

マルチプレックス PCR 法を用いた 琵琶湖水系産タモロコ属 2 種のミトコンドリア DNA の 簡易識別法：手法開発と南湖の産着卵への適用

馬淵浩司・西田一也・吉田 誠

〒 520–0022 滋賀県大津市柳が崎 5–34 国立環境研究所琵琶湖分室

(2019年9月19日受付；2020年1月9日改訂；2020年1月10日受理；2020年3月6日J-STAGE 早期公開)

キーワード：ホンモロコ、タモロコ、湖畔ヤナギ、産卵

魚類学雑誌
Japanese Journal of
Ichthyology

© The Ichthyological Society of Japan 2020

Kohji Mabuchi*, Kazuya Nishida and Makoto A. Yoshida. 2020. Multiplex PCR-based genotyping of mitochondrial DNA from two *Gnathopogon* species found in the Lake Biwa system: its development and application to field-collected eggs from the South Basin. Japan. J. Ichthyol., 67(1): 51–65. DOI: 10.11369/jji.19-033.

Abstract The endemic Lake Biwa species *Gnathopogon caerulescens* has become severely endangered since the 1990s due to deterioration of its spawning habitat, much of which was in the South Basin of the lake. To aid in the conservation of the species, a rapid molecular method was devised for discriminating it from a sympatric congener, *Gnathopogon elongatus*, widely distributed in western Japan. Three allele-specific primers were developed for the mitochondrial cytochrome *b* gene regions of three lineages of the two species: Cytb465hon_c for *G. caerulescens*, and Cytb315tam_e1 and Cytb246tam_e2 for the E1 and E2 lineages, respectively, of *G. elongatus*. Using the same reverse primer (Cytb522R), the specific primers for *G. caerulescens* and the E1 and E2 lineages of *G. elongatus* were designed to amplify ca. 80-, 230-, and 310-bp fragments, respectively. Multiplex PCR reactions including these four primers produced species/lineage-specific fragments. Although false fragments sometimes appeared, they did not affect discrimination between the two species. To demonstrate the efficacy of this method, field-collected eggs were analyzed, a total 1,238 eggs being collected from 37 egg populations on submerged roots of *Salix* trees (the spawning substrate preferred by *G. caerulescens*) on the coast of the South Basin between 18 April and 16 May 2019. Analysis of 298 eggs (approximately equal samples from each population) using a published DNA method resulted in 249 being successfully sorted into the genera *Gnathopogon* (206 eggs), *Carassius* (33), and *Cyprinus* (10). Subsequent analysis of the *Gnathopogon* eggs with our method detected 185 *G. caerulescens* and three *G. elongatus* (E1) eggs, 18 being unidentified. *G. caerulescens* eggs were included in 32 of the 37 egg populations from throughout the South Basin, except the southernmost region, indicating that the geographic distribution of spawning sites of the species is rapidly recovering to pre-1960s levels (based on literature estimates).

*Corresponding author: NIES Lake Biwa Branch Office, National Institute for Environmental Studies, 5–34 Yanagasaki, Otsu, Shiga 520–0022, Japan (e-mail: mabuchi.koji@nies.go.jp)

ホンモロコ *Gnathopogon caerulescens* はコイ科タモロコ属の小型魚類（全長 10cm ほど）で、琵琶湖水系の固有種である。重要な漁獲対象魚であり、1954–1995 年までは毎年 150–350 t の漁獲量があった（藤岡, 2013）。しかし、1996 年以降の漁獲量は急減し、1998 年には 30 t を割り、2002

年以降は 20 t を下回る水準で推移している。本種は戦前から釣魚として人気があり、多くの釣り客を関西圏から集めていたが（亀山, 1941）、1995 年から急に釣れなくなり（北原, 2018）、藤岡（2013）によると、南湖を中心に見られた早春のモロコ釣りの賑わいは、2013 年の時点では琵琶湖南湖の沿

岸からはまったくみられなくなっていた（ただし、詳細は後述するが、伊庭内湖など一部の内湖では2008年ごろから再びみられるようになっていた：亀甲ほか，2015）。

本種は、秋・冬季には琵琶湖・北湖（Fig. 1A）の沖合50–90mの深層域に生息しているが、4–6月を最盛期とする産卵のため、春先から沿岸の浅場へ移動する（中村，1969）。産卵場所は湖岸や内湖のヨシ帯およびこれらに流入する細流で（中村，1969）、とくに波に洗われるヤナギの根（Fig. 2）に好んで卵を産み付ける（藤岡，2013；亀甲，2019）。琵琶湖の南湖（Fig. 1A, B）は、水深が浅く（ $< 7\text{ m}$ ）面積的にも琵琶湖全体の11分の1以下を占めるに過ぎないが、かつての沿岸にはこのようなヤナギ（以下、湖畔ヤナギ）が多く、琵琶湖のホンモロコシの65%が産卵していたという推

計もある（びわ湖生物資源調査団，1966）。しかし、藤岡（2013）によると、この主要な産卵場であった南湖での産卵は1996年以降まったく認められていない。以上の状況を反映して本種は、滋賀県レッドデータブックでは絶滅危機増大種（滋賀県生きもの総合調査委員会，2016）、環境省のレッドリストでは絶滅危惧IA類（環境省，2019）、国際自然保護連合のレッドリストでは絶滅危惧種（EN）（Kanao and Hasegawa, 2019）として掲載されている。

個体数激減の理由としては、1992年に変更・開始された瀬田川洗堰による琵琶湖水位の新たな操作が主因とされている。ホンモロコシは水際のヤナギの根に好んで産卵するため、産卵期の人為的な水位低下の影響により、産着卵の多くが干出死亡してしまう事例が知られている（臼杵，2008）。激減の原因としてはこの他に、湖岸堤（Fig. 1B）等の建設による沿岸や内湖にある産卵場所への移動阻害や、オオクチバスやブルーギルによる卵や稚魚の捕食も考えられている（藤岡，2013）。また、主要な産卵場であった南湖での個体数減少については、水草の大量繁茂が北湖との間の移動を妨げている可能性も指摘されている（滋賀県農政水産部水産課，2016）。

一方、近年では、琵琶湖北湖の東岸に接続する2つの内湖、伊庭内湖と西の湖において産卵のための来遊個体数に回復がみられている。1995年以降全体的に釣れなくなっていたのが伊庭内湖では2007年頃から、西の湖では2013年頃から、流出河川を含めて再び釣れるようになり（北原，2012, 2013）、急増した遊漁者から来遊個体群を守るため2017年からは流入河川（投網やたもすくいによる遊漁が行われていた）での採捕規制が行われている（亀甲ほか，2018）。この2つの内湖で例外的に来遊数が回復した原因としては、比較的良好な内湖環境が保持されてきたことに加え（美濃部・桑村，2001；亀甲ほか，2014）、集中的な外来魚駆除（Shibata et al., 2011）や水田を使った種苗放流（亀甲ほか，2013）が奏功したと考えられている。同様の試みは、かつての大産卵場である南湖の一部、赤野井湾や下笠地区（Fig. 1Bの区間16と13に対応）でも行われており、水草の除去（滋賀県農政水産部水産課，2016）もおそらく好影響を及ぼして、ここ3年ほどは周辺部で産卵回復の兆しが認識されている（米田，私信）。なお、これらで行われた種苗放流では、耳石標識個体の放流・再捕実験も併せて行われ、冬季の北

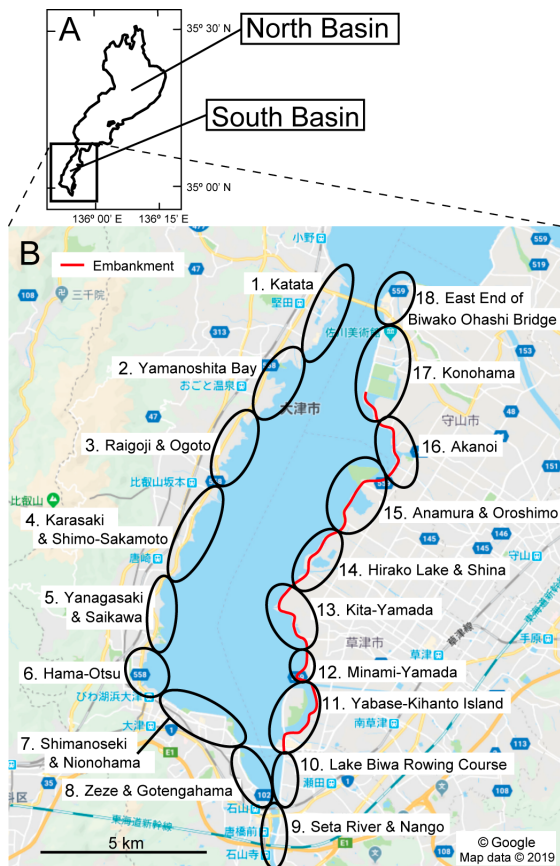


Fig. 1. The study area in Lake Biwa, Japan. A, Locations of the North and South Basins of Lake Biwa. B, The 18 study areas along the coast of the South Basin (embankment constructed from 1975 to 1991 indicated by red line). Area boundaries and names based on FISH-UP(1984), except those in area 18.

湖への移動とともに、繁殖個体の産卵回帰（産卵のために、稚魚期を過ぎた水田周辺や流下した内湖へ戻る）も確認されている（亀甲ほか，2015；亀甲，2016）。この産卵回帰の性質から、漁業や遊漁の対象となる接岸集団を沿岸各地で回復させるには、それぞれの地域における産卵集団の回復が必要であると推察される。

ホンモロコの個体群全体を 1995 年以前の水準まで回復させるためには、かつての主要な産卵場所である南湖について、沿岸の広い範囲で産卵が行われるようにすることが有効と考えられる。そのためにはまず、現在の南湖の産卵状況を把握することが出発点となる。しかし、琵琶湖の沿岸植物帯ではホンモロコと同時期（4-7 月）にフナ類やコイ、ワタカが水面付近の植物体に同様の卵を産み付けるため（Mabuchi, 2016）、産卵調査には注意が必要である。これら魚種の産卵期は、ホンモロコを先頭にこの順番で少しずつずれながら始まるが、それぞれの期間は大きく重複している（中村，1969）。また、どの産着卵もほぼ球形で、最大径は約 1-2 mm の範囲に収まる。種ごとに大小の傾向はあるが、種内の変異幅は魚種間で重複しており、大きさからの種判別は難しい。さらに、どの種の卵も産出後しばらくの色（卵黄の色）は淡黄であり、種によって薄く赤褐色（ゲンゴロウブナ）、橙色（ニゴロブナ）、褐色（コイ）、緑色（ワタカ）を帯びるとされているが（中村，1969）、発生が進んで卵黄が縮小した卵を外見から種同定することはほぼ不可能である。

琵琶湖沿岸にはさらに、同属のタモロコが生息していることも注意が必要である。本種は中部、北陸地方以西の本州と、高知県を除く四国に自然分布する日本固有種であるが（川瀬，2018）、琵琶湖周辺では、湖岸の水深 5m 以浅や内湖、およびこれらに通じる流れの緩やかな河川や灌漑水路に生息する（中村，1969）。産卵期はホンモロコより少し遅く 4 月中旬から始まるが、最盛期と終止期はほとんど同じで、期間は 4-7 月である（中村，1969）。産卵場所は、内湖あるいは流入河川・水路であり、ホンモロコと同様にヤナギの根や浮いている水草などに卵を産み付けるので、両者が入り混じって産卵している例も観察される（中村，1969）。産出直後の卵は、ホンモロコの卵と同様、淡黄色の球形で、卵径は約 1.3 mm とホンモロコ卵（約 1.3-1.6 mm）と比べてやや小さいものの、小型のホンモロコが産む卵とはほぼ同じである（中村，1969）。以上の状況から、外見や産卵場所か

らタモロコとホンモロコの卵を判別することは難しい。

以上のように判別の難しい別属や別種の卵を含む卵群に対して各卵の種を効率よく同定する方法としては、まず、ミトコンドリア DNA をターゲットとした塩基サイト特異的プライマーを用いたマルチプレックス PCR によって属判別（増幅断片の長さの違いで判別）を行い、次いで同様の方法で属内の種判別を行う手法が開発されており、その有効性は実例をもって示されている（馬淵ほか，2019）。しかし、ホンモロコを、同じタモロコ属のタモロコ *Gnathopogon elongatus* と識別するためのプライマーは開発されておらず、これまでは増幅断片のシーケンスにより判別されていた。そこで本研究では、これらタモロコ属の 2 種を簡便に PCR 判別できるようにするため、塩基サイト特異的プライマーを開発し、さらに、その有用性を示す一例として、南湖の各地点から採集した産着卵についてこれを試験的に適用した。その結果、2019 年シーズンのホンモロコ産卵について地理的な広がりを知見が得られたので、文献資料から推定した過去の産卵場所分布との比較を行った上で、今後の個体群回復について考察を行なった。

材料と方法

PCR プライマーの設計 プライマーの設計は、Kakioka et al. (2013) で使用されたミトコンドリアゲノム cytochrome *b* 遺伝子領域 1,125 bp の 16 個のハプロタイプに基づいて行った (Fig. 3)。Kakioka et al. (2013) は、分布域全体から得られたタモロコ 513 個体、ホンモロコ 56 個体についてこの遺伝子の後半部 598 bp にもとづく系統解析を行い、タモロコの中に 3 つの主要系統 (E1, E2, E3) が存在することと、ホンモロコ (系統 C) はそのうちの 1 つ (E1) と近縁であることを明らかにした。今回の研究で用いた参照ハプロタイプは、これら主要系統の遺伝的多様性を代表するよう当該の論文中で選ばれた 16 個であり、cytochrome *b* 遺伝子領域のほぼ全長をカバーしている。系統グループごとの内訳は、E1 が 5 個、E2 が 7 個、E3 が 2 個、C が 2 個である。

塩基配列のアラインメントは MAFFT (Katoh et al., 2017) でを行い、全長 1,125 bp のデータセットを得た。これを Mesquite (Maddison and Maddison, 2018) 上で検討し、cytochrome *b* 遺伝子領域の前半部の 3 箇所に E1, E2, C のハプロタイプをそ

それぞれ特異的に増幅する上流プライマーを1個ずつ作成した (Fig. 3)。なお、E3は長野県の天竜川水系のみから報告されており琵琶湖水系には分布しないことから (Kakioka et al., 2013)、今回のプライマー作成の対象とはしなかった。変異座位のうち246, 315, および465番目をターゲットとした塩基サイト特異的プライマーを作成した。このうち246番目の座位は、E2グループのハプロタイプではG、それ以外ではAであることから、プライマーの3'末端をGにしてE2グループのハプロタイプのみ matches するようにした。さらに、Sommer et al. (1992) に従い、PCR増幅の特異性を高めるためプライマーの3'末端から3塩基目にミスマッチとなる塩基を導入し、E2グループのDNA断片のみが増幅されるようにした。315および465番目をターゲットとした塩基サイト特異的プライマーでも同様の措置を行い、それぞれE1およびCグループのDNA断片のみが増幅されるようにした。

以上のようにして作成した3つのプライマーは次のとおりである：Cytb246tam_e2 (5'-CGGATGATTTATCCGAAATCTG-3'), Cytb315tam_e1 (5'-GAGGCCTATATTACTGG-3'), Cytb465hon_c (5'-ATTATCAGCAGTTCCACAT-3')。これらのプライマーは全長1,125 bpのデータセット上ではそれぞれ、225-246, 299-315, 447-465番目の塩基に対応している (Fig. 3)。一方、これらに対応する下流プライマーには、同じ遺伝子領域の中央部に設計されたコイ属・フナ属・タモロコ属・ワタカの共通プライマーCytb522R (5'-GCAAAGAATCGTGTARTGTTGCATT-3') (Mabuchi, 2016) を用いた。このプライマーは、本研究で用いている全長1,125 bpのデータセットでは504-529番目の塩基に対応しているため、以上のプライマーにより増幅されるDNA断片のサイズは、検体のmtDNAがタモロコのエ2グループのものなら約310 bp、同E1グループのものなら約230 bp、ホンモロコのものなら約80 bpの断片となる。なお、今回ターゲットとしなかったE3グループのmtDNAでは、上の3つのプライマーのどれもマッチしないので、DNA断片は増幅されないと予想される。

テストサンプルの調整とシーケンス 上記プライマーの増幅特異性を確認するため、琵琶湖水系から採集されたホンモロコ7個体、タモロコ8個体の合計15個体をテストサンプルとした (Table 1)。各個体から対鰭の先端を切り取り99.5%エタノールで固定後に-30°Cで保管し、後日、カネカ

簡易DNA抽出キット Ver. 2 (カネカ) を用いてDNAを抽出した。すべてのDNAサンプルについて、ターゲット領域であるcytochrome *b* 遺伝子領域の前半部について以下のように塩基配列の決定を行い、上述の系統グループ (E1, E2, C) のいずれであるかを確認した。塩基配列決定のための上流プライマーにはCytb51LD (5'-TTAAAATCGCTAACGACTCA-3') (馬淵・西田, 2006)、下流プライマーには上述のCytb522Rを用いた。この2つを用いたPCR反応液5 μ lの組成は、EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa) が2.5 μ l (最終濃度は規定濃度)、5 μ M primer が0.5 μ l \times 2 (最終濃度はそれぞれ0.5 μ M)、distilled water が1 μ l、template DNA が0.5 μ l (最終濃度は1-10 ng/ μ l)。この反応液を用いて、Thermal Cycler Dice Touch (TaKaRa) 上で次の反応を行った：94°C・5分の熱変性後、94°C・15秒の熱変性、50°C・15秒のアニーリング、72°C・30秒の伸張反応の3ステップを30サイクル、最後に72°C・2分の伸張反応。PCRの増幅断片長 (約520 bp) の電気泳動解析は3%アガロースゲル上で100 V, 15分で行い、サイズマーカーには100 bp DNA Ladder H3 RTU (NIPPON Genetics) を用いた。目的サイズの増幅断片を確認後、PCR産物をUSB社のExoSAP-ITで処理し、BigDye Terminator Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。反応には、PCR増幅に用いた2つのプライマーをそれぞれ用い、塩基配列の決定はABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 上で行った。

テストサンプルによる増幅特異性確認 上で設計した塩基サイト特異的プライマーについて、15個体のテストサンプルをマルチプレックスPCRすることにより、増幅特異性を確認した。PCR反応液5 μ lの組成は、GoTaq Green Master Mix (Promega) が2.5 μ l (最終濃度は規定濃度)、5 μ M primer が0.2 μ l \times 4 (最終濃度はそれぞれ0.2 μ M)、distilled water が1.2 μ l、template DNA が0.5 μ l (最終濃度は1-10 ng/ μ l)。用いたプライマー合計4つのうち、上流プライマーはCytb246tam_e2, Cytb315tam_e1, Cytb465hon_cの3つ、下流プライマーはCytb522Rの1つ (全てシグマアルドリッチジャパン合同会社製で脱塩精製)。この反応液を用いて、LifeECO (BioER) 上で次の反応を行った：94°C・5分の熱変性後、94°C・15秒の熱変性、52.5°C・15秒のアニーリング、72°C・30秒の伸張反応の3ステップを30サイクル、最後に72°C・2分の伸張反応。PCRの増幅断片長の電気泳動解

Table 1. Specimens of the two *Gnathopogon* spp. examined in this study. Two entire specimens (asterisked) were deposited in the Kanagawa Prefectural Museum of Natural History [voucher numbers, KPMNI 52130 (*) and 52153 (**)]

Sample code	Location	Collection date	Haplotype group	Accession no.
<i>Gnathopogon caerulescens</i>				
B30	North Basin of Lake Biwa (Purchased at a fish market)	12 Sep. 2017	C	LC497079
B31	North Basin of Lake Biwa (Purchased at a fish market)	12 Sep. 2017	C	LC497081
B32	North Basin of Lake Biwa (Purchased at a fish market)	12 Sep. 2017	C	LC497082
B77	North Basin of Lake Biwa (Purchased at a fish market)	14 Nov. 2017	C	LC497080
B96*	North Basin of Lake Biwa (Purchased at a fish market)	19 Nov. 2017	C	LC497079
B97	North Basin of Lake Biwa (Purchased at a fish market)	19 Nov. 2017	C	LC497079
B98	North Basin of Lake Biwa (Purchased at a fish market)	19 Nov. 2017	C	LC497081
<i>Gnathopogon elongatus</i>				
B247	Anjiki River, Hikone City, Shiga Pref.	2 Jan. 2018	E2	LC497085
B313**	Drainage channel in Natsumi, Konan City, Shiga Pref.	30 Jan. 2018	E1	LC497083
B314	Drainage channel in Natsumi, Konan City, Shiga Pref.	30 Jan. 2018	E1	LC497083
B326	Yuradani River, Konan City, Shiga Pref.	4 Feb. 2018	E2	LC497084
B327	Yuradani River, Konan City, Shiga Pref.	4 Feb. 2018	E2	LC497084
B328	Yuradani River, Konan City, Shiga Pref.	4 Feb. 2018	E1	LC497083
B329	Yuradani River, Konan City, Shiga Pref.	4 Feb. 2018	E2	LC497084
B406	Drainage channel in Mori, Otsu City, Shiga Pref.	7 Apr. 2018	E1	LC497083

析は、テストサンプルのシーケンス時と同じ方法で行った。増幅された断片が目的のものであることを確認するため、各増幅断片に対応する上流プライマーを用いて前項と同じ方法で塩基配列の決定を行った。

卵群サンプルの採集と DNA 抽出 2019 年の 4 月 18 日から 5 月 16 日までの間に、琵琶湖南湖（一部は北湖の隣接部）の湖岸で採集を行った。ホンモロコは水際のヤナギ（湖畔ヤナギ）の根に好んで産卵することから、本種の産着卵をできるだけ多く検出するため、このような場所（Fig. 2）で産着卵を探索し、徒手で採集した。産着卵の探索を行った地点は、卵を発見できなかったところも含めて地理的な位置の緯度・経度を GPS 端末 GPSMAP 64s（Garmin）で記録した。卵群のサンプルは、基本的に約 10 個以上が付着しているヤナギの根の末端（Fig. 2B）ごと採集し、水を入れた 15 ml のプラスチックチューブに入れて持ち帰った。持ち帰った卵はその日のうちに 99.5% エタノールで固定したが、チューブ中で孵化した仔魚も同様に固定した。これらのサンプルは固定後すぐに -30°C で保管し、後日、カネカ簡易 DNA 抽出キット Ver. 2（カネカ）を用いて 1 卵（または孵化仔魚 1 個体）ずつから DNA を抽出した。抽出の対象とした卵（または孵化仔魚）は各卵群サンプルから基本的には 8 個（4–12 個）をランダ



Fig. 2. Photographs of lake-side *Salix* trees, their submerged roots being the preferred spawning substrate of *Gnathopogon caerulescens*. A, Tree growing on the natural lake shore in area 2 (see Fig. 1). B, Root carpet of the tree in A, from which egg-population sample G858 (for details, see Table 2 and Fig. 5) was collected. C, Tree growing on the artificial stone revetment in area 15 (see Fig. 1). D, Close up of wave-washed roots of the tree in C, from which egg-population sample G731 was collected.

ムに選んだ。なお、抽出作業の最初のステップでは Proteinase K（Promega）を添加してタンパク質の消化力を増強し、抽出後はエタノール沈殿（中山・西方，1995）で更なる精製を行なった。

卵群サンプルの PCR 種判別 上述のようにして採集した卵の中には、ホンモロコ、タモロコを

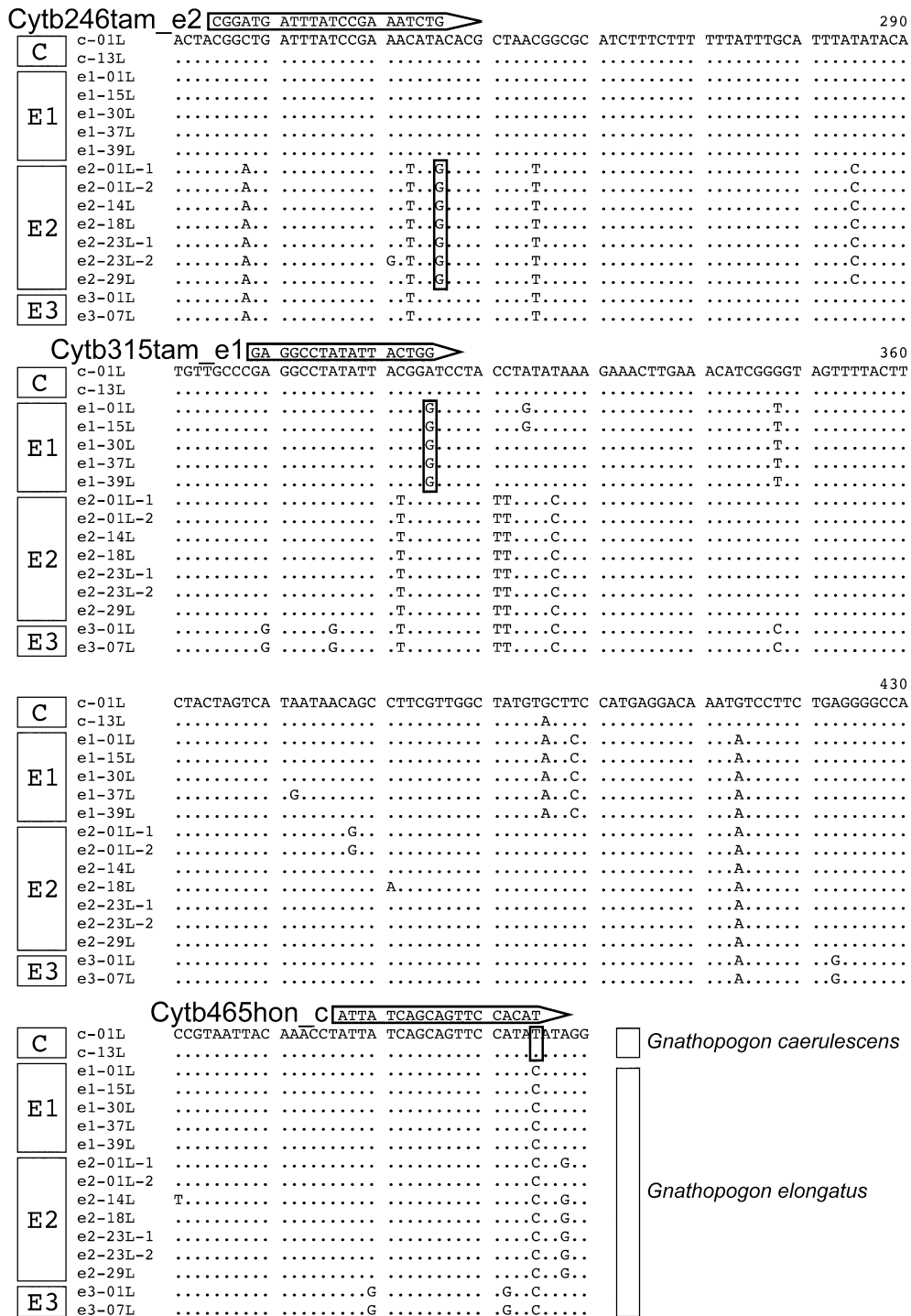


Fig. 3. Sequences and locations of the three allele-specific primers (Cytb246tam_e2, Cytb315tam_e1, and Cytb465hon_c) designed in this study, with aligned sequences of the cytochrome *b* gene regions of 2 and 14 published haplotypes from *Gnathopogon caerulescens* and *G. elongatus*, respectively. Nucleotide positions are numbered according to the aligned data. Nucleotides identical to the first sequence are denoted by dots. Mitochondrial (mt) DNA haplotype groups revealed by Kakioka *et al.* (2013) are indicated to the left of the haplotype names: *G. caerulescens* includes only a single haplotype group (C), whereas *G. elongatus* includes three groups (E1, E2, and E3). Because the haplotypes of the E3 group do not occur in the Lake Biwa system (known only from the Ina Valley, Nagano Prefecture), primers were developed to discriminate between the remaining three groups: C, E1, and E2. With a reverse primer (Cytb522R), these three primers amplified 80-, 230-, and 310-bp fragments, respectively, for the C, E1, and E2 group haplotypes.

含むタモロコ属の他にも、フナ属やコイ属の卵も含まれている可能性があるため、以下のような段階的な DNA 種判別を行なった。ニゴロブナとギンブナの判別以外は、ミトコンドリア DNA をターゲットとした塩基サイト特異的プライマーによる PCR 種 (属) 判別 (増幅断片の長さの違いで判別) を用いた。最初のステップでは、Mabuchi et al. (2016) の方法により、コイ属、フナ属、タモロコ属、ワタカのいずれの卵であるかを判別した。ついで、コイ属の卵と判定されたものについては、馬淵・西田 (2006) の方法により、在来コイか国外からの導入コイかを判別した。フナ属の卵については、まず、Mishina et al. (2014) の方法により、ゲンゴロウブナか、それ以外かを判別し、後者と判定されたものについては、Mishina et al. (2014) を一部改変した馬淵ほか (2019) の方法を用い、マイクロサテライト多型解析によるゲノム倍数性判定に基づいてニゴロブナ (2 倍体) とギンブナ (3 倍体) を判別した。タモロコ属の卵については、今回開発した塩基サイト特異的プライマーを用いて、ホンモロコかタモロコかを判別した。以上の一連の判別ステップは、最後のタモロコ属の判別以外は、馬淵ほか (2019) の Fig. 3 にまとめられている一連のステップと全く同じである。以上の一連の解析で、PCR 増幅は LifeECO (BioER) または Thermal Cycler Dice Touch (TaKaRa) で行い、ミトコンドリア DNA の増幅断片長の電気泳動解析はテストサンプルのシーケンス時と同じ方法で行った。また、フナ属のマイクロサテライト多型解析は、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 上で行い、サイズマーカーには GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

なお、本研究で開発したプライマーでマルチプレックス PCR した際、ごく少数ながら比較的濃いサブバンドが出たサンプルがあったが、これについては、以下のプライマーペアでターゲット領域全体をカバーする断片を PCR 増幅し、上述と同じ方法で塩基配列を決定し種判別を行った：L14724 (5'-TGA CTTGAARAACCA YCGYYG-3') (Palumbi et al., 1991) ; H15915 (5'-ACCTCCGATC TYCGGATTACAAGA-3') (Aoyama et al., 2000)。

過去の産卵場の推定 南湖における過去の産卵場の広がりについては、本研究以前に産卵行動や産着卵の分布を広範囲に調査したデータが見当たらず、実証的な例を示すことは困難である。しかし、南湖における成魚の出現・接岸が産卵のためという特殊な事情を考慮すると、かつて盛んであっ

たホンモロコ釣りの「釣り場情報」からある程度推定可能と考えられる。この仮定にもとづき、戦前の 1941 年以降に出版された書籍や雑誌等で紹介されている釣り場情報から、ターゲットとして「ホンモロコ」と明記されている場所を抜き出し、この場所が含まれる区域 (Fig. 1) を産卵区域と判定して表にまとめた。なお、入手できた文献のうち、京都新聞社 (1994) では「ホンモロコ」の他に「モロコ」という名称も使用され、混称されることが多いタモロコやスゴモロコ類がホンモロコと区別されていることが推測できたが、佐々木 (2015) では、「モロコ」という名称のみが使用され、ホンモロコのみを指すのかどうか判然としなかった。このため、この文献は今回の産卵場推定には使用しなかった。また、琵琶湖南湖の釣り場紹介雑誌としては、つり人社の発行する一連のシリーズがあるが、これらも基礎資料としては用いなかった。これらはバスやコイの他にコアユやワカサギなど小型魚の釣り場情報も掲載されているが (佐藤, 2011; つり人社 CPG 編, 2019 など)、ホンモロコに関しては、釣り場として復活している伊庭内湖や西の湖の項目でも情報が掲載されておらず (佐藤, 2014)、記述の対象魚種とされていない可能性がある判断した。以上から、今回の南湖におけるホンモロコの産卵場推定には、亀山 (1941)、山口 (1963)、FISH-UP 編集部 (1984)、京都新聞社 (1994) の計 4 編の文献を利用した。

結 果

プライマーの増幅特異性の確認 テストサンプルとして用いた琵琶湖水系産のホンモロコ 7 個体、タモロコ 8 個体の cytochrome *b* 遺伝子領域の前半部 (約 460 bp) の塩基配列を決定したところ、ホンモロコ 7 個体はすべて C グループのハプロタイプを持ち、タモロコ 8 個体のうち 4 個体 (B313, 314, 328, 406) は E1 グループの、残りの 4 個体 (B247, 326, 327, 329) は E2 グループのハプロタイプをもっていた (Table 1)。各個体のトータル DNA について、本研究で設計したプライマーでマルチプレックス PCR を行ったところ、各個体の塩基配列から予想されるサイズの増幅断片 (バンド) が観察された (Fig. 4A)。ただし、E2 系統のハプロタイプを持つタモロコのサンプルについては、ホンモロコに対応する小さいサイズのサブバンドがやや明瞭に (本バンドよりは薄く) 出た場合があった (Fig. 4A の B247)。テストサンプル

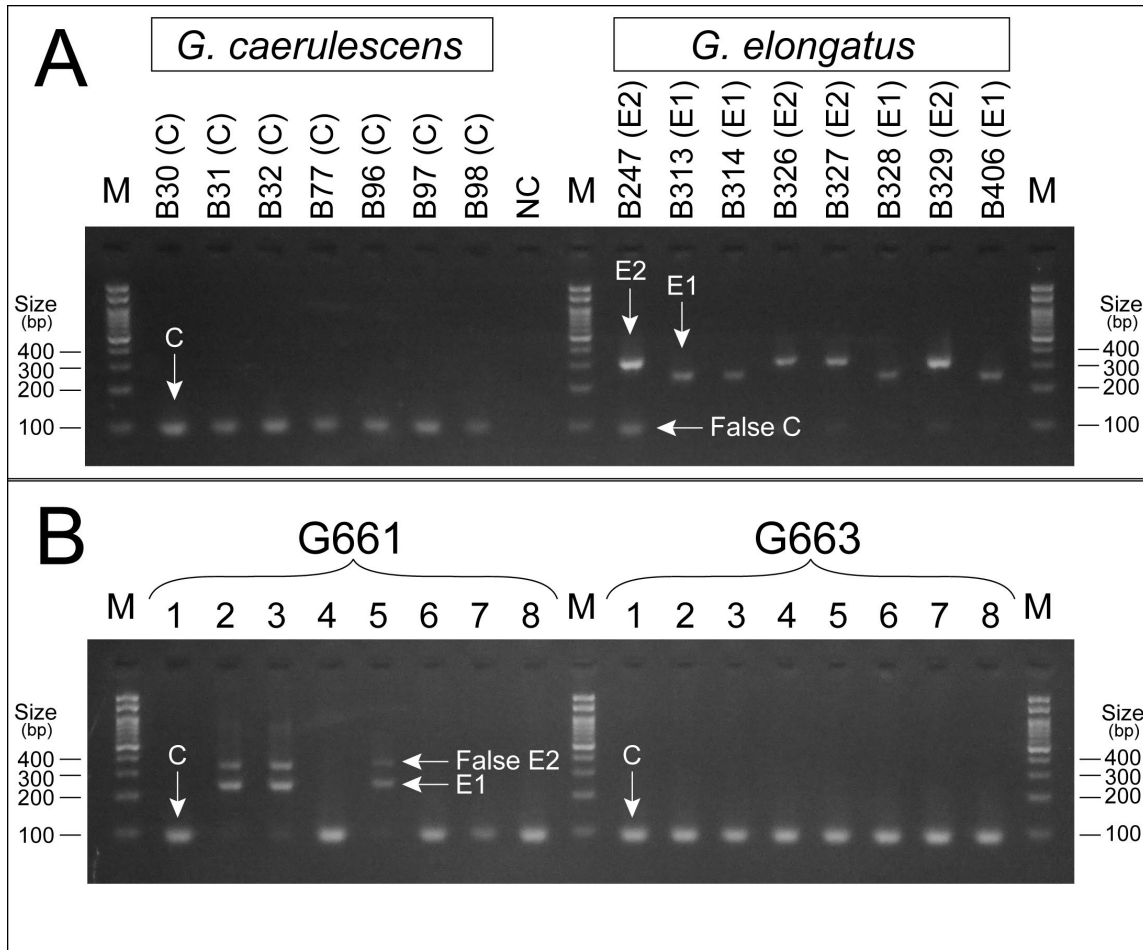


Fig. 4. Electrophoresis gel images of multiplex PCR products amplified by a primer set including the following four primers: Cytb246tam_e2, Cytb315tam_e1, Cytb465hon_c, and Cytb522R. “M” is a size marker. A, PCR amplification of DNA from seven *Gnathopogon caerulescens*, a negative control (NC), and eight *G. elongatus*. For specimen codes, see Table 1. The mtDNA haplotype group revealed by direct sequencing of the targeted gene region (ca. 460 bp) is indicated in parentheses after each specimen code. Although a false band [size similar to that of the group C haplotype (ca. 80 bp)] was observed for B247, it was thinner than the true band for E2 (ca. 310 bp). B, PCR amplification of DNA from 16 eggs from two egg-population samples: G661 (8 eggs) and G663 (8 eggs). False bands (sizes similar to that of the group E2 haplotype) were observed for egg nos. 2, 3, and 5 of G661, but the bands (ca. 350 bp) were slightly larger than that for the group E2 haplotype (ca. 310 bp); direct sequencing of the entire target region (ca. 460) demonstrated that these three eggs shared a haplotype identical to the single E1 group haplotype detected in test samples B313, 314, 328, and 406 (accession no, LC497083).

全 15 個体それぞれの増幅サンプルについて対応する上流プライマーでダイレクトシーケンスを行ったところ、サブバンドが出た B247 も含めて、目的の遺伝子領域と一致するシーケンスが、期待されるサイズで得られた

南湖沿岸の卵群サンプルへの適用 各区間の湖畔ヤナギで採集された卵群の詳細（採集地点の位置情報を含む）と卵が発見されなかった地点の位置・日付情報は Table 2 のとおり。2019 年の 4 月 18 日から 5 月 16 日の間の 29 日間に合計 37 の卵

群、1,238 個の卵が採集された。

各卵群について 8 個ずつ（ただし G656 は 4 個、G828 は 10 個、G823 は 12 個）、合計 298 個の卵について DNA 種判別を行ったが、PCR 増幅の不調により、判別が最後まで完了できない事例が各段階で生じた。その結果、属が不明のものが 49 個（16%）、タモロコ属だが種が不明のものが 18 個（6%）、フナ属だが種・亜種が不明のものが 7 個（2%）、ニゴロブナ（2 倍体）かギンブナ（3 倍体）かが不明のものが 3 個（1%）、コイ属だが

Table 2. Numbers of eggs collected (PCR analyzed) from each egg population (coded as Gnnn) with 2019 collection date and GPS data for collection location. Collection area numbers (1–18) correspond to those in Figs. 1 and 5. Date and location also indicated for zero eggs collected, indicated by codes, such as Xn_yymmdd

Code	N. of eggs	Date	Area No.	Latitude	Longitude
G665	32 (8)	21 April	1	35.12372	135.92860
X1_190514	0 (0)	14 May	1	35.10779	135.91771
X2_190514	0 (0)	14 May	1	35.10901	135.91971
G663	28 (8)	21 April	2	35.09742	135.91013
G664	26 (8)	21 April	2	35.09773	135.91029
G857	55 (8)	14 May	2	35.10263	135.91524
G858	61 (8)	14 May	2	35.10407	135.91550
G699	26 (8)	24 April	3	35.07256	135.89083
X1_190421	0 (0)	21 April	4	35.04853	135.87450
G683	34 (8)	23 April	4	35.05656	135.87888
X1_190501	0 (0)	1 May	4	35.05408	135.87605
G823	11 (12)	11 May	4	35.04470	135.87231
X2_190511	0 (0)	11 May	4	35.04448	135.86995
G824	20 (8)	11 May	4	35.04346	135.86870
X1_190511	0 (0)	11 May	5	35.03689	135.86932
G821	32 (8)	11 May	5	35.03304	135.86754
G822	25 (8)	11 May	5	35.03607	135.86795
G827	16 (8)	13 May	6	35.02266	135.86324
G828	10 (10)	13 May	6	35.02280	135.86324
X1_190430	0 (0)	30 April	9	34.97877	135.90779
X2_190430	0 (0)	30 April	9	34.97559	135.90806
G666	22 (8)	21 April	11	34.99780	135.90693
G667	17 (8)	21 April	11	34.99765	135.90686
X4_190503	0 (0)	3 May	11	35.01103	135.92052
X5_190503	0 (0)	3 May	11	35.00122	135.90978
G788	10 (8)	10 May	11	34.99783	135.90694
G743	94 (8)	3 May	12	35.02344	135.91729
G744	85 (8)	3 May	12	35.02310	135.91734
G745	59 (8)	3 May	12	35.02290	135.91731
G730	xx (8)	27 April	13	35.03381	135.91236
G741	45 (8)	30 April	13	35.02815	135.91402
G661	10 (8)	20 April	14	35.04759	135.91658
G662	22 (8)	20 April	14	35.04849	135.91671
G742	60 (8)	30 April	14	35.05076	135.91744
G825	22 (8)	12 May	14	35.04842	135.91672
X1_190512	0 (0)	12 May	14	35.05272	135.92144
G826	24 (8)	12 May	14	35.05186	135.92075
X1_190427	0 (0)	27 April	15	35.05824	135.92940
G731	33 (8)	27 April	15	35.06989	135.93474
G645	17 (8)	18 April	16	35.08319	135.94621
G739	98 (8)	29 April	17	35.09192	135.93893
G740	27 (8)	29 April	17	35.09621	135.93703
G656	4 (4)	20 April	18	35.12221	135.94330
G657	22 (8)	20 April	18	35.12233	135.94341
G658	30 (8)	20 April	18	35.12268	135.94366
G659	11 (8)	20 April	18	35.12477	135.94620
G660	11 (8)	20 April	18	35.12715	135.94888
G887	49 (8)	16 May	18	35.11922	135.94179
G888	65 (8)	16 May	18	35.11890	135.94210

系統が不明のものが1個 (<1%) あった。属名が判明した249個の内訳は、タモロコ属が206個(83%)、フナ属が33個(13%)、コイ属が10個(4%)だった。タモロコ属と判別された卵206個のうち種不明は18個、残り188個のうちホンモロコは185個(98%)、タモロコは3個(2%)だった。

なお、今回開発したプライマーによるマルチプレックスPCRによりホンモロコと判定された卵は、全てホンモロコに対応する約80bpのシングルバンドにより判定された。また、タモロコのE2グループと判定された卵はなく、この系統の一部のテストサンプル(Fig. 4AのB247)で観察された

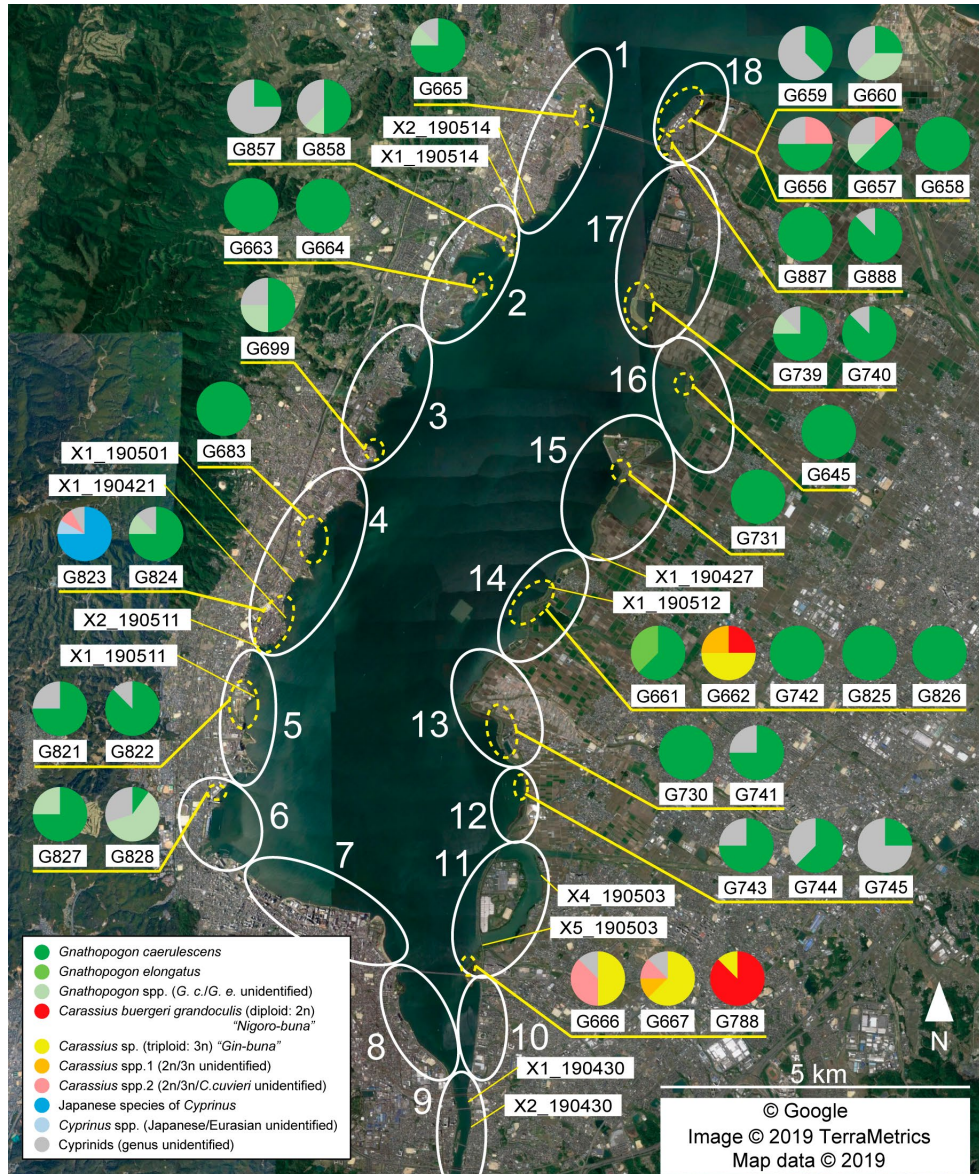


Fig. 5. Species/subspecies composition of the 37 egg populations marked on the Google Earth aerial view of the study area (original picture taken on 19 April 2018: white ellipses correspond to the 18 areas in Fig. 1 and Table 3). Names of the egg populations (Gnnn) are listed below each pie chart. Numbers of eggs collected (PCR analyzed), date of collection and GPS data of the collection point for each egg population given in Table 2. Pie charts are grouped by egg collection site. Eggs of *Gnathopogon caerulescens* were detected from all coastal areas of the South Basin, except the southernmost region (area nos. 7–11). Locations at which no eggs were found are represented by codes such as Xn_yymmdd and marked on the map (GPS data, see Table 2).

ような、E2 グループのバンド（約 310 bp）にホンモロコの「偽の」バンド（約 80 bp）が同時に現れるようなサンプルも存在しなかった。

卵群ごとの種組成（および卵が発見されなかった地点の位置）を地図上にマッピングした結果は Fig. 5 のとおり。全部で 37 の卵群のうち 32（86%）の卵群にはホンモロコと同定された卵が含まれ、属・種が不明の卵を考慮外とすると、この 32 卵群のうち 29（91%）の卵群は 100% ホンモロコの卵で占められていた。ホンモロコ卵を含む卵群で別種の卵が混在していたのは G656, 657, 661 の 3 つのみで、G656 と G657 ではフナ属卵がそれぞれ 1 個、G661 ではタモロコ卵が 3 個含まれていた。ホンモロコ卵が含まれなかった卵群は 5 つのみで、うち 4 つ（G662, 666, 667, 788）はフナ属、1 つ（G823）はコイ属とフナ属の卵を含んでいた。なお、上述の G661 のタモロコ卵 3 個は、種判別 PCR の際、E1 ハプロタイプに対応するバンド（約 230 bp）の他に、E2 ハプロタイプのバンド（約 310 bp）よりやや大きなサブバンド（約 350 bp）が見られたため（Fig. 4B）、ターゲット領域より外側のプライマーで PCR 増幅してシーケンスを行った。得られた 3 つの塩基配列は全て、テストサンプルから得られた E1 グループのハプロタイプ（LC497083）と同一だった。

産着卵の探索対象とした湖畔ヤナギ（Fig. 2）は、南湖湖岸の 18 区間のうち、7, 8, 10 番の 3 区間を除く 15 区間に存在した（Fig. 5）。このうち区間 9 では産着卵が発見できず（X1_190430, X2_190430）、11 では産着卵が発見できなかったか（X4_190503, X5_190503）、または、あったとしてもフナ属の卵だった（G666, 667, 788）。以上から、ホンモロコの卵が検出された区間は、1-6 と 12-18 だった。

過去の産卵場の推定 文献にもとづいて推定した、南湖における過去の産卵区間（Fig. 1）の分布と、産着卵の解析に基づく 2019 年の産卵区間の分布は Table 3 のとおり。1941, 1963, 1984 年には 18 区間中 15-16 区間が産卵区間として推定されたが、1994 年には 7 区間にまで落ち込んだ。1941-1984 年の間は、すべての区間が少なくとも一度は産卵区間になっていたと推定された。2019 年の産着卵調査では、18 区間中 13 区間で産卵が確認された。

考 察

プライマーの有効性 開発したプライマーによるマルチプレックス PCR は、各テストサンプル（成魚の鱗から調整）について、塩基配列から期待されるサイズの DNA 断片（3 つの系統グループ C, E1, E2 でサイズが異なる）を増幅した（Fig. 4A）。さらに、増幅断片のダイレクトシーケンスの結果もターゲットとした遺伝子領域と一致した。以上から、本研究において設計されたプライマーは、琵琶湖水系産のタモロコ属の 3 つの系統グループひいては 2 種の mtDNA を識別するのに有効であると考えられた。

なお、E2 系統のハプロタイプを持つタモロコのテストサンプルについては、ホンモロコに対応するサイズのサブバンドが観察される例があったが（Fig. 4A の B247）、このサブバンドは「正解」の E2 バンドより明瞭に薄く、一方のホンモロコのテストサンプルでは、タモロコに対応する「偽の」バンドが全く生じなかったため、ホンモロコの C とタモロコの E2 の判別に支障は出ないと考えた。また、応用例である卵サンプルでは、約 230 bp の E1 バンドとともに、約 350 bp のサブバンド（約 310 bp の E2 バンドよりやや大きい）が観察される例があったが（Fig. 4B の G661 の 2, 3, 5）、より外側のプライマーペアによる PCR（バンドは 1 本だけ出現）とその増幅断片のシーケンスによって、E1 ハプロタイプであることが確認できた。このタモロコ（E1）卵の事例では、「偽の」E2 バンドに注意する必要があるが、サイズを注意深く観察することによって正解のバンドが E1 バンドだけであることが判断でき、またたとえ両者間の判別に迷ったとしても、ホンモロコと間違えることはない。以上の検討結果から、本研究において設計されたプライマーは、マルチプレックス PCR でサブバンドが生じる場合があるものの、上に記述した 2 つのパターンを認識していれば、ホンモロコとタモロコの判別には、問題なく利用できる判断した。

2019 年のホンモロコ産卵の広がり 本種の産着卵は、区間 7-11 で検出されなかったものの、18 区間の 3 分の 2 を上回る 13 区間で検出され、南湖の広い範囲で産卵が行われていたことが証明された（Fig. 5）。この結果は、藤岡（2013）が記述している「（1996 年以降は）主要な産卵場のあった南湖ではまったく産卵が認められないようになっており、この状況は現在も続いている」という数

Table 3. Presumed *Gnathopogon caerulescens* spawning areas in the South Basin of Lake Biwa, based on fishing spot information from fishing guides, with the areas confirmed by field-collected eggs in the present study. For each area location, see Figs. 1 and 5. References: #1, Kameyama (1941); #2, Yamaguchi (1963); #3, FISH-UP (1984); #4, The Kyoto Shimbun (1994). Because *G. caerulescens* migrates from the North Basin to the South Basin each spring to attach eggs to coastal vegetation, its occurrence in a coastal region implies the existence of spawning sites in that region

Reference	#1	#2	#3	#4	Present study
Publication Year	1941	1963	1984	1994	
Area					
1	x	x	x	x	X
2	x	x	x	—	X
3	x	x	x	x	X
4	x	x	x	x	X
5	x	x	x	x	X
6	x	x	x	—	X
7	x	x	x	x	—
8	n.m.	x	x	x	—
9	n.m.	n.m.	x	—	—
10	x	x	x	—	—
11	x	x	x	—	—
12	x	x	—	—	X
13	x	x	—	—	X
14	x	x	x	x	X
15	x	x	x	—	X
16	x	x	—	—	X
17	x	x	x	—	X
18	n.m.	—	x	—	X

“x” indicates presence of fishing spot(s) for *G. caerulescens* in the spawning season (“X” in present study indicates eggs of *G. caerulescens* collected)

“—” indicates absence of fishing spots for *G. caerulescens* (“—” in present study indicates no eggs of *G. caerulescens* found)

“n.m.” indicates area not mentioned in fishing guides

年前の状況（調査方法等詳細は不明）とは対照的である。

文献に基づく過去の産卵場所の推定 戦前の1941年から、個体群が大幅に縮小する直前の1994年までに出版された文献に掲載されているホンモロコの釣り場情報に基づく、少なくとも1963年までは、南湖沿岸の全域で本種が釣れており、産卵が行われていたと推定される (Table 3)。しかし、1984年には湖岸堤 (Fig. 1B) の建設が進んでいた西岸の一部 (区間 12, 13, 16) で釣れなくなっており、ほぼ工事が完了した1994年には一部 (区間 14) を除いて西岸 (区間 10–18) ではほとんど釣れなくなっていた。これ以降はホンモロコの産卵場を推定できる適切な文献が見つからなかったため区間ごとの状態を議論することは難しいが、上述の藤岡 (2013) や北原 (2018) で記述されている概況から判断すると1995年以降から近年までは、南湖での産卵はほとんど行われ

ていなかったと推測される。

南湖における産卵回復の要因 釣り場情報にもとづいて推定した過去の産卵区間を、産着卵のDNA調査による本研究の結果と比較すると (Table 3)、2019年に観察された産卵区域の広がり、南湖岸全域にわたって産卵が行われていた1960年代までの状態に近づいているように見える。

では、2019年の南湖で観察された広範囲にわたる産卵回復は、どのような原因によってもたらされたのだろうか。赤野井湾や下笠地区 (区間 16と13) の局所的な回復については、第一に種苗放流や外来魚・水草の駆除などこの地域で集中して行われた対策が奏功しているの自然である。一方、Fig. 5に示されたような南湖全域 (後ほど議論する一部領域を除いた) での産卵回復には、広範囲に影響を及ぼした別の要因も考える必要がある。水草の除去は赤野井湾や下笠地区以外の南湖の複数地点でも行われており (滋賀

県琵琶湖政策課, 2014), また, ここ3年ほどは南湖の水草の量が少なく(滋賀県, 2018), さらに2018年の外来魚の量が全湖的に少なかったこと(読売新聞, 2019)等が要因として考えられる. 一部の内湖でホンモロコが回復した要因として外来魚の駆除が大きいと考えられていることを考慮すると(亀甲ほか, 2015; 亀甲, 2016), 2019年の南湖で観察された広範囲にわたる産卵回復には, とくに外来魚の全湖的な減少が効いている可能性が高いと考えられるが, 水草と外来魚およびホンモロコの間量的関係については今後の課題である.

なお, 産卵場所の大幅な拡大は, 生まれた場所とは距離的に大きく離れた場所で産卵を行なった個体がいることを想像させ, 上述したホンモロコ親魚の産卵回帰の傾向と矛盾するように見える. しかし, 回帰する場所はある程度の広がりを持っており(亀甲ほか, 2015; 亀甲, 2016), 回帰場所を徐々にずらしながら数年をかけてエリアを拡大したと考えれば, ある程度納得がいく. ただし, その実態を解明するには, 詳しい調査が必要と考えられる.

南湖の南端領域での産卵回復に向けて 推定した過去の産卵区間との比較から(Table 3), 2019年の産卵区域の広がり, 来遊群が衰退する以前の状況に大きく近づいているものの, 南端領域(区間7-11)での回復にはまだ至っていないことがわかる.

産卵の回復が検出できなかったこの領域は, 区域11を除いて高度に人工護岸化されており, 湖畔ヤナギだけでなく他の植物も含めた水際の抽水植生がほぼ存在しない. また, 区間11も, 矢橋帰帆島(人工島)の対岸に湖畔ヤナギが点在するが, 島影に位置するために根元を洗う波が非常に少ない. このように, 今回の調査でホンモロコ卵が検出できなかった領域は, 産卵場所として利用されにくい状態にあると考えられる.

南端領域での産卵回復策としては, 産卵場所として利用される環境を整備することが重要と考えられる. 区間7-10はすでに高度に人工護岸化されているが, 今回, 他の領域で部分的に人工護岸化された場所も調査した結果, 石質の人工護岸環境でも, Fig. 2C, Dのように湖畔ヤナギが一本でも根付いていれば産卵に利用される場合があるのが観察された. 具体例として, 区間3のG699, 区間5のG821, 822, 区間13のG741, 区間14のG661, 742, 825, 826, 区間15のG731, 区間

17のG739, 740, 区間18のG657, 658, 659, 660がこの例に当てはまる(このような場所は, 湖岸堤のある西岸の区間11-18の範囲に多かった). したがって, 区間7-10でも, 同様の環境にこのようなヤナギを少数でも植栽すれば, 産卵場所として機能することが期待される.

しかし, 湖畔ヤナギを植栽する場所の条件は慎重に検討すべきかもしれない. なぜなら, 近接した湖岸にある湖畔ヤナギを同じ日に調べた場合でも, ホンモロコ産卵の存在した木と発見できなかった木があったからである(Table 2). 例えば5月11日に区間4で探索した結果, G824が採集された湖畔ヤナギから直線距離で約160m離れたX2_190511の湖畔ヤナギでは産卵を発見できなかった. 同様の関係が, 5月11日の区間5における160m離れたG822とX1_190511, 5月12日の区間14における120m離れたG826とX1_190512の湖畔ヤナギでも見られ, さらに, GPSデータの記録はないが, 数mしか離れていない湖畔ヤナギでも同様の関係が頻繁に見られた. このような産卵の有無には, 何らかの環境条件の違いが影響していた可能性がある. そうだとしたら, どのような環境条件の違いが影響したのか. 根の広がりやその傾斜, 琵琶湖水位との高低関係, 波当たりの程度や水温などの候補因子を検討しておくことは, 新たに植栽する場所・方法を検討する上で, 非常に有益と考えられる.

より根本的に, 琵琶湖全体でホンモロコ産卵の回復を図るためには, 適切な水位操作法を検討するために, 沿岸部における詳しい産卵生態について理解することが必要だと考えられる. 産卵場所の選択性に関しては, 内湖流入河川については既に報告があるが(Kikko et al., 2020), 本湖の沿岸部における詳しい研究はまだない. また, 産卵のタイミングについては, コイ・フナ類で研究があるが(佐藤・西野, 2010), ホンモロコについては依然不明である. 沿岸部におけるホンモロコの詳しい産卵生態を解明することは, 次の重要な課題であり, 本研究で開発した手法は, その調査の効率化に大きく役立つことが期待できる.

謝 辞

滋賀県水産試験場の米田一紀氏と亀甲武志氏には, 琵琶湖南湖の赤野井湾や北湖に接続する西の湖・伊庭内湖におけるホンモロコの現況について, 貴重な情報をいただいた. 神奈川県立生命の星・

地球博物館の瀬能宏氏には、魚類標本の一部をコレクションに登録いただいた。滋賀県琵琶湖環境科学研究センターにはシーケンサーの利用について便宜を図っていただいた。本研究の一部は、地方創生推進交付金「琵琶湖モデル・水環境ビジネス推進プロジェクト」の援助を受けた。卵の採集は、滋賀県特別採捕許可（特第 30-87）を得て行った。

引用文献

- Aoyama, S., S. Watanabe, S. Ishikawa, M. Nishida and K. Tsukamoto. 2000. Are morphological characters distinctive enough to discriminate between two species of freshwater eels, *Anguilla celebesensis* and *A. interioris*? Ichthyol. Res., 47: 157–161.
- びわ湖生物資源調査団編. 1966. びわこ生物資源調査団中間報告：一般調査の部. 近畿地方建設局, 大阪. 1121 pp.
- FISH-UP 編集部編. 1984. 琵琶湖の釣り場 湖南・湖東. 第 5 版（一部改定）. 青銅企画出版, 豊中. 136 pp.
- 藤岡康弘. 2013. 琵琶湖固有（亜）種ホンモロコおよびニゴロブナ・ゲンゴロウブナ激減の現状と回復への課題. 魚類学雑誌, 60: 57–63.
- Kakioka, R., T. Kokita, R. Tabata, S. Mori and K. Watanabe. 2013. The origins of limnetic forms and cryptic divergence in *Gnathopogon* fishes (Cyprinidae) in Japan. Environ. Biol. Fish, 96: 631–644.
- 亀山素光. 1941. モロコ釣編. 益田甫（編）, pp. 3–118. 湖沼の釣（現代日本の釣叢書 5）. 水産社, 東京.
- Kanao, S. and K. Hasegawa. 2019. *Gnathopogon caerulescens*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T114640023A114640052. <https://www.iucnredlist.org/species/114640023/114640052>. (参照 2020-2-11)
- 環境省. 2019. 環境省レッドリスト 2019. 環境省：<http://www.env.go.jp/press/files/jp/110615.pdf>. (参照 2019-8-31)
- Katoh, K., J. Rozewicki and K. D. Yamada. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Brief. Bioinform., 2017. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>. (参照 2019-9-19)
- 川瀬成吾. 2018. タモロコ. 中坊徹次（編・監修）, p. 103. 小学館の図鑑 Z 日本魚類館 精緻な写真と詳しい解説, 初版. 小学館, 東京.
- 亀甲武志. 2016. 西の湖での外来魚駆除によるホンモロコの回復. [http://biwako.eco.coocan.jp/exchange/2016/photo/kikkou\(2016\).pdf](http://biwako.eco.coocan.jp/exchange/2016/photo/kikkou(2016).pdf). (参照 2019-12-17)
- 亀甲武志. 2019. ホンモロコの琵琶湖沿岸での産卵行動. 動物行動の映像データベース, データ番号: momo181229un04b. <http://www.momo-p.com/index.php?movieid=momo181229un04b&embed=on>. (参照 2019-5-24)
- Kikko T., D. Ishizaki, Y. Kataoka, N. Oue, A. Sakai, Y. Kai and Y. Fujioka. 2020. Spawning habitats selectivity of of Honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*) in lagoon inlets, central Japan. Ichthyol. Res., 67: 185–190.
- 亀甲武志・北門利英・石崎大介・氏家宗二・澤田宣雄・三枝 仁・酒井明久・鈴木隆夫・西森克浩・二宮浩司・甲斐嘉晃. 2015. 伊庭内湖周辺におけるホンモロコ釣り遊漁における釣獲尾数の推定. 日本水産学会誌, 81:17–26.
- 亀甲武志, 根本守仁, 伴 修平, 三枝 仁, 澤田宣雄, 石崎大介, 中橋 富久, 寺本 憲之, 藤岡 康弘. 2013. 稲作水田におけるホンモロコ *Gnathopogon caerulescens* 仔稚魚の育成. 水産増殖, 61: 303–309.
- 亀甲武志・西森克浩・石崎大介・吉岡 剛・大前信輔・中村亮一・地村由紀人・窪田雄二・片岡佳孝・根本守仁・岡本晴夫・大植伸之・藤岡康弘. 2018. 琵琶湖内湖の流入河川におけるホンモロコ産卵保護のための採捕規制. 日本水産学会誌, 84: 452–455.
- 亀甲武志・岡本晴夫・氏家宗二・井出充彦. 2015. 西の湖で放流されたホンモロコの産卵接岸状況. 平成 26 年度滋賀県水産試験場事業報告, 28.
- 亀甲武志・岡本晴夫・氏家宗二・石崎大介・白桦 崇広・根本守仁・三枝 仁・甲斐嘉晃・藤岡康弘. 2014. 琵琶湖内湖の流入河川におけるホンモロコの産卵生態. 魚類学雑誌, 61: 1–8.
- 北原一平編. 2012. 琵琶湖と西日本の静かな釣り Wolton 創刊準備号 Vol.00. ウォルトン舎, 京都府向日市. 88 pp.
- 北原一平編. 2013. 琵琶湖と西日本の静かな釣り Wolton Vol.02. ウォルトン舎, 京都府向日市. 88 pp.
- 北原一平編. 2018. 琵琶湖と西日本の静かな釣り Wolton Vol.07. ウォルトン舎, 京都府向日市. 104 pp.
- 京都新聞社編. 1994. 空から見た琵琶湖の釣り 湖南・湖東編. 京都新聞社, 京都. 144 pp.
- Mabuchi, K. 2016. A method for PCR-based identification of fish eggs attached to vegetation in Lake Biwa, Japan. Conserv. Genet. Resour., 8: 215–217.
- 馬淵浩司・西田 睦. 2006. PCR 法を用いた琵琶湖産野生型コイのミトコンドリア DNA の簡易識別法. 水産育種, 35: 19–23.
- 馬淵浩司・西田一也・吉田 誠. 2019. 琵琶湖流入河川・丁野木川の人工護岸支流におけるホンモロコ・ニゴロブナ・在来コイの産卵：産着卵の DNA 種判別にもとづく知見. 魚類学雑誌, 66: 237–243.
- Maddison, W. P. and D. R. Maddison. 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.6. <http://www.mesquiteproject.org>. (参照 2019-9-19)
- 美濃部 博・桑村邦彦. 2001. 琵琶湖周辺の内湖に

- おける魚類相の変化と生息環境分析 在来魚の繁殖・生息の場としての生態的機能の復元に向けて. 応用生態工学, 4: 27-38.
- Mishina, T., M. Takada, H. Takeshima, M. Nakano, R. Tabata, M. Nishida and K. Watanabe. 2014. Molecular identification of species and ploidy of *Carassius* fishes in Lake Biwa, using mtDNA and microsatellite multiplex PCRs. Ichthyol. Res., 61: 169-175.
- 中村守純. 1969. 日本のコイ科魚類. 資源科学研究所, 東京. 455 pp.
- 中山広樹・西方敬人. 1995. 細胞工学別冊 目で見える実験ノートシリーズ バイオ実験イラストレイテッド①分子生物学実験の基礎. 秀潤社, 東京. 184 pp.
- Palumbi S., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillian, L. Stice and G. Grabowski. 1991. The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu. 47 pp.
- 佐々木正和編. 2015. 空撮 Series02 琵琶湖釣り場ガイド 1 湖南・湖西の釣り場 116. コスミック出版, 東京. 130 pp.
- 佐藤一裕編. 2011. 琵琶湖大明解 MAP 南湖 (別冊 釣り人 Vol.395). つり人社, 東京. 114 pp.
- 佐藤一裕編. 2014. 琵琶湖大明解 MAP 北湖 (別冊 釣り人 Vol.367). つり人社, 東京. 114 pp.
- 佐藤祐一・西野麻知子. 2010. 水位操作がコイ科魚類の産卵に与える影響のモデル解析と対策効果予測. 湿地研究, 1: 17-31.
- Shibata, J., Z. Karube, M. Oishi, M. Yamaguchi, Y. Goda and N. Okuda. 2011. Physical structure of habitat network differently affects migration patterns of native and invasive fishes in Lake Biwa and its tributary lagoons: stable isotope approach. Popul. Ecol., 53: 143-153.
- 滋賀県. 2018. 平成30年度上半期 びわ湖環境インフォメーション 琵琶湖をとりまく現状と課題. <https://www.pref.shiga.lg.jp/file/attachment/2070727.pdf>. (参照 2019-9-6)
- 滋賀県琵琶湖政策課. 2014. 南湖の水草対策の取り組みについて. <https://www.pref.shiga.lg.jp/file/attachment/52717.pdf>. (参照 2019-8-28)
- 滋賀県生きもの総合調査委員会. 2016. 滋賀県で大切にすべき野生生物: 滋賀県レッドデータブック 2015年版. サンライズ出版, 彦根. 647 pp.
- 滋賀県農政水産部水産課. 2016. 赤野井湾におけるホンモロコの産卵状況について. https://www.shigaken-gikai.jp/voices/GikaiDoc/attach/Nittei/Nt6689_02.pdf. (参照 2019-8-28)
- Sommer, S. S., A. R. Groszback and C. D. K. Bottema. 1992. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. BioTechniques, 12: 82-87.
- つり人社 CPG 編. 2019. 琵琶湖岸釣り MAP 南湖 (別冊 釣り人 Vol.490). つり人社, 東京. 111 pp.
- 白杵崇広. 2008. ホンモロコの産卵状況と低水位の影響. 平成19年度滋賀県水産試験場事業報告: 47.
- 山口一鱗. 1963. ホンモロコのつり場と乗り物時刻表. 今江釣具店, 京都. 1 p.
- 読売新聞. 2019. 2019年8月24日夕刊: 琵琶湖ブルーギル激減.