテの人為移入起源. 魚類学雑誌. 61: 89-96.

### <査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

### <その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

### (2) 口頭発表（学会等）

- 1) 松葉成生、畑啓生：日本生態学会（2013）  
「愛媛県における在来種ヤリタナゴと国内移入種アブラボテの交雑」
- 2) 松葉成生、久保田菜々、黒川真帆、畑啓生：四国魚類研究会（2013）  
「松山平野における在来種ヤリタナゴと国内移入種アブラボテの交雑実態及びそれらの分布把握」
- 3) 松葉成生、大内魁人、吉見翔太郎、畑啓生：日本魚類学会（2013）  
「松山平野における在来種ヤリタナゴと移入種アブラボテの交雑と遺伝子浸透」
- 4) 吉見翔太郎、畑啓生：四国魚類研究会（2014）  
「DNAで探るアブラボテ属タナゴ2種の系統地理」
- 5) 桑原明大、畑啓生：四国魚類研究会（2014）  
「愛媛県松山平野の湧水性河川における希少イシガイ類の生息環境」
- 6) 大内魁人、畑啓生：四国魚類研究会（2014）  
「産卵床の二枚貝を共有する在来種ヤリタナゴと国内移入種アブラボテの交雑」
- 7) 大内魁人、畑啓生：第42回四国魚類研究会（2015）  
「松山平野における在来種ヤリタナゴと国内移入種アブラボテの交雑」
- 8) 桑原明大、畑啓生：第42回四国魚類研究会（2015）  
「愛媛県松山平野の湧水性河川におけるマツカサガイの分布と再生産」
- 9) 畑啓生、松葉成生、大内魁人、桑原明大、吉見翔太郎、石井麻友、井上幹生：日本生態学会（2014）  
「国内外来種が引き起こす在来種との交雑と遺伝子浸透：松山平野の在来種ヤリタナゴと移入種アブラボテの事例」

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

### (4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 愛媛大学ミュージアム講座（主催：愛媛大学ミュージアム、2014年6月12日、愛媛大学ミュージアム、聴講者約40名）畑啓生：「愛媛の希少種ヤリタナゴを守れ！国内外来種アブラボテとの競合と交雑」
- 2) 坂の上の雲ミュージアム・大学連携市民講座（大学からアジアをみる）（主催：坂の上の雲ミュージアム、2014年9月21日、受講者約20名）畑啓生：「幻の魚をさがして」

- 3) 第16回重信川の自然をはぐくむ会総会（主催：重信川の自然をはぐくむ会、2015年2月2日、メルパルク松山、総会参加者約100名）畑啓生・井上幹生：「自然再生地を用いたヤリタナゴ保全の提案」
- 4) 中国四国地区生物系三学会合同大会公開シンポジウム「淡水魚をめぐる水辺の生物多様性ーその危機の保全への取り組みー」（主催：日本動物学会・日本植物学会・日本生態学会中国四国地区支部会、2015年5月16日、愛媛大学メディアホール）畑啓生：「松山の絶滅危惧種ヤリタナゴを国内外来種アブラボテとの交雑から守れー自然再生地を用いた希少種の保全ー」

#### **(5) マスコミ等への公表・報道等**

※本研究についてのマスコミ等への公表履歴等について、記載すること。該当部分のコピー等を添付しても構わない。ただし、コピーの添付については、著作権等の問題が生じない場合に限る。

- 1) 愛媛新聞（2013年3月18日、「絶滅危惧種交雑進む、松山平野の川ヤリタナゴと移入？近縁種。生態系かく乱の懸念、地域固有遺伝子専門家「保護を」）



# 県絶滅危惧種 交雑進む

## 松山平野の川 ヤリタナゴと移入?近縁種

### 生態系かく乱の懸念 地域固有遺伝子 専門家「保護を」

県のレッドデータブックで絶滅危惧ⅠB類に指定されているコイ科の淡水魚ヤリタナゴと、同一類の近縁種アブラボテの交雑が、松山平野の国近川などで高頻度で起きていることが、愛媛大大学院理工学研究科の畑啓生(はたけひさ)と、同1類の近縁種ア

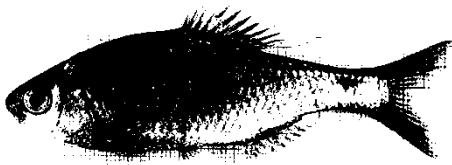
川、国近川、神寄川、長尾谷川で両種を20匹採取し、母方の遺伝情報を受け継ぐミトコンドリアから由来を判断した。結果、ヤリタナゴは香川県や岡山県など瀬戸内海地域の個体と同系統だったが、アブラボテは福岡県西部や佐賀県の個体と同系統だった。

畑助教は、アブラボテが在来種なら瀬戸内海地域の系統に属するはずとし「自然に生息域を広げたとは考えにくく、福岡西部などから人為的に移入され、繁殖している可能性が

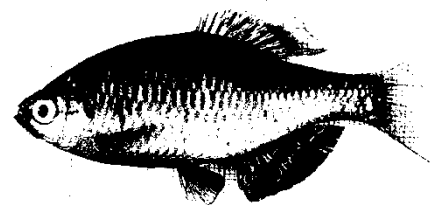
清水孝昭主任研究員(71)は「生態系による環境変化で79年に重信川で2匹報告された後、80年代には報告例が途絶。99年調査で神寄川などで再び見られるようになった。環境変化で自然に個体数が増えたとは思えない。住民が自覚なく放流し、生態系のかく乱が起きている可能性がある」と懸念する。

さらに21・3%が相手の遺伝的要素を核遺伝子に20%以上持つ交雑個体が判明した。畑助教は、両種は同じ一枚貝に産卵するが、長い時間をかけて共存関係を築いていないため交雑を防ぐ仕組みが機能しておらず、高い頻度で交雑が起きている可能性がある」と推測。

松山で育まれてきた地域個体のオリジナル遺伝子が永久に失われてしまう。結果を地域住民と共有し、地域固有遺伝子の保護を訴えたい」と話している。(長谷川悠介)

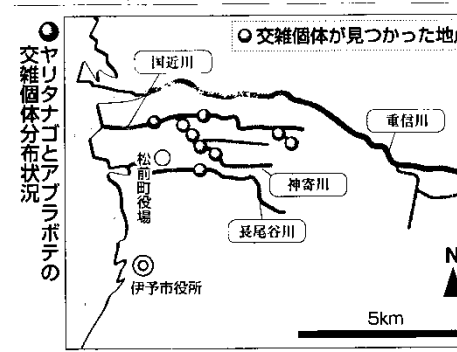


ヤリタナゴ(愛媛大提供)



アブラボテ(愛媛大提供)

交雑個体が見つかった地点



ヤリタナゴとアブラボテの交雑個体分布状況

00年調査で神寄川などで再び見られるようになった。環境変化で自然に個体数が増えたとは思えない。住民が自覚なく放流し、生態系のかく乱が起きている可能性がある」と懸念する。

2) 朝日新聞 (2015年4月16日、「絶滅危惧ヤリタナゴ、純粋種繁殖ピンチ。産卵に使う貝の不足原因? 愛媛大が研究」)

# 絶滅危惧ヤリタナゴ 純粋種繁殖ピンチ

## 近い二つの種が交配 増える交雑種



ヤリタナゴ

×



アヲナボナ

⇩



＝いずれも畑啓生助教授提供

# 産卵に使う貝の不足原因?

県のレッドデータブックで絶滅危惧種に指定されている淡水魚のヤリタナゴと、後から持ち込まれたとされる近縁のアヲナボナとの間で自然交配(交雑)が生じていることが、愛媛大の研究グループの調査でわかった。昔から松山平野にいたヤリタナゴの純粋な種が姿を消すおそれがあるとして、保全池を造るなどの対策を提案している。

どちらもタナゴの一種でよく似ており、全長約10センチのヤリタナゴがやや大きい。両種の間生まれた交雑種も含め外見では判別できないという。

同大学院理工学研究所の畑啓生助教授(生態学)らは2011、13年、松山平野を流れる重信川、国近川など3水系の19地点と周囲にある湧水池3地点でタナゴを採集し、遺伝子型で種を調べた。216匹のうち112匹がヤリタナゴ、88匹がアヲナボナ、10

%に当たる21匹が交雑種だった。14年6、10月に国近川で採集した調査では、331匹のうち交雑種が18%に当たる44匹と比率が高まり、ヤリタナゴよりアヲナボナのほうが多かった。

畑助教授によると、アヲナボナは1979年に重信川で確認されたのが県内で初めてだった。今、重信川や近くにいるのは、有明海(九州)に注ぐ川にいるのと同じ遺伝子型を持っている。タナゴは観賞用として

### 愛媛大が研究

乱獲や放流が繰り返されているため、人為的に県内に持ち込まれた可能性が高いという。

畑助教授が交雑の要因とみているのは、産卵に使う二枚貝の少なさだ。両種ともマツカサガイに雌が管を伸ばしてエラに産卵、孵化した赤ちゃんはしばらく貝の中で育つ。

調査では、マツカサガイが多くなる川では交雑がほとんど見られない一方、密度が半分以上の二つの川では交雑が高い頻度で起きていた。貝が少ない川では両種とも雌に多くの雄が群がる集団交配が起きやすく、交雑につながっている可能性があるという。

マツカサガイは各川で局所的にしか見られず、殻が小さいものはほとんど見つからない。稚貝がコイなどに食べられたり、稚貝が好む川底の砂が減ったりしてマツカサガイが減少している可能性があるともみている。

交雑種にも生殖能力があることから、放置すれば遺伝子汚染が進む。畑助教授は重信川そばにある湧水池にヤリタナゴとマツカサガイを一緒に放流して保護することを提案している。「放置すれば、1万年もの時をかけて松山平野に適応してきた在来種が失われ、生態系が攪乱されてしまう。ヤリタナゴの純粋な遺伝子を守りたい」と話した。

(豊野真英)

## (6) その他

特に記載すべき事項はない。

## 8. 引用文献

- 1) Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1659.
- 2) Dawson, D.A., Burland, T.M., Douglas, A., Le Comber, S.C., Bradshaw, M., 2003. Isolation of microsatellite loci in the freshwater fish, the bitterling *Rhodeus sericeus* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes* 3, 199-202.
- 3) Downing, J.A., Rochon, Y., Pérusse, M., Harvey, H., 1993. Spatial aggregation, body size, and reproductive success in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Journal of the North American Benthological Society* 12, 148-156.
- 4) Downing, W.L., Downing, J.A., 1993. Molluscan shell growth and loss. *Nature* 362, 506-506.
- 5) 愛媛県, 1979. 第2回自然環境保全基礎調査 河川調査報告書. In:
- 6) 愛媛県, 2003. 愛媛県レッドデータブック2003, 愛媛県県民環境部環境局自然保護課, 愛媛県
- 7) 愛媛県立博物館, 1994. 重信川周辺の泉とその生物, 愛媛県立博物館, 愛媛県
- 8) 愛媛県立博物館, 1995. 重信川周辺の泉とその生物II, 愛媛県立博物館, 愛媛県
- 9) Ellis, M.M., 1936. Erosion silt as a factor in aquatic environments. *Ecology* 17, 29-42.
- 10) 藤原, 結花, 内田, 有紀, 川西, 亮太, 井上, 幹生, 2014. 灌漑用湧水池における魚類群集の変化—護岸改修と外来魚に着目した10年前との比較—. *応用生態工学* 16:91-105
- 11) 福原, 修一, 前川, 渉, 長田, 芳和, 1998. 九州北西部の3小河川におけるタナゴ類の産卵床利用の比較. *大阪教育大学紀要* 47:27-37
- 12) Gilles, A., Lecointre, G., Miquelis, A., Loerstcher, M., Chappaz, R., Brun, G., 2001. Partial combination applied to phylogeny of European cyprinids using the mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19, 22-33.
- 13) Hashiguchi, Y., Kado, T., Kimura, S., Tachida, H., 2006. Comparative phylogeography of two bitterlings, *Tanakia lanceolata* and *T. limbata* (Teleostei, Cyprinidae), in Kyushu and adjacent districts of Western Japan, based on mitochondrial DNA analysis. *Zoological Science* 23, 309-322.
- 14) Karachle, P.K., Stergiou, K.I., 2010. Intestine morphometrics of fishes: A compilation and analysis of bibliographic data. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 40, 45-54.
- 15) Kitamura, J., 2007. Reproductive ecology and host utilization of four sympatric bitterling (Acheilognathinae, Cyprinidae) in a lowland reach of the Harai River in Mie, Japan. *Environmental Biology of Fishes* 78, 37-55.
- 16) 桑代, 勲, 1972. 瀬戸内海の地形発達史, 桑代勲遺稿出版委員会, 広島
- 17) 近藤, 高貴, 1987. イシガイ類7種の繁殖期. *Venus* 46:227-236

- 18) 近藤, 高貴, 1998. 淡水貝類の生息環境. 環動昆 9:166-170
- 19) 近藤, 高貴, 2008. 日本産イシガイ目貝類図譜, 日本貝類学会特別出版物第3号, 東京
- 20) Maruyama, A., Yamada, Y., Yuma, M., Rusuwa, B., 2001. Stable nitrogen and carbon isotope ratios as migration tracers of a landlocked goby, *Rhinogobius* sp. (the orange form), in the Lake Biwa water system. *Ecological Research* 16, 697-703.
- 21) 松葉, 成生, 吉見, 翔太郎, 井上, 幹生, 畑, 啓生, 2014. 分子系統地理が示す愛媛県松山平野におけるアブラボテの人為移入起源. *魚類学雑誌* 61:89-96
- 22) 諸澤, 崇裕, 藤岡, 正博, 2007. 霞ヶ浦における在来4種と外来3種のタナゴ類 (*Acheilognathinae*) の生息状況. *魚類学雑誌* 54:129-137
- 23) 永田, 俊, 宮島, 利宏, 2008. 流域環境評価と安定同位体, 京都大学学術出版会, 京都
- 24) 中坊, 徹次, 2013. 日本産魚類検索 全種の同定 第三版. In Ed by 東海大学出版会, 神奈川県
- 25) 中島, 淳, 鬼倉, 徳雄, 松井, 誠一, 及川, 信, 2006. 福岡県における純淡水魚類の地理的分布パターン. *魚類学雑誌* 53:117-131
- 26) 中村, 守純, 1969. 日本のコイ科魚類—日本産コイ科魚類の生活史に関する研究 資源科学研究所, 東京
- 27) 日本第四紀学会, 1987. 日本第四紀地図, 東京大学出版会, 東京
- 28) 日本魚類学会自然保護委員会, 2013. 見えない脅威” 国内外来魚” —どう守る地域の生物多様性, 東海大学出版会, 神奈川県
- 29) 奥田, 昇, 2012. 安定同位体を用いた水田生態系の構造と機能の評価手法. *日本生態学会誌* 62:207-215
- 30) 鬼倉, 徳雄, 中島, 淳, 江口, 勝久, 乾, 隆帝, 比嘉, 枝利子, 三宅, 琢也, 河村, 功一, 松井, 誠一, 及川, 信, 2006. 多々良川水系におけるタナゴ類の分布域の推移とタナゴ類・二枚貝の生息に及ぼす都市化の影響. *水環境学会誌* 29:837-842
- 31) Onikura, N., Nakajima, J., Miyake, T., Kawamura, K., Fukuda, S., 2012. Predicting distributions of seven bitterling fishes in northern Kyushu, Japan. *Ichthyological Research*, 1-10.
- 32) Shirai, Y., Ikeda, S., Tajima, S., 2009. Isolation and characterization of new microsatellite markers for rose bitterlings, *Rhodeus ocellatus*. *Molecular Ecology Resources* 9, 1031-1033.
- 33) 田部, 雅昭, 福原, 修一, 長田, 芳和, 1994. 淡水二枚貝ドブガイに見られる遺伝的 2 型. *貝類学雑誌 Venus : the Japanese journal of malacology* 53:29-35
- 34) Takehana, Y., Nagai, N., Matsuda, M., Tsuchiya, K., Sakaizumi, M., 2003. Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome b Gene in Japanese Wild Populations of Medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science* 20, 1279-1291.
- 35) Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

- 36) Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- 37) Uchida, Y., Inoue, M., 2010. Fish species richness in spring-fed ponds: effects of habitat size versus isolation in temporally variable environments. *Freshwater Biology* 55, 983-994.
- 38) Vähä, J.-P., Primmer, C.R., 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* 15, 63-72.
- 39) Watters, G.T., 1996. Small dams as barriers to freshwater mussels (Bivalvia, Unionoida) and their hosts. *Biological Conservation* 75, 79-85.
- 40) Yamano, H., Kim, C.-H., Takeuchi, H., Hosoya, K., 2012. Intestinal morphology in oily bitterlings (Cyprinidae: Acheilognathinae). *Ichthyological Research* 60, 80-84.
- 41) Yamaoka, K., 1985. Intestinal coiling pattern in the epilithic algal-feeding cichlids (Pisces, Teleostei) of Lake Tanganyika, and its phylogenetic significance. *Zoological Journal of the Linnean Society* 84, 235-261.

## **Genetic introgression to a native endangered bitterling by introduction of an endangered congeneric fish in Ehime, Japan**

Principal Investigator: Hiroki HATA

Institution: Graduate School of Science and Engineering,  
Ehime University  
2-5 Bunkyo, Matsuyama, Ehime 790-8577, JAPAN  
Tel: +81-89-927-9638 / Fax:  
+81-89-927-9638  
E-mail: hata@sci.ehime-u.ac.jp

[Abstract]

**Key Words:** Endangered species, Wildlife conservation, Introduced species, Hybrid, Introgression

Many alien species have been artificially introduced to Japanese freshwater, and they disturb local ecosystems through biotic interactions such as prey-predator interaction, competition, and sometimes hybridization and introgression to native species. Especially domestic alien species, which is alien species introduced from other region in Japan, are rapidly increasing in Japan because they are easy to colonize introduced area, and are difficult to be detected and controlled. Phylogeographic analysis of a bitterling fish, *Tanakia limbata*, in western Japan was conducted to identify the origin of *T. limbata* in Ehime, Shikoku Island. Additionally, distribution of *T. limbata* was surveyed in rivers and spring-fed ponds in Matsuyama plain in Ehime. As a result, *T. limbata* have spread its distribution in Matsuyama plain in these 19 years. Sequences of mitochondrial cytochrome *b* gene indicate that these individuals have 4 haplotypes, which were shared with *T. limbata* population in the Yabe River in Fukuoka, pouring into Ariake Sea, in Kyushu Island. These haplotypes belong to West Kyushu group. On the other hand, *T. limbata* of West Seto clade inhabit the western Honshu and the eastern Kyushu where the same paleoriver system was shared with Ehime 20,000 years ago. These results suggest that the individuals of *T. limbata* we collected in Ehime were originated from the Yabe River or the adjacent water, and artificially introduced over the mountain chain that may play as a barrier separating West Kyushu group and West Seto group. Field observation revealed that these two bitterlings set their eggs on the same species of bivalves, *Pronodularia japonensis*, in April to September. The distribution of *P. japonensis*,



however, was strictly limited to a few sites in this plain, and its density was quite low, suggesting that introduced *T. limbata* disturbed the reproduction of native *T. lanceolata* through competition for breeding resources. Microsatellite markers in nucleolus genome also revealed that *T. lanceolata* and *T. limbata* hybridized with each other, and throughout the Matsuyama plain, introgression between two species occurred. Based on these findings, *T. lanceolata* was listed as a critically endangered species in Red Databook in Ehime Prefecture. We propose the conservation of endangered *T. lanceolata* using artificial ponds constructed by Nature Restoration Project, as collaboration among government, citizen and academia.