

仁淀川および物部川水系におけるDNA多型による ギンブナのクローニングとそれらの分布

大原健一・董仕・谷口順彦

〒783-8520 南国市物部乙200 高知大学農学部栽培漁業学科
(電子メール: nobuhiko@cc.kochi-u.ac.jp)

(1997年5月23日受付; 1997年9月24日改訂; 1997年12月8日受理)

キーワード: ギンブナ, クローン, DNA フィンガープリント, D-loop, RFLP

魚類学雑誌
Japanese Journal of
Ichthyology

© The Ichthyological Society of Japan 1998

Kenichi Ohara, Shi Dong and Nobuhiko Taniguchi.* 1998. Identification and distribution of clonal lines detected by DNA polymorphism in silver crucian carp, *Carassius langsdorffii* collected from the Monobe and Niyodo rivers. Japan. J. Ichthyol., 45(1): 21-27.

Abstract Silver crucian carp, *Carassius langsdorffii*, a triploid gynogenetic fish were collected from the Niyodo and Monobe Rivers, Kochi prefecture, Japan. Clonal lines were identified by genetic markers such as isozyme patterns (PROT, CK, PGM, GPI, EST), DNA fingerprinting and RFLP of the D-loop region of mtDNA. A total of 17 clonal lines were detected by DNA fingerprinting and isozyme genotypes. Six clones were common to both rivers, with ten and one being restricted to the Niyodo and Monobe Rivers, respectively. In RFLP analyses of the D-loop region of mtDNA, eight haplotypes were detected, one to the four clones being included in each. Average haplotypic diversity (h) among the clonal lines was relatively high (0.782) in RFLP, whereas the average inter-clonal BSI was low (0.195) in DNA fingerprinting. The factor responsible for the high genetic divergence among the 17 silver crucian carp clones was discussed from the view points of their clonal nature and gynogenetic reproduction.

*Corresponding author: Nobuhiko Taniguchi, Department of Cultural Fisheries, Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan (e-mail: nobuhiko@cc.kochi-u.ac.jp)

西 日本のギンブナ (*Carassius langsdorffii*)は三倍体で(谷口, 1982), 雌性発生による繁殖を行うと言われている(小林, 1971; 小林・越智, 1972; 小野里, 1983; Yamashita et al., 1990, 1993; 董・谷口, 1996; 董ほか, 1997)。小野里(1983)はアイソザイムの電気泳動パターンおよび鱗移植法により北海道産のギンブナ集団内に複数のクローニングの存在を認めた。董ほか(1996)はDNAフィンガープリントとアイソザイムにより高知県物部川産のギンブナ野生集団内のクローニング系統を判別し、それらのクローニング系統間に顕著な遺伝的分化が見られることを解明した。また、Umino et al. (1997)はDNAフィンガープリントによって広島県黒瀬川

産の野生集団内のギンブナ77個体を判別した結果、66%が一つのクローニング系の子孫であることを確認している。

自然三倍体で、かつ雌性発生を行うギンブナの生殖様式は、異種精子ゲノムの排除と第一極体を放出させないことがあると考えられている(Nakakuki et al., 1984; Yamashita et al., 1990, 1993)。ギンブナの野生集団はこのような特異な生殖特性を備えながら、種内の多様性をクローニングの混在という形で保持している(董ほか, 1996)。しかし、ギンブナ集団の多様性維持のメカニズムは不明でこれを明らかにするためには、多型的遺伝マーカーを用い、詳細な集団解析を行いクローニング系の分

布状況および各クローニング系間の遺伝的つながりを調査することが必要であると考えられる。

ギンブナのクローニング性の証明には今まで、組織適合性、アイソザイム、RAPD-PCR、DNA フィンガープリントが使用されている（小野里、1983; Murayama et al., 1984; Umino et al., 1996; 董・谷口、1996; 董ほか、1996, 1997）。また、mtDNA の分析はクローニング性の証明には必ずしも有効ではないが、クローニング系間の類縁性を調査する上では有効性が期待できる。mtDNA のなかでも最も変異を蓄積していると言われる D-loop 領域の RFLP（制限断片長多型）分析は、PCR 法を用いるため非常に簡便な方法であり、かつ、顕著な多型性を示している（Martin et al., 1992; 高橋ほか、1994）。

本研究では、異なる河川および同一河川内の異なる支流からギンブナを採集し、一つの集団内のクローニング構成を比較検討した。クローニングの系統判別にはアイソザイムと DNA フィンガープリントを用いた。また、mtDNA の D-loop 領域の RFLP 分析を行うことによって、雌性発生を行うギンブナクローニングの mtDNA のハプロタイプの保有状態について調査し、それらの遺伝マーカーの組合せにより、クローニング系統間の分化の状態を調査した。

実験方法

供試魚 ギンブナの採集は1994年3月に高知県中東部の物部川下流域で、1995年5月、7月に高知県中西部の仁淀川水系中流域の柳瀬川と下流域の波介川で実施した。仁淀川と物部川の河口間の距離はおよそ 50 km である。ギンブナの三倍性については赤血球サイズおよび筋漿タンパク像によって確認した（瀬崎ほか、1977；谷口、1982；小野里ほか、1983）。ギンブナの採集尾数は物部川下流域で31尾、仁淀川水系の柳瀬川で88尾、波介川で125尾であった。

アイソザイムの検出 -20°C に冷凍した供試魚の筋肉と肝臓の解凍ドリップを酵素試料とし、水平式デンプンゲル電気泳動法により多型的アイソザイムを検出した。検出したタンパクおよびアイソザイムは筋漿タンパク (PROT), クレアチニナーゼ (CK; EC: 2. 7. 3. 2), ホスフォグルコムター (PGM; EC: 5. 4. 2. 2), エステラーゼ (EST; EC: 3. 1. 1. -), グルコースリン酸イソメラーゼ (GPI; EC: 5. 3. 1. 9) である。電気泳動用バッファーは PROT, CK に対してトリスホウ酸-EDTA バッファー (TBE Buffer) を、EST, GPI, PGM に対して、トリスクエン酸バッファー (T-C Buffer, pH 8.0) を用いた

（谷口・岡田、1980; 谷口、1982; 董ほか、1996）。複数の遺伝子座の存在する PROT, PGM, EST, GPI の多型については谷口（1982），および董ほか（1996）に従って表し、CK については董ほか（1996）に従い遺伝子型を表した。

DNA フィンガープリント法 供試魚から採取した血液から DNA をフェノールで抽出し、制限酵素 *HinfI* で消化した。1.2% アガロースゲルで分離した後、 ^{32}p アイソトープで標識した YNZ 22 プローブを用い、オートラジオグラフにより DNA 断片を検出した（万年ほか、1990; Han et al., 1992; 董ほか、1996, 1997）。DNA フィンガープリント像から個体間の DNA 断片バンド共有度 BSI を求めた（Han et al., 1992）。BSI は $2\text{Nab}/(\text{Na}+\text{Nb})$ で求め、Nab は a 個体と b 個体の間の共有バンド数を、Na および Nb は a および b 個体それぞれの総バンド数である。すべてのバンドを共有する個体を同一クローニングとみなし、今回の実験では、同一の DNA フィンガープリントが 2 個体以上発見されたギンブナをクローニング系とし番号を付した。

mtDNA D-loop 領域の増幅と RFLP 分析 抽出した DNA を鋳型とし Martin et al. (1992) によって設計されたプライマー (L15560; 総塩基数 23 mer, 配列 5' → 3' CAT ATT AAA CCC GAA TGA TAT TT, H01067; 総塩基数 25 mer, 配列 5' → 3' ATA ATA GGG TAT CTA ATC CTA GTT T) を用いて PCR を行い、mtDNA の D-loop 領域を増幅した。PCR 反応は 94°C 1 分を 1 サイクル、 94°C 1 分、 45°C 1 分、 72°C 1 分を 30 サイクル、 72°C 7 分を 1 サイクル行った。増幅した断片を 4 塩基あるいは 5 塩基配列認識の制限酵素 (*HinfI*, *RsaI*, *NdeII*, *AluI*, *TaqI*) で消化し、2-3% アガロースゲルで泳動し、臭化エチジウムで染色後、RFLP を検出した（Martin et al., 1992; 高橋ほか、1994）。クローニング系統内およびクローニング系統間、採集地点ごとのハプロタイプの出現状況を記録し、各集団のハプロタイプ多様度 $h=2n(1 \times \sum x_i^2)/(2n-1)$ を求めた（根井、1990）。

結果

アイソザイムと DNA フィンガープリントによるクローニング判別 PROT は谷口（1982）に見られた II-2, II-3, 董ほか（1996）に見られた II-5 と合わせて 3 タイプが検出された。CK* は三つの対立遺伝子 *a, *b, *c が存在し、それらの遺伝子型は $a/b/c$, $a/a/b$, $b/b/c$ の 3 タイプが検出された。EST, PGM および肝臓を試料とした GPI については既報に従ってタイプ分けし、それらと一致しないものは新しいタイ

Table 1. Pheno- and genotypes observed of 17 clonal lines in silver crucian carp, *Carassius langsdorffii*

	Phenotypes of clone																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
DNA fingerprinting	I	II	III	I	IV	I	III	V	I	VI	III	VII	VIII	VI	VI	V	VI
mt DNA haplotypes	II-2 <i>a/b/c</i>	II-5 <i>b/b/c</i>	II-2 <i>a/b/c</i>	II-2 <i>a/b/c</i>	II-2 <i>a/b/c</i>	II-2 <i>a/b/c</i>	II-2 <i>a/b/c</i>	II-3 <i>a/a/b</i>	II-2 <i>a/b/c</i>								
Protein polymorphism																	
PROT* ¹	II-2	II-5	II-2	II-2	II-2	II-2	II-2	II-3	II-2	II-2							
CK ²	<i>a/b/c</i>	<i>b/b/c</i>	<i>a/b/c</i>	<i>a/b/c</i>													
PGM* ³	1	2	3	4	5	6	3	7	2	1	8	4	9	4	8	9	6
GPI (muscle)	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1
GPI (liver)* ³	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10	11	7	12	4	12	13
EST* ³	1	2	3	4	5	6	7	8	7	9	6	10	8	4	11	8	7
Observed number	10	16	5	26	4	20	6	36	6	10	66	3	12	12	2	2	7

*¹ Phenotype classes according to Taniguchi(1982).

*² Genotype classes according to Dong et al.(1996).

*³ Phenotype classes according to Dong et al.(1996).



Fig. 1. DNA fingerprinting of clonal lines of 11, 9, 10, 12, 17, 6 and 16 in silver crucian carp, *Carassius langsdorffii* detected by genome DNA digested by *Hinf*I, and hybridized with radiolabelled YNZ22 probe.

として追加した。ESTは既報に見られた7タイプと今回新しく4タイプが認められ、あわせて11タイプが、PGMは既報に見られた6タイプと今回新しく3タイプが認められ、あわせて9タイプが、肝臓を試料としたGPIは既報に見られた7つのタイプと今回新しく6タイプが認められ、あわせて13タイプが確認された。筋肉を試料としたGPIは2タイプが確認された。それらを組み合わせることにより、17のクローン系が判別された(Table 1)。

DNA フィンガープリントによりクローン判別された17のクローン系は、アイソザイムパターンにより判別できたものと一致した(Fig. 1)。同一クローン内ではすべてのバンドを共有し、BSIは1であった(Fig. 1)。17のクローン系統間の平均 BSIは0.195であった。各集団内のクローン系統間の平均

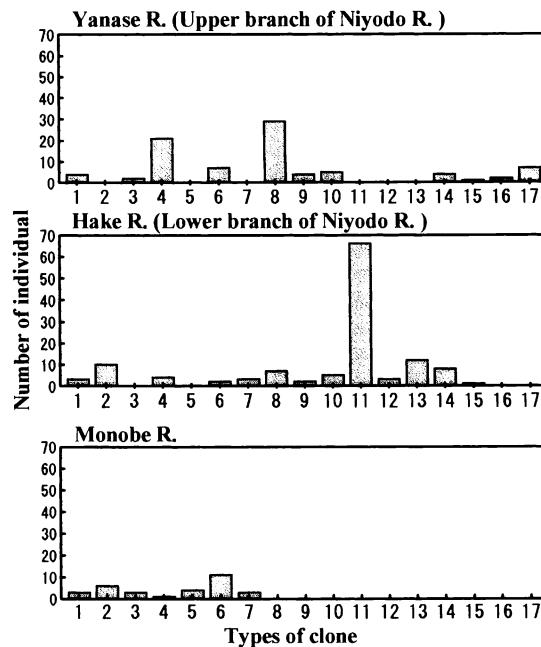


Fig. 2. Frequency distribution of clones detected by DNA fingerprinting and isozyme.

BSIは、仁淀川が0.204、物部川が0.201となり、仁淀川水系内の支流内の平均 BSIは柳瀬川が0.249、波介川が0.212であった(Table 2)。

判別された17系統のクローンの中で、仁淀川および物部川両水系に共通なものは6系統、仁淀川に特異的なものは10系統、物部川に特異的なものは1系統であった。仁淀川水系内の両支流に共通なものは8系統、柳瀬川に特異的なものは3系統、波介川に特異的なものは5系統であった。採集地点間で共通に見られたクローンにも出現頻度に違いが見られた(Fig. 2)。

mtDNA D-loop領域の増幅とRFLP分析

PCRにより増幅されたmtDNA D-loop領域の断片のサイズは期待された約2100 bpであることが確認できた。各酵素ごとに検出された切断型は、*Hinf*Iが3タイプ、*Rsa*Iが2タイプ、*Taq*Iが5タイプ、*Alu*Iが2タイプ、*Nde*IIが2タイプであった(Table 3, Fig. 3)。この中で等長のバンドが重なっている部分があり、*Hinf*Iの3タイプと*Taq*Iの1タイプ(d)では、推測されたTotal fragment sizeが他の酵素に比べて約1000 bp小さく見積もられた。また、他の酵素においても検出できないほど小さい断片が認められ、Total fragment sizeの変異に関与していると推測された。各酵素のタイプを組み合わせることにより、8つ(I~VIII)のハプロタイプが判別

Table 2. Average values of interclonal BSI within a location

Within a location	Average BSI
Niyodo R. (16*)	0.204
Yanase R. (11)	0.249
Hake R. (13)	0.212
Monobe R. (7)	0.201
Mean (17)	0.195

* Number of clonal lines detected.

できた(Table 4)。また、一つのハプロタイプに1~4のクローン系統が含まれていることが判明した。

これとは逆に一つのクローン系内で複数のハプロタイプが出現することはなかった(Table 1)。出現したハプロタイプは仁淀川水系で7タイプが出

Table 3. Approximate sizes of mtDNA fragment with D-loop region of silver crucian carp, *Carassius langsdorffii* digested by five restriction endonucleases

<i>HinfI</i>			<i>RsaI</i>	
a*	b	c	a	b
420* ²	420	420	1110	1110
250	250		420	420
	210	210	350	
190				300
		130		
80	80	80	1880	1830
940* ³	960	840		
<i>TaqI</i>				
a	b	c	d	e
2100				
	2000			
		1200		1250
		620	620	620
2100	2000	1820	620	1870
<i>AluI</i>				
a	b		<i>NdeII</i>	
1150	1150		910	910
400	400		600	600
350			380	
	280			190
1900	1830		1890	1700

*¹ Restriction morph.

*² Fragment size(bp).

*³ Total of fragment size(bp).

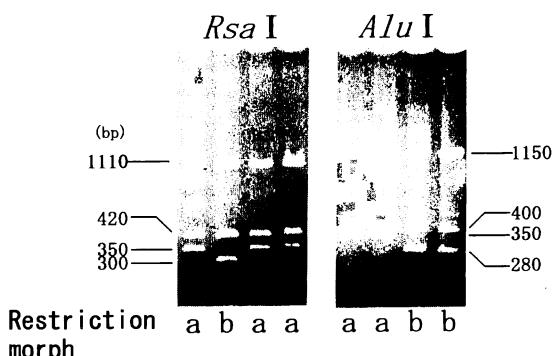


Fig. 3. An example of restriction fragments patterns of D-loop region of mtDNA digested by *RsaI* and *AluI*.

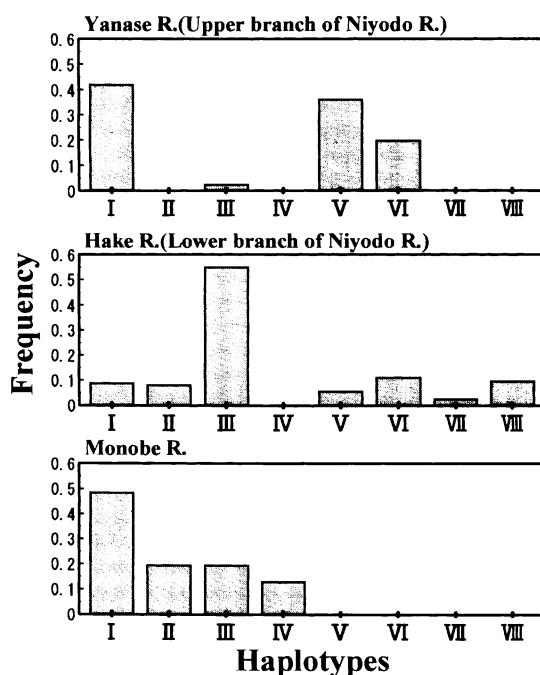


Fig. 4. Frequency distribution of mt DNA haplotypes in the Yanase River upper branch of the Niyodo River system and the Hake River lower branch of the Niyodo River system and the Monobe River system.

現し、このうち4タイプ(V, VI, VII, VIII)は仁淀川水系にのみ認められた。物部川水系で4タイプが出現し、1タイプ(IV)は物部川にのみ認められた(Fig. 4)。ハプロタイプ多様度は全体で0.782、仁淀川水系で0.781、物部川水系で0.671であった。仁淀川水系内では柳瀬川で0.775、波介川で0.775であった(Table 4)。同一ハプロタイプ内のクローン系間のDNA フィンガープリントの平均BSIは

0.345 ± 0.290 と低かった (Table 5)。一方、ハプロタイプVに含まれる2系統間のBSIは0.740と高かった。

考 察

ギンブナ集団は複数のクローニング系統の混在集団であることが判っている (董ほか, 1996)。本研究では仁淀川・物部川両水系合わせて17系統という多数のクローニング系が見られたが、アイソザイムとDNAフィンガープリントのそれぞれのマーカーによりクローニング判別が可能であり、それら2マーカーのクローニング判別の結果がよく一致した。mtDNAにおける一つのハプロタイプには複数のクローニング系が含まれていた。今回のRFLP分析では全D-loop領域の数%の変異を認識したに過ぎず、今後さらに多くの制限酵素を用いるか、直接シーケンスすることによって検出されるハプロタイプ数は増加する可能性がある。

小野里 (1983)は北海道産のギンブナを組織適合性によって調査したところ、地域によっては数百個体調べても一つのクローニング系が全体のほとんどを占めたことを報告している。董ほか (1996)は高知県物部川でギンブナ32個体に7つのクローニング系が存在することを報告している。Umino et al. (1997)は広島県黒瀬川でギンブナ77個体を調査したところ、86%が3系統のクローニングからの子孫で

あり、残りの14%は同一のクローニングではないことを報告した。今回調査した仁淀川水系内の柳瀬川、波介川の両支流間で共通のクローニングが8系統見られた。仁淀川と物部川の河口の間は約50km離れており、顕著な隔離要因にもかかわらず、共通のクローニングが6系統も見られた。このような事実は両河川集団が共通のクローニングギンブナを祖先集団として共有することを示唆している。

クローニング系の中にはハプロタイプVに含まれる2系統のように同一ハプロタイプで、DNAフィンガープリントのBSIが高く、共通のアイソザイムのパターンを多く持つ遺伝的に極めてよく似通っているものも見られた (Table 5)。このことはこれら2系統が共通のクローニングから派生した可能性を示唆している。クローニング系の分化については卵形成時の組み換えが報告されているが (Murayama et al., 1984; 大沢ほか, 1984; Zhang et al., 1992)、一腹子のクローニング性について証明した報告もあり (小野里, 1983; 董仕・谷口, 1996; Umino et al., 1996; 董仕ほか, 1997)、今後さらに調査する必要がある。

集団中の母系数の指標となるハプロタイプ多様度を、雌性発生を行うギンブナと他の有性生殖を行う魚類との間で比較することができる。ハプロタイプ多様度はマダイで0.892 (Tabata and Mizuta, 1997)、メカジキで0.922 (Chow et al., 1997)と高いのに対し、ギンブナではやや低い値 (0.782) となった。しかし、これら海水魚と比較すると、淡水魚であるギンブナのハプロタイプ多様度は十分に高いレベルに維持されていると考えられる。

また、調査したアイソザイムでは多くの多型が検出され、*GPI**, *CK**など複数の遺伝子座で明らかにヘテロ型であった。これらのことからギンブナはクローニング性と著しいクローニング間分化、複数の遺伝子座のヘテロ接合性、mtDNAにおけるハプロタ

Table 4. Frequency distribution of 8 haplotypes of mtDNA and haplotypic diversity (*h*) in the Niyodo and Monobe river systems

Haplotype	Niyodo R. system			
	Monobe R.	Total	Yanase R.	Hake R.
I (aaaaa)	11	36	15	62
II (badbb)	10	0	6	16
III (cacbb)	69	2	6	77
IV (babbb)	0	0	4	4
V (bbbbbb)	7	31	0	38
VI (bacbb)	14	17	0	31
VII (baebb)	3	0	0	3
VIII (aacbb)	12	0	0	12
n	126	86	31	243
<i>h</i>	0.775	0.775	0.671	0.782

*The letter parenthesis in each haplotypes denote restriction patterns for *Hinf*I, *Rsa*I, *Taq*I, *Alu*I, *Nde*II from left to right.

Table 5. Average values of interclonal BSI of DNA fingerprint within a haplotype of mtDNA

Haplotype	Average BSI
I (4*)	0.199
III (3)	0.065
V (2)	0.740
VI (4)	0.347
Mean	0.345

* Number of clonal lines detected.

イプの多様性など著しい遺伝的多様性を内包する種集団という認識に立つことができる。このようなギンブナの遺伝的多様性はその構成要素であるクローン系の起源の古さをも示唆するものと考えられる。

一般的に無性生殖は厳しく不安定な環境下で多いといわれているが、ギンブナ集団の生殖様式もまた、不安定な淡水域の生態系への一つの適応と見なすことができる。

引用文 献

- Chou, S., H. Okamoto, Y. Uozumi and Y. Takeuchi. 1997. Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Mar.Biol.*, 27: 359–367.
- 董仕・谷口順彦. 1996. RAPD-PCR およびアイソザイムパターンによるギンブナ腹子のクローン性の証明. *日本水産学会誌*, 62: 891–896.
- 董仕・谷口順彦・辻莊一. 1996. DNA フィンガープリントとアイソザイムパターンによるギンブナクローンの識別. *日本水産学会誌*, 62: 747–753.
- 董仕・大原健一・谷口順彦. 1997. 高水温処理によるギンブナ卵へのコイ精子の導入とDNAマーカーによる確認. *日本水産学会誌*, 63: 201–206.
- Han, H., H. Mannen, A. Tsujimura and N. Taniguchi. 1992. Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 2027–2031.
- 小林弘. 1971. 3倍体ギンブナのgynogenesisに関する細胞学的研究. *動物学雑誌*, 80: 316–322.
- 小林弘・越智尚子. 1972. キンブナとドジョウの精子の媒精により生じた3倍体ギンブナの仔魚の染色体について. *動物学雑誌*, 81: 67–71.
- Kojima, K., K. Matsumura, M. Kawashima and T. Kajishima. 1984. Studies on the gametogenesis in polyploid Ginbuna *Carassius auratus langsdorffii*. *J. Fac. Sci. Shinshu Univ.*, 19: 37–52.
- 万年英之・辻莊一・後藤信男. 1990. M13 ファージを用いたニワトリ核DNA フィンガープリント. *日本畜産学報*, 61: 1057–1062.
- Martin, A. P., R. Humphreys and S. R. Palumbi. 1992. Population genetic structure of the Armorhead, *Pseudopenaceros wheeleri*, in the North Pacific Ocean: application of the Polymerase Chain Reaction to Fisheries Problems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 2386–2391.
- Murayama, Y., M. Hijikata, T. Nomura and T. Kajishima. 1984. Analyses of histocompatibility and isozyme variation in triploid fish, *Carassius auratus langsdorffii*. *J. Fac. Sci. Shinshu Univ.*, 35: 125–138.
- Nakakuki, M., H. Toya, K. Sawano and T. Kajishima. 1984. On the fertilization of the triploid ginbuna. *J. Fac. Sci. Shinshu Univ.*, 19: 53–61.
- 根井正利. 1990. 分子進化遺伝学. 五條堀考・齊藤成也(訳) pp. 222–223. 培風館. 東京.
- 大沢康典・筒井清・町田秀夫・梶島孝夫. 1984. 三倍体ギンブナ *Carassius auratus langsdorffii* の同腹 F_1 個体間のクローン性の検討. *J. Fac. Sci. Shinshu Univ.*, 19: 25–35.
- 小野里坦. 1983. クローンブナの話. *淡水魚*, 9: 33–41.
- 小野里坦・鳥澤雅・草間政幸. 1983. 北海道に於ける倍数体フナの分布. *魚類学雑誌*, 30: 184–190.
- 瀬崎啓次郎・小林弘・中村守純. 1977. 2倍体および3倍体ギンブナの赤血球の比較. *魚類学雑誌*, 24: 135–140.
- Tabata, K. and A. Mizuta. 1997. RFLP Analysis of the mtDNA D-loop Region in Red Sea Bream, *Pagrus major* Population from Four Locations of Western Japan. *Fisheries Sci.*, 63: 211–217.
- 高橋保夫・小林敬典・上田高嘉. 1994. PCR 法を用いたミヤコタナゴのミトコンドリア DNA の D-Loop 領域における遺伝変異. *水産育種*, 20: 39–45.
- 谷口順彦. 1982. 西日本のフナ属魚類—オオキンブナをめぐって. *淡水魚*, 8: 59–68.
- 谷口順彦・岡田容典. 1980. マダイの生化学的多型に関する遺伝学的研究. *日本水産学会誌*, 46: 437–443.
- Umino, T., K. Morishima, K. Arai and H. Nakagawa. 1996. Influences of the first-feeding delay on subsequent growth and viability of clonal crucian carp, *Carassus langsdorffii*. *J. Appl. Biol. Sci. Hiroshima Univ.*, 35: 125–138.
- Umino, T., K. Arai, K. Maeda, Q. Zhang, K. Sakae, I. Niwase and H. Nakagawa. 1997. Natural clones detected by Multilocus DNA Fingerprinting in gynogenetic triploid Ginbuna *Carassius langsdorffii* in Kurose river, Hiroshima. *Fisheries Sci.*, 63: 147–148.
- Yamashita, M., H. Onozato, T. Nakanishi and Y. Nagahama. 1990. Breakdown of the sperm nuclear envelope is a prerequisite for male pronucleus formation: direct evidence from the gynogenetic crucian carp *Carassius auratus langsdorffii*. *Devel. Biol.*, 137: 155–160.
- Yamashita, M., J. Jiang, H. Onozato, T. Nakanishi and Y. Nagahama. 1993. A tripolar spindle formed at meiosis I assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp, Ginbuna *Carassius auratus langsdorffii*. *Develop. Growth & Differ.*, 35: 631–636.
- Zhang, F., T. Oshiro and F. Takashima. 1992. Chromosome synapsis and recombination during meiotic division in gynogenetic triploid Ginbuna, *Carassius auratus langsdorffii*. *Japan. J. Ichthyol.*, 39: 151–155.