奈良県池原貯水池から検出されたフロリダバスMicropterus salmoides floridanus由来のミトコンドリアDNA

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	北川,忠生 沖田,智昭 伴野,雄次 杉山,俊介 岡崎,登志夫 吉岡,基 柏木,正章
発行元	日本水産學會
巻/号	66巻5号
掲載ページ	p. 805-811
発行年月	2000年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

Nippon Suisan Gakkaishi 66(5), 805–811 (2000)

奈良県池原貯水池から検出されたフロリダバス *Micropterus salmoides floridanus* 由来のミトコンドリア DNA

北川忠生，沖田智昭，伴野雄次，杉山俊介
岡崎登志夫，吉岡　基，柏木正章

(1999年10月13日受付，2000年5月8日受理)

Mitochondrial DNA of the Florida Subspecies of Largemouth Bass *Micropterus salmoides floridanus* Detected in Ikehara Reservoir, Nara Prefecture, Japan

Tadao Kitagawa,*1 Tomoaki Okita,*1 Yuji Banno,*1 Shunsuke Sugiyama,*1
Toshio Okazaki,*2 Motoi Yoshioka,*1 and Masaaki Kashiwagi*1

The largemouth bass *Micropterus salmoides* consists of two subspecies of the northern subspecies *M. s. salmoides* and the Florida subspecies *M. s. floridanus*. It has been widely regarded that largemouth bass, introduced and widespread in Japan, is the northern subspecies. In 1988, the Florida subspecies was also introduced into the Ikehara Reservoir (Nara Prefecture), where northern subspecies were already present. To assess the influence of this introduction, the genetic structure of the largemouth bass population in Ikehara Reservoir and thirteen other locations throughout Japan were examined and compared by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) method for mitochondrial DNA (mtDNA). Analysis of the ND1 region of mtDNA using sixteen restriction enzymes revealed 10 haplotypes (1–10) that form two distinct clusters in the UPGMA tree. One cluster consisted of two haplotypes (1 and 2) commonly detected in most populations throughout Japan, and the other cluster consisted of eight haplotypes (3–10) detected only in Ikehara and its connected Reservoirs. The reported rapid assay to identify mtDNA from two subspecies using D-loop region clearly revealed that eight haplotypes (3–10) were from the Florida subspecies.

キーワード：オオクチバス，ノーザンバス，フロリダバス，池原貯水池，ミトコンドリア DNA，PCR–RFLP，有孔側線鱗数

オオクチバス *Micropterus salmoides* は北アメリカを原産とするサンフィッシュ科オオクチバス属の淡水魚で，五大湖周辺からミシシッピー川水系，フロリダ州からバージニア州にかけての大西洋岸を中心に広く分布している。[1] 日本には，1925年食用目的として赤星鉄馬氏によってカリフォルニア州サンタローザから神奈川県芦ノ湖へ最初に持ち込まれたのを機に生息するようになった。[2,3] 本種はその著しい魚食性のために内水面漁業や日本在来の淡水魚へ与える影響から一般には害魚として扱われていることが多い。その一方で，原産地と同様日本でもルアーと呼ばれる疑似餌を用いたスポーツフィッシングの対象として人気が高く，そのため数度にわたる原産地からの追加移入や釣り人による放流が国内各地で行われてきた。その結果，現在では全国各地の湖沼，河川での生息が認められるようになっている。[3-5]

本種は北米北部を中心に分布する *M. s. salmoides*（通称，ノーザンバス）と主にフロリダ半島を中心とした南部に生息している *M. s. floridanus*（通称，フロリダバス）の2亜種からなり，[6] このうち日本に移入され現在広く分布しているのはノーザンバスであると考えられている。[3] 一方のフロリダバスはノーザンバスに比べ大型化するため，原産地である北米地域では格好のスポーツフィッシングの対象魚とされている。[3] 日本でも釣り客の動員を目的として，1988年奈良県下北山村の池原貯水池にこのフロリダバスの稚魚一万尾が放流されたことがあった。[7] フロリダバス稚魚の池原貯水池への放流当

*1 三重大学生物資源学部 (Faculty of Bioresources, Mie University, Kamihama, Tsu, Mie 514–8507, Japan).
*2 水産庁養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Tamaki, Watarai, Mie 519–0423, Japan).

初は，それ以前から多くのノーザンバスが同貯水池に生息していたこと，さらにその原産地が温暖なフロリダ半島地域で池原貯水池のある紀伊半島の南部とは気候が異なることから，稚魚が成長し繁殖することは困難であると考えられていた。[8] しかし全国的にオオクチバスが小型化している一方で，池原貯水池ではフロリダバス放流から10年近くが経過した最近になって大型の個体が多数捕獲されるようになり，かつてのフロリダバス放流の効果ではないかとの憶測がなされている（淀，私信）。しかし，オオクチバス両亜種の外部形態はその最大サイズを除いて酷似している上，両亜種間での交雑が予想されることもあり，従来の形態学的な研究では池原貯水池におけるフロリダバスの繁殖の実体に関しての詳細な把握は困難であった。

オオクチバスの原産地である北米地域では，これまで形態学的には困難であった両亜種が混合している集団の解析がアイソザイム分析により可能となってきた。[9] また近年行われているミトコンドリアDNA（mtDNA）を用いた分析も，オオクチバスの亜種や集団の解析では同様に有効な指標となることが報告されている。[10,11] 特にmtDNAはその塩基置換速度が速いことから種内や近縁種間の集団の解析に適していることが知られている。[12] これらの遺伝学的な手法を用いて池原貯水池におけるオオクチバスの集団構造を把握することは，フロリダバス移入の影響を検証する上でも，また今後の移殖魚を管理していく上からも意義深いものと考えられる。

そこで本研究では，mtDNAの一部領域を対象としたPCR-RFLP（Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms）分析とオオクチバス2亜種を形態的に識別する特徴として報告されている有孔側線鱗数[6]とを比較することにより，かつて放流されたフロリダバスの池原貯水池での繁殖の有無，並びに現在の同貯水池におけるオオクチバスの集団構造について検討した。

材料および方法

標本採集　材料として1996年7月から1997年10月にかけて奈良県下北山村の池原貯水池より釣獲した52個体と，その比較対象として1996年7月から1997年10月にかけて全国の13箇所の湖沼及び河川で釣獲した40個体を用いた（Fig. 1, Table 1）。これら13の湖沼のうち，三重県七色貯水池（No. 11, Fig. 1）は池

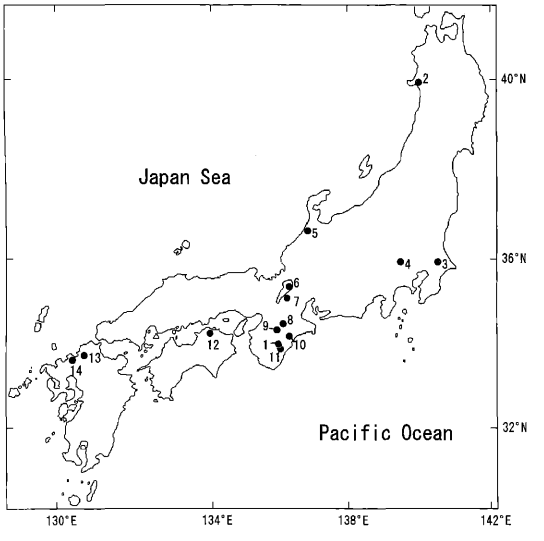

Fig. 1. Sampling sites of largemouth bass in this study.
Location numbers correspond to those in Table 1.

Table 1. Sampling List of the largemouth bass used in this study

	Location	Abbreviation	N	Sample Code
1	Ikehara Reservoir, Nara Prefecture	IK	52	IK. 01–52
2	Lake Hachirogata, Akita Pref.	HC	4	HC. 01–04
3	Lake Kasumigaura, Ibaragi Pref.	KM	3	KM. 01–03
4	Marsh Otagaya, Saitama Pref.	OT	2	OT. 01–02
5	Unoke River, Ishikawa Pref.	UN	1	UN. 01
6	Lake Biwa, Shiga Pref.	BW	7	BW. 01–07
7	Lake Nishinoko, Shiga Pref.	NS	3	NS. 01–03
8	Muro Reservoir, Nara Pref.	MR	1	MR. 01
9	Lake Tsufuro, Nara Pref.	TF	4	TF. 01–04
10	Funatsu River, Mie Pref.	FN	2	FN. 01–02
11	Nanairo Reservoir, Mie Pref.	NN	6	NN. 01–06
12	Kasuga River, Kagawa Pref.	KG	4	KG. 01–04
13	Tatara River, Fukuoka Pref.	TT	1	TT. 01
14	Zuibaiji River, Fkuoka Pref.	ZI	2	ZI. 01–02

原貯水池のすぐ下流に位置し水路により連結しているため，放流されたフロリダバスが流入している可能性が示唆されていた湖である。魚体はそのまま−80℃で凍結，あるいは肉片のみを99.6%エタノールに浸して分析まで保存した。凍結保存の標本については左側面の肩帯から下尾軸骨後端までの有孔側線鱗数を計測した。

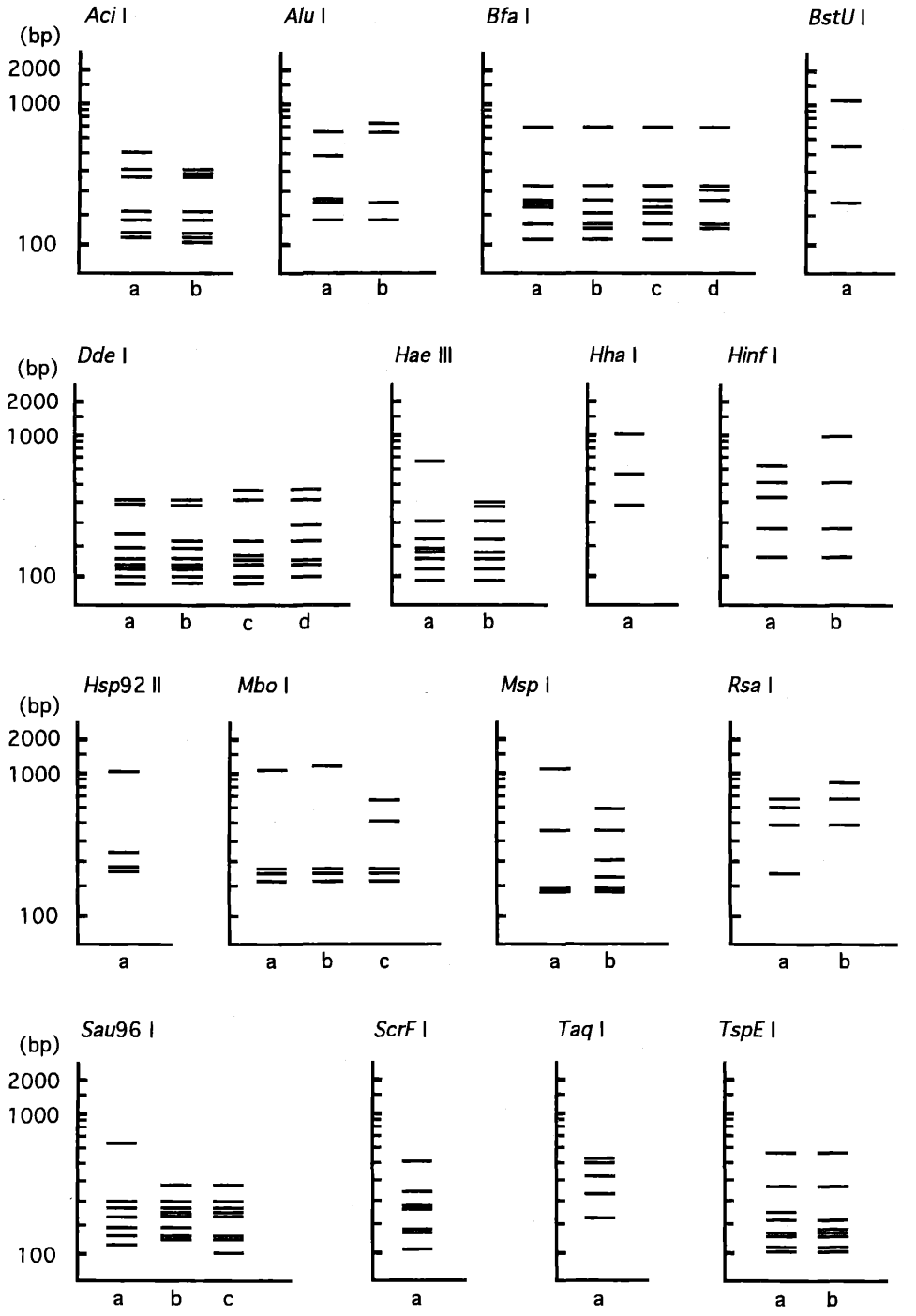

Fig. 2. Diagram of the *electoriphoretic* patterns of mtDNA ND1 region revealed by 16 restriction enzymes in 3% agarose gel.
The graduations alongside each band pattern indicate 100 bp ladder DNA size marker.

ND1遺伝子領域のPCR-RFLP分析　各標本からAsahida *et al.*[13]に従い，核DNAを含む全DNAを抽出した。抽出した全DNAを鋳型にして，NADH脱水素酵素サブユニット1（ND 1）遺伝子領域を含む約2.0 kbpのDNA断片をプライマーセット（L鎖側5′-ACC CCG CCT GTT TAC CAA AAA CAT-3′, H鎖側5′-GGT ATG AGC CCG ATA GCT TA-3′）[14]を用いてPCR法により増幅した。サーマルサイクラー（PTC-100, MJ Research, Inc. 製）によるPCR反応条件は94℃-120秒に続いて94℃-60秒，50℃-60秒，72℃-120秒の温度サイクルを30回，最後に72℃-300秒とした。PCRによって増幅されたDNA断片の切断には，Fig. 2に示した16種類の4または5塩基対認識型制限酵素を用いた。続いて3％アガロースゲルを用いた電気泳動の後，エチジウムブロマイド染色及び紫外線撮影により切断型を確認した。

各ハプロタイプ（mtDNAの遺伝子型）間における共有断片の割合からNei and Li[15]に従って塩基置換率を推定し，PHYLIP ver. 3.57cパッケージのNeighborプログラム[16]を用いてUPGMA法により各ハプロタイプ間の遺伝的類縁関係をもとめた。

Dループ領域のPCR-RFLP分析　続いてBremer *et al.*[11]に従いmtDNAのDループ領域を分析対象としたオオクチバスの亜種の判定を行った。ND1領域のPCR-RFLP分析で検出された各ハプロタイプについて1～4個体，計22個体を対象に，全DNAからDループ領域の一部，約450塩基対（bp）をプライマーL鎖側L15998-PRO（5′-TAC CCC AAA CTC CCA AAG CTA-3′），H鎖側CSBDH（5′-TGA ATT AGG AAC CAG ATG CCA-3′）を用いてPCR法により増幅し，制限酵素*Taq* Iで処理した。これらの電気泳動によって得られたバンドパターンをBremer *et al.*[11]の報告と比較することで各個体のmtDNAがどちらの亜種に由来しているものか検討した。

結　　果

ND1遺伝子領域のPCR-RFLP分析　PCR法によってmtDNAのND1遺伝子を含む約2.0 kbpのDNA断片を効率よく増幅させることができた。分析対象としたすべての個体において，この領域での塩基の欠損や挿入による断片長の変化は検出されなかった。

16種類の制限酵素による切断型のうち，11酵素による切断型において多型が検出された（Fig. 2）。このうち*Dde* Iと*Bfa* Iでは4種類（a, b, c, d），*Mbo* Iと*Sau*96 Iでは3種類（a, b, c），残りの7酵素では2種類（a, b）の切断型が認められた。これら各酵素の切断型の組み合わせから識別された10種類のハプロタイプをそれぞれハプロタイプ1, 2, 3,…, 10として，各集団におけるそれらの出現頻度をTable 2に示した。ハプロタイプ1は1個体の分析である宇の気川（No. 5, Fig. 1）を除くと全ての集団で検出され，ハプロタイプ2もまた全国の殆どの集団において検出された。これに対してハプロタイプ4, 5, 6, 8, 9, 10は池原貯水池で，ハプロタイプ7はこれに連結している七色貯水池（No. 11, Fig. 1）でのみ検出され，ハプロタイプ3はこれら両集団にのみ共通して検出された。

各ハプロタイプ間の塩基置換率をもとに作成したUPGMA樹において（Fig. 3），池原，七色両貯水池を含む全国の殆どの集団に共通して検出されたハプロタイプ1, 2と，池原，七色両貯水池のみから検出されたハプロ

Table 2. Composite ND1 haplotypes for 14 largemouth bass populations

Haplotype	Composite fragment pattern*1											Location*2													
												IK	HC	KM	OT	UN	BW	NS	MR	TF	FN	NN	NG	TT	ZI
1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a		19	1	1	1		7	3	1	3	2	1	1	1	2
2	a	a	a	b	a	a	b	a	a	a	b	6	3	2	1	1				1		2	3		
3	a	a	b	c	b	b	b	b	a	b	b	2										2			
4	a	a	b	c	b	b	b	b	b	b	b	5													
5	a	a	b	c	b	b	b	b	b	c	b	1													
6	a	a	b	c	b	b	c	b	b	c	b	4													
7	a	b	d	c	b	b	b	b	b	c	b											1			
8	b	a	b	d	b	b	b	b	a	b	b	10													
9	a	b	b	c	b	b	b	b	b	b	b	2													
10	b	a	c	d	b	b	b	b	a	b	b	3													

*1 The composite fragment pattern consists of the fragment patterns produced by polymorphic eleven enzymes: *Aci* I, *Alu* I, *Bfa* I, *Dde* I, *Hea* III, *Hinf* I, *Mbo* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Sau* 96I and *Tsp EI*, respectively.

*2 See the abbreviations in Table 1.

タイプ3～10からなる2つのクラスターが形成され，両者の間に明確な遺伝的分化が認められた。両クラスター間の塩基置換率は平均で1.793% であった。

D ループ領域の PCR-RFLP 分析　Bremer *et al.*[11] は D ループ領域の一部，約450 bp を対象とした PCR-RFLP 分析において制限酵素 *Taq* I による消化で形成されるバンドパターンがおよそ250, 160 bp の組み合わせ（同方法による50 bp 以下のバンドの検出は困難である）のものをノーザンバス由来の mtDNA ハプロタイプ A，またその切断型がおよそ410 bp，あるいは290, 120 bp の組み合わせものをそれぞれフロリダバス由来のハプロタイプ B, C として報告している。本研究において同様な分析を行いその切断型を比較した結果，池原，七色両貯水池の多くの個体がフロリダバス由来のハプロタイプ B, C を保有していることが明らかになった (Fig. 4)。また検討したすべての個体において ND1 領域のハプロタイプ 1, 2 と Bremer *et al.*[11] の報告した D ループ領域のノーザンバス由来のハプロタイプ A との間に特定の対応が認められた。同様に ND1 領域のハプロタイプ3～6とハプロタイプ7～10はそれぞれ D ループ領域のフロリダバス由来のハプロタイプ C, B との間に特定の対応が認められた (Table 3)。

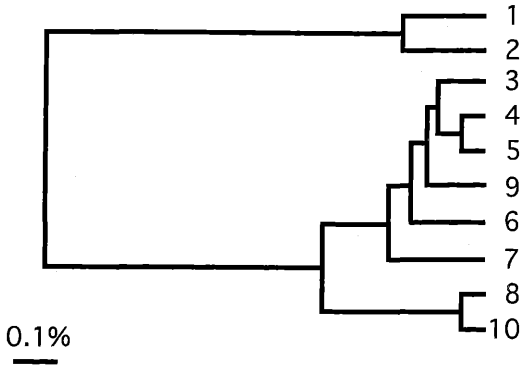

Fig. 3. UPGMA tree of mtDNA ND1 haplotypes among Japanese largemouth bass populations based on estimated nucleotide sequence divergence.

以上の結果から，Fig. 3 で示された全国的に認められたハプロタイプ 1, 2 と池原，七色両貯水池でのみ認められたハプロタイプ3～10の間の遺伝的分化は，ノーザンバスとフロリダバスの亜種間の分化に対応していることが判明した。

側線鱗数の計測　池原貯水池とこれと同一水系に属する七色貯水池から得られた個体の側線鱗数は62から76と幅広い値を示したのに対し，これ以外の全国各地の集団ではすべて68以下であった (Table 4)。

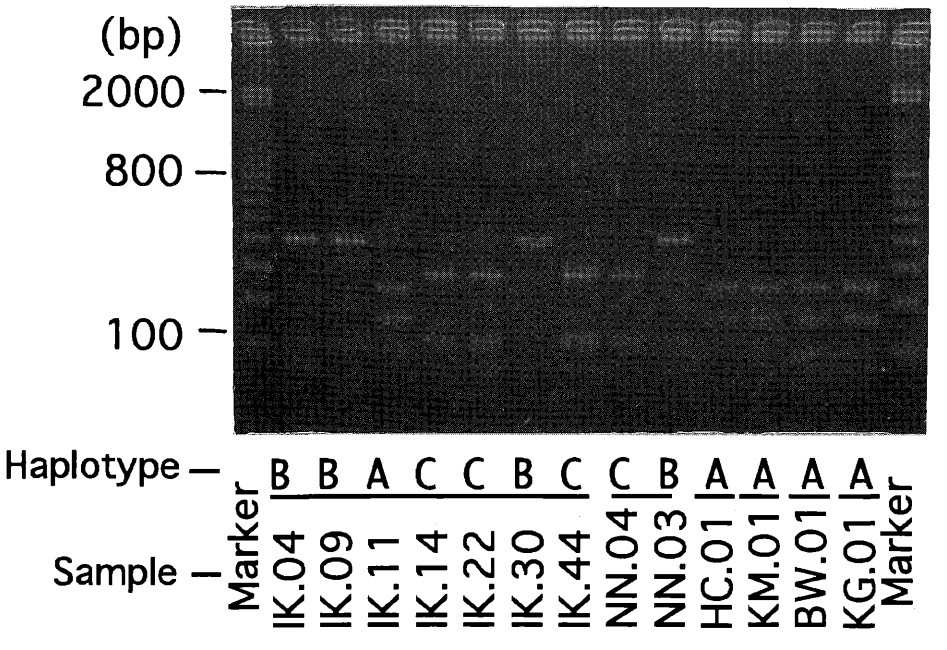

Fig. 4. Electrophoretic patterns of mtDNA control region digested with *Taq* I.
Letters (A, B and C) correspond to haplotypes reported by Bremer *et al.*[11] Abbreviated samples correspond to Table 1. Both sides in this gel are DNA size markers (100 bp ladders).

Table 3. Combination of ND1 and D-loop* haplotypes in each fish

Sample Code	Haplotype	
	ND1	D-Loop*
IK. 11	1	A
IK. 13	1	A
HC. 01	1	A
BW. 01	1	A
IK. 34	2	A
KM. 01	2	A
KG. 01	2	A
IK. 48	2	A
IK. 14	3	C
IK. 28	3	C
NN. 04	3	C
IK. 37	4	C
IK. 22	4	C
IK. 16	5	C
IK. 44	6	C
IK. 47	6	C
NN. 03	7	B
IK. 09	8	B
IK. 10	8	B
IK. 04	9	B
IK. 20	10	B
IK. 30	10	B

* Corresponded to Bremer *et al.* (1998).

Table 4. Numbers of scales along lateral line (NSL) and ND1 haplotype in each fish

Sample Code	NSL	Haplotype	Sample Code	NSL	Haplotype
Ikehara Reservoir:			IK. 40	71*	4*
IK. 09	67	8*	IK. 41	66	1
IK. 10	71*	8*	IK. 42	70*	2
IK. 11	68	1	IK. 43	65	8*
IK. 12	73*	8*	IK. 44	67	6*
IK. 13	67	1	IK. 45	64	1
IK. 14	71*	3*	IK. 46	63	1
IK. 15	70*	8*	IK. 47	64	6*
IK. 16	63	5*	IK. 48	66	2
IK. 17	64	1	IK. 49	62	1
IK. 18	70*	1	IK. 50	63	8*
IK. 19	66	1	IK. 51	67	4*
IK. 20	72*	10*	IK. 52	65	8*
IK. 21	67	1			
IK. 22	69*	4*	Nanairo Reservoir:		
IK. 23	68	1	NN. 01	67	2
IK. 24	68	1	NN. 02	72*	2
IK. 25	66	1	NN. 03	76*	7*
IK. 26	72*	8*	NN. 04	67	3*
IK. 27	66	6*	NN. 05	70*	1
IK. 28	72*	3*	NN. 06	74*	3*
IK. 29	64	1			
IK. 30	69*	10*	Other locations:		
IK. 31	71*	8*	KM. 01	64	2
IK. 32	64	8*	KM. 02	62	1
IK. 33	73*	6*	KM. 03	68	2
IK. 34	66	2	UN. 01	60	2
IK. 35	69*	1	BW. 01	65	1
IK. 36	71*	1	BW. 02	68	1
IK. 37	69*	4*	BW. 03	61	1
IK. 38	69*	10*	MR. 01	63	1
IK. 39	66	4*	KG. 02	68	1

* Morphological type and haplotype for Florida subspecies (NSL is more than 69; haplotypes 3–10).

考　　察

本研究におけるmtDNAの分析結果から，池原貯水池とこれに接続した七色貯水池に，かつて放流されたフロリダバスまたはその子孫が繁殖している事実が明らかになった。フロリダバス稚魚の放流（1988）から調査時点（1996, 1997）までに稚魚の成長や繁殖に充分と思われる時間が経過していることから，[3,17] 近年の池原貯水池におけるオオクチバスの大型化はフロリダバスの放流の影響であるものと推察される。

ND1領域の分析結果において，全国的にみられるノーザンバス集団のmtDNAの変異性は低く，わずかに2種類のハプロタイプが検出されたにすぎなかった。これは従来示唆されているように[*3]日本各地のノーザンバス集団はごくわずかな系統を起源とする集団が広がったものであることを支持する結果であった。これに対し，同分析において検出されたフロリダバス由来のハプロタイプは8種類と多く，池原貯水池に放流されたフロリダバス集団は遺伝的変異性の高いものであることが明らかとなった。

オオクチバス2亜種の有孔側線鱗数の値はノーザンバスでおおよそ59から67，これに比べフロリダバスでは69から73と多い傾向にあることが報告されている。[6] 本研究においてフロリダバスの繁殖が確認された池原，七色両貯水池からは側線鱗数69以上の個体が多数認められたのに対し，これらを除く全国各地の集団か

[*3] 梶本　誠，朝日田卓，篠塚由美，井田　齊：平成11年度日本水産学会春季大会講演要旨集，p. 87.

らは側線鱗数68以下の個体のみが認められたことは(Table 4)，従来の知見とほぼ一致する結果であった。これら池原，七色両貯水池においてのみ検出された側線鱗数69以上を便宜上フロリダバスの形質としてmtDNAハプロタイプの種類との対応を検討した結果(Table 4)，それぞれの亜種を特徴づける側線鱗数の値とmtDNAハプロタイプの組み合わせが一致しない個体，即ちフロリダバス由来のmtDNAを持っているにも関わらず側線鱗数がノーザンバスの範囲にあるもの（例えばIK.09)，あるいはこの逆の組み合わせのもの（例えばIK.18）が認められた。このような現象は，側線鱗数などの形態的特徴が核DNAに支配され，父方，母方双方の形質が遺伝するのに対し，mtDNAはこれとは独立して母系遺伝するという遺伝様式の違いにより，両亜種間の交配が繰り返された結果生じるものであると推察される。このような食い違いが高頻度に観察されたことは，原産地である北米で報告されているのと同様に[9-11]池原，七色両貯水池においても両亜種間の交雑が進行していることを示唆している。

本研究において，フロリダバスが放流された池原貯水池と同一の水系以外からはフロリダバス由来のmtDNA遺伝子型は検出されなかった。しかし近年では，池原貯水池以外の湖沼におけるフロリダバスの生息の可能性が示唆されており（淀，私信)，全国規模での調査と実体の把握を行う必要がある。過去に北米から持ち込まれたノーザンバスが，釣り人の遊魚目的や業者の営利目的のために全国各地で無秩序に放流されたことによって内水面漁業や在来種に深刻な影響を与えてきたことを考えると，大型化が予想されるフロリダバスの後代がこれと同様に池原貯水池から全国各地に流出することが懸念される。本研究において得られたオオクチバスのmtDNAに関する情報は，今後の調査と移殖管理を行っていく上で有効な指標になると考えられる。

謝　辞

三重大学生物資源学部付属水産実験所の淀　太我博士からは貴重な情報の提供をして頂くと共に，オオクチバスの形態的データの取り扱いについて御指導を頂いた。また，香川県水産試験場の横川浩治氏ならびに釣り人社「Basser」編集部の方々には，文献の収集に際しご協力頂いた。

池原貯水池のオオクチバスの採集にあたっては，大谷浩一郎氏をはじめ三重大学バスフィッシングサークル「Line Break」の皆様に，全国各地の標本の採集にあたっては，京華高等学校教諭，渡辺昌和氏に御尽力頂いた。ここに記して厚く御礼申し上げる。

参考文献

1) W. B. Scott and E. J. Crossman: Largemouth bass, in "Freshwater Fishes of Canada". *Fisheries Research Board of Canada Bull.*, **184**, 734–740 (1973).
2) 丸山為蔵，藤井一則，木島利通，前田弘也：ブラックバス.「外国産新魚種の導入経過」(水産庁研究部資源課，水産庁養殖研究所編)，1987, pp. 40–42.
3) 金子陽春，若林　務：ブラックバス移殖史．釣り人社，東京，1998, 254p.
4) 大谷和夫，菊川義仁：ブラックバス—典型的な害魚？．「日本の淡水生物—侵略と攪乱の生態学」(川合禎次，川那部浩哉，水野信彦編)，東海大学出版会，東京，1980, pp. 20–29.
5) 桐生　透：オオクチバス(2)分布と生息水域，「ブラックバスとブルーギルのすべて—外来魚対策検討委託報告書」(全国内水面漁業共同組合連合会編)，東京，1992. pp. 20–27.
6) R. M. Bailey and C. L. Hubbs: The black basses (*Micropterus*) of Florida, with description of a new species. *University of Michigan Museum of Zoology Occasional Papers*, **516**, 1–40 (1949).
7) 若林　務：日本にバスがやってきた—その移入史と将来「週刊釣りサンデー別冊新魚シリーズ7，新ブラックバスのすべて」，週刊釣りサンデー，大阪，1988, pp. 30–32.
8) 前畑政善：オオクチバス，「日本の淡水魚」(川那部浩哉，水野信彦編)，山と渓谷社，東京，1996, pp. 494–505.
9) D. P. Philipp, W. F. Childers, and G. S. White: Management implications for different genetic stocks of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in the United States. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*, **38**, 1715–1723 (1981).
10) F. P. Gelwick, E. R. Gilliand, and W. J. Matthews: Introgression of the Florida largemouth bass genome into stream populations of northern largemouth bass in Oklahoma. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **124**, 550–562 (1995).
11) J. S. A. Bremer, L. Zhang, J. S. Bulak, and B. Ely: A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) assay for the discrimination of mitochondrial DNA from the Florida and northern subspecies of largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **127**, 507–511 (1998).
12) J. C. Avise and N. C. Saunders: Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): Analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*, **108**, 237–255 (1984).
13) T. Asahida, T. Kobayashi, K. Saitoh, and I. Nakayam: Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Sci.*, **62**, 727–730 (1996).
14) H. J. Hall and L. W. Nawrocki: A rapid method for detecting mitochondrial DNA variation in the brown trout, *Salmo trutta*. *J. Fish Biol.*, **46**, 360–364 (1995).
15) M. Nei and W. H. Li: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endnucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 5269–5273 (1979).
16) J. Felsenstein: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57c. Univ. of Washington (1995).
17) T. Yodo and S. Kimura: Age and growth of the largemouth bass *Micropterus salmoides* in Lakes Shorenji and Nishinoko, Central Japan. *Fisheries Sci.*, **62**, 524–528 (1996).