



|                  |                                                                                                                      |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 中国におけるドジョウ倍数体の分布に関する研究                                                                                               |
| Author(s)        | 李, 雅娟; 印, 傑; 王, 嘉博 他                                                                                                 |
| Citation         | 日本水産学会誌, 74(2), 177-182<br><a href="https://doi.org/10.2331/suisan.74.177">https://doi.org/10.2331/suisan.74.177</a> |
| Issue Date       | 2008-03-15                                                                                                           |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/37292">https://hdl.handle.net/2115/37292</a>                                    |
| Rights           | 本文データは学協会の許諾に基づきCiNiiから複製したものである                                                                                     |
| Type             | journal article                                                                                                      |
| File Information | 110006644795.pdf                                                                                                     |



## 中国におけるドジョウ倍数体の分布に関する研究

李 雅娟,<sup>1</sup> 印 傑,<sup>2</sup> 王 嘉博,<sup>1</sup> 袁 旭,<sup>1</sup>  
魏 傑,<sup>1</sup> 孫 効文,<sup>1</sup> 荒井克俊<sup>3\*</sup>

(2007年6月22日受付, 2007年10月15日受理)

<sup>1</sup>大連水産学院, <sup>2</sup>湖北省水産科学研究所, <sup>3</sup>北海道大学大学院水産科学研究院

## A study on the distribution of polyploid loaches in China

YA-JUAN LI,<sup>1</sup> JIE YIN,<sup>2</sup> JA-BO WANG,<sup>1</sup> XU YUAN,<sup>1</sup>  
JIE WEI,<sup>1</sup> XIAO-WEN SUN<sup>1</sup> AND KATSUTOSHI ARAI<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China, <sup>2</sup>Hubei Fisheries Science Research Institute, Wuhan 430071, China, <sup>3</sup>Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan

Natural triploid and asexually reproducing clonal diploid loaches are found in Japanese populations of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. The distribution of polyploid loaches in Chinese populations has not been studied except for a few cytogenetic studies that described the occurrence of polyploidy. In the present study, we examined the ploidy status of a total of 762 specimens collected from 29 localities in China by measurements of erythrocytic cell nucleus after the ploidy determination performed by chromosome counting and DNA content flow-cytometry in selected individuals. Among diploid, triploid and tetraploid individuals, significant differences were detected in major and minor diameters of nucleus, and also nuclear volume. A few triploid (3n) loaches were detected in relatively wide areas including Hohhot, Neimenggu (3.3%), Tianjin (5.3%), Hangzhou, Zhejiang (3.3%), Chibi, Hubei (3.3%), Honghu, Hubei (6.7%) and Shashi, Hubei (3.3%). However, tetraploid (4n) loaches were detected only in Chibi (3.3%), Honghu (16.7%), Shashi (3.3%) and Ezhou (5.0%) from Hubei province. These results indicate that there are several localities in China exhibiting relatively higher frequencies of polyploid loaches.

キーワード：三倍体, 四倍体, ドジョウ, 倍数体

ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* は中国大陸, 朝鮮半島, 日本列島, 台湾などに広く分布するコイ目ドジョウ科ドジョウ属の一次性淡水魚類である。<sup>1)</sup> 日本のドジョウ集団では両性生殖により繁殖する正常二倍体 (2n=50) のほか, 低い頻度で自然三倍体 (3n=75) が出現することが知られており,<sup>2)</sup> 新潟県広神村に出現する自然三倍体は一部の二倍体が産する非還元二倍体卵と正常な精子の受精を起源とする。<sup>3)</sup> また, 北海道北部に生息するドジョウ二倍体の一部は非還元二倍体卵を産み, これらの非還元卵は精子の遺伝的関与なく雌性発生によりクローン系統として繁殖すること, また, そのような非還元卵が偶発的に精子を取り込むことにより自然三倍体あるいは二倍体-三倍体モザイクが生じることが明らかにされている。<sup>4-6)</sup> 自然三倍体ドジョウでは, 雄

はほとんどの場合機能的精子を産しないが, 雌は受精可能な半数体卵と三倍体卵, あるいは二倍体を産む場合が見られた。<sup>3,7)</sup> 自然三倍体が非還元的に三倍体の卵を産む場合があることは, 通常の受精により四倍体個体が生じる可能性を示唆する。また, クローンドジョウから派生したと考えられる二倍体-三倍体モザイクが非還元二倍体精子を産することから,<sup>8)</sup> もし非還元二倍体卵がこの様な二倍体精子を取り込めば四倍体が野生集団に出現することになる。以上のように, 日本産ドジョウにおいて自然四倍体が出現する可能性は皆無ではないものの, 実際には自然四倍体は現在まで野生集団で発見されておらず,<sup>3,9)</sup> 市場より得た起源不明の標本においてのみ見出されてきた。<sup>2,10)</sup>

これに対して, 中国大陸のドジョウでは, 湖北省の武

\* Tel : 81-138-40-5535. Fax : 81-138-40-5537. Email : arai kt@fish.hokudai.ac.jp

昌近辺から得た標本 ( $n=13$ ) はすべて染色体数 100 を持つことが報告されている。<sup>11)</sup> また、広東省韶関、湖北省の武漢および沙市で得たドジョウ標本の染色体数も 100 と報告されている。<sup>12,13)</sup> これらの核型分析の結果は、中国大陸に四倍体相当の染色体数を持つドジョウが生息することを示すが、これらのドジョウがゲノムを 4 セット有する遺伝的な四倍体 ( $4n=100$ ) であるのか、すでに二倍体化 ( $2n=100$ ) した集団であるのか否かは不明である。起源不明の染色体数 100 を有するドジョウは、産生する配偶子から人為的な雌性あるいは雄性発生を誘起した場合、染色体倍加の操作を行わなくとも、子孫は半数体症候群を示さず正常な個体に発生することから、ゲノムを 4 セット持つ四倍体であることが証明されている。<sup>14-16)</sup> そして、これら四倍体ドジョウの配偶子を用いて三倍体、四倍体あるいは六倍体集団等が作成され、それらの特性が詳しく調べられている。<sup>9,17-22)</sup> 今後、中国産の四倍体相当のドジョウについても同様の実験遺伝学的アプローチが必要となるが、この様な検討のためには、まず倍数体ドジョウの中国大陸における分布を検討することが重要である。しかしながら、上述の核型研究以外のドジョウ倍数体についての知見は乏しく、二倍体、三倍体を含む倍数体の自然分布に関する研究は行われていない。

そこで、本研究では自然倍数体ドジョウの起源と出現機構ならびにその遺伝資源としての特性解明に資するため、中国大陸 29 地点において採集したドジョウ標本について、染色体観察および DNA 量フローサイトメトリーにより明らかにされた倍数体判定の結果に基づき、赤血球サイズを測定し地点毎の二倍体、三倍体および四倍体の出現頻度を検討した。

#### 材料および方法

**供試魚** 2005～2006 年に中国黒竜江 Heilongjiang 省 7 地点、遼寧 Liaoning 省 5 地点、山東 Shandong 省 1 地点、湖北 Hubei 省 10 地点、安徽 Anhui 省 1 地点、江蘇 Jiangsu 省 1 地点、浙江 Zhejiang 省 1 地点、内蒙古 Neimenggu 自治区 1 地点、直轄市である天津 Tianjin 市と上海 Shanghai 市の合計 29 地点において採集したドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* 合計 762 個体を本研究に供した。

**血液塗抹標本の作製と観察** 供試魚の尾柄より血液を採取し、常法により血液塗抹標本を作製し、ギムザ染色の後、デジタルカメラにて顕微鏡写真を撮影した。デジタルノギス (Adobe Photoshop 7.0) により 1 個体あたり 50 個の赤血球について核の長径と短径を測定した。また、これらの測定結果から赤血球核の体積を算出した。

**染色体標本の作製と観察** 染色体標本の作成については Lin<sup>23)</sup> と Zhang<sup>24)</sup> の方法を一部改変して行った。すな

わち、供試魚の腹腔内に蒸留水に溶解した Phytohemagglutinin (PHA) を体重 1 g 当たり  $6\mu\text{g}$  注射した。そして、供試魚を  $25^{\circ}\text{C}$  に保った水槽に収容し、18～20 時間静置した。その後、同量の PHA を二回注射した。供試魚を  $25^{\circ}\text{C}$  に保った水槽に収容し 4～6 時間静置した。次に、体重 1 g 当たり  $6\mu\text{g}$  の接種量となるように淡水魚用リンゲル液に溶解した 0.1% コルヒチン液を腹腔内注射し、2～3 時間静置した。解剖して、鰓、腎臓、脾臓を取り出し、 $0.0375\text{ mol KCl}$  で 45 分間低張処理を施した。そして、カルノア液 (メチルアルコール：酢酸 = 3 : 1) で固定後、空気乾燥法により標本とし、ギムザ染色後、光学顕微鏡観察に供した。

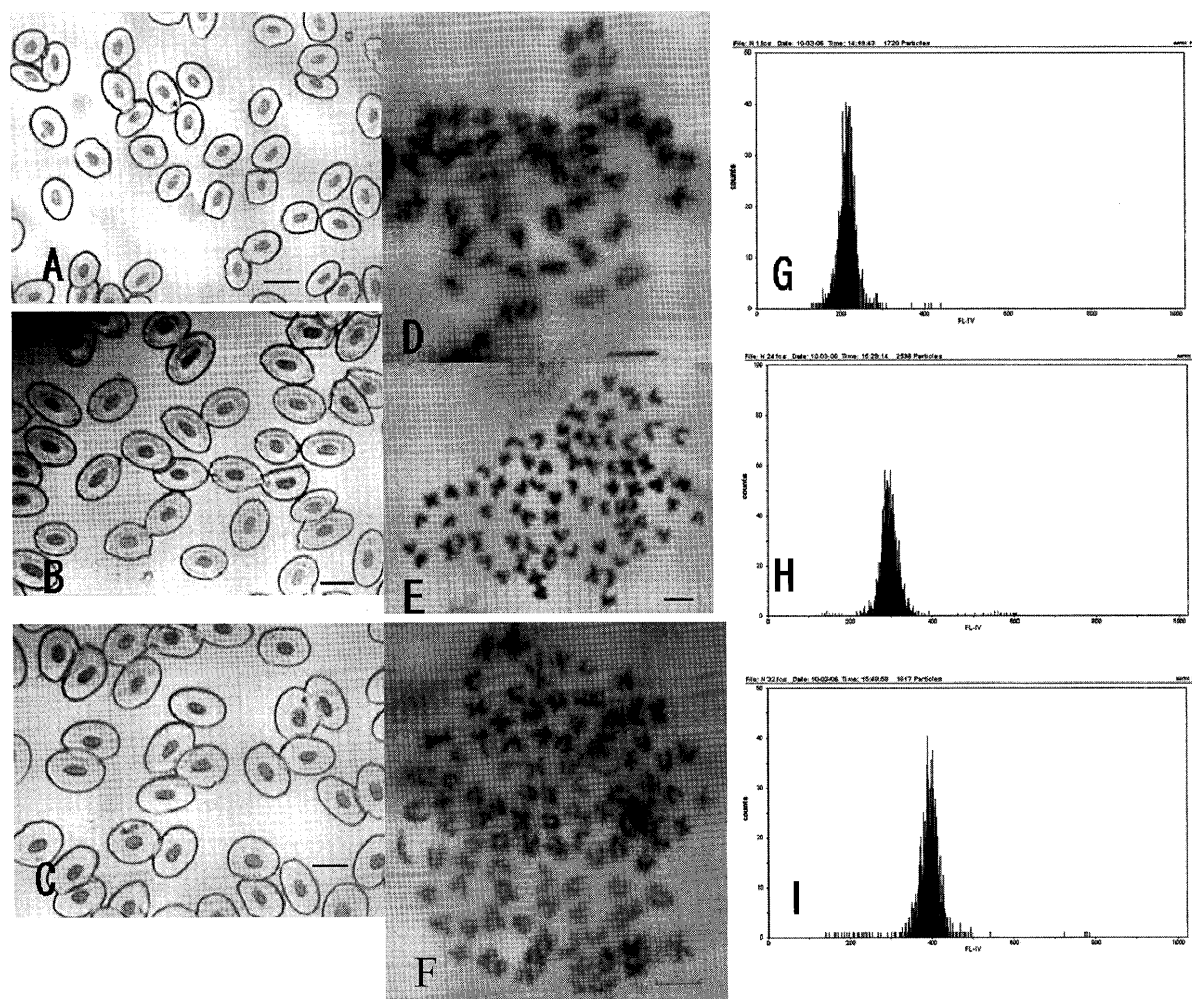
**DNA 量フローサイトメトリー** 供試魚の尾柄より採血し、既報記載の方法に従って、<sup>4,7)</sup> DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色後、フローサイトメーター (Cell Counter Analyser Partec PAS-III) により分析した。この際、二倍体ドジョウ血液の DNA 量を正常二倍体の基準 (2C) とした。

**検定方法** 赤血球核の長径、短径および体積について各倍数体間における有意差を Turkey-Kramer's test により検定した。

#### 結 果

すでに Li et al.<sup>11)</sup> により四倍体の出現が報告されている湖北省の標本から調査した。まず、湖北省の赤壁 Chibi ( $n=30$ ) と洪湖 Honghu ( $n=30$ ) および沙市 Shashi ( $n=30$ ) の標本について、赤血球サイズを観察すると、小型、中型、大型の異なる赤血球サイズをもつ個体があった (Fig. 1A-C)。そこで、これらについて染色体標本を観察したところ、小型の赤血球をもつ 30 個体は染色体数 50 を示したのに対し、中型の赤血球をもつ 4 個体は染色体数 75 を、大型の赤血球をもつ 7 個体は染色体数 100 を示した (Fig. 1D-F)。従って、これらは各々二倍体 ( $2n=50$ )、三倍体 ( $3n=75$ ) および四倍体 ( $4n=100$ ) と判断できた。これらのうち、二倍体 30 個体、三倍体 4 個体、四倍体 7 個体について DNA 量フローサイトメトリーを行ったところ、二倍体の相対 DNA 量を 1 とした場合、全ての三倍体は約 1.5、全ての四倍体は約 2 の相対値を示した (Fig. 1G-I)。

以上の染色体観察および DNA 量フローサイトメトリーにより倍数性判定を行った個体について赤血球核径を測定したところ、三倍体の赤血球核長径は  $5.56 \pm 0.13\mu\text{m}$ 、同短径は  $3.09 \pm 0.06\mu\text{m}$ 、同体積は  $223.43 \pm 8.04\mu\text{m}^3$  となった (Table 1)。四倍体の赤血球核長径は  $5.89 \pm 0.29\mu\text{m}$ 、同短径は  $3.49 \pm 0.10\mu\text{m}$ 、同体積は  $302.38 \pm 13.15\mu\text{m}^3$  となった (Table 1)。三倍体および四倍体の赤血球は二倍体 (赤血球長径:  $4.59 \pm 0.16\mu\text{m}$ 、同短径:  $2.79 \pm 0.07\mu\text{m}$ 、同体積:  $150.48 \pm 7.16\mu\text{m}^3$ )



**Fig. 1** Erythrocytic cells (A–C), chromosomes (D–F) and DNA-content flow-cytometrical histograms (H–J) of diploid (A, D, G), triploid (B, E, H) and tetraploid (C, F, I) loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Scales indicate 10  $\mu\text{m}$ . A: erythrocytes of diploid loach from Chibi, B: erythrocytes of triploid loach from Chibi, C: erythrocytes of tetraploid loach from Chibi, D: metaphase spread of diploid cell with 50 chromosomes, E: metaphase spread of triploid cell with 75 chromosomes, F: metaphase spread of tetraploid cell with 100 chromosomes, G: flow-cytometrical histogram showing diploid cell population with 2C DNA content, H: flow-cytometrical histogram showing triploid cell population with 3C DNA content, I: flow-cytometrical histogram showing tetraploid cell population with 4C DNA content.

と比較して有意に大きく ( $P < 0.01$ ), 三倍体と四倍体の間にも有意差があった ( $P < 0.05$ ) (Table 1)。二倍体と三倍体, 二倍体と四倍体との間で, 血球体積の比は各々 1 : 1.5, 1 : 2 であり, 各倍数体間のゲノム量の比を反映していた。

以上の結果より, 小型, 中型および大型の赤血球を示した個体は各々二倍体, 三倍体, 四倍体と判定された。そこで, 以上の結果に基づいて, 赤血球の測定から, 黒竜江 Heilongjiang 省 7 地点, 遼寧 Liaoning 省 5 地点, 山東 Shandong 省 1 地点, 湖北 Hubei 省 7 地点, 安徽 Anhui 省 1 地点, 江蘇 Jiangsu 省 1 地点, 浙江 Zhejiang 省 1 地点, 内モンゴル Neimenggu 自治区 1 地点, 天津 Tianjin 直轄市, 上海 Shanghai 直轄市各 1 地点から得た合計 672 個体の倍数体判定を行った。そして, 先の

**Table 1** Measurements (mean  $\pm$  S.D.) of erythrocytes of loaches in China

| Measurement                                 | Diploid (n)            | Triploid (n)          | Tetraploid (n)         |
|---------------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Major diameter of nucleus ( $\mu\text{m}$ ) | 4.59 $\pm$ 0.16 (30)   | 5.56 $\pm$ 0.13 (4)   | 5.89 $\pm$ 0.29 (7)    |
| Minor diameter of nucleus ( $\mu\text{m}$ ) | 2.79 $\pm$ 0.07 (30)   | 3.09 $\pm$ 0.06 (4)   | 3.49 $\pm$ 0.10 (7)    |
| Nuclear volume ( $\mu\text{m}^3$ )          | 150.48 $\pm$ 7.16 (30) | 223.43 $\pm$ 8.04 (4) | 302.38 $\pm$ 13.15 (7) |

湖北省 3 地点の倍数体判定結果とあわせ二倍体, 三倍体および四倍体の出現頻度を Table 2 および Fig. 2 に示した。Fig. 2 では, 調査地点は site no. で表し, 既報<sup>11-13)</sup>の結果もあわせて示した。

**Table 2** Frequencies of polyploid loaches in 29 localities in China

| Site no. | Province/Municipality | Locality    | Number of loaches | Diploid (%) | Triploid (%) | Tetraploid (%) |
|----------|-----------------------|-------------|-------------------|-------------|--------------|----------------|
| 1        | Heilongjiang          | Heihe       | 30                | 30(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 2        |                       | Wudalianchi | 26                | 26(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 3        |                       | Keshan      | 29                | 29(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 4        |                       | Hulan       | 15                | 15(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 5        |                       | Harbin      | 30                | 30(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 6        |                       | Binxian     | 19                | 19(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 7        |                       | Jiamusi     | 30                | 30(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 8        | Liaoning              | Shenyang    | 30                | 30(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 9        |                       | Huludao     | 30                | 30(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 10       |                       | Liaoyang    | 20                | 20(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 11       |                       | Dandong     | 28                | 28(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 12       |                       | Zhuanghe    | 30                | 30(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 13       | Hubei                 | Shiyan      | 25                | 25(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 14       |                       | Xiangfan    | 30                | 30(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 15       |                       | Dawu        | 27                | 27(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 16       |                       | Wuhan       | 30                | 30(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 17       |                       | Daye        | 22                | 22(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 18       |                       | Huangshi    | 27                | 27(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 19       |                       | Ezhou       | 20                | 19(95.0)    | 0(0)         | 1(5.0)         |
| 20       |                       | Chibi       | 30                | 28(93.3)    | 1(3.3)       | 1(3.3)         |
| 21       |                       | Honghu      | 30                | 23(76.7)    | 2(6.7)       | 5(16.7)        |
| 22       |                       | Shashi      | 30                | 28(93.3)    | 1(3.3)       | 1(3.3)         |
| 23       | Tianjin               | Tianjin     | 19                | 18(94.7)    | 1(5.3)       | 0(0)           |
| 24       | Shandong              | Qingdao     | 20                | 20(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 25       | Jiangsu               | Nanjing     | 25                | 25(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 26       | Shanghai              | Shanghai    | 20                | 20(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 27       | Zhejiang              | Hangzhou    | 30                | 29(96.7)    | 1(3.3)       | 0(0)           |
| 28       | Anhui                 | Ningguo     | 30                | 30(100)     | 0(0)         | 0(0)           |
| 29       | Neimenggu             | Hohhot      | 30                | 29(96.7)    | 1(3.3)       | 0(0)           |
|          | Total                 |             | 762               | 747         | 7            | 8              |

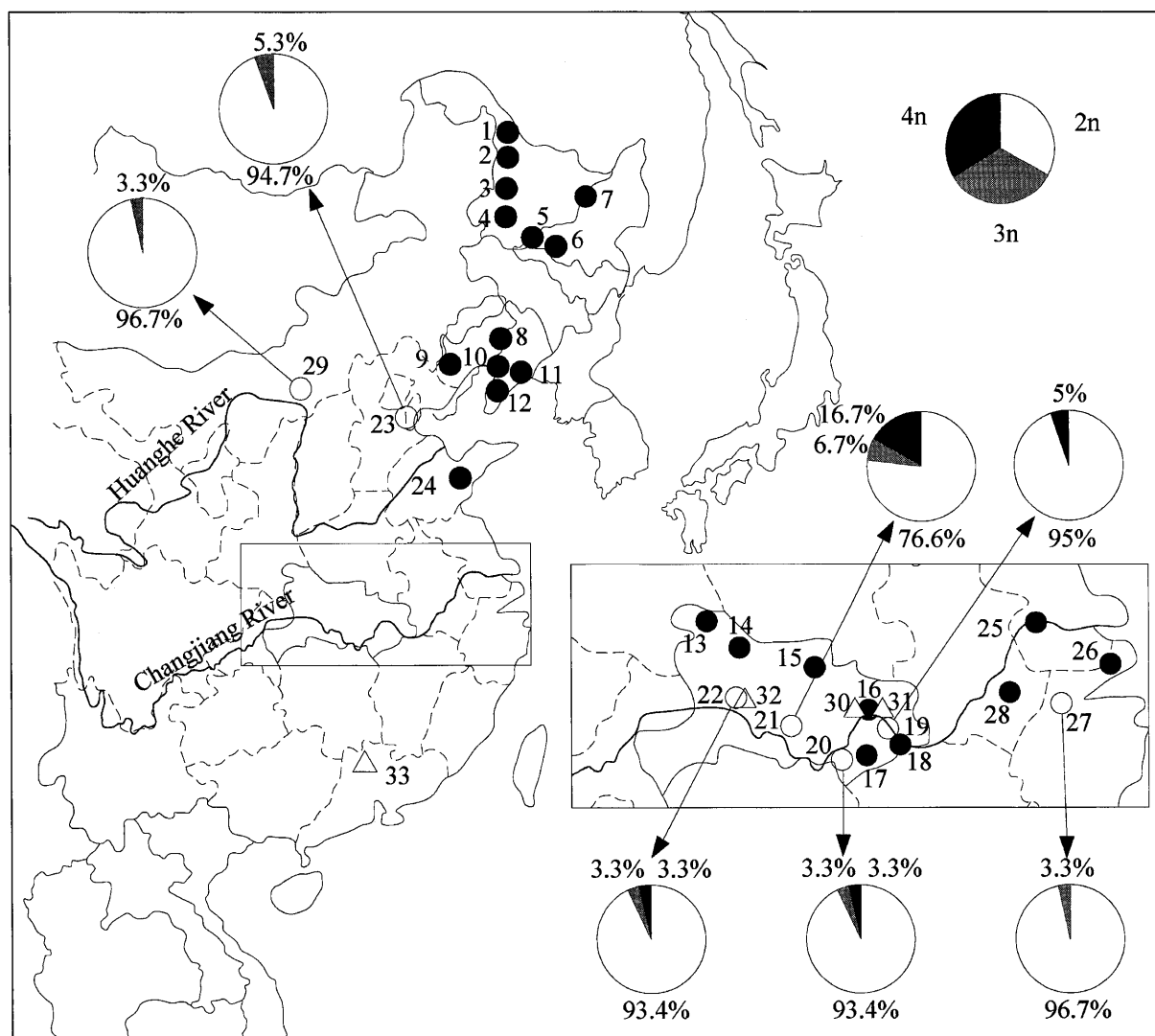
29地点のうち、赤壁 Chibi (site no. 20), 洪湖 Honghu (no. 21), 沙市 Shashi (no. 22), 天津 Tianjin (no. 23), 杭州 Hangzhou (no. 27), 内 蒙 古 Hohhot (no. 29) の6地点において、三倍体が観察標本の3.3~6.7%に見られた (Fig. 2)。また、4地点 (赤壁, 洪湖, 沙市, および鄂州 Ezhou, no. 19) では四倍体が見られ、その頻度は洪湖 (no. 21) で最も高かった (Fig. 2)。上記以外の22地点では倍数体を見出せなかった。

### 考 察

本研究において、中国の29地点762個体を調査したところ (Table 2, Fig. 2), 黒竜江 Heilongjiang 省7地点 (site no. 1~7), 遼寧 Liaoning 省5地点 (no. 8~12), 湖北 Hubei 省6地点 (no. 13~18), 山東 Shandong 省1地点 (no. 24), 江蘇 Jiangsu 省1地点 (no. 25), 安徽 Anhui 省1地点 (no. 28), および上海市 (no. 26) では二倍体のみが出現し、調査した範囲では

倍数体個体は認められなかった。しかし、湖北省の赤壁 Chibi (no. 20), 洪湖 Honghu (no. 21), 沙市 Shashi (no. 22), 浙江 Zhejiang 省の杭州 Hangzhou (no. 27), 内蒙古自治区の呼和浩特 Hohhot (no. 29), 天津 Tianjin 市 (no. 23) では少数の三倍体が出現した。これらのうち、赤壁, 洪湖, 沙市では少数の四倍体が三倍体と同時に出現し、鄂州 (Ezhou, no. 19) では四倍体が見られた。本研究で調査した地点では、どこでも二倍体が優勢であり、同所的に少数の三倍体, 四倍体あるいはその両方が出現していた。また、四倍体の出現は湖北省の長江水系に限られており、その中でも洪湖 (no. 21) は他地点と比べ、高い倍数体頻度 (四倍体 16.7% : 三倍体 6.7%) を示した。しかし、染色体観察による過去の報告<sup>11-13)</sup>にあるような、四倍体のみが生じた地点は本研究では見られず、検出した四倍体は多数の二倍体と同時に出現した。

日本における自然三倍体ドジョウは、同所的に生息す



**Fig. 2** Frequencies of diploid, triploid and tetraploid loaches estimated in China. Site numbers 1 to 29 in the map are the localities for ploidy determination shown in Table 2. Solid circles indicate localities including only diploid individuals. Open circles indicate localities including diploid, triploid and/or tetraploid individuals and frequencies of diploid and polyploid individuals are shown by pie-graphs. Triangles indicate localities where the occurrence of only tetraploid individuals were described in previous papers.<sup>11-13)</sup> Site no. 30; Wuhan,<sup>12,13)</sup> no. 31; Wuchang,<sup>11)</sup> no. 32; Shashi, Hubei province,<sup>12,13)</sup> no. 33; Shaoguan, Guangdong province.<sup>12,13)</sup>

る二倍体の産する非還元二倍体卵と正常半数性精子の受精により生じるが,<sup>3,4)</sup> 湖北省のドジョウに於いては、二倍体と四倍体ドジョウ間の交配により三倍体が生じる可能性も考えられる。市場に由来する起源不明の四倍体ドジョウの産する卵あるいは精子を二倍体由来の精子あるいは卵と各々受精することにより、生存可能な三倍体が生じることが報告されている。<sup>17,18)</sup> また、三倍体（二倍体×四倍体）は雌で妊性を示し、小型の半数体卵と大型の三倍体卵を産することから、<sup>17,18)</sup> 三倍体の卵を経由して四倍体が出現する可能性も考えられる。しかしながら、目下のところ、湖北省に出現した四倍体ドジョウの生殖特性に関しては全く報告がない。今後、人為雌性・

雄性発生誘起<sup>14-16)</sup>のみならず、二倍体との実験的交配<sup>17,18)</sup>をこれら中国産四倍体ドジョウの卵と精子を用いて実施し、その結果を観察することが必要である。

湖北省から地理的に離れた天津市（no. 23）、杭州（no. 27）、内蒙古の呼和浩特（no. 29）では、低頻度の三倍体出現（3.3～5.3%）を示した。これらの地域では、四倍体が認められなかったことから、その出現状況は日本における自然三倍体の出現状況と類似している。<sup>9)</sup> もし、日本における自然三倍体と同様の出現機構が働いているとすれば、同所的に生息する二倍体個体の中に、非還元的に二倍体卵を産む個体が存在し、それらの二倍体卵が精子を遺伝的に取り込むこと<sup>3)</sup>により自然三倍体が

生じたのかもしれない。北海道北部の自然三倍体のように、自然クローン二倍体の産する非還元卵の偶発的受精<sup>4,6)</sup>により三倍体が生じたとすると、三倍体出現地にはクローン集団が同所的に存在することになり、一層興味深い。また、ギンブナ等に於いて知られているような、三倍体为非還元三倍体卵を産み、これらが雌性発生等により単性的にクローンとして繁殖する機構<sup>25)</sup>も現時点では否定できない。中国産の自然三倍体ドジョウの出現機構を明らかにするためには、今後、その生殖特性の解明とともに、同所的に生息する二倍体との遺伝的類縁関係に関する詳細な研究が必要である。

## 謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会論文博士号取得希望者に対する支援事業 (CSC-10610)、科学研究費補助金基盤研究 (B) (18380108)、および文部科学省 21 世紀 COE プログラム拠点形成費により実施された。記してここに感謝の意を表する。ドジョウ標本採集に協力頂いた大連水産学院の学生諸氏に感謝する。

## 文 献

- 1) 斉藤憲治. ドジョウ. 「日本の淡水魚」(川那部浩哉・水野信彦編). 山と溪谷社, 東京. 1989; 382-385.
- 2) Arai K, Matsubara K, Suzuki R. Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 2167-2172.
- 3) Zhang Q, Arai K. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyol. Res.* 1999; **46**: 153-161.
- 4) Morishima K, Horie S, Yamaha E, Arai K. A cryptic clonal line of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) evidenced by induced gynogenesis, interspecific hybridization, microsatellite genotyping and multilocus DNA fingerprinting. *Zool. Sci.* 2002; **19**: 565-575.
- 5) Itono M, Morishima K, Fujimoto T, Bando E, Yamaha E, Arai K. Premiotic endomitosis produces diploid eggs in the natural clone loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *J. Exp. Zool.* 2006; **305A**: 513-523.
- 6) Itono M, Okabayashi N, Morishima K, Fujimoto T, Yoshikawa H, Yamaha E, Arai K. Cytological mechanisms of gynogenesis and sperm incorporation in unreduced diploid eggs of the clonal loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *J. Exp. Zool.* 2007; **307A**: 35-50.
- 7) Oshima K, Morishima K, Yamaha E, Arai K. Reproductive capacity of triploid loach obtained from Hokkaido Island, Japan. *Ichthyol. Res.* 2005; **52**: 1-8.
- 8) 森島 輝, 荒井克俊. 雌性発生子孫のマイクログサテライトマーカー分析による新潟県広神村産ドジョウの非還元卵形成機構の推定. 水産育種 2004; **34**: 27-30.
- 9) Arai K. Genetics of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: recent progress and perspective. *Folia biologica* 2003; **51** (Suppl.): 107-117.
- 10) Ojima Y, Takai A. The occurrence of spontaneous polyploid in the Japanese common loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Proc. Japan Acad.* 1979; **55**, Ser. B: 487-491.
- 11) Li K, Li Y-C, Zhou D. A comparative study of the karyotypes in two species of mud loaches. *Zool. Res.* 1983; **4**: 75-80.
- 12) Li Y-C, Li K. Karyotypes of *Opsariichthys bidens* and *Misgurnus anguillicaudatus*, with a consideration of the relationship between polymorphism of chromosome number and taxonomy of fish. *Journal of Wuhan Univ.* 1987; **1**: 107-112.
- 13) Yin J, Zhao Z-S, Chen X-Q, Li Y-Q, Zhu L-Y. Karyotype comparison of diploid and tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica* 2005; **4**: 469-472.
- 14) Arai K, Matsubara K, Suzuki R. Chromosomes and developmental potential of progeny of spontaneous tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 2173-2178.
- 15) Arai K, Matsubara K, Suzuki R. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 1993; **117**: 227-235.
- 16) Arai K, Ikeno M, Suzuki R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. *Aquaculture* 1995; **137**: 131-138.
- 17) Matsubara K, Arai K, Suzuki R. Survival potential and chromosomes of progeny of triploid and pentaploid females in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 1995; **131**: 37-48.
- 18) Zhang Q, Arai K. Flow cytometry for DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 870-877.
- 19) Arai K, Taniura K, Zhang Q. Production of second generation progeny of hexaploid loach. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 186-192.
- 20) 谷浦 興, 堀江 晋, 海野徹也, 中川平介, 荒井克俊. ドジョウ自然四倍体子孫の生残, 成長, 成熟およびその他特性に関する研究. 水産育種 2002; **32**: 109-120.
- 21) Horie S, Taniura K, Umino T, Nakagawa H, Arai K. Performance of the progeny of natural tetraploid loaches in long-term communal rearing experiments under a laboratory condition. *Suisanzoshoku* 2004; **52**: 91-98.
- 22) Horie S, Taniura K, Umino T, Nakagawa H, Arai K. Retarded growth of hexaploid loaches. *Suisanzoshoku* 2004; **52**: 279-286.
- 23) Lin Y-H. A PHA injection method *in vivo* for the rapid obtainment of large number of metaphase figures from kidney cells in teleosts. *Journal of Fisheries of China* 1982; **6**: 201-207.
- 24) Zhang S-M. A new method for fish chromosomes preparation. *Hereditas* (Beijing) 1993; **15**: 35-36.
- 25) Umino T, Arai K, Maeda K, Zhang Q, Sakae K, Niwase I, Nakagawa H. Natural clones detected by multilocus DNA fingerprinting in gynogenetic triploid gibel carp *Carassius langsdorfii* in Kurose River, Hiroshima. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 147-148.