

原 著

カワムツ属2種とオイカワの交雑個体の 形態比較およびミトコンドリア DNA 解析

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 松 岡 悠
大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 平 井 規 央
大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 石 井 実

Mitochondrial DNA and morphologic analysis of the hybrids of *Candidia* spp. and *Opsariichthys platypus*. Haruka Matsuoka, Norio Hirai and Minoru Ishii (Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)

We collected the specimens of the dark chubs *Candidia sieboldii* and *C. temminckii*, the pale chub *Opsariichthys platypus*, and the suspected hybrids of *Candidia* spp. and *O. platypus* in the Senzu River, Wakayama Prefecture and in the Daisoku River, Kagawa Prefecture, western Japan. We conducted both morphological analysis and genetic analyses using the *cyt b* gene of mtDNA on these specimens. The phylogenetic analysis based on the *cyt b* sequences showed that the three species diverged into three clades; two individuals suspected as hybrids were included in the same clade as *O. platypus*. Principal component analysis based on morphological characteristics separated the three species into three groups, and the suspected hybrids from Wakayama and Kagawa Prefectures fell midway between *C. sieboldii* and *O. platypus* and between *C. temminckii* and *O. platypus*, respectively. These results demonstrate that the maternal line of both suspected hybrids is *O. platypus*; the paternal lines of the suspected hybrids from Wakayama and Kagawa Prefectures are presumed to have been *C. sieboldii* and *C. temminckii*, respectively.

Keywords : *Candidia* spp., *Opsariichthys platypus*, hybrid, genetic analysis, morphologic analysis

要旨:和歌山県の紀ノ川水系支流千手川,香川県の大東川水系大東川からカワムツ属のヌマムツ,カワムツと,ハス属のオイカワ,およびそれらの属間交雑が疑われる個体が採集された。これらの3種と交雑が疑われる個体について,ミトコンドリアDNAの*cyt b*遺伝子塩基配列を用いた遺伝子解析と形態比較を行った。分子系統樹を推定したところ,3種は種ごとに3つのクレードに分かれ,交雑が疑われる2個体はいずれもオイカワのクレードに含まれた。形態比較では7形質のデータに基づく主成分分析を行った。その結果,3種は3つのグループに分かれ,和歌山県産の交雑が疑われる個体はヌマムツとオイカワ,香川県産の交雑が疑われる個体はカワムツとオイカワの中間に位置した。また,各形態形質について比較したところ,側線上方鱗数,側線鱗数,背鰭前方鱗数の3形質で主成分分析と同様の結果が得られた。これらのことから,交雑が疑われる2個体の母系はオイカワ,父系は和歌山県産の個体がヌマムツ,香川県産の個体がカワムツである可能性が高いと考えられた。また,これらの個体の生殖腺には発達が認められず,繁殖能力はもたないことが示唆された。和歌山県のオイカワは人為的移入による分布とされているため,国内外来種オイカワが在来種ヌマムツに対して,交雑による繁殖干渉等の影響を与えていることが懸念された。

キーワード:カワムツ属,オイカワ,交雑,遺伝子解析,形態観察

はじめに

西日本の河川に生息する淡水魚のカワムツ属 *Candidia* とハス属 *Opsariichthys* (いずれもコイ科) は、属間で交雑することが知られており、埼玉県、福井県、香川県、山口県ではヌマムツ *C. sieboldii* とオイカワ *O. platypus* (酒井ほか, 1992; 渡辺・坂戸自然史研究会, 2000; 安芸, 2004; 加藤, 2004), 愛知県, 広島県ではカワムツ *C. temminckii* とオイカワ (吉郷, 2000; 荒尾・下山, 2006), 九州地方ではヌマムツとハス *O. uncirostris* (鬼倉・向井, 2013) の交雑個体が報告されている。これらの交雑個体のうち、カワムツ属 2 種とオイカワの交雑個体については、これらが各種間の中間的な形態的特徴を示すことから交雑個体と判断されている (酒井ほか, 1992; 吉郷, 2000; 加藤, 2004; 荒尾・下山, 2006)。3 種は、2013 年まで同属 *Zacco* とされていたが、形態比較と Chen et al. (2008) が示した分子系統関係からヌマムツとカワムツはカワムツ属 *Candidia*, オイカワはハス属 *Opsariichthys* とされている (細谷, 2013)。

本研究では、和歌山県和歌山市と香川県丸亀市で採集されたカワムツ属とオイカワの交雑が疑われる個体について、形態的特徴を比較するとともに、ミトコンドリア DNA の解析結果について報告する。

本研究を遂行するにあたり、標本の収集にご協力いただいた高槻市立自然博物館の花崎勝司氏、自然再生学会の三宅壽一氏、京都大学大学院 (当時) の小松聖児氏、および大阪府立大学 (当時) の猪塚彬士氏、大阪府立大学大学院 (当時) の原仁志氏に厚くお礼申し上げます。また、データの統計解析にあたりアドバイスをいただいた大阪府立大学大学院の鈴木真裕氏に感謝申し上げます。

調査地と方法

2011 年 11 月 16 日に和歌山県和歌山市の紀ノ川水系支流千手川, 2012 年 3 月 5 日に香川県丸亀市の大東川水系大東川で魚類の採集調査を実施した。採集はタモ網を使用して行った。採集した個体は細谷 (2013) に従い、体側の色帯の方向, 側線鱗数, 臀鰭分岐軟条数などに基いて同定した。

遺伝子解析には和歌山県千手川産のヌマムツ 11 個体, カワムツ 3 個体, 交雑が疑われる 1 個体 (以下, OM-W; Fig. 1) および香川県大東川産のヌマムツ 10 個体, カワムツ 1 個体, 交雑が疑われる 1 個体 (以下, OM-K; Fig. 2) を用いた。また, 比較のために 2015 年 6 月 28 日に和歌山県日高郡の水路で採集したカワムツ 3 個体, 2012 年 3 月 6 日に香川県丸亀市土器川で採集したカワムツ 5 個体も使用した。全 DNA は鰭や粘膜から DNA すいすいー F (株式会社リーゾ製) を用いて抽出した。ミトコンドリア DNA の cytochrome *b* 遺伝子の一部を増幅する PCR は, プライマーに nscytbf (5'-GAG ACC AAT GAC TTG AAG AAC CAC-3') と F7420C05 (5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG-3') (Takehana et al., 2003) を使用し, サーマルサイクラー (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad) で, 94°C 120 秒, 次に 94°C 90 秒・55°C 120 秒・72°C 120 秒を 29 サイクルの条件下で行った。PCR 増幅産物は精製後, シークエンサー (ABI PRESIM®3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystem) を使用して配列を読み取り, 得られた配列は GenBank/EMBL/DDBJ [accession numbers. LC158447-LC158448, LC168798-LC168827, LC168833-LC168835] に登録した。また, 比較のため, GenBank/EMBL/DDBJ に登録されている滋賀県彦根市産のヌマムツ (LC021311), 滋賀県高島市産のカワムツ (LC021310) および



Fig. 1. A suspected hybrid individual of *Candidia sieboldii* and *Opsariichthys platypus* collected in the Senzu River in Wakayama Prefecture, western Japan on November 16, 2011.



Fig. 2. A suspected hybrid individual of *Candidia temminckii* and *Opsariichthys platypus* collected in the Daisoku River in Kagawa Prefecture, western Japan on March 5, 2012.

滋賀県長浜市産のオイカワ (LC019793) の塩基配列 (Kitanishi et al., 2016) を一緒に解析した。MEGA6 (Tamura et al., 2013) を用いて、デフォルトの設定でこれらの塩基配列のアライメントを行った。ハプロタイプの系統解析は MEGA6 を使用し、BIC (Bayesian information criterion; Schwarz, 1978), AICc (Akaike's information criterion corrected for small sample sizes; Hurvich & Tsai, 1989) によって選択された TN93 (Tamura-Nei model; Tamura & Nei, 1993) +G (Yang, 1996) モデルに基づいて、NJ (neighbor-joining; Saitou & Nei, 1987) 系統樹を推定した。系統樹は 1,000 回反復のブートストラップ法を用いて評価した。

形態観察には、遺伝子解析に用いた個体のうち、和歌山県産ヌマムツ 9 個体、カワムツ 6 個体、OM-W, 香川県産ヌマムツ 10 個体、カワムツ 6 個体、OM-K を用いた。そのほかに 2015 年 6 月 28 日に和歌山県日高郡の水路で採集した遺伝子解析を行っていないカワムツ 3 個体を用いた。また、比較のために 2011 年 10 月 29 日, 2012 年 1 月 19 日, 5 月 17 日に大阪府阪南市男里川で採集したオイカワ 12 個体も使用した (きしわだ自然資料館収蔵標本: KSNHM-P3166, 3217, 3337)。

形態計測は酒井ほか (1992), 吉郷 (2000), 加藤 (2004), 細谷 (2013) を参考にして, 標準体長, 体高, 頭長, 眼径, 臀鰭分岐軟条数, 側線上方鱗数, 側線鱗数, 背鰭前方鱗数の 8 形質について行った。3 種の比較については, 分散分析 (ANOVA) で有意な差が認められた場合は Tukey-Kramer 法による多重比較を行った。

これらの計測値のうち, 標準体長を除いた 7 形質に基づく主成分分析を行った。解析には R (3.2.2) を用いた。

結果

和歌山県と香川県で採集されたヌマムツ 21 個体とカワムツ 15 個体, 交雑が疑われる 2 個体について, ミトコンドリア DNA の cytochrome *b* 遺伝子 (1,152 bp) の塩基配列を決定した。その結果, ヌマムツは和歌山県から 1 ハプロタイプ (Cs-W), 香川県から 1 ハプロタイプ (Cs-K), カワムツは和歌山県から 2 ハプロタイプ (Ct-W1, W2), 香川県から 2 ハプロタイプ (Ct-K1, K2) が確認された。交雑が疑われる個体の塩基配列 (OM-W, K) はいずれもオイカワに類似しており, 系統樹

を推定したところ、オイカワのクレードに含まれた (Fig. 3)。なお、形態的特徴と遺伝子解析による同定結果は、遺伝子解析に使用したヌマムツとカワムツの全標本で一致した。

ヌマムツ 19 個体、カワムツ 15 個体、オイカワ 12 個体および交雑が疑われる OM-W、OM-K の 8 形質を計測し、体高、頭長、眼径は標準体長比を算出した。Table 1 に、標準体長を除く 7 形質の計測値を示した。その結果、標準体長に対する体高を除く 6 形質で種間に有意な差が認められた (Tukey-Kramer 法, $p < 0.05$)。標準体長に対する

頭長と眼径の平均値はオイカワがそれぞれ 25.4、6.5%であり、カワムツ属 (それぞれ 26.8、7.8 ~ 8.5%) より低かった。また、同定形質とされる臀鰭分岐軟条数と側線鱗数の平均値は細谷 (2013) と一致し、側線上方鱗数の平均値はヌマムツ、カワムツ、オイカワが 13.9、11.0、9.1%、背鰭前方鱗数の平均値は 25.4、21.9、16.1%とヌマムツ、カワムツ、オイカワの順に高かった。

和歌山県で採集された OM-W は標準体長 104.0mm で、体側部にはカワムツ属の特徴であるがね色の縦帯が薄く確認された (Fig. 1)。胸

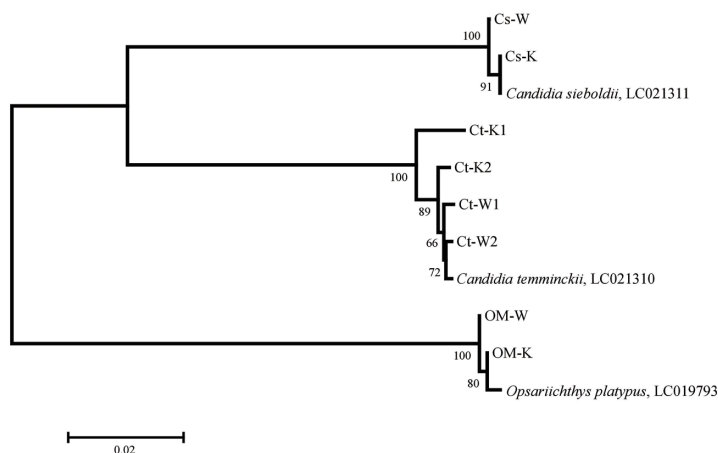


Fig. 3. A NJ tree of *Candidia sieboldii*, *C. temminckii*, *Opsariichthys platypus* and two suspected hybrids based on the mtDNA cytochrome *b* sequences (1,152 bp). Numerals at nodes indicate NJ bootstrap probabilities.

Table 1. The mean measured values and standard deviations of morphological characteristics of *Candidia sieboldii*, *C. temminckii*, *Opsariichthys platypus*, and the measured values of two suspected hybrids, OM-W and OM-K. Different alphabets indicate significant differences ($P < 0.05$ by Tukey-Kramer's test).

Characteristics	<i>C. sieboldii</i> n = 19	<i>C. temminckii</i> n = 15	<i>O. platypus</i> n = 12	OM-W n = 1	OM-K n = 1
Body depth/ Standard length (%)	21.9 ± 1.1 a	23.3 ± 1.4 a	21.5 ± 2.1 a	23.4	20.4
Head/ Standard lengths (%)	26.8 ± 1.1 a	26.8 ± 1.0 a	25.4 ± 0.8 b	25.5	25.4
Eye diameter/ Standard length (%)	7.8 ± 0.8 a	8.5 ± 0.9 a	6.5 ± 1.0 b	5.7	7.4
No. of anal fin rays	9.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	9	10
No. of scales above lateral line	13.9 ± 0.7 a	11.0 ± 0.8 b	9.1 ± 0.7 c	12	11
No. of lateral line scales	56.8 ± 2.9 a	48.3 ± 2.8 b	43.2 ± 1.5 c	49	45
No. of predorsal scales	25.4 ± 1.6 a	21.9 ± 1.6 b	16.1 ± 1.2 c	23	20

鰭と腹鰭の前縁は朱色で、ヌマムツ、オイカワの特徴と一致した。香川県産のOM-Kは標準体長52.9mmで体側部には縦帯があり、胸鰭と腹鰭の前縁は黄色で形態的特徴はカワムツ属に類似していた (Fig. 2)。計測した形質のうち種間に有意な差が認められた6形質について交雑が疑われる2個体と3種を比較すると、標準体長に対する頭長はOM-W, Kが25.5, 25.4%で、オイカワの平均値25.4%とおおよそ一致した。一方、眼径はOM-Wが5.7%, OM-Kが7.4%で、OM-Kはカワムツ (8.5%) とオイカワ (6.5%) の平均値の間であった。臀鰭分岐軟条数はOM-Wが9でヌマムツ、オイカワ、OM-Kは10でカワムツと一致した。3種で平均値が異なる側線上方鱗数、側線鱗数、背鰭前方鱗数はいずれもOM-WがOM-Kより高かった。また、OM-Wは側線上

方鱗数、側線鱗数、背鰭前方鱗数が12, 49, 23で、3形質ともカワムツの平均値 (順に11.0, 48.3, 21.9) よりも高く、OM-Kは側線鱗数、背鰭前方鱗数が45, 20で、カワムツとオイカワ (順に9.1, 43.2, 16.1) の間であった。

7形質について行った主成分分析の結果、3種は3つのグループに分かれ、OM-Wはヌマムツとオイカワ、OM-Kはカワムツとオイカワの中間に位置した (Fig. 4)。

考察

本研究では、和歌山県と香川県で採集されたカワムツ属とオイカワの交雑が疑われる個体について、遺伝子解析と形態観察を行った。遺伝子解析には母系遺伝とされるミトコンドリアDNAを使用したため、交雑が疑われる2個体の母系はオイカワであることが明らかになった。形態計測値の主成分分析の結果から、和歌山県産のOM-Wはヌマムツとオイカワの交雑個体、香川県産のOM-Kはカワムツとオイカワの交雑個体であると考えられた。各形質のうち、側線上方鱗数、側線鱗数、背鰭前方鱗数でOM-Wはヌマムツとオイカワ、OM-Kはカワムツとオイカワの中間的な値を示した。また、OM-Wの胸鰭と腹鰭の前縁にはヌマムツとオイカワが呈する朱色が観察され、OM-Kの胸鰭と腹鰭はカワムツと同様に黄色であったが、これらのことも主成分分析の結果と矛盾しなかった。

カワムツ属2種とオイカワの繁殖行動は比較的類似しており、基本的に雄と雌の一对で行われることが知られている (川那部・水野, 1989)。渡辺・坂戸自然史研究会 (2000) はオイカワの雄がヌマムツの産卵に参加する例は観察されるものの、ヌマムツの雄がオイカワの産卵に参加する例は確認されなかったとしている。また、鬼倉・向

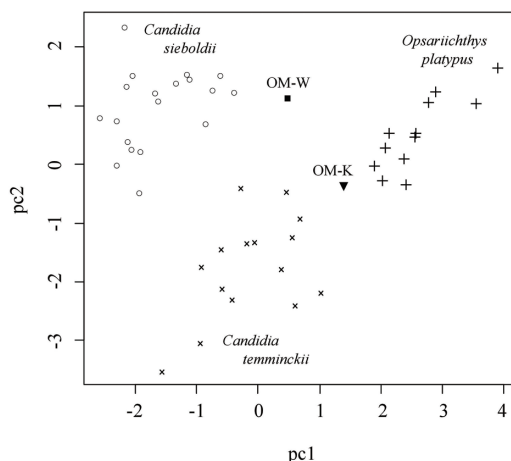


Fig. 4. Principal component analysis (PCA) based on 7 morphological characteristics of *Candidia sieboldii*, *C. temminckii*, *Opsariichthys platypus* and two suspected hybrids. Open circles, x-marks, plus signs, close squares and close triangles represent *C. sieboldii*, *C. temminckii*, *O. platypus*, OM-W and OM-K, respectively. The contribution ratios of pc1 and pc2 axes were 0.47 and 0.28, respectively, and the cumulative contribution ratio was 0.75.

井 (2013) は九州地方でヌマムツとハスの交雑個体を確認し、それらのミトコンドリア DNA の配列はハスと同じであったと報告しているが、この場合、ヌマムツの雄がハスの産卵に参加したと推測される。本研究で遺伝子解析に用いた交雑個体 OM-W, K はともに母系がオイカワであったことから、カワムツ属の雄がオイカワの産卵に参加したことで生じた可能性が高いと考えられる。

ヌマムツとオイカワの交雑個体の繁殖能力については、酒井ほか(1992)が生殖腺の状態を観察し、極めて未発達であることを確認している。本研究で使った交雑個体 2 個体のうち、香川県産の OM-K は未成魚であり、和歌山県産の OM-W は成魚であったが、生殖腺の発達は認められなかった。また、カワムツ属 2 種とオイカワの交雑個体は埼玉県から山口県に至る各地から記録があるものの (酒井ほか, 1992; 渡辺・坂戸自然史研究会, 2000; 吉郷, 2000; 安芸, 2004; 加藤, 2004; 荒尾・下山, 2006), 確認された個体数は酒井ほか (1992) で 10 個体, 渡辺・坂戸自然史研究会 (2000) で 20 個体以上である以外は 1 ～ 数個体と少なかった。これらのことから、カワムツ属とオイカワが同所的に生息する場所では、交雑個体が偶発的に発生するが、それらの個体数密度は極めて低く、繁殖能力はもたない可能性が高いと考えられる。

鬼束ほか (2012) は統計的手法を用いてカワムツのオイカワに対する忌避行動を観察している。また、川那部 (1969) はカワムツ (ヌマムツが独立種となる以前で、本研究のカワムツかヌマムツのいずれを指すかは不明) とオイカワが、多様な河川環境下において同所的に生息していても互いに微生息場所を変えていることを確認している。産卵場所については、カワムツは淵尻から平瀬にかけての砂泥底や礫底部を利用するのに対し、オイカワは平瀬の岸寄りの流れがゆるい砂礫底であるとされ (川那部・水野, 1989), それらはある

程度分離していると考えられる。しかし、開発によって一様化された河川環境下では、生息環境が開発前より重なる可能性が高く、雑種形成の機会を増加させる一因になっていると考えられる。近年、多くの淡水魚類が国内外来種として各地で確認されており、カワムツ属 2 種およびオイカワも本来は生息しない地域に分布を拡大している (細谷, 2013; 斎藤, 2015)。本研究で採集を行った香川県では 3 種とも自然分布とされているが、和歌山県のオイカワは人為的導入による分布とされている (細谷, 2015)。和歌山県でオイカワとヌマムツの交雑個体 OM-W が確認されたことから、国内外来種のオイカワが在来種のヌマムツに対して、繁殖能力を持たない交雑個体を生じることによって繁殖機会を奪う繁殖干渉等の影響を与えていることが懸念される。河川環境の一様化やカワムツ属とオイカワの生息環境の重複が互いに与える影響の程度については、継続した個体群の観察によって明らかにすることが必要である。

引用文献

- 安芸昌彦. 2004. 栗林公園の淡水魚類. 香川生物, 31 : 13 – 22.
- 荒尾一樹・下山淳二. 2006. 愛知県で採集されたオイカワとカワムツの交雑個体. 豊橋市自然史博物館研報, 16 : 53 – 54.
- Chen, I. S., J. H. Wu & C. H. Hsu. 2008. The taxonomy and phylogeny of *Candidia* (Teleostei: Cyprinidae) from Taiwan, with description of a new species and comments on a new genus. *Raffles Bulletin of Zoology*, 19 : 203–214.
- 細谷和海. 2013. コイ科. 「日本産魚類検索 全種の同定 第三版」(中坊徹次編), pp. 318, 1815. 東海大学出版会, 泰野.
- . 2015. コイ目. 「山溪ハンディ図鑑 15 日

- 本の淡水魚」(細谷和海編), pp. 88 – 95. 山と溪谷社, 東京.
- Hurvich, C. M. & C. L. Tsai. 1989. Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika*, 76 (2) : 297–307.
- 加藤文男. 2004. 福井県におけるオイカワ属魚類の分布と雑種の記録. 福井市自然史博物館研究報, 51 : 15 – 24.
- 川那部浩哉. 1969. 川と湖の魚たち. 196pp. 中公新書, 東京.
- ・水野信彦. 1989. 日本の淡水魚. 720pp. 山と溪谷社, 東京.
- Kitanishi, S., A. Hayakawa, K. Takamura, J. Nakajima, Y. Kawaguchi, N. Onikura & T. Mukai. 2016. Phylogeography of *Opsariichthys platypus* in Japan based on mitochondrial DNA sequences. *Ichthyological Research*, doi 10.1007/s10228-016-0522-y.
- 鬼束幸樹・秋山壽一郎・松田孝一郎・臼杵幸平・竹内 光. 2012. 板櫃川における魚類生息域の季節変化の調査. 土木学会論文集 B1 (水工学), 68 (4) : I_703 – I_708.
- 鬼倉徳雄・向井貴彦. 2013. 有明海沿岸域のクリーク地帯における国内外来魚の分布パターン. 「見えない脅威 “国内外来魚” — どう守る地域の生物多様性 —」(向井貴彦・鬼倉徳雄・淀 太我・瀬野 宏編), pp. 25 – 37. 東海大学出版会, 泰野.
- 斎藤憲治. 2015. オイカワの仲間. 「くらべてわかる 淡水魚」, pp. 38 – 41. 山と溪谷社, 東京.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 : 406–425.
- 酒井治己・永田昭広・藤岡 豊. 1992. 山口県におけるオイカワ属魚類の分布と雑種の出現. 水産大学校研究報告, 40 : 75 – 82.
- Schwarz, G. 1978. Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6 : 461–464.
- Takehana, Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya & M. Sakaizumi. 2003. Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of Medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science*, 20 : 1279–1291.
- Tamura, K. & M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10 : 512–526.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 : 2725–2729.
- 渡辺昌和・坂戸自然史研究会. 2000. 魚の目から見た越辺川. 160pp. まつやま書房, 東松山.
- Yang, Z. 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in Ecology and Evolution*, 11 (9) : 367–372.
- 吉郷英範. 2000. 広島県下におけるオイカワ属の交雑個体の記録とカワムツ A 型の分布 (予報). *比婆科学*, 194 : 1 – 8.