静岡水試研報(42)：17-22, 2007
Bull. Shizuoka Pref. Fish. Exp. Stn. (42):17-22, 2007

# メバル属3魚種のマイクロサテライトDNAマーカーのカサゴへの適用とマルチプレックスPCRの導入

霜村胤日人[*1]・阿久津哲也[*1]・川嶋尚正[*1]

Application to *Sebastiscus marmoratus* of microsatellite DNA markers of three *Sebastes* species and the introduction of multiplex PCR system

Tsuguhito Shimomura,Tetsuya Akutsu and Naomasa Kawashima

キーワード：カサゴ，マイクロサテライト，マルチプレックスPCR

## はじめに

カサゴ *Sebastiscus marmoratus*（カサゴ目フサカサゴ科カサゴ属）は，北海道南部以南の日本各地のほかに東シナ海にも分布し，沿岸域の岩礁地帯に生息している。本種は，静岡県では一本釣，底延縄，刺網などによって周年漁獲され，その魚価は比較的高く1kgあたり1,500～2,000円程度で取り引きされる例もある[1]。また，本県では遊漁対象種としての人気が高く，さらには本種の栽培漁業への展開も検討されるなど[2]，水産上重要な魚種となっている。

近年，DNA分析技術の進歩は著しく，ニジマス[3,4]，マダイ[5,6]，ヒラメ[7,8]などでは様々なDNAマーカーが開発され，遺伝的集団構造の解析や育種などに利用されている。なかでもマイクロサテライトDNA多型は高感度遺伝マーカーとしてその利用性の高さが指摘されており，魚類の個体識別や親子判別，さらには野生集団や人工集団の遺伝的集団構造の解析などに応用されている[9]。通常，マイクロサテライトDNAマーカーは対象魚種ごとに開発する必要がある。しかし，その開発には多くの時間と高いコストを費やすため，開発上の問題点となっている。一方で，マーカーによっては近縁魚種への応用が可能であることも知られており[10,11]，開発コストを削減する上で有用な方法と考えられている。

そこで，筆者らはカサゴに近縁である同科メバル属 *Sebastes* の3魚種，クロソイ *S. schlegeli*[12]，ウスメバル *S. thompsoni*[13] および東部太平洋に生息するオレンジメヌケ *S. pinniger*[14] で報告されているマイクロサテライトDNAマーカーの本種への適用を検討した。さらに，一つのサンプル反応液中で複数のDNA領域を同時に増幅することにより分析にかかる労力や時間，コストを削減することが可能なマルチプレックスPCRを導入することで，本種のマイクロサテライトDNA多型分析の一助とし，これまで知見の乏しい本種の遺伝子解析を用いた研究の発展に資することを目的とした。

報告に先立ち，本稿の校閲を賜った愛媛大学助教授高木基裕博士に厚くお礼を申し上げる。

## 材料及び方法

### 試験1　マイクロサテライト座の増幅

マイクロサテライト座の増幅確認には，静岡県産のカサゴを試験により54個体もしくは10個体用いた。供試魚のDNAは，99.5%エタノールで固定した胸鰭の一部を用いて，ISOHAIR（(株) ニッポンジーン）により抽出した。試験に供したマイクロサテライト座は，Yoshida *et al.*[12]，Sekino *et al.*[13]，Uchida *et al.*[14]が報告した計23座とした

2007年3月14日受理
静岡県水産試験場（本場）業績第1118号
*1 静岡県水産試験場水生生物多様性プロジェクトスタッフ

(第1表)。増幅のためのDNAポリメラーゼには，*Ssc51*, *Sth3A*, *Sth3B*, *Sth24*, *Sth37*, *Sth45*, *Sth56*, *Spi7*, *Spi9*, *Spi10*, *Spi14*, *Spi17*, *Spi18*の13座についてはAmpliTaq Gold®（アプライドバイオシステムズジャパン㈱，以下AmpliTaq Gold）を，*Ssc1*, *Ssc12*, *Ssc23*, *Ssc69*, *Ssc71*, *Sth86*, *Sth91*, *Spi4*, *Spi6*, *Spi12*の10座についてはSpeedSTAR™ HS DNA Polymerase（タカラバイオ㈱，以下SpeedSTAR）を用いた。なお，各座のフォワードプライマーは5'末端を蛍光標識（6-FAM, VIC, NED, PET）した。1検体あたりの反応液組成は，AmpliTaq Goldを用いた場合ではAmpliTaq Gold（5U／μl）0.25μl，10×PCR Buffer2.5μl，dNTP Mixture（2mM each）2.5μl，フォワードおよびリバースプライマー（100pmol／μl）各0.5μl，DNA溶液（50 - 100ng／μl）1.0μl，超純水で全体量を25.0μlとし，SpeedSTARを用いた場合ではSpeedSTAR（5U／μl）0.05μl，10×Fast Buffer I（$Mg^{2+}$ plus）1.0μl，dNTP Mixture（2.5mM each）0.8μl，フォワードおよびリバースプライマー（100pmol／μl）各0.1μl，DNA溶液（50 - 100ng／μl）1.0μl，超純水で全体量を10.0μlとした。温度条件は，AmpliTaq Goldを用いた場合では各報告[12~14]に従い，SpeedSTARを用いた場合では94℃60秒の後，95℃5秒，65℃5秒の2ステップを30回行った。PCRにはGeneAmp® PCR System 9700（アプライドバイオシステムズジャパン㈱）を用いた。増幅産物の電気泳動および検出には，ABI PRISM®POP-6をポリマーとし50cmのキャピラリーアレイを装着したABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズジャパン㈱）を用いた。なお，PCR産物の塩基対数はサンプルと同時に電気泳動をしたGeneScan™-500 LIZ™ SizeStandardサイズマーカーを基にGeneMapper®ソフトウェアVer.3.7（アプライドバイオシステムズジャパン㈱）により決定した。アリルの命名は塩基対数とした。アリル数，アリルの出現範囲，ヘテロ接合体率の観察値（*ho*）と期待値（*he*），Hardy - Weinberg平衡からのずれの有無はPOPGENE[15]により算出した。

### 試験2　親子間での増幅アリルの比較

カサゴの親子間でのマイクロサテライト座の増幅アリルの比較には，静岡県産の雌カサゴ2個体とそれぞれの仔魚9個体を用いた。供試魚のDNAは，99.5%エタノールで固定した雌親魚では胸鰭の一部を，仔魚ではその組織全体を用いて，ISOHAIRにより抽出した。試験に供したマイクロサテライト座は，*Ssc1*, *Ssc12*, *Ssc23*, *Ssc69*, *Sth3A*, *Sth3B*, *Sth24*, *Sth37*, *Sth45*, *Spi10*, *Spi12*の11座とした。PCRおよびその諸条件，PCR産物の電気泳動，検出，塩基対数の決定およびアリルの命名は試験1と同様とした。

### 試験3　マルチプレックスPCR

マルチプレックスPCRの検討には，静岡県産のカサゴ4個体を用いた。供試魚のDNAは，99.5%エタノールで固定した胸鰭の一部を用いて，ISOHAIRにより抽出した。試験に供したマイクロサテライト座は，*Ssc1*, *Ssc12*, *Ssc23*, *Ssc69*, *Sth3A*, *Sth3B*, *Sth24*, *Sth37*, *Sth45*, *Spi12*の10座とした。これらの座について，プライマー同士の相補配列を少なくするよう考慮したSET1（*Sth3A*・*Sth37*・*Sth45*），SET2（*Sth3B*・*Sth24*），SET3（*Ssc1*・*Ssc12*・*Ssc23*・*Ssc69*・*Spi12*）の3組で試験を行った。増幅のためのDNAポリメラーゼには，SET1およびSET2についてはAmpliTaq Goldを，SET3についてはSpeedSTARを用いた。1検体あたりのプライマー総量は，SET1で0.75, 0.30, 0.15μlの3段階，SET2で0.5, 0.2, 0.1μlの3段階，SET3で0.1μlとし，座の混合割合はSET1およびSET2では等量，SET3については*Ssc1*：*Ssc12*：*Ssc23*：*Ssc69*：*Spi12*=1：1：1：1：1，3：3：2：2：3，4：3：2：2：4，6：3：2：2：6の4段階とした（ただし，各座のフォワードおよびリバースプライマーの濃度は100pmol／μlで，混合量は全て1：1とした）。また，SET3ではDNA溶液（100ng／μl）の添加量を1.5μlとした。なお，1検体あたりの他の反応液組成は試験1と同様とした。SET1およびSET2の温度条件は，94℃10分の後，94℃30秒，56℃または57℃，58℃，59℃で45秒，72℃45秒の3ステップを30回行い，最後に72℃5分の伸長反応を行った。SET3の温度条件は試験1と同様とした。なお，PCR，PCR産物の電気泳動，検出，塩基対

第1表　カサゴのマイクロサテライトDNA領域を検出するために検討した魚種のマーカー

| 魚　種 | マイクロサテライト座 | 引　用 |
|---|---|---|
| クロソイ | *Ssc1*, *Ssc12*, *Ssc23*, *Ssc51*, *Ssc69*, *Ssc71* | Yoshida *et al.*[12] |
| ウスメバル | *Sth3A*, *Sth3B*, *Sth24*, *Sth37*, *Sth45*, *Sth56*, *Sth86*, *Sth91* | Sekino *et al.*[13] |
| オレンジメヌケ | *Spi4*, *Spi6*, *Spi7*, *Spi9*, *Spi10*, *Spi12*, *Spi14*, *Spi17*, *Spi18* | Uchida *et al.*[14] |

数の決定およびアリルの命名は試験1と同様とした。

また，同一の供試魚を用いて各座単独でのPCRを行った。PCRおよびその諸条件，PCR産物の電気泳動，検出，塩基対数の決定およびアリルの命名は試験1と同様とし，各座でみられたアリルとマルチプレックスPCRの各SETでみられたアリルとを比較した。

## 結　　果

### 試験1　マイクロサテライト座の増幅

各座の増幅結果と変異性を第2表に示した。カサゴにおいて良好なPCR産物が得られた座は，AmpliTaq Goldを用いた場合では*Sth3A*, *Sth3B*, *Sth24*, *Sth37*, *Sth45*, *Spi10*の6座で，SpeedSTARを用いた場合では*Ssc1*, *Ssc12*, *Ssc23*, *Ssc69*, *Ssc71*, *Sth86*, *Sth91*, *Spi4*, *Spi6*, *Spi12*の10座であった。しかし，*Ssc71*, *Sth86*, *Sth91*の3座は単型であった。多型であった座のアリル数は2〜23，平均11.9であった（ただし，*Spi10*は後述の試験2の結果からデータより除いた）。最も高い変異性を示した座は*Ssc12*と*Ssc23*で，共に23個のアリルが検出された。アリルが5個以上検出された座のヘテロ接合体率（*he*）は0.465〜0.917，平均（*He*）0.782であった。*Sth45*ではHardy - Weinberg平衡から有意にずれていた（$P<0.05$）。なお，*Spi4*, *Spi6*については，アリル数が4以下と少ないため，ヘテロ接合体率およびHardy - Weinberg平衡からのずれを算出しなかった。

一方，*Ssc51*, *Sth56*, *Spi7*, *Spi9*, *Spi14*, *Spi17*, *Spi18*の7座では，良好なPCR産物が得られず塩基対数の決定が困難なサンプルが複数認められた。

### 試験2　親子間での増幅アリルの比較

雌親魚とその仔魚のアリルを第3表に示した。*Spi10*ではPCR産物が得られたものの，雌親魚と同一のアリルが認められない仔魚があった。なお，他の座については，雌親魚と仔魚との間に少なくとも1つは同一のアリルがみられた。

### 試験3　マルチプレックスPCR

SET1では，各座の増幅産物は*Sth3A*が116〜130bpに，*Sth37*が229〜245bpに，*Sth45*が190〜196bpに出現した。また，設定した56℃から59℃のアニーリング温度の範囲および3段階のプライマー総量において，これらの良好なPCR産物が得られたが，通常のPCRではみられない増幅量の少ない産物が140〜150bpにみられた。SET2では，各座の増幅産物は*Sth3B*が153〜187bpに，*Sth24*が143〜147bpに出現した。また，設定した56℃から59℃のアニーリング温度の範囲および3段階のプライマー総量において，これらの良好なPCR産物が得られた。SET3で

第2表　カサゴで検出されたマイクロサテライト座の増幅結果と変異性

| 座 | 蛍光標識 | ポリメラーゼ*1 | 検体数 | アリル数 | アリルの範囲（bp） | *ho* | *he* | *P**2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ssc1* | VIC | S | 54 | 5 | 245−259 | 0.444 | 0.465 | 0.473 |
| *Ssc12* | NED | S | 54 | 23 | 153−201 | 0.982 | 0.898 | 0.954 |
| *Ssc23* | 6-FAM | S | 54 | 23 | 182−256 | 0.944 | 0.917 | 0.199 |
| *Ssc51* | NED | T | 10 | 0 | —*5 | — | — | — |
| *Ssc69* | PET | S | 54 | 13 | 156−206 | 0.944 | 0.829 | 0.697 |
| *Ssc71* | PET | S | 10 | 1 | 169 | — | — | — |
| *Sth3A* | 6-FAM | T | 54 | 17 | 112−148 | 0.889 | 0.842 | 0.209 |
| *Sth3B* | VIC | T | 54 | 13 | 153−187 | 0.889 | 0.852 | 0.963 |
| *Sth24* | NED | T | 54 | 11 | 139−161 | 0.685 | 0.706 | 0.767 |
| *Sth37* | PET | T | 54 | 11 | 223−251 | 0.815 | 0.788 | 0.878 |
| *Sth45* | NED | T | 54 | 5 | 190−198 | 0.593 | 0.638 | 0.011*3 |
| *Sth56* | VIC | T | 10 | 0 | — | — | — | — |
| *Sth86* | NED | S | 10 | 1 | 180 | — | — | — |
| *Sth91* | PET | S | 10 | 1 | 215 | — | — | — |
| *Spi4* | 6-FAM | S | 10 | 2 | 164−172 | — | — | — |
| *Spi6* | VIC | S | 10 | 4 | 92−104 | — | — | — |
| *Spi7* | NED | T | 10 | 0 | — | — | — | — |
| *Spi9* | PET | T | 10 | 0 | — | — | — | — |
| *Spi10* | 6-FAM | T | 10 | 14 | 124−254 | — | — | — |
| *Spi12* | VIC | S | 54 | 16 | 89−141 | 0.852 | 0.885 | 0.745 |
| *Spi14* | NED | T | 10 | 0 | — | — | — | — |
| *Spi17* | PET | T | 10 | 0 | — | — | — | — |
| *Spi18* | 6-FAM | T | 10 | 0 | — | — | — | — |
| 平均*4 | | | | 13.7 | | *Ho*=0.804 | *He*=0.782 | |

*1：T＝AmpliTaq Gold，S＝SpeedSTAR
*2：Hardy-Weinberg平衡の$\chi^2$検定結果
*3：$P<0.05$
*4：*Ssc1*, *Ssc12*, *Ssc23*, *Ssc69*, *Sth3A*, *Sth3B*, *Sth24*, *Sth37*, *Sth45*, *Spi12*の平均
*5：未算出

第3表　カサゴ雌親魚とその仔魚のアリル

| サンプル | 各マイクロサテライト座におけるアリル | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Ssc1* | *Ssc12* | *Ssc23* | *Ssc69* | *Sth3A* | *Sth3B* | *Sth24* | *Sth37* | *Sth45* | *Spi12* | *Spi10* |
| 雌親魚A | 245/255 | 169/187 | 220/224 | 162/166 | 118/138 | 153/175 | 145/149 | 241/251 | 192/194 | 109/109 | 266/266 |
| A産仔魚1 | 245/255 | 163/187 | 194/220 | 166/170 | 116/138 | 153/173 | 145/149 | 235/251 | 192/194 | 109/115 | 154/154* |
| A産仔魚2 | 245/255 | 169/187 | 186/224 | 166/170 | 116/118 | 173/175 | 145/145 | 235/241 | 192/196 | 109/109 | 154/154* |
| A産仔魚3 | 245/245 | 169/187 | 194/220 | 166/170 | 116/118 | 173/175 | 145/145 | 235/241 | 194/194 | 109/109 | 154/154* |
| A産仔魚4 | 245/245 | 169/187 | 194/220 | 166/168 | 116/118 | 173/175 | 145/157 | 235/241 | 192/196 | 109/115 | 128/128* |
| A産仔魚5 | 245/245 | 163/169 | 194/220 | 162/170 | 116/138 | 153/173 | 145/149 | 231/251 | 194/194 | 109/109 | 154/154* |
| A産仔魚6 | 245/245 | 169/187 | 186/220 | 166/170 | 118/130 | 157/175 | 145/149 | 235/251 | 192/196 | 109/109 | 128/128* |
| A産仔魚7 | 245/255 | 163/169 | 194/224 | 166/170 | 116/118 | 173/175 | 145/145 | 235/241 | 194/196 | 109/115 | 154/154* |
| A産仔魚8 | 245/245 | 169/169 | 194/220 | 166/168 | 116/138 | 153/173 | 149/157 | 235/241 | 192/196 | 109/115 | 128/128* |
| A産仔魚9 | 245/255 | 169/187 | 186/224 | 166/170 | 118/130 | 157/175 | 149/157 | 235/251 | 192/196 | 109/109 | 128/128* |
| 雌親魚B | 245/245 | 165/195 | 210/224 | 162/194 | 138/148 | 153/155 | 145/145 | 229/231 | 192/192 | 109/115 | 210/210 |
| B産仔魚1 | 245/245 | 175/195 | 204/224 | 162/166 | 116/148 | 155/177 | 143/145 | 229/231 | 192/194 | 115/139 | 210/242 |
| B産仔魚2 | 245/245 | 165/175 | 202/210 | 162/196 | 116/148 | 155/177 | 143/145 | 229/231 | 192/192 | 109/139 | 158/210 |
| B産仔魚3 | 245/245 | 175/195 | 202/224 | 162/166 | 116/138 | 153/173 | 145/145 | 229/229 | 192/194 | 109/139 | 242/242* |
| B産仔魚4 | 245/245 | 175/195 | 204/210 | 162/166 | 116/148 | 155/173 | 145/145 | 229/229 | 192/192 | 115/139 | 210/242 |
| B産仔魚5 | 245/245 | 165/185 | 202/210 | 194/196 | 116/138 | 153/177 | 143/145 | 229/229 | 192/192 | 109/109 | 210/242 |
| B産仔魚6 | 245/245 | 175/195 | 202/210 | 166/194 | 116/148 | 155/173 | 143/145 | 229/229 | 192/194 | 109/139 | 158/210 |
| B産仔魚7 | 245/245 | 165/185 | 202/224 | 162/166 | 116/138 | 153/173 | 145/145 | 229/231 | 192/194 | 109/109 | 210/210 |
| B産仔魚8 | 245/245 | 165/175 | 204/224 | 162/166 | 116/138 | 153/177 | 143/145 | 229/229 | 192/192 | 109/139 | 158/158* |
| B産仔魚9 | 245/245 | 185/195 | 204/210 | 162/166 | 116/138 | 153/177 | 143/145 | 229/229 | 192/194 | 109/115 | 158/158* |

＊：雌親魚と同一のアリルが認められない仔魚サンプル

は，4段階の混合割合において，同一サンプルでみられる各座の増幅産物は同じであり，*Ssc1* が 245～249bp に，*Ssc12* が 163～191bp に，*Ssc23* が 182～216bp に，*Ssc69* が 158～170bp に，*Spi12* が 95～119bp に出現した。なお，*Ssc1*：*Ssc12*：*Ssc23*：*Ssc69*：*Spi12*＝1：1：1：1：1の割合では *Ssc1*，*Ssc12*，*Spi12* の増幅量が少なく，3：3：2：2：3の割合では *Ssc1* および *Spi12* の増幅量が少なく，4：3：2：2：4の割合ではいずれの座も良好な増幅産物が得られ，6：3：2：2：6の割合では *Ssc12*，*Ssc23*，*Ssc69* の増幅量が少なかった。

また，同一サンプルにおいて，各座のアリルは単独での増幅とマルチプレックス PCR での増幅とで違いは認められなかった。

## 考　　察

試験1，2の結果から，近縁魚種より選抜した計10個のマイクロサテライト座（*Ssc1*，*Ssc12*，*Ssc23*，*Ssc69*，*Sth 3A*，*Sth3B*，*Sth24*，*Sth37*，*Sth45*，*Spi12*）がカサゴのマーカーとして有用と考えられた。アリル数の少なかった *Spi4* と *Spi6*，および単型を示した *Ssc71*，*Sth86*，*Sth91* については，サンプル数の増加あるいは他海域産サンプルの分析などにより，異なるアリルが検出される可能性はあるが，カサゴの遺伝的多様性を示すマーカーとしての感度はあまりよくないと考えられた。また，*Spi10* において雌親魚とその仔魚との間に同一のアリルが認められなかったことは，メンデルの法則に反し，マイクロサテライト領域を増幅していないものと思われ，*Spi10* はカサゴのマーカーとして機能しないものと考えられた。一方，上記の10座において雌親魚とその仔魚との間に少なくとも1つは同一のアリルが認められたことは，各座がメンデル遺伝様式を示すものと考えられた。

有用と考えられた10座について，*Ssc1*，*Ssc12*，*Ssc23*，*Ssc69* の4座の平均アリル数および平均ヘテロ接合体率（期待値）はカサゴで16.0および0.777，クロソイで15.8および0.672[12]，*Sth3A*，*Sth3B*，*Sth24*，*Sth37*，*Sth45* の5座ではカサゴで11.4および0.765，ウスメバルで8.6および0.738[13]，*Spi12* の1座ではカサゴで16.0および0.885，オレンジメヌケで6.0および0.390[14]となり，本来開発された種と同等あるいはそれを上回った。また，10座の平均ヘテロ接合体率（*He*）も0.782と高い値であったことから，カサゴの天然集団の解析においていずれの座もマーカーとして有効な感度を有するものと考えられた。これらのことから，人工飼育下にあるような小集団の個体識別や親子判別，あるいは大集団の遺伝的構造の解析などへの利用性は高いと思われる。なお，*Sth45* において Hardy - Weinberg 平衡からの有意なずれが認められた要因には，他の座で Hardy - Weinberg 平衡にあることを加味すると，null アリル[9] の存在が最も疑われた。このマーカーを解析に用いる場合には，この点を十分に考慮する必要がある。以上のように，メバル属3魚種で開発されたマイクロサテライト DNA マーカーが他属のカサゴに適用でき，その集団解析に有効と考えられた。

PCR のマルチプレックス化では，プライマー塩基配列

の相補性を考慮した座の組み合わせの最適化が重要である。試験3では，各SETとも最大で5〜6塩基の相補配列を含んでいたが，全てのSETで良好なPCR産物が得られたことから，それぞれの増幅に問題はないと考えられた。SET1では，通常のPCRではみられない増幅量の少ない産物が140〜150bpに出現するが，アリルの検出を妨げるようなものではなく，また，同一サンプルにおいて，各座のアリルに単独での増幅とマルチプレックスPCRでの増幅とで違いが認められなかったことも踏まえると，SET1〜3のマルチプレックスPCRは有効なものと判断された。SET3についてはポリメラーゼにSpeedSTARを用いることで，PCRの温度条件が異なる複数のプライマーセットにより複数のマーカー座を同一の温度条件下で同時に増幅することが可能となり，さらにシャトルPCR用に開発された高速ポリメラーゼであることから，Taqポリメラーゼよりも著しく短い反応時間でPCR産物を得ることができた。このようにマルチプレックスPCRを導入することでより効率的なマイクロサテライトDNA多型分析が可能となり，特に多数の検体を処理する際には非常に有効な手段と考えられた。

## 要　　約

カサゴのマイクロサテライトDNA多型分析の一助とするため，近縁魚種のマーカーの適用を検討するとともに，分析コストの削減及び省力化を可能にするマルチプレックスPCRの導入を試みた。

1） クロソイから選抜した*Ssc1*，*Ssc12*，*Ssc23*，*Ssc69*の4座，ウスメバルから選抜した*Sth3A*，*Sth3B*，*Sth24*，*Sth37*，*Sth45*の5座，オレンジメヌケから選抜した*Spi12*の1座の計10マイクロサテライト座についてカサゴへの適用が可能であった。

2） 選抜した10座のカサゴにおける平均アリル数は13.7，平均ヘテロ接合体率（期待値）は0.782であり，いずれの座もマーカーとして有効な感度を有していた。

3）マルチプレックスPCRが可能なマイクロサテライト座の組み合わせは①*Sth3A*・*Sth37*・*Sth45*，②*Sth3B*・*Sth24*，③*Ssc1*・*Ssc12*・*Ssc23*・*Ssc69*・*Spi12*であった。

## 文　　献

1）山田博一・伊藤円・飯田益生・霜村胤日人・田中直也・村尾秀治・上嶋慎一・山田照義（2006）：カサゴ栽培生態研究，平成16年度静岡県水産試験場事業報告，91〜95.

2）静岡県（2005）：第5次静岡県栽培漁業基本計画の策定，静岡県公報第1662号，911〜916.

3）Nakamura K, Ozaki A, Akutsu T, Iwaki K, Sakamoto T, Yoshizaki G, Okamoto N (2001)：Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*), Mol Genet Genomics, 265 (4), 687〜693.

4） Sakamoto T.,N.Okamoto,Y.Ikeda,Y.Nakamura and T.Sato (1994)：Dinucleotide-repeat polymorphism in DNA of rainbow trout and its application in fisheries science, J.Fish.Biol, 44, 1093〜1096.

5） Motohiro Takagi,Nobuhiko Taniguchi,Doug Cook, and Roger W.Doyle (1997)：Isolation and Characterization of Microsatellite Loci from Red Sea Bream *Pagrus major* and Detection in Closely Related Species, Fisheries Science, 63 (2), 199〜204.

6）Kazuo Tabata and Akira Mizuta (1997)：RFLP Analysis of the mtDNA D-loop Region in Red Sea Bream *Pagrus major* Population from Four Locations of Western Japan, Fisheries Science, 63 (2), 211〜217.

7）菅谷琢磨・池田実・藤尾芳久（1998）：ヒラメmtDNADループ領域のRFLP分析によるハプロタイプの検出，水産育種，26，33〜40.

8）Motohiro Takagi, Kazunori Yoshida, and Nobuhiko Taniguchi (1999)：Isolation of Microsatellite Loci from Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* and Detection of PCR Fragments with Simple Non-RI Methods, Fisheries Science, 65 (3), 486〜487.

9）社団法人日本水産資源保護協会（1999）：第1章　遺伝的多様性評価手法の開発，水生生物の遺伝的多様性の評価及び保存に関する技術マニュアル，3〜128.

10）高木基裕・谷口順彦（1996）：ミニサテライトおよびマイクロサテライトDNA領域多型と魚類遺伝・育種研究への応用，水産育種，23，1〜12.

11）野口大毅・池田実・中嶋正道・谷口順彦（2003）：サクラマス集団解析のためのマイクロサテライトDNAマーカーの開発とその特性について，水産育種，33，61〜66.

12）K.Yoshida, M.Nakagawa and S.Wada (2005)：Multiplex PCR system applied for analysing microsatellite loci of Schlegel's black rockfish, *Sebastes schlegeli*, Molecular Ecology Notes, 5, 416〜418.

13） M.Sekino,N.Takagi,M.Hara and H.Takahashi

(2000) : Microsatellites in rockfish *Sebastes thompsoni* (Scorpaenidae), Molecular Ecology, 9(5), 634～636.

14) D.Gomez-Uchida, E.A.Hoffman, W.R.Ardren and M.A.Banks (2003) : Microsatellite markers for the heavily exploited canary (*Sebastes pinniger*) and other rockfish species, Molecular Ecology Notes, 3, 387～389.

15) F.C.Yeh,R.Yang and T.Boyle (1999) : POPGENE VERSION 1.31, http://www.ualberta.ca/~fyeh/