

## 第5章 マリアナ海域に出現する魚卵の種組成と分布

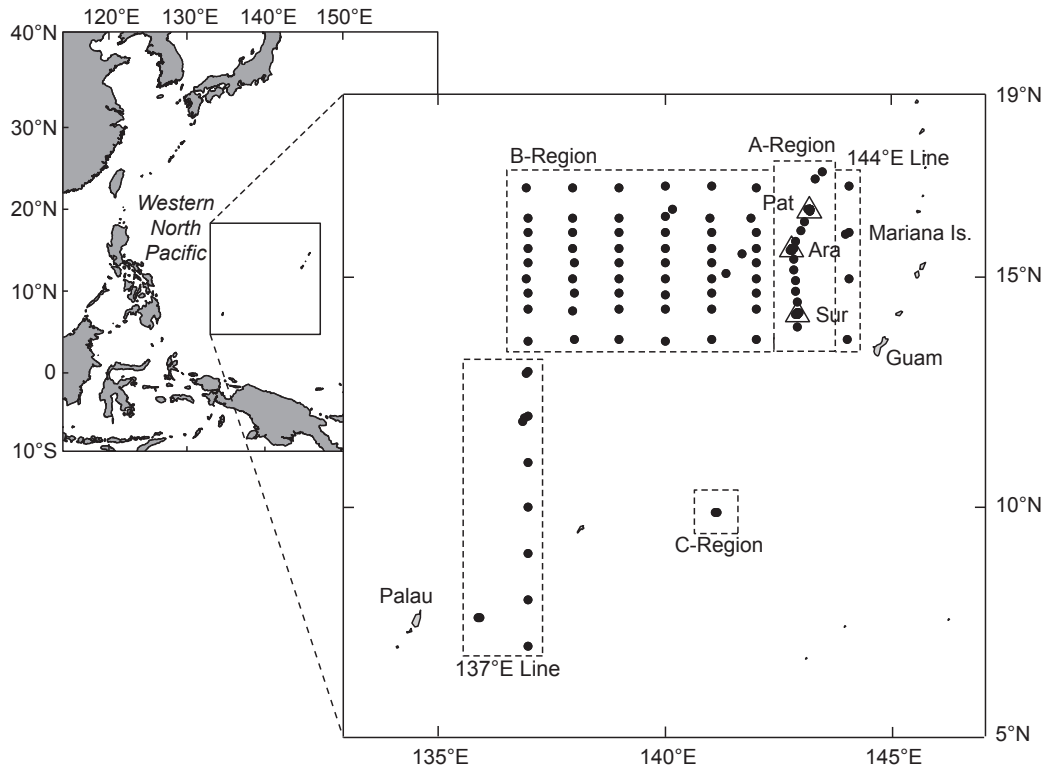
大陸から遠く離れた外洋域の魚卵の種組成とその出現量に関する知見は皆無である。海域で採集された魚卵では、キンメダイ卵 (Akimoto et al., 2002), マリアナ海域で採集されたウナギ目卵 (Aoyama et al., 2001), ウナギ卵 (Yoshinaga et al., 2011), ハワイ沖でのカジキ類とサバ科の卵 (Hyde et al., 2005), メキシコ湾でのフエダイ科とニベ科3種の卵 (Bayha et al., 2008), 日本の仙台湾と常磐沖で採集された卵 (Saitoh et al., 2009), メキシコのユカタン半島沿岸で採集された卵 (Valdez-Moreno et al., 2010) で DNA 種査定を適用した研究例がある。しかしながら、これまでの魚卵を対象として DNA 種査定を用いた研究は、特定の分類群、または沿岸域で採集されたごく少数の卵を対象としており、限られた分類群で卵の検出の成否を調べることを目的としていた。従って、種組成が明らかでない外洋域において、DNA 種査定法がどの程度有効であるのかを評価した研究例はいまだない。

そこで本章では、北太平洋西部のマリアナ諸島西方海域に出現する魚卵に対して DNA 種査定法を用いた解析をおこなうことで、外洋域における DNA 種査定法の有効性を検討することを目的とした。さらに、多くの外洋性魚類の産卵生態は不明であることから、外洋域での魚卵の分布に関する知見を得ること、それをもとに外洋性魚類の産卵生態の概略を考察することも目的とした。

### 第1節 材料と方法

#### 第1項 魚卵の採集

2002年7月5日から8月15日にかけておこなわれた東京大学海洋研究所研究船白鳳丸（現在は海洋研究開発機構所属）による KH-02-02 次航海において、西マリアナ海嶺の海山を含む北太平洋西部マリアナ諸島西方海域（北緯 7°–17°, 東経 136°–144°）のグリッド調査による魚卵の採集を実施した (Fig. 5-1-1)。なお、東経 143° 線上の海山周辺海域を A 海域、北緯 13°–17°, 東経 137°–142° の海域を B 海域、北緯 10°, 東経 141° の周辺海域を C 海域とした。A 海域は、海山直上の採集点を A1, それ以外の採集点を A2 とした。さらに A 海域東方の東経 144° 線上（以下 144° 線）と北緯 13° 以南の 136°–137° 線上（以下 137° 線）でも魚卵採集をおこなった。採集は IKMT ネット（網口 8.7 m<sup>2</sup>, 目合い 0.5 mm または 1.0 mm）の斜行曳き、または ORI ネット（網口 2 m<sup>2</sup>, 目合い 0.33 mm）のステップ曳きによっておこなった（表層から水深約 200–600 m）。



**Fig. 5-1-1** Map showing the sampling stations and collection areas during the KH-02-2 research cruise of the R/V Hakuho Maru of the Ocean Research Institute, University of Tokyo in the western North Pacific in 5 July–15 August 2002. Circles indicate the location of the sampling stations and the triangles show the locations of three seamounts in the West Mariana Ridge (Pat: Pathfinder; Ara: Arakane; Sur: Suruga)

曳網回数はそれぞれ 88 回, 33 回, 2 回であった。濾水量を網口に取り付けたフローメーターで計測し算出した。なお, A 海域でおこなった 1 曳網では, フローメーターが故障し濾水量が不明だったため, この曳網のデータは卵の採集密度の解析から除外した。ネットサンプルから魚卵を肉眼でソーティングした。採集した魚卵は, 船上で直ちにデジタルカメラ (Nikon DXM1200) を取り付けた実体顕微鏡下 (Nikon SMZ1500, 10–115 倍) で写真撮影した後, 99% エタノール, または 5% ホルマリンで固定した。

## 第2項 形態によるタイプ分け

採集した卵は, 第4章第1節第3項と同じ方法で形態によるタイプ分けをおこなった。

## 第3項 PCR とシーケンス

形態によって明瞭にグルーピングできたタイプのエタノール標本の中から各 1 個ずつ魚卵を選び, 遺伝子解析に供した。なお, 各タイプのサンプルがホルマリン固定のみの場合は形態の観察だけおこなった。

魚卵の粗全 DNA 抽出にはキレックスを用い, 第4章第1節第4項と同様の方法で 16S rRNA の約 1,200 塩基を増幅した。

PCR は Model 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) でおこなった。反応液の組成は, 滅菌蒸留水 8.20 または 8.24  $\mu$ l, 10 $\times$ EX Taq<sup>TM</sup> Buffer (Takara Bio Inc.) 1.5  $\mu$ l, dNTP (2.5 mM each) 1.2  $\mu$ l, プライマー (5  $\mu$ M) 各 1.5  $\mu$ l, EX Taq<sup>TM</sup> (Takara Bio Inc.) 0.10  $\mu$ l (0.5U) または 0.06  $\mu$ l (0.3U), 鋳型 DNA 溶液 1.0  $\mu$ l で, 最終量を 15.0  $\mu$ l とした。PCR 反応は, 94 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した後, 熱変性 94 $^{\circ}$ C 15 秒, アニーリング 50 $^{\circ}$ C 15 秒, 伸長反応 72 $^{\circ}$ C 45 秒の過程を 30–35 回繰り返し, 最終伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 7 分間おこなった。

得られた PCR 産物は, Exo-SAP IT (Amersham Bioscience Inc.) を用いて余剰の dNTP およびプライマーを除去した後, BigDye<sup>TM</sup> Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.) を用いて Dye Termination 反応をおこなった。反応は製品付属の説明書 (Applied Biosystems Inc.) に従い, PCR と同じプライマーとサーマルサイクラーを使用しておこなった。反応産物は 3100 Genetic Analyzer により泳動し, 塩基配列を決定した。

得られた泳動像を EditView ver.1.0.1 (Applied Biosystems Inc.) を用いて編集した。次に, AutoAssembler ver.2.1 (Applied Biosystems Inc.) 使用して得られた配列を連結し, DNASIS ver. 3.7 (Hitachi Software Engineering) で編集した。

## 第4項 DNA に基づいた種査定

それぞれの代表から得られたシーケンスは, 第4章第1節第5項と同様に BLASTClust に

よるクラスタリングと、BLASTによる既存DNAデータの検索をおこない、99%の相同性を基準として種を決定した。BLASTによる検索は、GenBankおよび第3章で得られたマリアナ海域に出現する成魚のDNAライブラリに対しておこなった。

## 第5項 分布の解析

卵の採集密度を濾水量 1 m<sup>3</sup>あたりの採集個数として算出し、海域間でKruskal-Wallis検定により比較した。海域は、A1, A2, B 海域, C 海域, 137° 線, 144° 線とした。post-hoc test にはDunn's multiple comparisonを使った。この検定にはPRISM 4.0c (GraphPad Software Inc.)を使用した。種が同定され、かつ30個以上の卵が採集されたタイプの出現個数を $\chi^2$ 検定によって比較した。A 海域とそれ以外の海域とで採集個数と濾水量をまとめ、期待値は濾水量の比で算出した。検定からは、採集個数が両海域のどちらも5個以下の種は除外した。期待値は両海域の濾水量の比から求め、Excel 2008 for Mac (Microsoft) の chitest 関数を用いて p 値を算出した。また、最も多く採集され、カツオ *Katsuwonus pelamis* と同定された卵のタイプの採集密度を計算し、それぞれの採集点にプロットした。同様に、種が同定されたタイプ、また、種が同定されなかったがDNAのクラスタとして識別できたタイプ、およびDNA解析に供しなかったタイプの出現もプロットして比較した。

## 第2節 形態によるタイプ分け

計123回の曳網により、計5,321個の卵が採集された (Table 5-2-1)。そのうち、2,623個は死亡して胚の形態がわからなかったために、以降の形態の観察とDNA解析から除外した。残りの2,698個の卵は形態に基づいて108タイプに分けられた (巻末 Appendix 3 参照)。明瞭な形態形質によってグルーピングできなかったIC群の卵 (358個) は複数のタイプに分けず、1つのタイプ (IC-40) として扱った。

## 第3節 DNAによる種査定の結果

### 第1項 DNAによるクラスタリング

108タイプのうち、エタノール保存されていた88タイプから1個ずつがDNAによる種査定の対象となった。その他の20タイプはホルマリンに固定されていたため解析から除外した。16S rRNAの部分配列 (1,019-1,190bp) が解析したすべての卵で増幅されシーケンスされた。



**Table 5-2-1** Summary of egg collection during KH-02-2 cruise. Number of eggs and catch rates (in the parenthesis, number of eggs  $\times 10^{-4}$  per  $1 \text{ m}^3$  of water filtered) are shown. Stations at almost same latitude ( $^{\circ}\text{E}$ ) and longitude ( $^{\circ}\text{N}$ ), or same seamount were pooled

Latitude ( $^{\circ}\text{N}$ )	Longitude ( $^{\circ}\text{E}$ )											Total
	136	137	138	139	140	141	142	143	144	143	144	
17		58 (9.9)	39 (11.3)	10 (2.6)	7 (1.3)	6 (1.2)	11 (1.8)	28 (2.3)	168 (35.1)	327		
Pathfinder								2662 (57.0)				2662
16		121 (9.6)	20 (1.6)	21 (1.7)	27 (2.3)	29 (1.9)	35 (1.8)	103 (8.0)	76 (7.1)	432		
Arakane								449 (8.7)				449
15		48 (3.9)	14 (0.9)	31 (2.0)	45 (2.9)	40 (2.3)	41 (2.9)	241 (17.3)	26 (5.3)	486		
14		19 (1.8)	13 (1.1)	25 (2.1)	24 (2.3)	19 (2.1)	18 (1.7)	193 (21.6)	18 (3.5)	329		
Suruga								536 (16.3)				536
13								18 (1.8)				18
12								16 (1.0)				16
11								1 (0.2)				1
10								3 (0.7)				3
9								6 (1.2)				6
8		27 (2.7)	10 (2.3)									37
7			5 (1.2)									5
v	27	305	86	87	103	108	105	565	288	5321		

この88個の配列をBLASTClustでクラスタリングしたところ、71のクラスタに整理され、形態では分けすぎていることがわかった。7個のクラスタはそれぞれ2タイプが、5個のクラスタはそれぞれ3タイプがまとめられた。

## 第2項 出現種

BLASTの結果、71クラスタにまとめられた88タイプのうち、34クラスタ(48%)46タイプ(52%)の配列が既存配列と99%以上の相同性を示し、分類群を特定できた(巻末 Appendix 4 参照)。そのうち28クラスタ(39%)37個(42%)の卵ではそれぞれ1種の配列とのみ高い相同性を示し、種に同定された。6クラスタ(9%)9タイプの卵は複数種の配列と高い相同性を示し、1種に特定できなかった。これらのクラスタに含まれるタイプとして分けられた卵は、DNA解析していない卵もすべてこれらの種に属するものとして扱った。その他の42タイプ37クラスタ42個の卵は、99%以上の相同性を示す配列が見つからなかった(≤98.92%)。

DNAによって分けられた28クラスタは、9目25科に属する28種に同定された(Table 5-3-1)。最も採集個数が多かったのはカツオ(n=982)であり、次にマルバラシマガツオ *Brama orcini* (n=144)、ムカシクロタチ *Scombrobrax heterolepis* (n=95)、アカマンボウ *Lampris guttatus* (n=81)、サヨリトビウオ *Oxyporhamphus micropterus* (n=70)、クサビフグ *Ranzania laevis* (n=54)、ヨロイギンメ *Scopelogadus mizolepis* (n=46)といった典型的な外洋性および中深層性の魚類が続いた。また、成魚が岩礁性であるネズミフグ *Diodon hystrix* の卵も比較的多く採集された(n=50)。その他の種の卵の採集数は30個以下と比較的少なく、15種は10個以下しか採集されなかった。形態で分けられた2タイプの卵(IC-30, ID-02; Table 5-3-1)は、調査海域に出現するクロマグロ *Thunnus orientalis* と99%以上の相同性を示した。しかし、太平洋に生息しないタイセイヨウクロマグロ *T. thynnus*、南半球に生息するミナミマグロ *T. maccoyii* とも同様の相同性を示したため(巻末 Appendix 4 参照)、この卵はマグロ属 *Thunnus* として扱った。同様に、複数種と高い相同性を示した5クラスタ(1-19個)は、それぞれトビウオ科 Exocoetidae、ミサキソコダラ属 *Ventrifossa*、ユカタハタ属 *Cephalopholis*、マグロ属 *Thunnus*、マカジキ科 Istiopholidae、マカジキ属 *Tetrapturus* として扱った。以上の結果、解析した卵では計34種類が同定できたと考えられた(Table 5-3-1)。

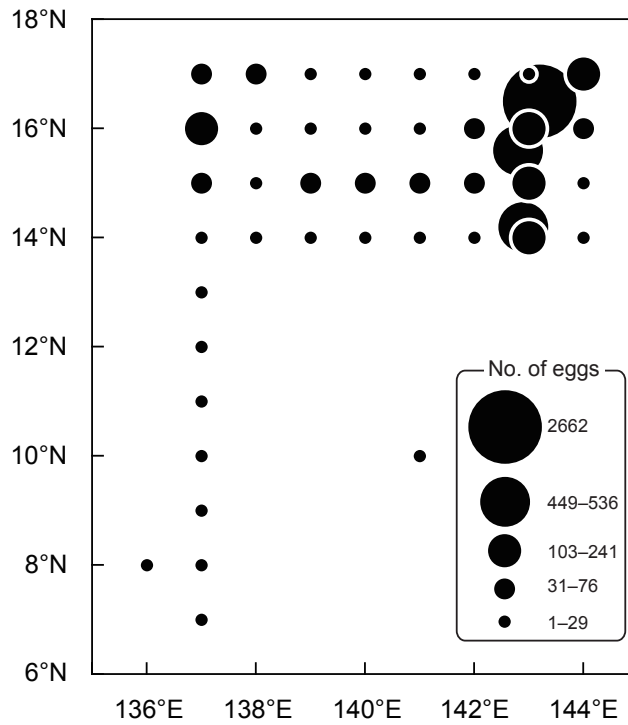
## 第4節 魚卵の分布

### 第1項 採集密度

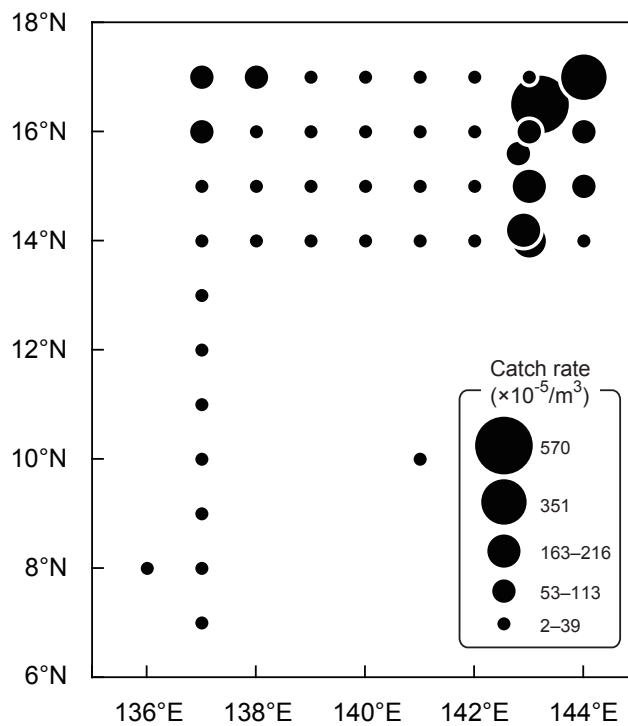
魚卵はすべての採集点で採集され、1曳網あたりの採集卵の数は大きく異なった(1-1,163

**Table 5-3-1** Results of DNA species identification of eggs collected during KH-02-2 cruise, based on 16S ribosomal RNA analysis

Order	Family	Species	Morphological types	Number of eggs
Anguilliformes	Ophichthidae	<i>Myrichthys maculosus</i>	ID-01	8
	Derichthyidae	<i>Derichthys serpentinus</i>	ID-07 IIB-04 IIID-01	15
		<i>Nessorhamphus ingolfianus</i>	ID-15	1
	Serrivomeridae	<i>Serrivomer sector</i>	ID-06	7
Clupeiformes	Engraulidae	<i>Encrasicholina punctifer</i>	IIB-01	3
Argentiniiformes	Microstomatidae	Microstomatidae sp.	IIIA-03	6
Stomiiformes	Gonostomatidae	<i>Diplophos taenia</i>	IIIB-03	5
	Sternoptychidae	<i>Argyropelecus hemigymnus</i>	IC-12	42
	Melanostomiidae	<i>Eustomias enbarbatus</i>	ID-12	2
Lampridiformes	Lampridae	<i>Lampris guttatus</i>	IIC-02	81
	Lophotidae	<i>Lophotus capellei</i>	IIIC-04 IIIC-05	8
	Trachipteridae	<i>Zu cristatus</i>	IIC-07	2
	Regalecidae	<i>Regalecus glesne</i>	IIA-02	5
Gadiformes	Macrouridae	<i>Ventrifossa</i> sp.	IA-02	1
Stephanoberyciformes	Melamphaidae	<i>Scopelogadus mizolepis</i>	IB-02 IIB-01 IIIB-02	46
Beloniformes	Fistulariidae	<i>Fistularia commersonii</i>	IID-06	1
	Exocoetidae	Exocoetidae sp.	IIA-04 IIA-05 IIA-07	19
		<i>Exocoetus monocirrhus</i>	IIC-01	8
		<i>Oxyporhamphus micropterus</i>	IIA-03	70
Perciformes	Acropomatidae	<i>Synagrops japonicus</i>	IC-23	2
	Serranidae	<i>Cephalopholis</i> sp.	IC-33	7
	Echeneidae	<i>Phtheichthys lineatus</i>	IC-04	30
		<i>Remora osteochir</i>	IC-03 IC-07 IC-37	15
	Bramidae	<i>Brama orcini</i>	IC-01 IC-09 IIIC-02	144
	Nomeidae	<i>Psenes cyanophrys</i>	IC-24	2
	Scombrolabracidae	<i>Scombrolabrax heterolepis</i>	IB-01	95
	Istiophoridae	Istiophoridae sp.	IC-17	25
		<i>Tetrapturus</i> sp.	IB-04	2
	Xiphiidae	<i>Xiphias gladius</i>	IC-16	19
	Scombridae	<i>Katsuwonus pelamis</i>	IC-08	982
<i>Thunnus</i> sp.		IC-30 ID-02	28	
Tetraodontiformes	Ostraciidae	<i>Lactoria diaphana</i>	IIIA-02	5
	Diodontidae	<i>Diodon hystrix</i>	IIIC-03	50
	Molidae	<i>Ranzania laevis</i>	IIIC-01	54



**Fig. 5-4-1** Comparisons of the number of eggs collected among the different regions of the KH-02-2 sampling survey. Black circles indicate the stations where eggs collected. The catches of eggs at stations along the same longitude (°E) and latitude, or around the same seamounts were combined



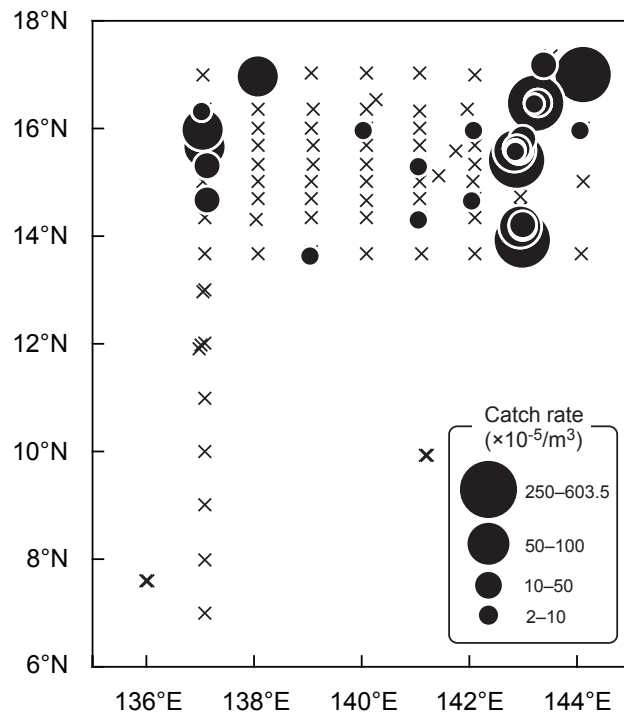
**Fig. 5-4-2** Comparisons of the catch rates (number of eggs per 1 m<sup>3</sup> of water filtered) among the different regions of the KH-02-2 sampling survey. Black circles indicate the stations where eggs collected. The catches of eggs at stations along the same longitude (°E) and latitude, or around the same seamounts were combined

個；平均 ± 標準偏差 =  $42.9 \pm 117.4$ ) (Fig. 5-4-1). 1回の曳網あたりに最も多く採集されたのは Pathfinder 海山上の採集点であり ( $n = 1,163$  eggs;  $10799 \times 10^{-5}/\text{m}^3$ ), 採集された計 5,321 個の卵のうち、およそ半数の 2,662 個は Pathfinder 海山直上の採集点から採集された。Arakane, Suruga 直上の採集点と合わせ、海山直上だけで全体の 69% が採集された。卵の採集密度は 3 海山直上の採集点が B 海域および  $137^\circ$  線よりも高かった (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.001$ , Dunn's multiple comparison test,  $p < 0.05$ ) (Fig. 5-4-2). しかし、3つの海山間では、採集密度に差は認められなかった。

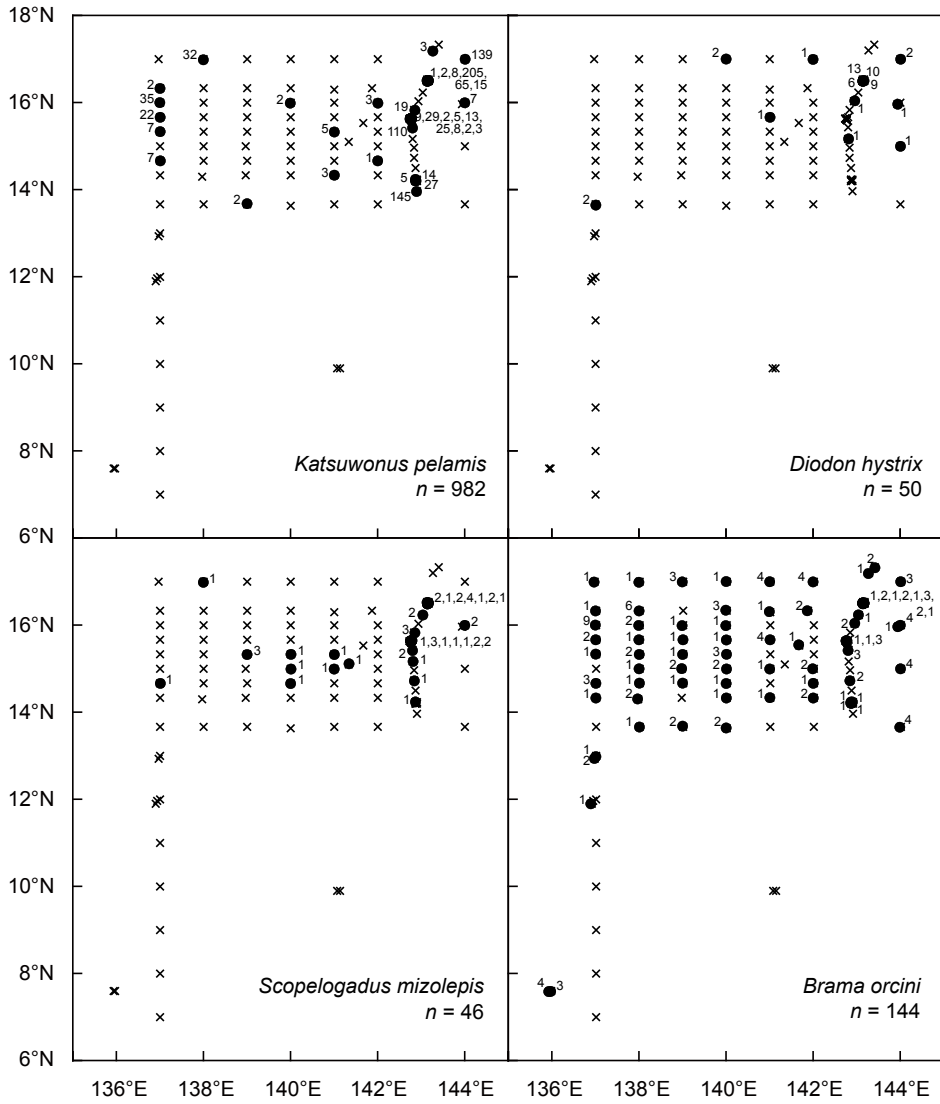
## 第2項 分類群が判明した卵の分布

分類群が判明した卵のうち、30個以上の卵が採集された種で分布を比較したところ、海域による分布の偏りが認められた。種が同定された卵の中で、最も採集数が多かったカツオ卵は、B海域の  $16^\circ\text{N}$ ,  $137^\circ\text{E}$  周辺 ( $0-64.8 \times 10^{-5}/\text{m}^3$ ; 平均 ± 標準偏差 =  $19.0 \pm 26.4 \times 10^{-5}/\text{m}^3$ ) と海山上 ( $0-603.5 \times 10^{-5}/\text{m}^3$ ;  $72.6 \pm 180.2 \times 10^{-5}/\text{m}^3$ ) で比較的高い密度を示し (Fig. 5-4-3), A海域で多く採集された ( $\chi^2$  検定,  $p < 0.001$ ) (Fig. 5-4-4). 一方で、B海域の  $139^\circ\text{E}-142^\circ\text{E}$ , B海域南方の  $137^\circ\text{E}$  線上, C海域ではわずかしこ採集されなかった。ネズミフグ ( $n = 50$ ) とヨロイギンメ ( $n = 46$ ) の卵は、それぞれ 72% と 80% が A 海域から採集され、カツオと同様に海山とその周辺 (A 海域) に多かった ( $\chi^2$  検定,  $p < 0.001$ ) (Fig. 5-4-4). 一方、マルバラシマガツオ ( $n = 144$ ) は調査海域全体から広く出現し、海山周辺からは 23% しか採集されず、海山よりも外洋域に多く出現していた ( $\chi^2$  検定,  $p < 0.001$ ) (Fig. 5-4-4). ムカシクロタチ, アカマンボウ, サヨリトビウオ, クサビフグ, テンガンムネエソ *Argyropelecus hemigymnus*, スジコバン *Phtheichthys lineatus* は海山域で 33-45% が採集されたが、海山域に集中する傾向は認められず、海域間による採集数の差もなかった ( $\chi^2$  検定,  $p > 0.05$ , Fig. 5-4-5).

その他の種では、マグロ属 ( $n = 28$ ), メカジキ *Xiphias gladius* ( $n = 19$ ), モヨウモンガラドオシ *Myrichthys maculosus* ( $n = 8$ ), ユカタハタ属 ( $n = 7$ ) の4種類の卵が、採集数は 7-28 個と少ないものの、その 63-96% が A 海域に出現し、海山周辺に比較的多く出現する傾向がみられた (Fig. 5-4-6). 一方、6-25 個が採集されたバショウカジキ科 ( $n = 25$ ), トビウオ科 ( $n = 19$ ), クビナガアナゴ *Derichthys serpentinus* ( $n = 15$ ), ハゴロモトビウオ *Exocoetus monocirrhus* ( $n = 8$ ), アカナマダ *Lophotus capellei* ( $n = 8$ ), モトノコバウナギ *Serrivomer sector* ( $n = 7$ ), ソコイワシ科の1種 *Microstomatidae* sp. ( $n = 6$ ), コバンザメ *Remora osteochir* ( $n = 6$ ) の8種類の卵は、海山で採集された個数が沖合に比べて少なく (0-53%), 広い範囲から出現し、海山周辺に集中する傾向は認められなかった (Fig. 5-4-7). その他、採集個数が 5 個以下だった 12 種類の卵では、タイワンアイノコイワシ *Encrasicholina punctifer* の卵 ( $n = 3$ ) は海山周辺にのみ出現し、対してウミスズメ *Lactoria diaphana* の卵 ( $n = 5$ ) は調査海域の広い範囲に出現するなど、種によって

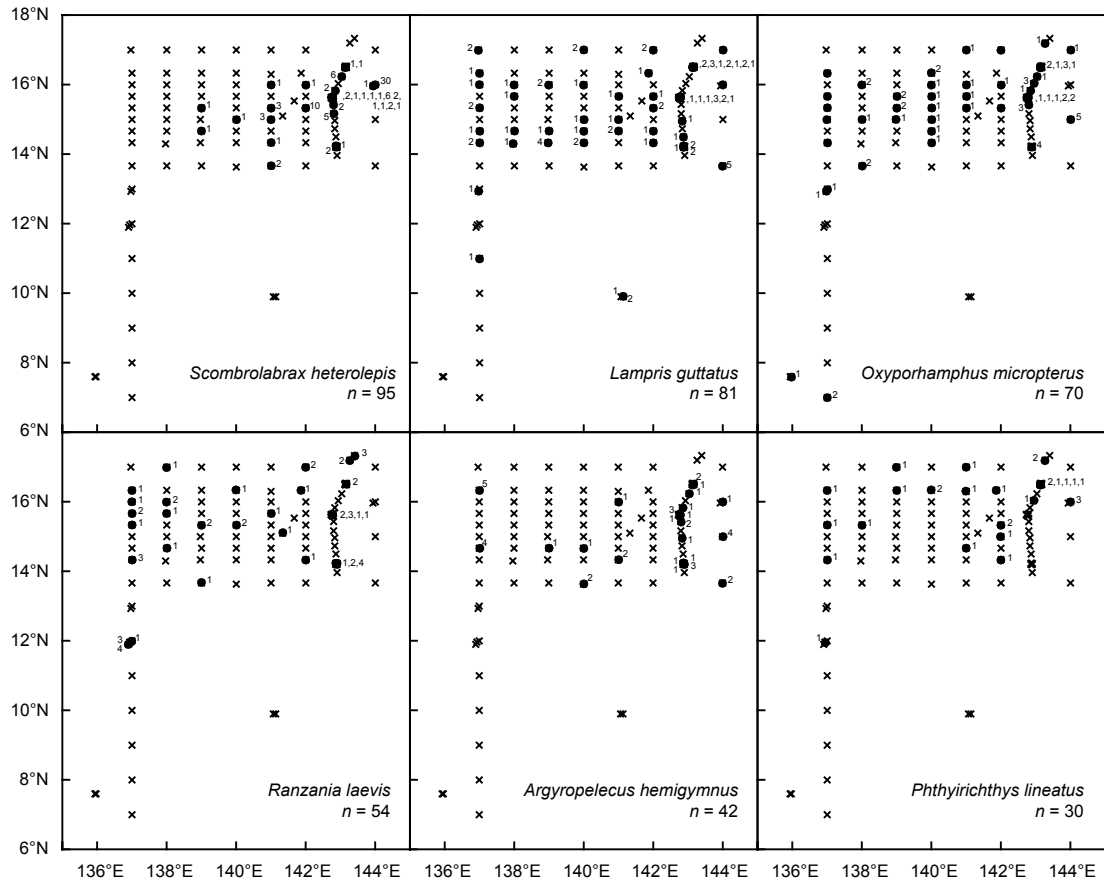


**Fig. 5-4-3** Distribution of eggs of the *Katsuwonus pelamis* during the KH-02-2 sampling survey. Crosses indicate stations where their eggs were not detected. Circles indicate the catch rates of *K. pelamis* expressed as the number of eggs per 1 m<sup>3</sup> of water filtered

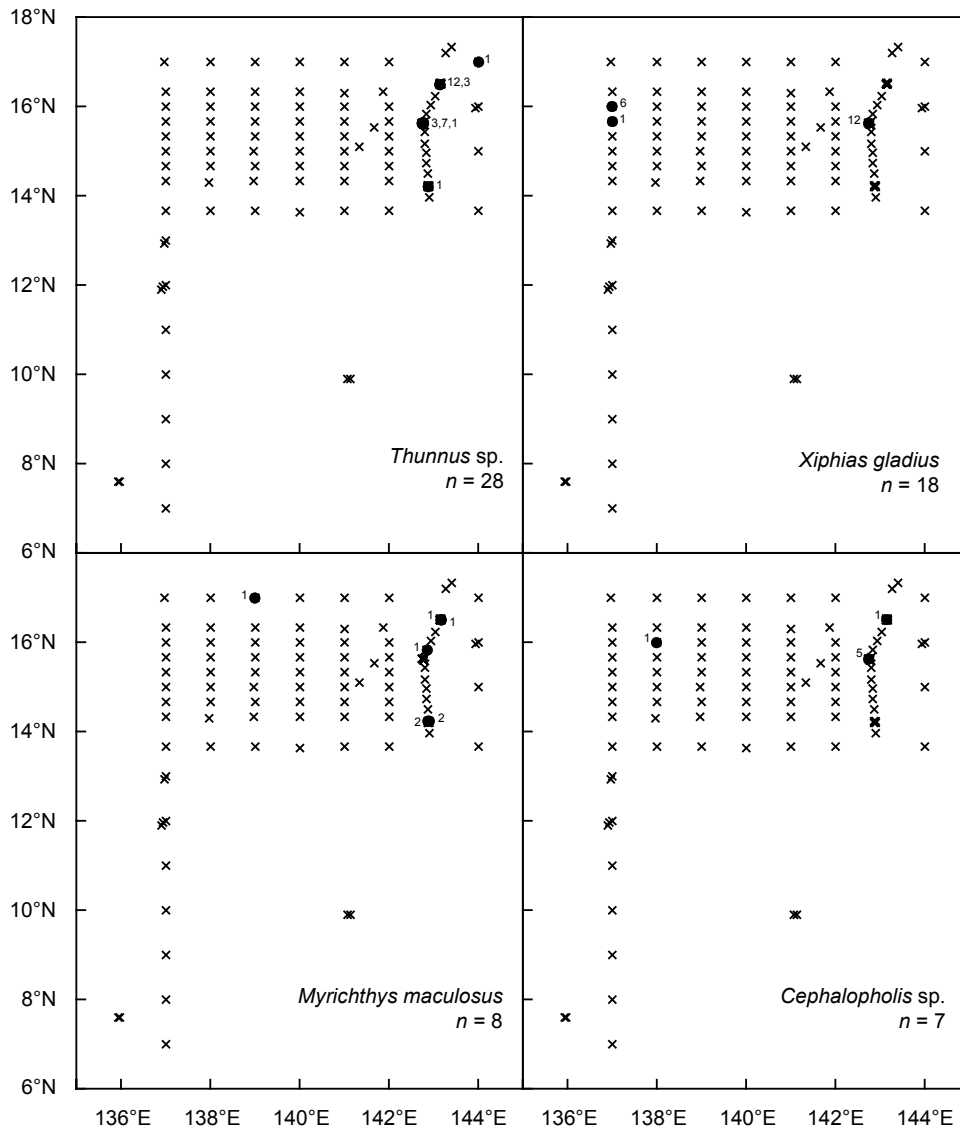


**Fig. 5-4-4** Presence of eggs of the *Katsuwonus pelamis*, *Diodon hystrix*, *Scopelogadus mizolepis* and *Brama orcini* during the KH-02-2 sampling survey. Black circles and crosses indicate present and absent stations, respectively. Numerals indicate the number of eggs collected

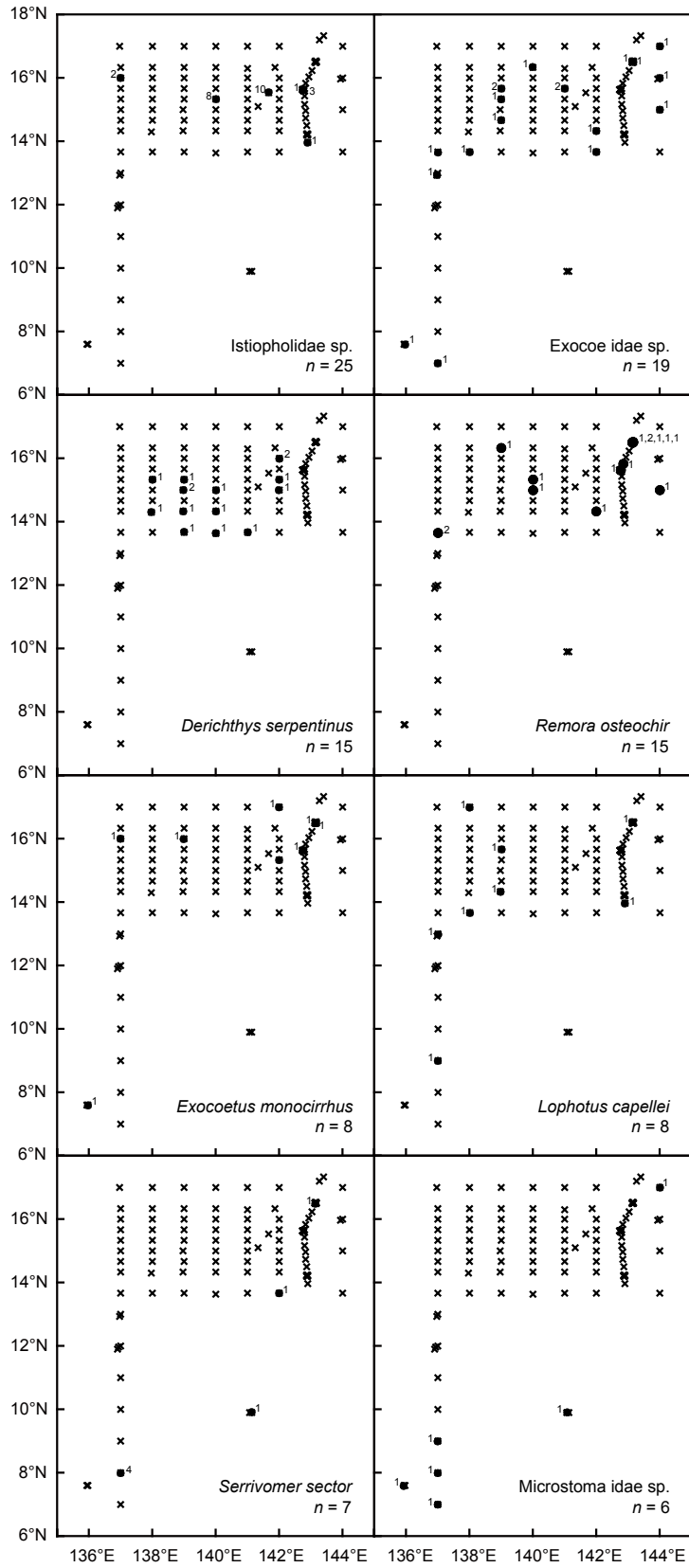




**Fig. 5-4-5** Presence of eggs of the *Scombrobrax heterolepis*, *Lampris guttatus*, *Oxyporhamphus micropterus*, *Ranzania laevis*, *Argyropelecus hemigymnus* and *Phthyrichthys lineatus* during the KH-02-2 sampling survey. Black circles and crosses indicate present and absent stations, respectively. Numerals indicate the number of eggs collected



**Fig. 5-4-6** Presence of eggs of the *Thunnus* spp., *Xiphias gladius*, *Myrichthys maculosus* and *Cephalopholis* spp. during the KH-02-2 sampling survey. Black circles and crosses indicate present and absent stations, respectively. Numerals indicate the number of eggs collected



**Fig. 5-4-7** Presence of eggs of the Istiopholidae spp., Exocoetidae spp., *Derichthys serpentinus*, *Remora osteochir*, *Exocoetus monocirrhus*, *Lophotus capellei*, *Serrivomer sector* and Microstomatidae sp. during the KH-02-2 sampling survey. Black circles and crosses indicate present and absent stations, respectively. Numerals indicate the number of eggs collected

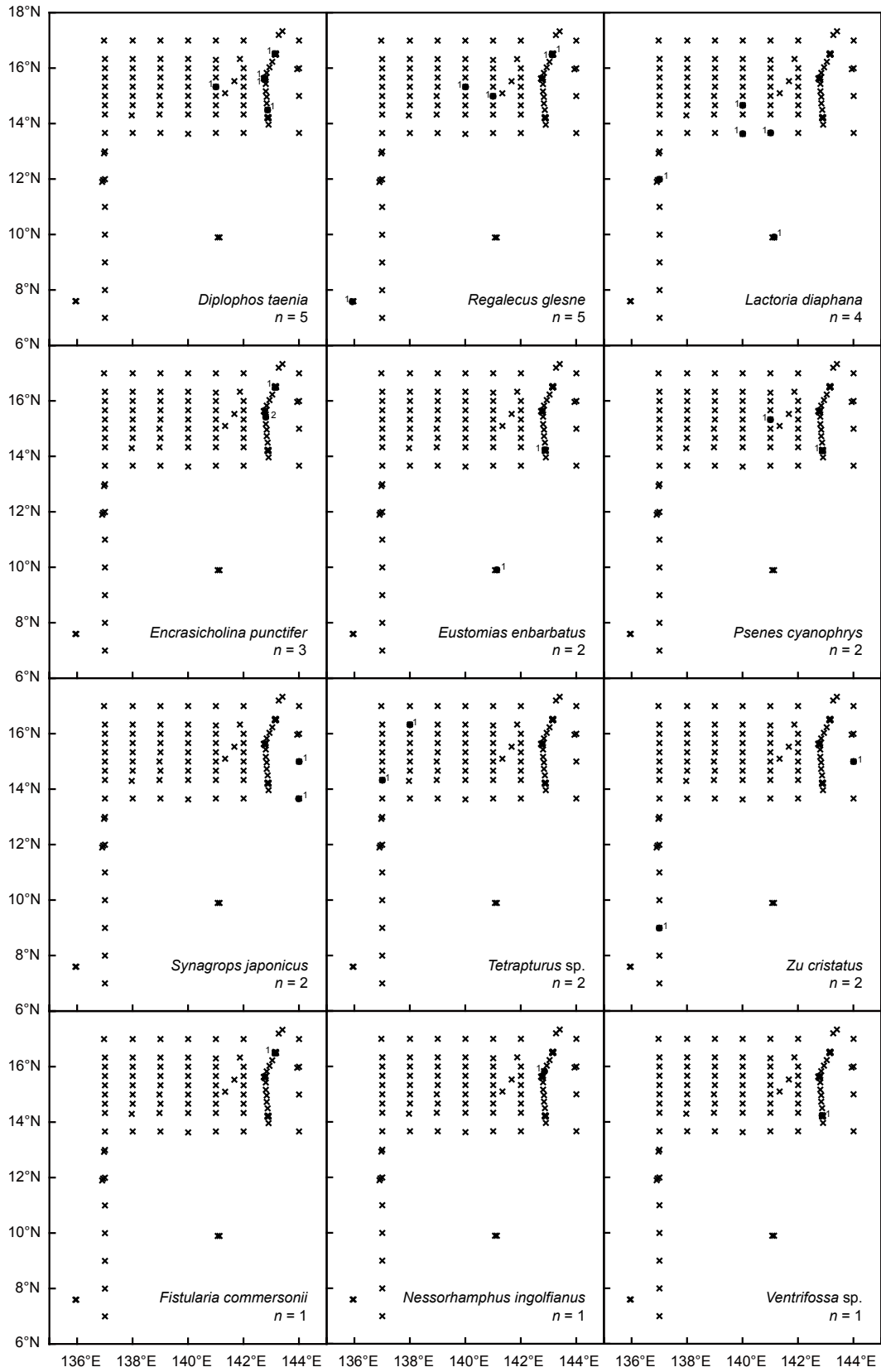


Fig. 5-4-8 Presence of eggs of 12 miscellaneous species during the KH-02-2 sampling survey. Black circles and crosses indicate present and absent stations, respectively. Numerals indicate the number of eggs collected

卵の分布パターンに違いがみられた (Fig. 5-4-8).

### 第3項 種不明卵の分布

DNA 解析をおこなったものの、BLASTにより種が不明だった37クラスタの卵の分布をクラスタごとに比較した (巻末 Appendix 5-7 参照). 最も採集数が多かった Cluster 7 の卵 ( $n = 183$ ) は、Pathfinder 直上の採集点でのみ採集された. 同様に、Cluster 4 ( $n = 54$ ) の卵も海山直上でのみ採集され、Pathfinder 直上だけで70%を占めた. その他13クラスタは、海山周辺海域でしか採集されなかった. 一方、Cluster 29 (IA05 と IB-03,  $n = 54$ ) は A 海域には15%しか出現せず、A 海域以外での出現が多かった ( $\chi^2$  検定,  $p < 0.001$ ).

また、DNA 解析をおこなわなかった20タイプの卵では (巻末 Appendix 8 参照)、複数種を含むと考えられる IC-40 を除き、各タイプの採集数は1-4個とわずかであったが、海山周辺で多くのタイプの卵が採集されていた.

## 第5節 考察

### 第1項 マリアナ海域における DNA 種査定の有効性と問題点

形態学的に分けられた88タイプの魚卵すべてで16S rRNA の解析が可能だった. その結果、16S rRNA の配列によって分けられた71クラスタのうち39%にあたる28クラスタが種に同定された. 加えて、9%にあたる6クラスタで属もしくは科のレベルで分類群が推定できた. これら出現種は太平洋の外洋域に分布することが報告されており (Froese and Pauly, 2011)、本研究の結果は生態学的に妥当であると考えられた. この結果は、マリアナ海域のような外洋域において、出現する候補種が不完全にしかわかっていない未知の母集団を対象とする場合でさえも、DNA による種査定法は新しい強力なツールを提供することを示唆している.

従来の形態形質による魚卵の同定では、個体発生に伴う胚の形態変化が最も大きな問題点のひとつだった. 胚の形態は受精直後から孵化時まで、ごく短い時間の間にも大きく変化するため、人工受精もしくは飼育環境下で得られた、種が既知の卵を用いた長期にわたる飼育実験をおこなわなければ信頼できる形態変化のデータを得ることができない. 本研究では、形態によって分けたタイプを DNA クラスタリングで再検討することにより、発生段階の異なる同種の卵をまとめることができた. すなわち、IB-02, IIIB-01, IIIB-02, また、IIA-04, IIA-05, IIA-07 は DNA によりそれぞれひとつのクラスタとしてまとめられ、さらにヨロイギンメ、また、トビウオ科としてそれぞれ同定された. 前者は油球の数と位置が、後者は胚の色素の配置が大きく異なっていた. 発生に伴う色素の出現は魚類において普遍的にみられる現象であり、

発生初期での油球数の減少は、ハモとウナギ（本研究第2章, Yamamoto and Yamauchi, 1974; Yamamoto et al., 1975）、また、ソコイワシ科とトウゴロウイワシ目 Atheriniformes でも報告されている（Ahlstrom et al., 1984; White et al., 1984）。同様に、マルバラシマガツオ（IC-01, IC-09, IIC-02）、クビナガアナゴ（ID-07, IIB-04, IID-01）、アカナマダ（IIC-04, IIC-05）、ヒシコバン（IC-03, IC-07, IC-37）、マグロ属（IC-30, ID-02）と同定された卵においても、発生段階が異なる同種の卵であると判断することができた。このように、発生に伴って変化しないDNAを用いることによって、発生による形態変化の問題を克服することができた。

しかしながら、DNAによる種査定の問題点もみとめられた。6クラスタ9タイプの卵では、複数種の配列と99%以上の相同性を示し、今回設定した99%の相同性基準では1種に特定することができなかった。これらの分類群においては、異種間で識別に十分な変異が16S rRNA領域に蓄積されていないと考えられる。DNAバーコーディングでは、生殖隔離と種分化に伴ってDNAに蓄積されてきた変異を指標として種を判断する。ここで、種の分岐年代が違えば変異の蓄積量も異なり、種として分けられているからといって、必ずしも対象領域に同じ量の変異が蓄積されているとは限らない。例えば、本研究ではマカジキ科とマカジキ属では種間の相同性が高く種レベルで識別できなかった。分岐年代が浅いと考えられているマカジキ科の *Kajikia audax* と *K. albidus* や、マカジキ属3種では、mtDNAのCOI、調節領域、ND2、12S rRNA、また、核のロドプシン遺伝子を用いても種のレベルで識別できない（Collette et al., 2006; Hanner et al., 2011）。このように、種査定に用いた領域で変異が少ないために識別できない分類群が出現したときには、より変異の大きい領域で種特異的なマーカーを探索する必要があるだろう。

mtDNAを用いて種査定をおこなうときの別の問題は遺伝子移入（introgression）である。本研究ではマグロ属の7種が種間で非常に高い相同性を示したため識別が不可能であった。マグロ属では、ビンナガ *Thunnus alalunga* のmtDNAが、過去に起きた交雑によってクロマグロ *T. orientalis* とタイセイヨウクロマグロ *T. thynnus* に移入していることが報告されている（Chow and Kishino, 1995）。これらマグロ属のうち、クロマグロ、ビンナガ、キハダ、コシナガ、メバチの卵は本研究の調査海域に同所的に出現すると予想されるが、これらをmtDNAのみを用いて識別するのは不可能だろう。マグロ属に近縁な分類群では、同じサバ科の *Scomberomorus maculatus* と *S. regalis* で遺伝子移入が起きていることが核のITS-1領域の解析と、COIに基づくUPGMA解析の結果を比較することで示されている（Paine et al., 2007）。本研究のようにmtDNAだけを対象とした場合は、交雑と遺伝子移入は誤同定を導く大きな原因となると考えられる。これまでのDNAによる種査定に関する多くの研究は、核よりもミトコンドリアを対象としてきた（Teletchea, 2009）。核DNAを用いた種査定の研究は数少ないものの、例えば、マカジキ科とメカジキ科では、ミトコンドリアのND4遺伝子と同様に核のMN32-2遺伝子座が種を識別するマーカーとなることが報告されている（McDowell and Graves, 2002）。今後、ミトコンドリアに加えて核のDNAマーカーを使用した手法も検討する必要がある。

本研究では、採集した卵の中から28種が同定され、属や科レベルも合わせれば34種類が同定できた。Kawakami et al. (2010) は本研究と同じデータで同様の解析をおこない、16種を同定した。この結果の差は、利用できるデータベース上の情報が増加し、同定可能な種が増えたために生じたと考えられる。また、本研究ではマリアナ海域で採集した32種の成魚のDNAデータも新たに加えて解析をおこなった。その結果、マルバラシマガツオ、ムカシクロタチ、アカナマダ、ユキフリソデウオ、ソコイワシ科の1種、フサカザリホシエソ *Eustomias enbarbatus*、スミクイウオ *Synagrops japonicus* の7種は、本研究で追加した配列によって同定された。DNAによる種査定は種が既知の配列の量が成功率の上昇に直結する。今後、これまでDNAデータの蓄積が少なかったマリアナ海域のような海域においてもDNAデータの蓄積が進むことによって、DNA種査定法の有効性は高まっていくと期待される。

しかし、データ量が増えたことによる問題点もあった。まず、Kawakami et al. (2010) で *Ventrifossa garmani* と同定されていた卵が、同じミサキソコダラ属の *V. longibarbata* と高い相同性を示した。これは、登録種数が増えたために、これまでは見逃されていた遺伝的変異の少ない近縁種が発見された例である。また今回は、Kawakami et al. (2010) で検出されたテングハギ属 *Naso* sp. と *Scomber scombrus* が検出されなかった。今回はBLAST検索の結果の表示数を250件としており、これを500件まで増やすと両者が検出された。これらの配列は、登録されている配列長が短く、アラインメント長もそれぞれ429–431bpと530bpと比較的短かったため、相同性が高くてもスコアが低かったために検出されなかったのだろう。*S. scombrus* は誤同定された標本に基づいてDNAデータが登録されていると考えられるので除外するが(Kawakami et al., 2010)、このように、データ数が増えてしまったために短いアラインメントの結果が高い相同性を持つにも関わらずマスクされる可能性があると予想できる。この問題を解決するためにはスコアの取りうる値を統一するために参照データベース上の配列の長さを揃える必要がある。出現する種があらかじめ完全に分かっている海域では、DNAデータのサブセットを作って参照データベースとすることも有効だろう。

## 第2項 外洋性魚類の産卵生態

本研究で、マリアナ海域に出現する魚卵の種組成とその分布を初めて報告した。その結果、採集個数が少ないために明確な結論は得られなかったものの、魚卵の分布には3つのパターンがあることが示唆された。すなわち、1) 海山に集中する「海山型」、2) 外洋の広範囲に分布するが海山にはほとんど出現しない「外洋型」、3) 広範囲に出現し、海山の有無に関わらずどこにでも一定の密度で出現する「一様型」である。今回種が同定された卵のうち、カツオ、ネズミフグ、ヨロイギンメの卵は海山周辺海域に出現が集中し、海山型に分類された。対照的にマルバラシマガツオの卵は海山周辺にはわずかにしか出現しない外洋型、ムカシクロタチやアカ



マンボウなどは海域による差のない一様型に分類された。魚類の卵期は数日から数週間と幅広く、採集された卵の発生段階と、海流による産卵後の分散を考慮しなければ正確な産卵場の推定は難しい。しかしながら、卵が出現した場所と産卵場は空間的に近い位置にあることは間違いなく、このような魚卵の分布はそれぞれの魚種の産卵生態を反映していると考えられる。

卵が海山型の分布を示した種のうち、ネズミフグは浅海の岩礁性の魚類であり (Leis, 1978)、水深の浅い海山周辺を産卵場としていると考えられた。同様に、卵が外洋型の分布を示したマルバラシマガツオ、一様型の分布を示したアカマンボウとサヨリトビウオ、クサビフグ、スジコバンは典型的な表層性、または外洋性の魚類であり (中坊, 2000c)、これらも成魚の生息場と産卵場の範囲が一致すると考えられた。また、ムカシクロタチの卵が一様型だったのに対しヨロイギンメの卵は海山型の分布を示し、世界の海洋に広く分布する中深層性魚類 (Ebeling, 1986; Parin, 1990) であっても、産卵生態が種により異なることが示唆された。一方、カツオは群れで回遊し、西部太平洋の 24°S - 35°N の非常に広い海域で一年中産卵することが報告されている (Naganuma, 1979)。本研究でみられたカツオ卵の分布は、既知の産卵生態と一致するものの、カツオの産卵が広範囲にわたる産卵域の中で、海山周辺にも集中する可能性を示唆した。マグロ属の卵も、採集数は少ないが、ほぼすべてが海山直上に出現しており、カツオやマグロのような高度回遊性魚類の産卵場形成にも海山がなんらかの影響を与えていることが示唆された。

### 第3項 外洋性魚類の産卵と海山との関わり

大陸のはるか沖合に位置する海山はユニークな生物相および生態系をもつことが報告されている (Wilson and Kaufmann, 1987; Rogers, 1994)。また、海山周辺海域は生産性が高く、多くの浮魚資源を支えている (Dower and Mackas, 1996)。そのため、ホラアナゴ科 Synphobranchidae の *Meadia abyssalis* (Fujikura et al., 1998)、クサカリツポダイ *Pseudopentaceros wheeleri* (Humphreys, 2000)、メバル属魚類 *Sebastes* spp. (Dower and Perry, 2001) が海山周辺で産卵すると考えられている。本研究の結果でも、海山周辺では卵の採集数が他の海域に比べ圧倒的に多く、カツオ、ネズミフグ、ヨロイギンメ以外にも種が不明の卵が多数出現した。これらのことから、海山は外洋域に生息する魚類の産卵場として多くの魚類に利用されている可能性があることが示唆された。

魚類が成熟し、産卵に至るには水温の変化が大きく影響する。しかしマリアナ海域のような熱帯の外洋域では水温などの環境変化が乏しい。今回はそれぞれの卵の採集個数が少なく、水温、塩分、海流、水深等の物理環境を加えた解析もおこなわなかった。今後は卵の採集に加えて物理環境の解析を加えることで、環境変化に乏しい外洋に生息する魚類が産卵するきっかけや、産卵域の選択に関わるメカニズムを明らかにすることができるだろう。

## 第6章 DNA 種査定に基づく卵の形態記載

本研究では、DNA 種査定法をマリアナ海域と浜名湖で採集した計 428 個の魚卵に適用した。その結果、浜名湖で 26 種、マリアナ海域で 28 種の魚卵を DNA に基づいて同定することができた。また、16S の相同性からは種に帰属させることができなかったものの、浜名湖で 19 個の、マリアナ海域で 43 個の、遺伝的に識別できるクラスタを発見した。DNA 解析をおこなわなかった卵の中では、形態学的な形質に基づき浜名湖で 11 タイプ、マリアナ海域で 20 タイプが識別できた。これらのサンプルを用いることで、DNA によって成魚、もしくは遺伝的なグループと高い信頼性をもって対応づけられた魚卵の形態を記載することができる。本章では、形態と DNA によって整理されたグルーピングに基づき、卵の形態を記載した。さらに、両海域における魚卵の形態的特徴も比較した。

### 第1節 材料と方法

#### 第1項 魚卵のグルーピング

形態の記載は、第4章で浜名湖において、第5章でマリアナ海域において採集された魚卵に基づいておこなった。第4章と第5章でおこなった形態によるタイプ分けと、DNA によるクラスタリング、BLAST による種査定結果に基づいてタイプおよびクラスタを整理した。さらに、採集された魚卵を以下の3グループに分けて扱った。

- 1) DNA に基づき種が同定された卵（以下、種）
- 2) DNA によってクラスタとして分けられたものの、種が不明だった卵（以下、クラスタ）
- 3) DNA 解析をおこなわず、タイプのみを分けた卵（以下、タイプ）

その結果、浜名湖では 26 種、19 クラスタ、11 タイプの計 56 種類が、マリアナ海域では 28 種、43 クラスタ、20 タイプの計 91 種類の卵の形態を記載した。浜名湖のサンプルでは、形態により複数種が混同されている可能性が DNA によって示唆されたため、DNA 解析をおこなった個体のみで種とクラスタを記載した。なお、発生段階の定義は第2章の第1節第3項と同様とした。

## 第2項 飼育方法

浜名湖で14種、マリアナ海域で7種の卵は飼育実験をおこない、孵化仔魚の形態も記載した。飼育は、採集された魚卵をプラスチック製の培養プレート（Iwaki Microplate 6 Well または 12 Well）に1個ずつ収容しておこなった。飼育中の水温は、浜名湖では外気温とほぼ同じとし（2004年8月26.0–31.8°C, 10–12月：15.2–20.5°C, 2005年1–3月：12.0–15.2°C, 4月：17.8–20.1°C, 6–9月：25.2–31.8°C）、マリアナ海域では白鳳丸研究室内の室温（25°C前後）とした（Table 6-1-1）。通気はおこなわず、適宜換水した。飼育卵は第4章、第5章と同様の方法で適宜観察をおこない、記載と測定は写真に基づいておこなった。

## 第2節 形態の記載

浜名湖とマリアナで採集された卵の形態を記載し、それぞれ Plates 1–7 と、Plates 8–19 に示した。さらに、それぞれの調査地で採集された卵の飼育によって得られた21種の孵化仔魚の形態を Plates 20–23 と Plates 24, 25 に示した。これにより、浜名湖とマリアナ海域に出現する浮遊性魚卵の形態学的なグルーピングと、DNAによる種査定結果との対応が可能になった。

浜名湖で採集され、卵の形態を記載した26種のうち、7種（アラメガレイ、アカササノハベラ、ホシササノハベラ、クロサギ、ワニエソ、ササウシノシタ、ダイナンウミヘビ）の卵は新規記載となった。また、マリアナ海域で採集され、卵の形態を記載した28種のうち、15種（テンガムネエソ、マルバラシマガツオ、ネズミフグ、ネッタユメハダカ、フサカザリホシエソ、モヨウモンガラドオシ、ヘラアナゴ、スジコバン、スジハナビラウオ、ヒシコバン、ムカシクロタチ、ヨロイギンメ、モトノコバウナギ、スミクイウオ、ソコイワシ科の1種）の卵は新規記載となった。

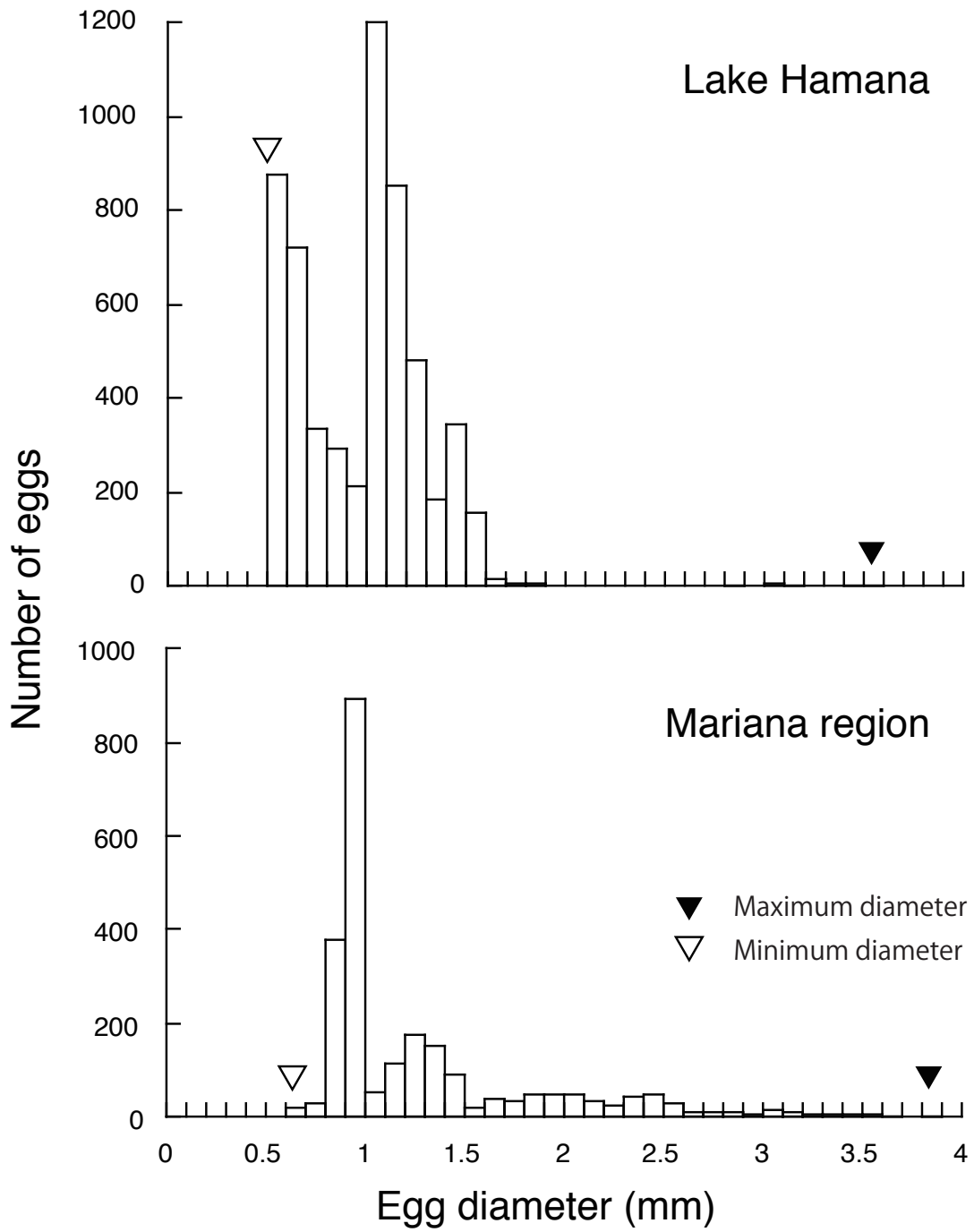
## 第3節 形態学的多様性

浜名湖で採集された卵の卵径は、0.50–3.54 mm だったが（ $n = 5,680$ ）（Fig. 6-3-1）、直径が2 mm 以上の卵は極めてまれであり（7個）、卵径0.5 mm と1.2 mm 前後の卵が大部分を占めた。一方、マリアナ海域で採集された卵の卵径は、0.62–3.86 mm だった（ $n = 2,387$ ）（Fig. 6-3-1）。卵径組成にはいくつかのピークがみられ、0.9 mm 前後の卵が最も多かったものの、1.3 mm, 2 mm, 2.5 mm 前後、さらに3 mm 以上の卵も比較的多く採集されていた。

採集された卵を典型的にグルーピング（IA–IIID 群）したところ、浜名湖では11のグループに分けられ、そのうち、油球をもち囲卵腔の狭いIC群が18タイプと最も多い形態的なタイプを含んでおり、形態によって識別できた45タイプのうち20%を占めた。次に油球をもたず囲

**Table 6-1-1** Rearing temperature during sampling period at Lake Hamana

Month	Rearing temperature
2004 Aug.	26.0–31.8
Oct.	20.0–20.5
Nov.	18.4–20.1
Dec.	15.2–19.8
2005 Jan.	12.0–15.0
Feb.	12.5–15.2
Mar.	13.2–15.0
Apr.	17.8–20.1
Jun.	25.2
Jul.	26.2–30.2
Aug.	27.6–31.0
Sep.	26.5–27.2



**Fig. 6-3-1** Comparison of distribution of egg diameter between the eggs collected in Lake Hamana (upper panel) and that collected in western Mariana region (lower panel). Black and white triangle indicate the maximum and minimum egg diameter, respectively

卵腔の狭い IIC 群が 7 タイプと多く (16%), その他は 1-3 タイプを含んでいた (2-7%)。マリアナでも同様に、採集された卵は典型的に 12 のグループに分けられ、そのうち、IC 群が 39 種類と最も多く、マリアナに出現した 108 の形態タイプの 36% を占めた。次に油球を 1 個もち囲卵腔の広い ID 群が多く (17 タイプ, 16%), その他のグループはそれぞれ 1-8 タイプが含まれていた。

## 第4節 考察

### 第1項 形態学的記載における DNA 種査定法の有効性

本章では、16S の解析結果に基づいて形態のタイプ分けを整理し、種、DNA によって識別されたクラスタ、DNA は不明であるものの形態によって識別できるタイプに分けて魚卵の形態を記載した。その結果、22 種で新規に魚卵の形態を記載することができ、DNA による種査定法は、これまで所属が不明であった卵を既知の種に対応づけるために非常に有効であると考えられた。また、種が判別できなかった卵についても、形態情報だけでなく 16S rRNA の配列も得たことで、より信頼できるグルーピングが可能だった。これら不明卵の 16S rRNA 配列を将来再解析することによって、これらの卵を種に帰属させることができると考えられ、種組成の解明と卵の形態の記載の重要な基礎情報となるだろう。

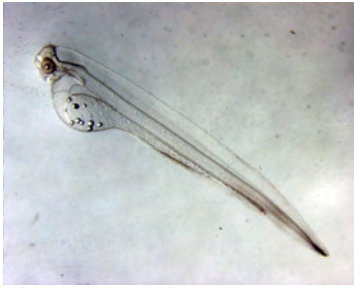
16S の種査定結果に基づいて形態を記載した結果、今まで分類が困難とされてきたいくつかの種について、新たな形態学的な分類形質があることが示唆された。浜名湖で採集されたマイワシ、コノシロ、サッパの 3 種は、形態ではすべて ID-01 としてまとめられていた。この 3 種の卵は、卵径と油球径が大きく重複し、識別するには生時の卵黄の亀裂の大きさと油球の大きさの大小関係、または孵化仔魚の筋節数と色素パターンを比較しなければ識別できない (池田・水戸, 1988)。しかしながら本研究では、この 3 種に同定された卵の卵径は、やや重複するものの差が認められ (サッパ: 1.38 mm, コノシロ: 1.25-1.59 mm, マイワシ: 1.53-1.83 mm)、油球径の比 (サッパ: 6.5%, コノシロ: 8.0-11.4%, マイワシ: 9.4-11.7%) と油球の色 (サッパ: 透明, コノシロとマイワシ: 黄色みをおびる) にも違いがみられた。浜名湖においてはこの 3 種はこれらの形態形質の組み合わせによって識別できる可能性がある。また、キチヌとクロダイの卵も、キチヌ卵 (直径 0.78-0.86 mm) がクロダイ卵 (直径 0.88-0.89 mm) よりも卵径が小さく、油球径の比がやや大きかったことから (キチヌ卵, 22.7-25.5%, クロダイ卵, 21.6-22.8%), これらの形質で識別できる可能性が示唆された。これまで形態による卵の分類ができなかった種についても、DNA 種査定の結果に基づいて形態を再検討することにより、新たな分類形質を見つけることができるだろう。

DNA による種査定結果が、既存の形態の記載と食い違う場合もあった。本研究でリュウグウノツカイと同定された卵 (IIA-02) は、卵膜上に短い棘を多数もつことと、油球がないことで、*Lophotus* sp. の卵の形態 (Olney, 1984) と酷似していた。しかしながら、得られた 16S の配列は、既存の *Lophotus* 属のいずれの配列 (*L. capellei*; AF049737, AY036619; *L. lacepede*; AY036618, AY036619, AY947838) とともに高い相同性を示さなかった。データベース上の配列が誤同定されたサンプルに基づいている可能性もあるが、*Lophotus* 属とリュウグウノツカイ (DQ532951, AY368296) の配列間相同性は 95% と比較的 low であり、登録されているリュウグウノツカイの配列が *Lophotus* 属のサンプルから由来したとも考えにくい。従って、これまで *Lophotus* 属の卵とされていた記載は、サンプルが誤同定されて記載されていたのかもしれない。DNA 配列に基づいて過去の知見を整理することで、魚卵の形態に関する知見のより信頼できる体系化がおこなえるだろう。

## 第2項 浮遊性魚卵の形態学的多様性

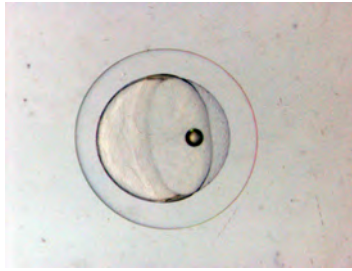
出現した浮遊性魚卵の形態の概要を浜名湖とマリアナ海域で比較したところ、卵径組成と典型的グループの組成が異なっていた。卵径組成は浜名湖では 2 mm 以下、特に 1 mm 前後の卵が頻出しており、対してマリアナではサイズ範囲が幅広かった。浮遊性魚卵の 12 個の典型的なグループは、浜名湖で 11、マリアナ海域で 12 が出現し、どのグループも海域によらず普遍的に出現すると考えられた。魚類の浮遊性魚卵の形態として最も一般的な IC 型 (池田・水戸, 1988) の卵はどちらの海域においても最も多くのタイプを含んでいた。しかしながら、タイプ数が次に多かったのは、浜名湖で IIC 群、マリアナで ID 群であった。ID 群にはウナギ目やニシン目の卵が多く含まれ、これらは卵径も 1 mm 台から 3 mm 以上と総じて大きい (水戸, 1961a; Castle, 1984)。以上のことから、本研究では出現する魚卵の種組成を完全に明らかにすることはできなかったものの、浜名湖とマリアナ海域では、産卵する魚類の種組成が大きく異なり、その分類群構成が、両海域で異なる魚卵の形態学的多様性の一因となっていると考えられた。





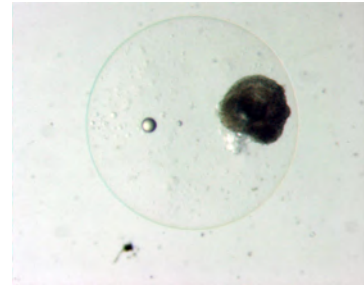
ダイナンウミヘビ  
*Ophisurus macrorhynchus*  
Cluster 36 (IIID-02)

孵化仔魚のみが得られた。全長9.21 mm。多数の油球をもち、その直径は0.16 mm前後。色素は出現していない。口が頭部下面に開いている。



コノシロ  
*Konosirus punctatus*  
Cluster 15 (ID-01)

卵は球形で、直径1.25–1.59 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.11–0.16 mmで、卵径の8.0–11.4%。卵黄には不明瞭な亀裂がみられる。囲卵腔は広い。



サツバ  
*Sardinella zunasi*  
Cluster 28 (ID-01)

卵は球形で、直径1.35 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。黄色みをおびる油球が1個あり、その直径は0.09 mmで、卵径の6.5%。卵黄には不明瞭な亀裂がみられる。囲卵腔は広い。



マイワシ  
*Sardinops melanostictus*  
Cluster 22 (ID-01)

卵は球形で、直径1.53–1.83 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。黄色みをおびる油球が1個あり、その直径は0.16–0.18 mmで、卵径の9.4–11.7%。卵黄には不明瞭な亀裂がみられる。囲卵腔は広い。



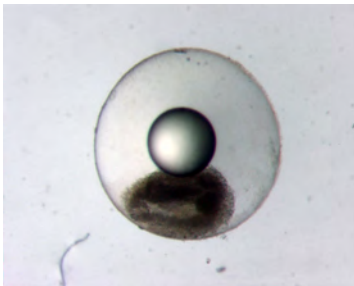
カタクチイワシ  
*Engraulis japonicus*  
Cluster 12 (IIB-01)

卵は楕円球形で、長径1.01–1.39 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。油球はない。卵黄には不明瞭な亀裂がみとめられる。



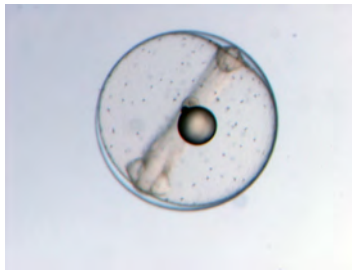
ワニエソ  
*Saulida wanieso*  
Cluster 44 (IIC-01)

卵は球形で、直径1.07 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。油球はない。卵黄は均質。発生後期で胚体が著しく伸長する。しかし、色素はまったく出現しない。



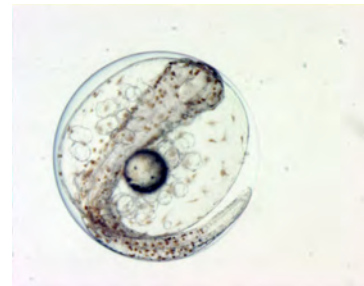
セスジボラ  
*Chelon affinis*  
Cluster 34 (IC-09)

卵は球形で、直径0.92 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.31 mmで、卵径の34.3%と大きい。



ホウボウ  
*Chelidonichthys spinosus*  
Cluster 21 (IC-07)

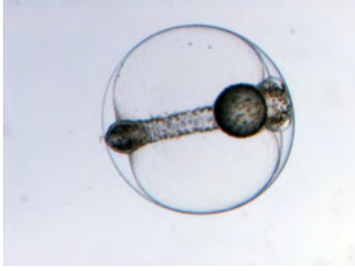
卵は球形で、直径1.13–1.26 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.21–0.26 mmで、卵径の17.5–21.3%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生中期の卵で卵黄と胚体に黒色素と褐色色素がまばらに出現し、後期には色素の数が増え、胚体と卵黄表面を均一に覆うようになる。



マゴチ  
*Platycephalus* sp.  
Cluster 6 (IC-01)

卵は球形で、直径0.77–0.85 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.15–0.17 mmで、卵径の18.1–22.0%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期の胚では胚体に点状の黒色素と褐色色素が多数出現する。また、卵黄に分枝した褐色色素が分布する。

Plate 1 Morphological descriptions of eggs collected in Lake Hamana



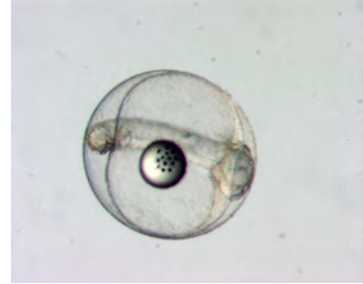
スズキ *Lateolabrax japonicus*  
Cluster 18 (IC-06)

卵は球形で、直径 1.22–1.28 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。黄色い油球が 1 個あり、その直径は 0.31–0.35 mm で、卵径の 24.9–27.9%。卵黄は均質。発生中期以降の卵で、卵黄には色素はみられないものの、油球と胚体に点状の黑色素と褐色色素が密に出現する。



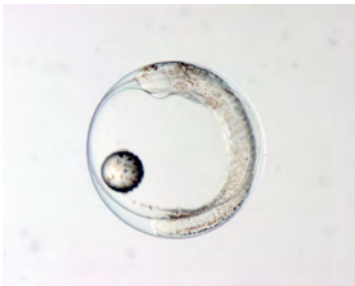
ヒイラギ *Leiognathus nuchalis*  
Cluster 26 (IC-10)

卵は球形で、直径 0.55–0.67 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.12–0.15 mm で、卵径の 20.3–22.1%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生中期の卵で、胚体と油球にわずかな黑色素が出現している。後期では色素量が増え、胚体に褐色色素が散在する。



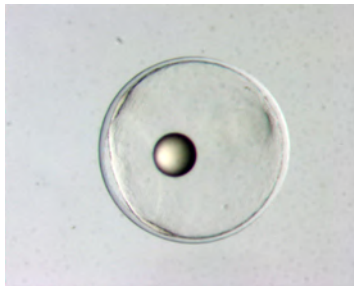
クロサギ *Gerres equulus*  
Cluster 29 (IC-11)

卵は球形で、直径 0.66–0.68 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.17–0.18 mm で、卵径の 25.5–27.3%。



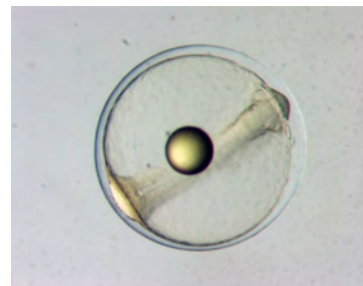
キチヌ *Acanthopagrus latus*  
Cluster 11 (IC-04)

卵は球形で、直径 0.78–0.86 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.20–0.21 mm で、卵径の 22.7–25.5%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期の胚では胚体と油球に点状の黑色素と褐色色素が散在する。卵黄に色素は出現しない。



クロダイ *Acanthopagrus schlegelii*  
Cluster 23 (ID-01)

卵は球形で、直径 0.88–0.89 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。黄色みをおびた油球が 1 個あり、その直径は 0.19–0.20 mm で、卵径の 21.6–22.8%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。



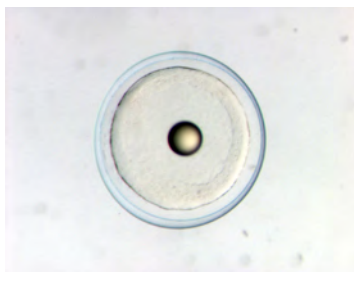
メジナ *Glirella punctata*  
Cluster 24 (IC-12)

卵は球形で、直径 0.97–1.04 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。黄色い油球が 1 個あり、その直径は 0.22–0.24 mm で、卵径の 22.5–22.7%。卵黄はやや黄色みをおびる。発生中期で色素はまったく出現していない。



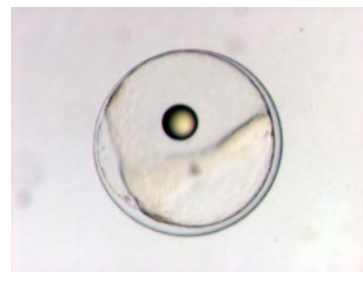
シロギス *Sillago japonica*  
Cluster 40 (IC-10)

卵は球形で、直径 0.65 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.14 mm で、卵径の 20.8%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期の卵で、胚体と油球に黑色素と褐色色素が分布する。この卵は卵径と油球径、その比からヒイラギと同じ IC10 としていたが 16S の配列で分かれた。



アカササノハベラ  
*Pseudolabrus eoethinus*  
Cluster 14 (IC-05)

卵は球形で、直径 0.82 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明、もしくはやや黄色みをおびた油球が 1 個あり、その直径は 0.14–0.15 mm で、卵径の 17.4–18.9%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生中期には色素はみられないが、後期には胚体に少数の黑色素がまばらに出現する。卵黄と油球には色素は出現しない。



ホシササノハベラ  
*Pseudolabrus sieboldii*  
Cluster 13 (IC-05)

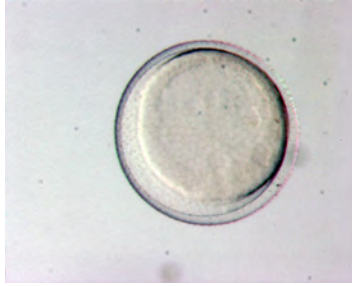
卵は球形で、直径 0.75–0.82 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.14–0.16 mm で、卵径の 17.7–20.7%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期の卵で色素はどこにも出現していない。

Plate 2 Morphological descriptions of eggs collected in Lake Hamana



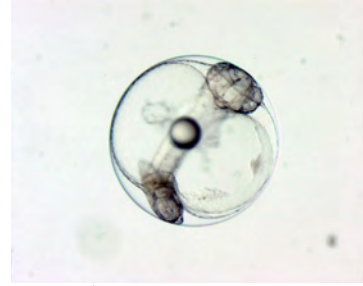
ネズミゴチ  
*Repomucenus curvicornis*  
Cluster 17 (IIA-02)

孵化仔魚のみが得られた。全長は1.30–1.52 mm、油球はない、卵黄は均質。卵黄表面と胚体に分枝した黒色素が散在する。卵黄の性状と色素の出現から、ハタタテヌメリと同じタイプにまとめていたが、16Sの解析によって分けられた。



ハタタテヌメリ  
*Repomucenus valenciennei*  
Cluster 25 (IIA-02)

卵は球形で、直径0.70–0.75 mm、卵膜は透明でその表面に微細な亀甲状構造がある。油球はない。卵黄は均質。発生後期で胚体に褐色色素が散在する。発生中期では、卵黄表面と胚体に点状の黒色素と褐色色素が散在する。



アラメガレイ  
*Tarphops oligolepis*  
Cluster 8 (IC-03)

卵は球形で、直径0.62–0.75 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.10–0.13 mmで、卵径の14.9–17.9%。卵黄は均質。発生中期には色素はみられず、後期の胚では胚体に点状の黒色素が散在する。油球、卵黄に色素は出現しない。



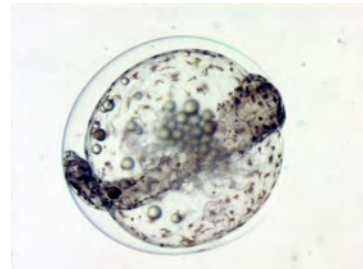
ムシガレイ  
*Eopsetta grigorjewi*  
Cluster 32 (II-hatched1)

孵化仔魚のみが得られた。全長2.60 mm、油球はない。卵黄と胚体は分枝する黒色素と褐色色素によってまばらに覆われる。また、膜鰭縁部にも黒色素と褐色色素が並ぶ。この個体はすでに孵化していたが、色素の出現が特徴的だったため、独立したタイプとして分けた。



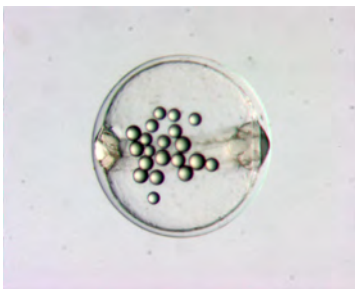
イシガレイ  
*Kareius bicoloratus*  
Cluster 19 (IIC-03)

卵は球形で、直径1.04–1.11 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。油球はない。卵黄は均質。発生後期で胚体に褐色色素が散在する。発生中期で、胚体に点状の黒色素が並ぶ。胚体は細く伸長し、後期には黒色および褐色色素で全面がまばらに覆われる。また、発生後期には分枝した黒色素が卵黄表面にまばらに出現する。



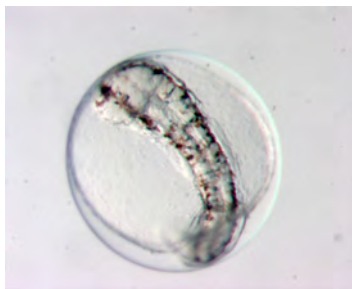
ササウシノシタ  
*Heteromycteris japonica*  
Cluster 3 (IIIB-01)

卵は球形で、直径0.86–0.95 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。直径0.05–0.10 mmの小さな油球が多数ある。卵黄には不明瞭な亀裂がみられる。発生中期に点状の褐色色素が卵黄に散在する。発生後期で胚体と卵黄に多数の点状の黒色素と褐色色素が出現し、まばらに覆われる。



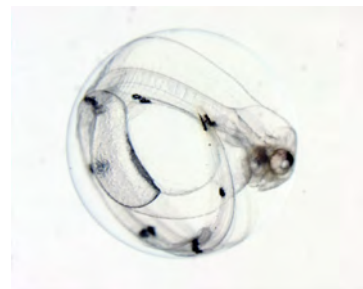
クrouシノシタ  
*Paraplagusia japonica*  
Cluster 42 (IIIC-01)

卵は球形で、直径0.69 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。直径0.06 mmの小さな油球が多数ある。発生中期で色素はまったく出現していない。



ギマ  
*Triacanthus biaculeatus*  
Cluster 27 (IIC-05)

卵は球形で、直径0.70 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。油球はない。卵黄は均質。発生後期で胚体には多数の黒色素と赤色色素が出現する。

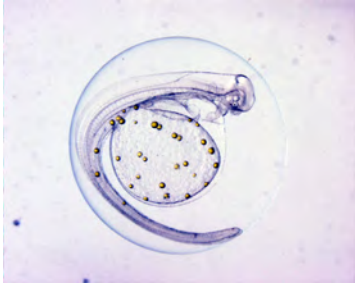


Cluster 4 (IID01)

卵は球形で、直径2.86–3.07 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。油球はない。卵黄には細かい亀裂がみられる。発生後期の卵で、胚体が著しく伸長する。胚体腹面に黒色素斑が間隔をおいて並ぶ。卵内ですでに眼の黒化が始まり、口も開いている。

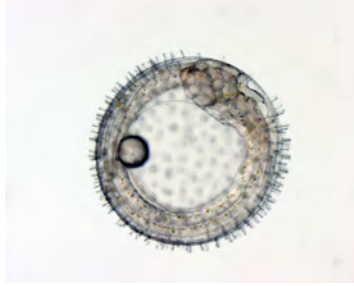
Plate 3 Morphological descriptions of eggs collected in Lake Hamana





Cluster 30 (IID01)

卵は球形で、直径 3.54 mm、卵膜は透明で平滑。卵黄には不明瞭な亀裂がみられる。直径 0.12 mm 前後の小さな油球が多数ある。発生後期の卵で、胚体は著しく伸長する。色素は出現しない。卵内ですでに頭部下面に口が開く。



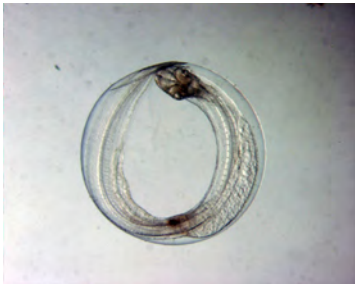
Cluster 31 (IA-01)

卵は球形で、直径 1.14 mm、卵膜は透明で、表面に多数の三枚羽状の突起が多数ある。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.19 mm で、卵径の 16.2%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期の胚では、胚体に点状の黒色素と黄色色素が並ぶ。



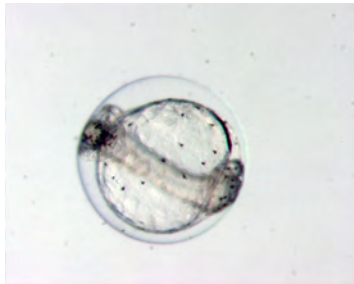
Cluster 33 (IC-13)

卵は球形で、直径 0.74 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.14 mm で、卵径の 18.8%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期の卵では、斑点状の黒色素と褐色色素が体に沿って並んでおり、油球にもいくつかの黒色素が出現している。



Cluster 35 (IID02)

卵は球形で、直径 3.44 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。油球はない。卵黄には細かい亀裂がみられる。発生後期の卵で、胚体が著しく伸長する。体に色素はない。卵内ですでに口が開いている。



Cluster 37 (IIC07)

卵は球形で、直径 0.64 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。油球はない。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期の卵で、少数の点状の褐色色素が卵黄に分布する。



Cluster 39 (IIC06)

卵は球形で、直径 1.05 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。油球はない。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生中期の卵では、細かな点状の黒色素が胚体に多数ならび、卵黄表面にも多数がまばらに分布する。



Cluster 43 (IIIC02)

処理中に卵膜が壊れてしまったために卵径と卵膜の性状は不明。卵黄径は 0.66 mm、直径 0.05 mm 前後の油球を複数もつ。油球の数は類似したサイズのクロウシノシタよりも少なかったため、独立したタイプとして分けた。



Cluster 45 (II-hatched2)

孵化仔魚のみが得られた。全長 1.38 mm、油球はない。卵黄は均質。体に多数の分枝した黒色素が散在し、わずかに褐色色素も混じって出現する。膜鱗にも少数の分枝した黒色素が出現する。この個体はすでに孵化していたが、色素の出現が特徴的だったため、独立したタイプとして分けた。



Cluster 1 (IIA01)

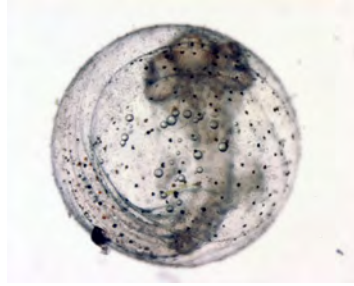
卵は球形で、直径 1.11–1.17 mm、卵膜は透明でその表面には全面に亀甲状の構造がある。油球はない。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期においても色素は出現していないが、胚体が著しく細長く伸長する。

Plate 4 Morphological descriptions of eggs collected in Lake Hamana



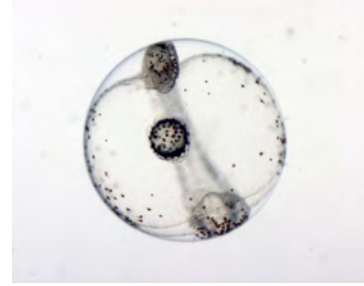
Cluster 2 (IIC01)

卵は球形で、直径 1.17 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。油球はない。卵黄は均質、発生後期で体が著しく伸長する。しかし、色素はまったく出現しない。



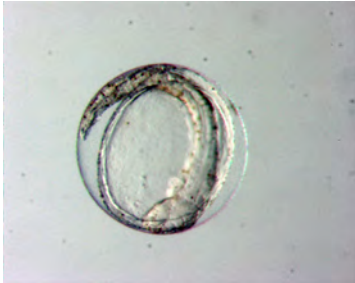
Cluster 5 (IIIA01)

卵は球形で、直径 1.50–1.53 mm、卵膜は透明でその表面には微細な亀甲状の構造がみとめられる。直径 0.05 mm 前後の小さな油球が多数ある。卵黄は均質、発生後期の卵で、点状の黒色素と赤味の強い褐色色素が胚体と卵黄に散在する。



Cluster 7 (IC02)

卵は球形で、直径 0.95–1.00 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.17 mm で、卵径の 17.1–17.6%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期の卵で、胚体全域、卵黄の左右側面、油球の表面、に点状の黒色素と褐色色素が散在する。



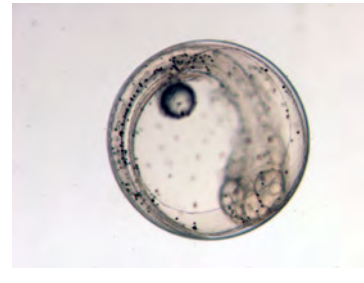
Cluster 9 (IIA02, IIC02)

卵は球形で、直径 0.65–0.88 mm、卵膜は透明でその表面に微細な亀甲状構造がある。油球はない。卵黄は均質、発生後期で胚体に褐色色素が散在する。



Cluster 10 (IIA02)

孵化仔魚のみが得られた。全長は 1.03–1.48 mm、油球はない。卵黄は均質、体の背面と膜鱗に少数の褐色色素が散在する。このような胚の形態と色素の出現から、Cluster 9 などとともに IIA02 としたが、16S の配列によって分けられた。Cluster 9 の孵化仔魚と比較すると、卵黄に色素が出現しない点が異なっていた。



Cluster 16 (IC-16)

卵は球形で、直径 1.24 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.21 mm で、卵径の 17.2%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期の卵では、点状の黒色素と赤味の強い褐色色素が油球と卵黄に散在し、胚体にも並ぶ。



Cluster 20 (IC07)

卵は球形で、直径 1.16–1.18 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.23–0.24 mm で、卵径の 20.1%。卵黄は均質、この Cluster に分けられた卵は、卵径と油球径、それらの比からホウボウ卵と同じく IC07 としていたが、16S 配列によって分けられた。



Cluster 38 (IIA01)

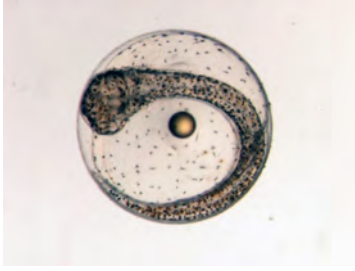
卵は球形で、直径 1.27 mm、卵膜は透明でその表面には全面に亀甲状の構造がある。油球はない。卵黄は均質、囲卵腔は狭い。発生後期において、孵化前に既に眼の黒化が始まっている。胚体は著しく伸長し、まばらに黒色素が並ぶ。卵膜と胚の形態から Cluster 1 と同じく IIA-01 にまとめていたが、16S 配列によって分けられた。



Cluster 41 (IC01)

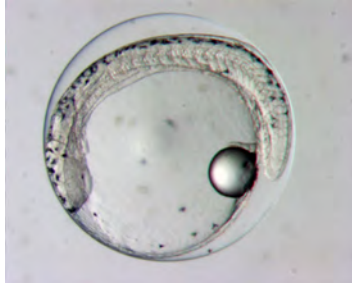
卵は球形で、直径 0.75 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.15 mm で、卵径の 20.7%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生中期の卵では、色素は出現していない。形態性質が重複するマゴチ卵とは色素のが出現しないことで分けられると考えられた。

Plate 5 Morphological descriptions of eggs collected in Lake Hamana



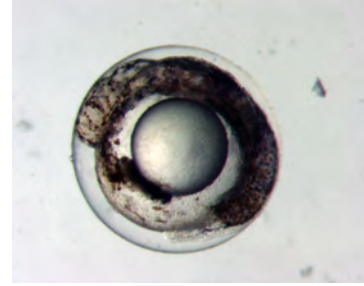
IA02

卵は球形で、直径1.02–1.27 mm、卵膜は透明でその表面には亀甲状の構造がある。黄色い油球が1個あり、その直径は0.07–0.17 mmで、卵径の6.8–15.1%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期で、胚体は黒色素と褐色色素に密に覆われ、卵黄にも黒色素と褐色色素が散在する。



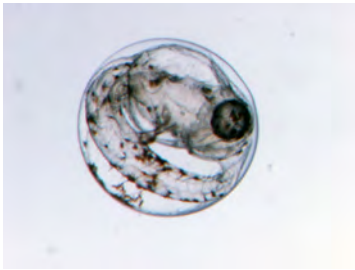
IC02c

卵は球形で、直径0.91–1.00 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.18–0.23 mmで、卵径の19.4–23.7%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期で、胚体の頭部から尾部にかけての背面に黒色素が列をなす。卵黄と油球状にも少数の黒色素が出現する。



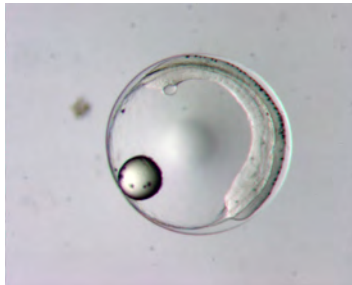
IC08

卵は球形で、直径0.95–0.99 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.45–0.46 mmで、卵径の46.2–47.4%と大きい。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。発生後期で、胚体は尾端部を除き黒色素に密に覆われる。また、卵黄にも帯状に黒色素が出現している。



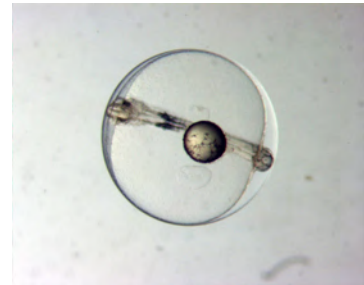
IC14

卵は球形で、直径0.82–0.93 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.19–0.21 mmで、卵径の22.5–23.3%。油球は卵黄の前端に位置する。卵黄は均質。発生後期で、胚体は伸長し、胚体、油球、膜鱗状にまばらに斑状の黒色素と褐色色素が出現する。



IC15

卵は球形で、直径0.58–0.65 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.13–0.14 mmで、卵径の21.0–22.9%。卵黄は均質。発生中期で、まだ眼は形成されていない。黒色素が胚体背側と油球上にわずかに出現する。

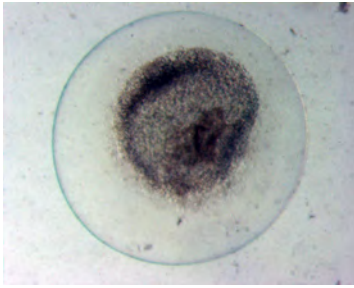


IC17

卵は球形で、直径1.66 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、その直径は0.39 mmで、卵径の23.6%。卵黄は均質。体は細く、発生中期で眼の周辺と胸部に黒色素の集合がみられる。また、油球上に放射状の黒色素と褐色色素が出現する。

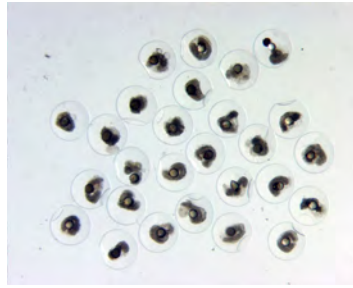
Plate 6 Morphological descriptions of eggs collected in Lake Hamana





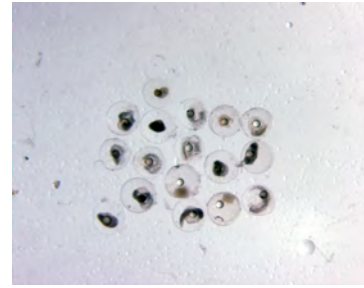
IIC04

卵は球形で、直径1.61 mm、卵膜は透明でその表面は平滑、油球はない、発生初期にあり他と識別する明瞭な形質がなかったものの、油球をもたないタイプの中でサイズが大きかったことから、独立したタイプとして分けた。



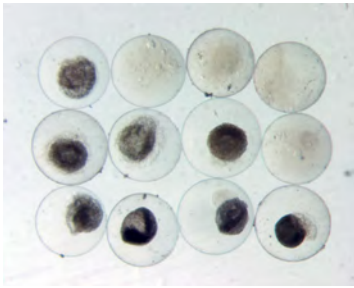
IC-complex A

球形で、卵膜が平滑、油球を1個もつタイプであるが、死んでいるなど状態が悪く、他と識別する明瞭な形質ももたなかった卵のうち、卵径が0.70-0.86 mmとやや大きかった卵を IC-complex A として分けた。



IC-complex B

球形で、卵膜が平滑、油球を1個もつタイプであるが、死んでいるなど状態が悪く、他と識別する明瞭な形質ももたなかった卵のうち、卵径が0.52-0.78 mmとやや小さかった卵を IC-complex B として分けた。

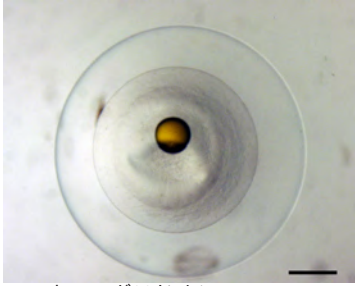


II-complex

球形で、卵膜が平滑、もたないタイプであるが、死んでいるなど状態が悪く、他と識別する明瞭な形質ももたなかった卵をすべて II-complex として分けた。これらの卵径は0.55-0.75 mm だった。

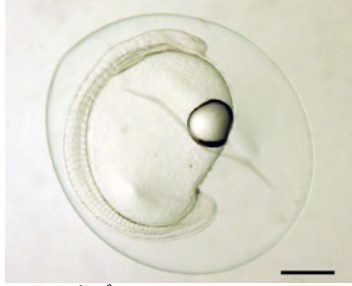
**Plate 7** Morphological descriptions of eggs collected in Lake Hamana





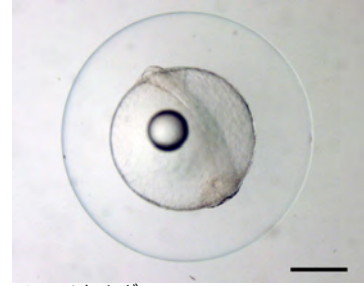
モヨウモンガラドオシ  
*Myrichthys maculosus*  
(Cluster 3, ID-01)

卵は球形で、直径2.24–2.76 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。囲卵腔は広い、褐色を呈する油球を1個もち、その直径は0.28–0.40 mmで、卵径の11.7–15.2%。



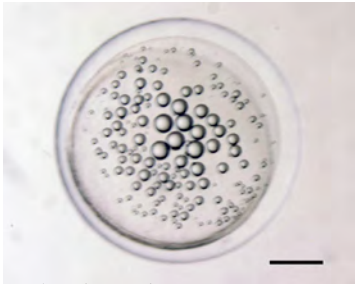
ヘラアナゴ  
*Nessorhamphus ingolfianus*  
(Cluster 63, ID-15)

卵は球形で、直径2.50 mm、卵膜は平滑で薄い。囲卵腔が広い。油球は1個あり、その直径は0.43 mmで、卵径の17.2%。油球は卵黄の前端に位置する。卵黄には亀裂が認められる。胚体は細長く、発生後期の筋節が42本数えられる段階では色素は認められない。



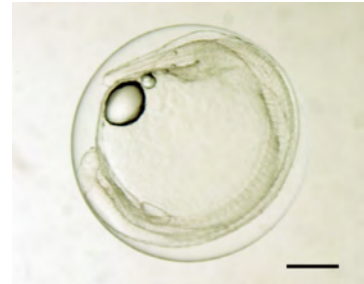
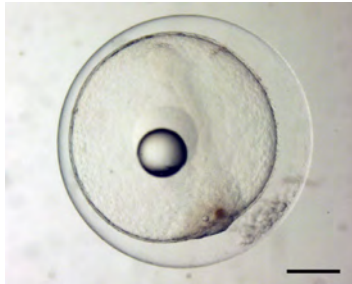
ノコバウナギ  
*Serrivomer sector*  
(Cluster 43, ID-06)

卵は球形で、直径2.20–2.34 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄径1.10–1.28 mmで囲卵腔が広い。卵黄には不明瞭な亀裂が認められる。透明な油球を1個もち、その直径は0.32–0.35 mmで、卵径の13.7–15.9%。発生中期では色素は認められない。



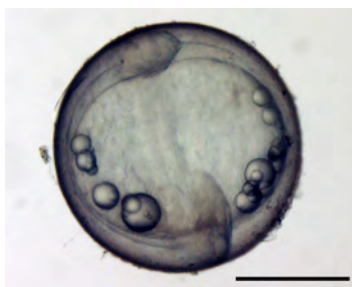
クビナガアナゴ *Derichthys serpentinus*  
(Cluster 42, ID-07, IIIB04, IIID01)

卵は球形で、直径2.26–2.47 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄径1.95–2.00 mmで囲卵腔はやや広い。卵黄には不明瞭な亀裂が認められる。発生初期では、直径は0.02–0.24 mmの多数の油球が存在する。発生に伴って油球は合一し、発生中期では透明な油球を1個もち、その直径は0.48 mmで、卵径の20.0%。後期では油球は卵黄の前端に位置する。胚体は細長く伸長し、卵黄がほぼ全長にわたって付着しており、多数の筋節が数えられる。発生中期と後期においても色素は出現しない。



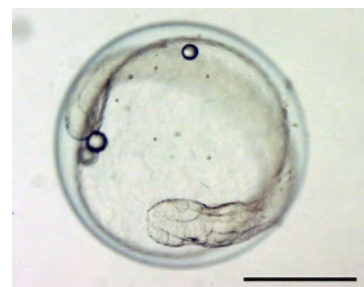
タイワンアイノコイワシ  
*Encrasicholina punctifer*  
(Cluster 62, IIB01)

卵は楕円球形で、長径1.21–1.35 mm、短径は0.61–0.62 mm、卵膜は平滑であり、油球はない。卵黄には亀裂が認められる。発生後期においても色素は出現しない。



ソコイワシ科の1種  
*Microstomatidae* sp.  
(Cluster 52, IIIA03)

卵は球形で、直径1.08–1.18 mm、卵膜表面は全域にわたって微細な点状構造で覆われる。油球は多数認められ、卵黄の左右両極に集まっている。油球径は0.05–0.16 mm、卵黄には泡沫上の亀裂が認められる。発生後期においても色素の出現はみられない。



ネットアイユメハダカ  
*Diplophos taenia*  
(Cluster 41, IIIB03)

卵は球形で、直径は1.08–1.15 mm、卵黄には亀裂が認められる。直径0.05–0.11 mmと非常に小さい油球がいくつかある。胚体は細く、発生後期においても色素は出現していない。

Plate 8 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region



テンガンムネエソ  
*Argyropelecus hemigymnus*  
(Cluster 15, IC12)

卵は球形で、直径0.85–0.94 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、油球径は0.21–0.28 mmで、卵径の23.1–31.1%。1層の内卵膜が卵膜のすぐ内側にある。



フサカザリホシエソ  
*Eustomias enbarbatus*  
(ID012)

卵は球形で、直径1.28–1.30 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。囲卵腔が広い。卵黄には亀裂が認められる。黄色い油球を1個もつ。油球は楕円球形で長径は0.22 mm、短径は0.15 mmであり、卵黄後端に位置する。胚体は細長く、卵黄はほぼその全長にわたって付着している。胚体中央部の背縁と尾端部には、胚体の縁辺にそって黒色素が配列している。



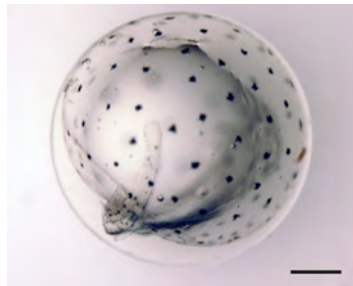
アカマンボウ  
*Lampris guttatus*  
(IIC02)

卵は球形で、直径2.08–2.64 mm、油球はなく、囲卵腔は狭い。発生後期で眼のレンズが形成された段階においても色素は出現していない。このタイプの卵は、卵内で仔魚の発達が進み、鰭条の伸長や、開口、消化管の形成が起きる。



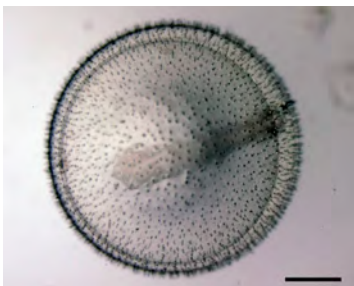
アカナマダ *Lophotus capellei*  
(Cluster 32, IIC04, IIC05)

卵径2.24–2.62 mm、卵膜は透明で平滑である。直径0.04–0.10 mm前後の小さい油球がいくつか卵黄内に散在している。胚体の長さは非常に短く、胚体が形成された時点では、卵黄の円周の1/6程度の長さである。発生中期には、樹枝状の黒色素が卵黄上面と胚体に散在する。後期になると、卵黄表面全域に、多数の点状の黒色素がほぼ均一に分布する。また、胚体全域にも点状の黒色素が認められる。



ユキフリソデウオ *Zu cristatus*  
(Cluster 50, IIC07)

卵は球形で、直径2.10–2.14 mm、卵膜は褐色を呈する。油球はない。卵黄表面に黒色素斑が不規則に散在している。胚体は発達が進んでおり、胸鰭や消化管が卵内ですでに形成されている。



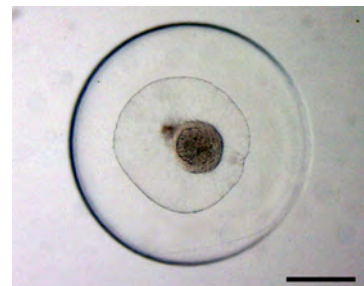
リュウグウノツカイ  
*Regalecus glesne*  
(IIA02)

卵は球形で、直径2.09–2.36 mm、卵膜は透明で、卵膜表面全域に長さ約0.04 mmの微細な棘が多数の分布する。油球はなく、囲卵腔は狭い。発生中期において胚体は卵径に比して短く、また、色素は出現していない。



ミサキソコダラ  
*Ventrifossa* sp.  
(Cluster 18, IA02)

卵は球形で、直径1.66 mm、卵膜は厚く、その表面全域に多角形の網目状構造が認められる。透明な油球が1個あり、その直径は0.32 mmで、卵径の19.3%。

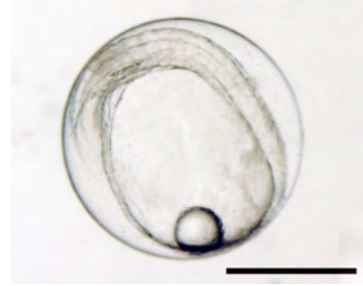
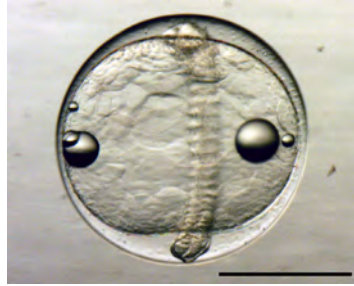


アオヤガラ  
*Fistularia commersonii*  
(Cluster 71, IID06)

卵は球形で、直径1.75 mm、卵黄径は0.98 mmで囲卵腔が広い。油球はない。

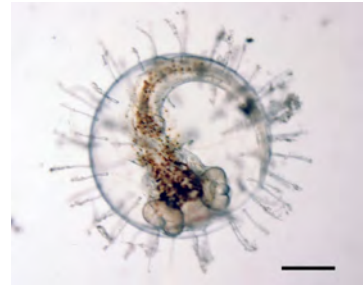
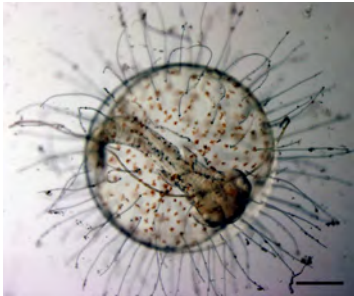
Plate 9 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region





ヨロイギンメ *Scopelogadus mizolepis*  
(Cluster 20, IB02, IIIB01, IIIB02)

卵は球形で、直径 0.85–0.97 mm、卵膜は透明で表面は平滑。卵黄には亀裂が認められる。発生初期には、0.07 mm 以下と小さい多数の油球が卵黄周辺部に分布する。発生に伴って油球の数と位置は変化し、中期には複数の油球があり、卵黄の両極に分かれて位置するが、後期では油球は 1 個で卵黄の前端に位置する。発生中期と後期においても胚体に色素は認められない。



トビウオ科 spp. *Exocoetidae* sp.  
(Cluster 28, IIA04, IIA05, IIA07)

卵は球形で、直径 1.72–2.15 mm、油球はない。卵膜表面に 35–0.9 mm 前後の退化纏絡糸がほぼ均一に分布している。卵黄表面に多数の赤色色素がほぼ均一に出現し、胚体には多数の黒色素が出現している。卵内で既に胸鰭と尾鰭条が形成される。胸鰭が形成された段階で、胚体腹面には多数の褐色色素が出現しており、特に頭部に密集している。



ハゴロモトビウオ  
*Exocoetus monocirrhus*  
(Cluster 1, IIC01)

卵は球形で、直径 2.64–2.99 mm、卵膜は透明で平滑である。卵内で胸鰭が形成されているが、この段階でも色素は出現していない。

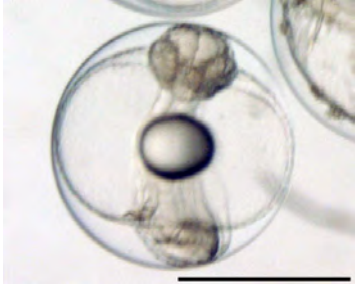
サヨリトビウオ  
*Oxyporhamphus micropterus*  
(Cluster 26, IIA03)

卵は球形で、直径 1.74–2.21 mm、卵膜は透明で、卵膜表面全域に 0.08 mm 前後の棘が均一に分布する。棘は半球面上に約 80 本が数えられる。囲卵腔は狭い。胚体全体に樹枝状の黒色素が並んでおり、頭部には褐色の色素が出現している。卵黄上面には樹枝状の黒色素が多数出現している。胸鰭が既に形成されている。

スミクイウオ  
*Synagrops japonicus*  
(Cluster 58, IC23)

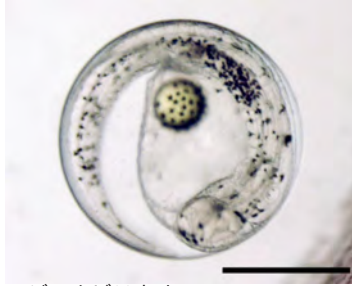
卵は球形で、直径 0.65–0.68 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。油球を 1 個もち、直径は 0.18 mm で、26.5–27.7。発生中期において、胚体の中軸上と油球上に黒色素が密集している。

Plate 10 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region



ユカタハタ属  
*Cephalopholis* sp.  
(Cluster 67, IC33)

卵は球形で、直径0.65–0.72 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。卵径に対して比較的大きく透明な油球を1個もち、その直径は0.16–0.21 mmで、卵径の23.1–30.0%。発生後期においても色素は認められない。胚体は卵径に比べて太い。



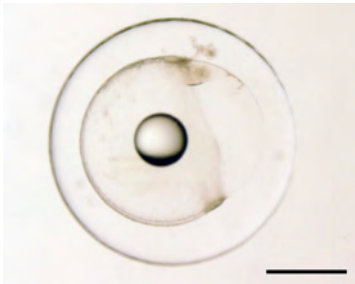
スジハナピラウオ  
*Psenes cyanophrhys*  
(Cluster 40, IC24)

卵は球形で、直径0.95–1.00 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。黄色い油球が1個あり、その直径は0.20–0.22 mmで、卵径の21.1–22.0%。油球上には多数の点状黒色素がほぼ等間隔に分布している。胚体にも多数の黒色素が認められ、特に胚体中央部腹面に密に出現している。



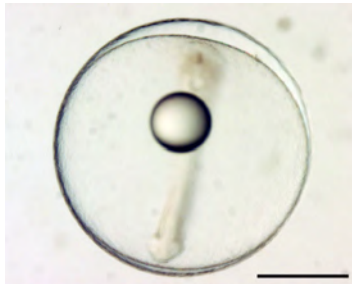
スジコバン  
*Phtheichthys lineatus*  
(Cluster 45, IC04)

卵は球形で、直径1.90–2.27 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。黄色い油球が1個あり、その直径は0.06–0.16 mmと卵径に比べ非常に小さく、卵径の2.9–8.0%。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。胚体全域に黒色素が密に出現する。



ヒシコバン *Remora osteochir*  
(Cluster 6, IC03, IC07, IC37)

卵は球形で、直径1.32–1.54 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。透明な油球を1個もち、透明な油球が1個あり、油球径は0.29–0.33 mmで、卵径の19.7–23.5%。卵黄は均質。中期に胚体が形成された時点では色素は出現していないが、後期では、卵黄表面と油球表面にまばらに黒色素が散在する。また、胚体全域にわたって多数の黒色素と褐色色素が密に分布している。



マルバラシマガツオ *Brama orcini*  
(Cluster 12, IC01, IC09, IIIC02)

卵径は1.21–1.48 mm、油球径は0.16–0.25 mm。発生初期には、直径0.03–0.15 mmの複数の油球が植物極側に集まって位置する。しかし、油球は発生が進むに従い合一し、中期以降には直径約0.25 mmの1個になる。油球には中期には卵黄の前端、後期には卵黄の後端に位置するようになる。発生中期には、油球上にはわずかに黒色素が出現しているものの、他に色素は出現していない。後期以降には、卵黄表面に樹枝状の黒色素が散在している。胚体上にも黒色素が認められ、頭部と尾端に密に出現している。

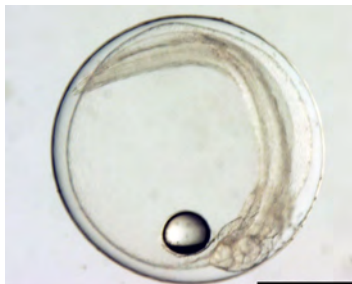
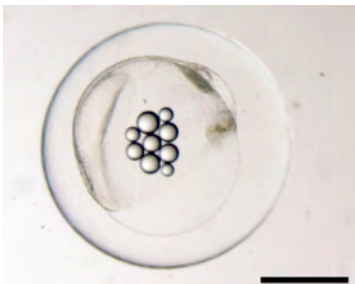
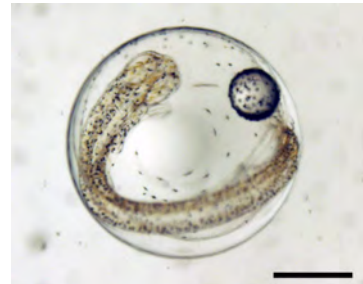


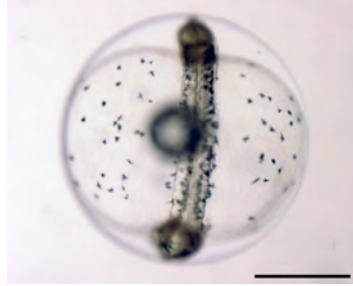
Plate 11 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region





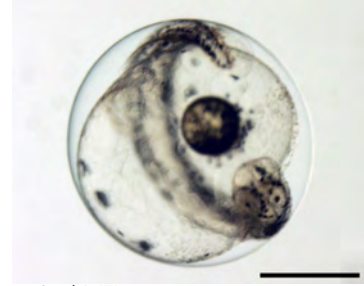
ムカシクロタチ  
*Scombr labrax heterolepis*  
(Cluster 10, IB01)

卵径 0.84 から 0.99 mm, 囲卵腔は狭く, 透明な油球が1個ある. 油球は比較的大きく, その直径は 0.23–0.29 mm で, 卵径の 25.3–32.6%. 卵黄には泡沫状の亀裂が認められる.



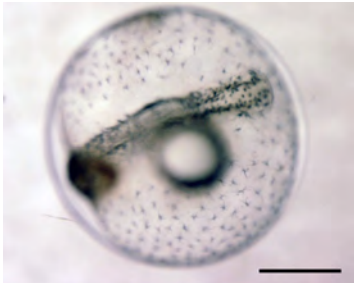
バシヨウカジギ科 *Istiopholidae* sp.  
(Cluster 35, IC17)

卵は球形で, 直径 1.18–1.46 mm, 卵膜は透明でその表面は平滑. 卵黄は均質. 囲卵腔は狭い, 透明な油球が1個あり, その直径は 0.25–0.35 mm で, 卵径の 20.3–25.4%. 卵黄表面, 油球上および胚体に多数の黒色素がまばらに分布している.



マカジギ属 *Tetrapturus* sp.  
(Cluster 48, IB04)

卵は球形で, 直径 1.22–1.29 mm, 卵膜は透明でその表面は平滑. 卵黄には亀裂が認められる. 黄色い油球が1個あり, 直径は 0.28–0.30 mm で, 卵径の 21.7–24.6%. 発生後期では, 黒色素が卵黄上に散在し, 油球上には密に出現している. 胚体上にも多数の黒色素が分布している.



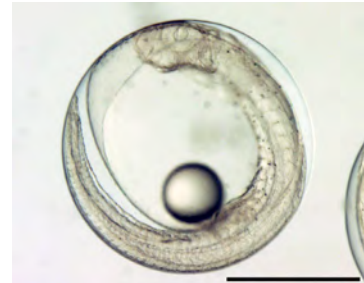
メカジギ *Xiphias gladius*  
(Cluster 34, IC16)

卵は球形で, 直径 1.54–1.65 mm, 卵膜は透明でその表面は平滑. 卵黄は均質. 囲卵腔は狭い, 透明な油球が1個あり, その直径は 0.36–0.42 mm で, 卵径の 22.2–26.9%. 卵黄表面全域に多数の樹枝状黒色素がほぼ均一に分布している. 発生中期では, 胚体状にも密に並んだ黒色素が認められる.



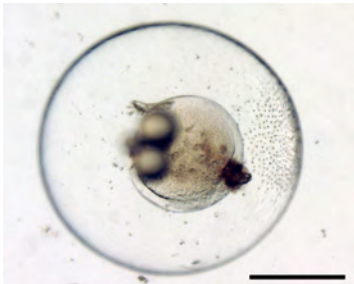
カツオ *Katsuwonus pelamis*  
(Cluster 9, IC08)

卵は球形で, 直径 0.83–1.03 mm, 卵膜は透明でその表面は平滑. 卵黄は均質. 黄色い油球が1個あり, 油球径は 0.16–0.25 mm で, 卵径の 17.6–28.7%. 発生中期では, 黒色素が油球上に認められ, さらに胚体の側面に多数が並んでいる.



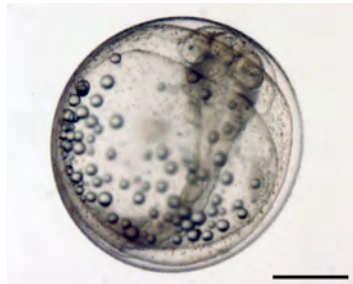
マグロ属 *Thunnus* sp.  
(Cluster 11, IC30)

卵は球形で, 直径 0.78–0.96 mm, 卵膜は透明でその表面は平滑. 卵黄は均質. 囲卵腔は狭い. 透明, もしくはやや黄色みを帯びた油球を1個もち, その直径は 0.15–0.25 mm で, 卵径の 20.7–26.0%. 発生中期では色素は出現していないが, 後期では発生後期では胚体全域にまばらに点状の黒色素が分布する. 油球は卵黄後端に位置する.



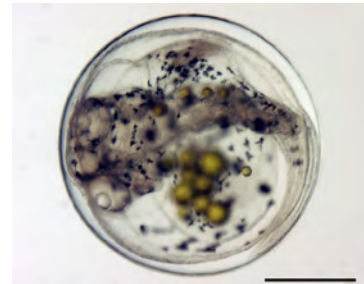
ウミスズメ *Lactoria diaphana*  
(Cluster 57, IIIA02)

卵は扁球形で, 長径約 1.38–1.50 mm, 短径約 1.31–1.45 mm, 複数の透明な油球をもつ. 卵膜の長軸方向の一端には顆粒状の構造がある.



ネズミフグ *Diodon hystrix*  
(Cluster 69, IIIC03)

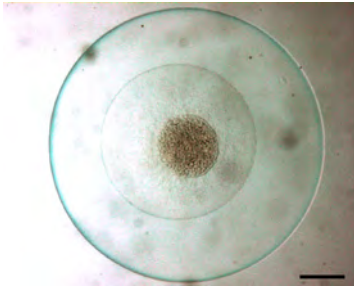
卵は球形で, 直径 1.56–1.89 mm, 卵膜は透明で平滑である. 直径 0.02–0.11 mm の透明な油球が多数ある. 発生が進むと, 胚体は厚い膜に包まれる.



クサビフグ *Ranzania laevis*  
(Cluster 47, IIIC01)

卵は球形で, 直径 1.35–1.55 mm, 卵膜は透明で平滑. 黄色い油球が多数あり, その直径は 0.02–0.10 mm. 発生後期において, 卵黄表面および胚体上には樹枝状の黒色素が散在している. このタイプは, 発生が進むと胚体が厚い膜に包まれる.

Plate 12 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region



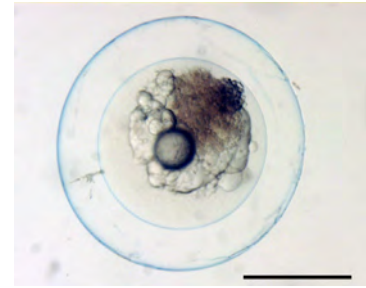
Cluster 4 (IID01)

卵は球形で、直径 2.58–3.86 mm、油球はない。卵黄には不明瞭な亀裂が認められる。囲卵腔が広い。これらの形態的特徴から、このタイプはウナギ目卵と推定された。



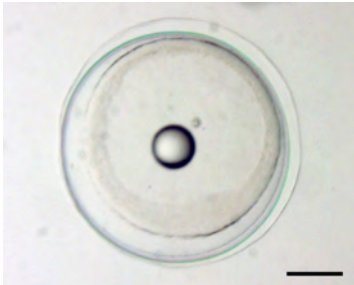
Cluster 5 (IC02)

卵は球形で、直径 1.68–1.87 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質、透明な油球が1個あり、油球径は 0.42–0.53 mm で、卵径の 23.6–29.0%。油球上に多数の樹枝状黒色素がほぼ均一に散在する。卵黄と胚体にも黒色素が散在する。胚体には、吻端と、眼胞および耳胞の直後にやや密に黒色素が出現する。



Cluster 7 (ID14)

卵は球形で、直径 0.95–1.32 mm、卵膜は薄く平滑で、青みがかって見える。直径 0.50–0.88 mm の1層の内卵膜をもつ。油球を1個もち、その直径は 0.15–0.18 mm で、卵径の 11.9–18.9%。



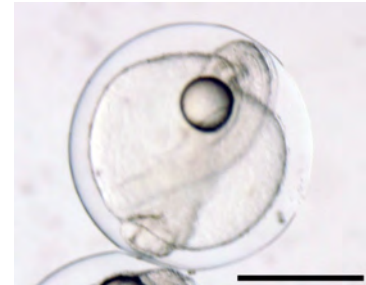
Cluster 8 (IC06)

卵は球形で、直径 1.40 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、卵黄前端に位置する。その直径は 0.25 mm、卵径の 17.9%。卵黄は平滑。囲卵腔は狭い、青色を呈する1層の内卵膜が認められる。



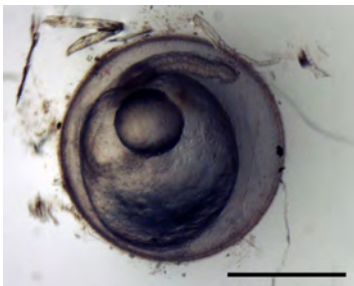
Cluster 13 (IC10)

卵は球形で、直径 0.94–1.01 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。透明な油球が1個あり、卵黄後端に位置する。油球径は 0.20–0.25 mm で、卵径の 19.8–25.5%。発生後期では、胚体の腹面にやや大きめの多数の点状黒色素が密に並んでいる。卵黄上と油球上にもいくつかの点状黒色素が認められる。



Cluster 14 (IC11)

卵は球形で、直径 0.95–0.96 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。透明な油球が1個あり、卵黄後端に位置する。油球径は 0.21–0.22 mm で、卵径の 21.9–23.2%。発生後期では卵黄は胚体の中央まで付着しており、尾部が長い。色素は認められない。



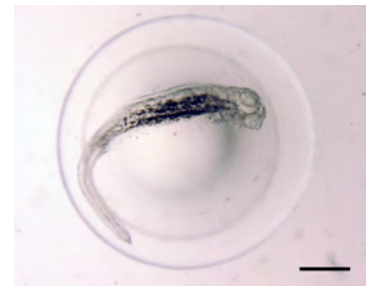
Cluster 16 (IA01)

卵は球形で、0.85–0.95 mm、卵膜は厚く、褐色を呈する。透明な油球が1個あり、その直径は 0.21–0.30 mm で、卵径の 23.3–31.6%。発生後期では油球は卵黄の後端にあり、胚体は卵黄に比べて小さく、色素は出現していない。



Cluster 17 (IIA01)

卵は球形で、直径 0.90–1.15 mm、卵膜は透明で、卵膜表面全域に多角形の網目状構造がある。囲卵腔は狭い。油球はない。発生中期において色素は出現していない。これらの形態的特徴から、このタイプはヒメ目の1種の卵と推察された。

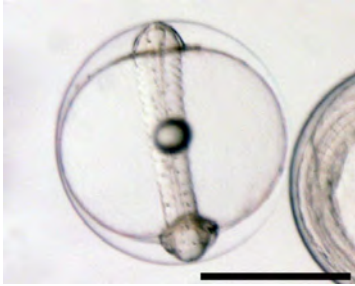


Cluster 19 (IID02)

卵は球形で、直径 2.42–2.55 mm、卵膜は透明で平滑。卵黄径は 1.90–1.94 mm で、囲卵腔がやや広い。油球はない。発生後期では、胚体胴部腹面に黒色素が密集している。

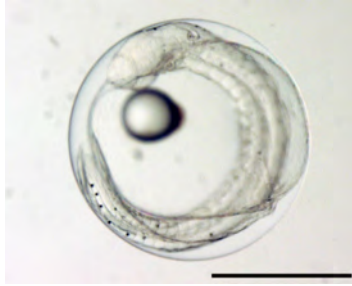
Plate 13 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region





Cluster 21 (IC13)

卵は球形で、直径0.77 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質、囲卵腔は狭い、透明な油球が1個あり、卵径に比べて比較的小さい油球を1個もち、その直径は0.11 mmで、卵径の14.3%。胚体は細長く、発生後期にあって色素は認められない。



Cluster 22 (IC14)

卵は球形で、直径0.78–0.90 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質、囲卵腔は狭い、透明な油球が1個あり、その直径は0.15–0.20 mmで、卵径の18.8–25.3%。油球は卵黄の前端に位置する。発生後期では胚体に点状の黒色素がまばらに並んでいる。



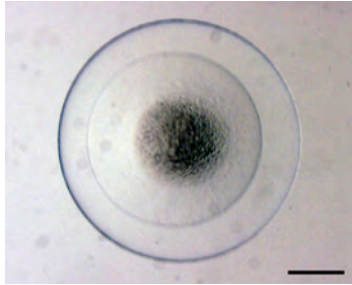
Cluster 24 (IA04)

卵は楕円球形で、長径が約1.10 mm、短径が約1.0 mm、透明な油球が1個ある。卵門周辺部が疣状に突出している。この形質は水戸(1963c)が報告しているヒラメ型(Bothidae sp.9)と類似することから、この卵はカレイ科の卵と判断された。



Cluster 25 (IIC03)

卵は球形で、直径2.09 mm、卵膜は透明で平滑である。油球はなく、囲卵腔は狭い。卵黄上と胚体頭部に樹枝状の黒色素が散在している。卵内ですでに胸鰭や消化管が形成されており、脊索末端の屈曲も始まっている。これらの形態から、アカマンボウ目フリソテウオ科の *Desmodema lorum* の卵と推察された。



Cluster 27 (IID03, IID04)

卵は球形で、直径2.10–2.30 mm、卵膜は透明で平滑である。卵黄径は1.30–1.55 mmで囲卵腔がやや広い。卵黄には亀裂が認められる。発生後期では胚体が非常に細長く、卵黄は胚体のほぼ全長にわたって付着している。後期においても色素の出現はみられない。



Cluster 29 (IA05, IB03)

卵は球形で、直径1.17–1.41 mm、卵膜は透明でその表面全域にうね状の構造が認められる。囲卵腔は広い、油球は黄色、もしくは透明で1個あり、卵黄後端に位置する。その直径は0.22–0.32 mmで、卵径の16.5–23.1%。発生後期では胚体全域に黒色素と褐色色素が密に出現しており、卵黄表面と油球上にも多数の樹枝状の黒色素が出現している。膜鰭上には褐色色素が出現している。



Cluster 30 (IIC04)

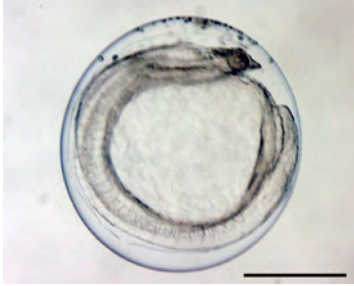
卵は球形で、直径2.71–2.88 mm、卵膜は透明で平滑である。油球はなく、囲卵腔は狭い。卵内ですでに胸鰭、消化管、尾鰭条が形成される。心臓付近に斑状の黒色素があり、そこを中心にして赤色色素が放射状に出現している。これらの明瞭な形態的特徴から、このタイプはイダテントビウオ属の卵と同定された。



Cluster 31 (IC15)

卵は球形で、直径1.25–1.42 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質、囲卵腔は狭い。透明な油球が1個あり、その直径は0.27–0.34 mmで、卵径の23.1–31.1%。油球は卵黄の後部に位置する。発生後期にあって色素は認められない。

Plate 14 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region



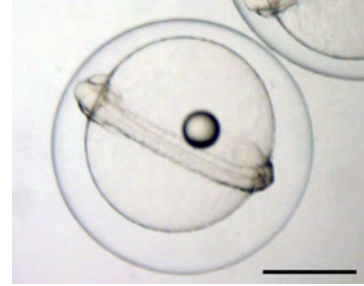
Cluster 33 (IIB02)

卵は球形で、直径は1.14–1.21 mm、卵膜は透明で平滑、囲卵腔は狭く、油球はない。卵黄には不明瞭な亀裂が認められる。1層の薄い内卵膜が認められる。派生後期においても色素は出現していない。



Cluster 36 (IIC05)

卵は球形で、直径0.69–0.70 mm、卵膜は透明で平滑である。油球はない。発生中期でも色素はまったく認められず、眼胞も形成されていない。非常に未熟な胚の形態を示した。



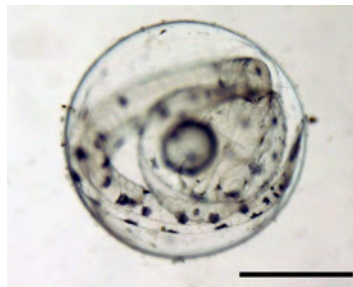
Cluster 37 (ID04)

卵は球形で、直径1.37–1.47 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄径は1.00–1.04 mmで囲卵腔はやや広い。卵黄は均質。透明な油球を1個もち、その直径は0.18 mmで、卵径の12.2–13.1%。発生中期では色素は認められない。



Cluster 38 (IC18, IC20)

卵は球形で、直径0.83–0.86 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。透明な油球が1個あり、その直径は0.18–0.20 mmで、卵径の21.7–23.3%。油球は卵黄の後部に位置する。発生後期で、胚体の尾部に数個の黒色素が出現している。



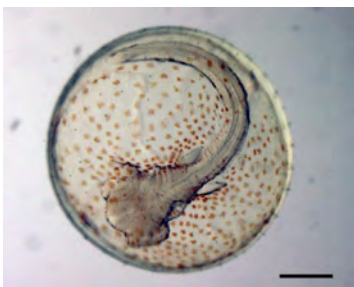
Cluster 39 (IC19, ID05)

卵は球形で、直径0.92–1.10 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄径0.62–0.64 mmで囲卵腔が広い。卵黄は均質。透明な油球を1個もち、その直径は0.23–0.25 mmで、卵径の22.6–25.0%。発生中期では色素は認められない。発生後期では、胚体は長く伸長し、卵黄は胚体前方に付着している。卵黄表面と油球上に黒色素が出現しており、胚体の腹面には大きな斑状の黒色素列が出現する。



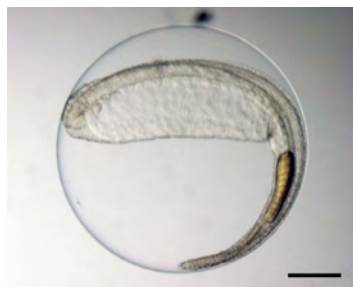
Cluster 44 (IC22)

卵は球形で、直径1.75–1.82 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。褐色を呈する油球を1個もち、その直径は0.35–0.36 mmで、卵径の19.4–20.6%。発生後期では樹枝状の黒色素が油球上に密に、卵黄前面にまばらに出現している。胚体上にも樹枝状の黒色素が認められ、胚体頭部と尾端部に密集している。



Cluster 46 (IIA06)

卵は球形で、直径2.13–2.44 mm、卵膜は透明で、卵膜表面に長さ0.03–0.04 mmの棘が均一に分布している。囲卵腔は狭い。卵黄表面には多数の斑状の赤色素が分布する。胚体上にも赤色素が認められる。卵内ですでに胸鰭が形成される。これらの明瞭な形態的特徴から、このタイプはサヨリトビウオ属の卵と同定された。



Cluster 49 (ID08)

卵は球形で、直径2.37 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。囲卵腔が広い。卵黄には明瞭な亀裂が認められる。油球は卵黄後端に位置し、長楕円球形で黄色い。胚体は非常に細長く、卵黄はほぼその全長にわたって付着している。膜鱗には多数の樹枝状黒色素が認められる。消化管末端が膜鱗縁辺に達しており、肛門は卵黄から6筋節離れて開いていた。



Cluster 51 (IID05)

卵は球形で、直径1.83–2.17 mm、卵膜は透明で平滑である。油球はない。1層の内卵膜があり、その直径は約1.01–1.33 mm、これらの形態的特徴から、このタイプはハウライエソ *Chauliodus sloani* の卵と同定された。

Plate 15 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region





Cluster 53 (ID09)

卵膜は平滑で非常に薄く、直径約1.96 mm。卵黄径は約0.81 mmで囲卵腔が広い。透明な油球が1個あり、直径0.15 mmで、卵径の7.7%。油球は卵黄後端に位置する。卵黄には明瞭な亀裂が認められる。発生後期で胚体は細長く、色素は認められない。これらの形態的特徴から、このタイプはウナギ目の卵と推定された。



Cluster 54 (ID11)

卵は球形で、直径1.65 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。囲卵腔が広い。卵黄には亀裂が認められる。卵黄後端に位置する透明で楕円球形の油球を1個もち、胚体中央部背側に数個の黒色素が認められる。また、尾端部の膜鱗上には胚体に沿って黒色素が並んでいる。胚体は細長く、卵黄はほぼその全長にわたって付着している。



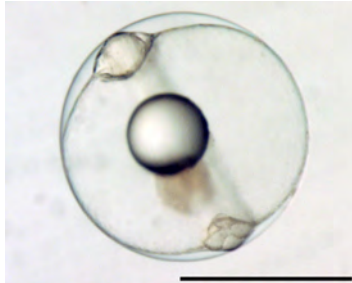
Cluster 55 (IB05)

卵は球形で、直径1.27 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が1個あり、卵黄後端に位置する。油球径は0.22 mmで、卵径の17.3%。卵黄には亀裂が認められる。発生後期で、筋節は約57本数えられる。胚体は細長く、その全長にわたって卵黄が付着している。囲卵腔はやや狭いものの、



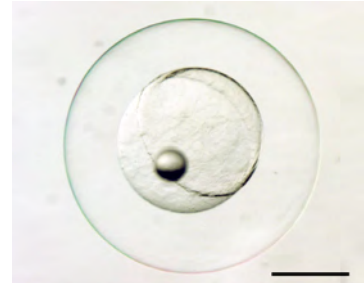
Cluster 59 (IC26)

卵は球形で、直径1.08–1.09 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。油球を1個もち、その直径は0.20–0.22 mmで、卵径の18.5–20.2%。油球上と、胚体の中軸上に黒色素が密集している。



Cluster 60 (IC27)

卵は球形で、直径0.70–0.76 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。透明な油球を1個もち、その直径は0.21–0.25 mmで、卵径の28.4–34.3%と大きい。発生中期において色素は出現していない。



Cluster 61 (ID13)

卵は球形で、直径1.64 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄径は0.93 mmで囲卵腔が広い。卵黄には泡沫状の亀裂が認められる。このような形態的特徴から、このタイプはウナギ目卵と推察された。



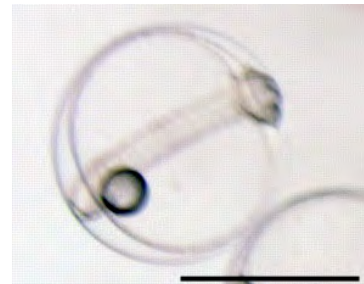
Cluster 64 (IC31)

卵は球形で、直径1.08–1.15 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。透明な油球を1個もち、その直径は0.28–0.31 mmで、卵径の25.2–27.5%。発生中期において色素は出現していない。油球は卵黄のほぼ中央に位置する。発生後期では尾部に褐色色素が並んでいる。



Cluster 65 (IIC07)

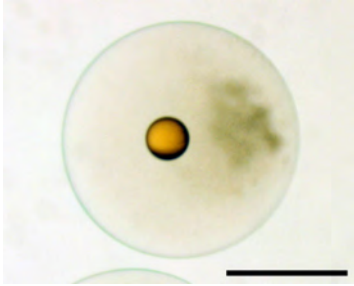
卵は球形で、直径0.99–1.09 mm、十数個の小さな油球（直径0.06–0.08 mm）が卵黄の周縁部に散在している。油球は薄い黄色を呈する。発生中期において色素の出現はみられない。



Cluster 66 (IC32)

卵は球形で、直径0.62–0.71 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。透明な油球を1個もち、その直径は0.12–0.14 mmで、卵径の18.3–21.2%。発生中期では色素は認められない。採集された卵の中で最も小さいタイプのひとつであり、卵径および油球径から区別できる。

Plate 16 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region



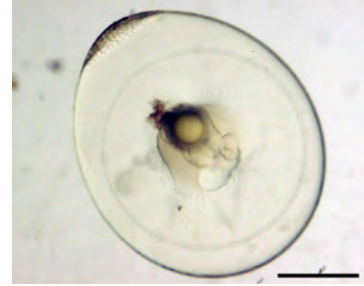
Cluster 68 (IC35)

卵は球形で、直径 0.97–1.00 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。オレンジ色の油球を 1 個もち、その直径は 0.17 mm で、卵径の 17.0–17.5%。



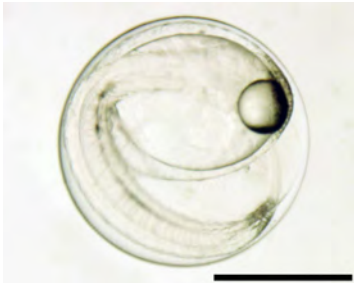
Cluster 70 (IC05)

卵は球形で、直径 0.84–1.01 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。透明な油球が 1 個あり、卵黄前端に位置する。その直径は 0.12–0.16 mm と比較的小さく、卵径の 11.8–16.8%。卵黄は平滑。囲卵腔は狭い。発生中期では胚体が細長く、色素は認められない。



IA06

卵は長卵形で長径 1.35–1.73 mm、短径 1.25–1.45 mm。長軸方向のところが一端に密な顆粒状構造の集合が認められる。直径 0.26 mm の透明な油球が 1 個ある。このような形態的特徴から、このタイプはハコフグ科の卵に同定された。



IB06

卵は球形で、直径 0.90 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄には亀裂が認められる。透明な油球が 1 個あり、卵黄前端に位置する。油球径は 0.18 mm で、卵径の 20.0%。胚体の中央部には点状の黒色素が数個、尾部には叢状のやや大きな黒色素が認められる。



IC21

卵は球形で、直径 1.02 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.25 mm で、卵径の 24.5%。油球は卵黄のほぼ中央部腹面に位置する。胚体、油球、卵黄上に点状の黒色素がまばらに出現している。34 筋節が数えられた。



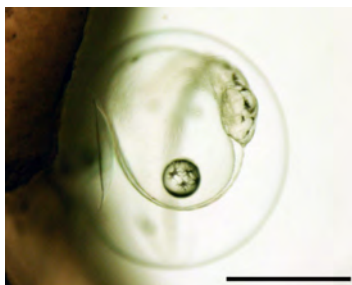
IC25

卵は球形で、直径 0.90–0.93 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。透明な油球を 1 個もち、その直径は 0.19–0.23 mm で、卵径の 20.9–24.7%。発生後期では樹枝状の黒色素が油球上にほぼ等間隔に分布しており、卵黄表面にも少数が認められる。胚体上にも樹枝状の黒色素が散在しており、褐色色素も頭部、胚体中央部、尾部に認められる。



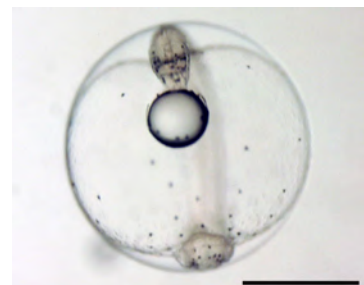
IC28

卵は球形で、直径 1.36 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。油球を 1 個もち、その直径は 0.25 mm で、卵径の 18.4%。発生中期において色素は出現していない。卵膜はやや薄く、青みを帯びている。



IC29

卵は球形で、直径 0.96 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。透明な油球が 1 個あり、その直径は 0.15 mm で、卵径の 15.6%。油球は卵黄の前端に位置する。発生後期では、樹枝状の黒色素が油球上と、卵黄後端にも 1 個認められる。さらに、胚体背面には頭部から尾部にかけて黒色素がならび、尾部中央部腹面にも叢状の黒色素が認められる。

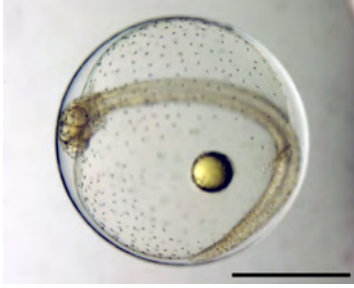


IC34

卵は球形で、直径 1.04 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。囲卵腔は狭い。透明な油球を 1 個もち、その直径は 0.25 mm で、卵径の 24.0%。油球は 1 個で卵黄の後方に位置している。発生後期では、卵黄表面、油球上および胚体に点状の黒色素がまばらに出現している。

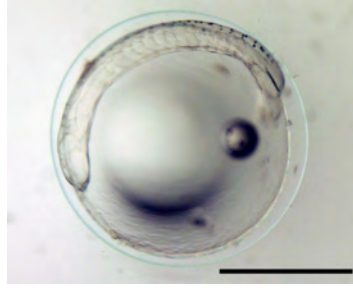
Plate 17 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region





IC36

卵は球形で、直径2.10 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質、囲卵腔は狭い、黄色い油球を1個もち、その直径は0.35 mmで、卵径の16.7%。発生後期では、卵黄表面全域に点状の黒色素がほぼ均一に分布している。また、胚体全域に点状の黒色素と褐色色素が認められる。



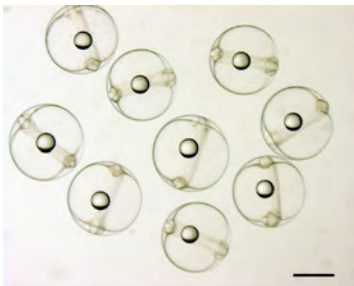
IC38

卵は球形で、直径0.96 mm、卵膜は青みを帯びており、その表面は平滑。卵黄は均質、囲卵腔は狭い。透明な油球を1個もち、その直径は0.14 mmで、卵径の14.6%。発生中期の筋節が12本数えられる段階では胚体背面に点状の黒色素がならんでいる。また、油球上に数個の点状の黒色素が認められる。



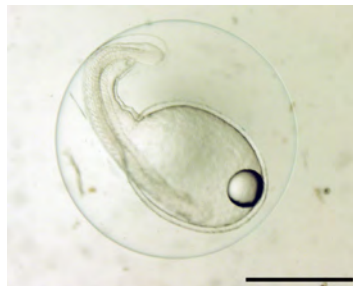
IC39

卵は球形で、直径1.36 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。卵黄は均質。透明な油球を1個もち、その直径は0.29 mmで、卵径の21.3%。油球は卵黄の後端に位置する。発生後期では、いくつかの点状の黒色素が油球上、胚体の吻端部、胚体中央部、尾端部に認められる。



IC40

油球を1個もち、卵膜が平滑で球形の卵のうち、発生がごく初期にあるなどの理由で明瞭に識別できる形質をもたなかった卵をIC40としてまとめた。このタイプは、332個がまとめられ、卵径は0.73-1.25 mm、油球径は0.15-0.30 mm、油球径の卵径との割合が19.0-26.4%の卵を含んでいた。



ID03

卵は球形で、直径2.17-2.24 mm、卵膜は透明でその表面は平滑。囲卵腔は広い。卵黄前端に透明な油球を1個もち、その直径は直径0.33 mmで、卵径の14.7-15.2%。卵黄には不明瞭な亀裂が認められる。発生後期においても色素は出現しない。これらの形態形質に加え、Aoyama et al. (2001) でDNAによる種判別によりノコバウナギ科 Serrivormeridae に近縁とされた卵と同一の形態を示したことから、このタイプはウナギ目の卵と推察された。



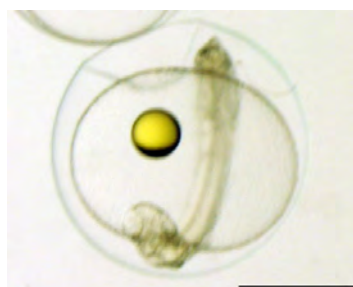
ID10

卵は球形で、直径約1.62 mm、囲卵腔は広い。卵黄には亀裂が認められる。胚体は細長く、卵黄は胚体のほぼ全長にわたって付着している。油球は長径0.21 mmの楕円球形で、卵黄の後端に位置している。



ID16

卵は球形で、直径2.17 mm、卵膜は透明で平滑。囲卵腔が広い。油球は1個あり、直径0.35 mmで、卵径の16.1%であり、卵黄の前端に位置する。卵黄には亀裂が認められる。胚体が非常に細長く、卵黄がほぼ全長にわたって付着している。



ID17

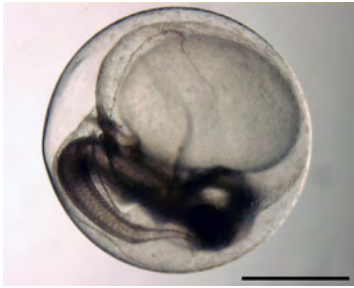
卵は球形で、直径1.10-1.18 mm、卵膜は透明で平滑。囲卵腔がやや広い。黄色い油球が1個あり、その直径は0.18-0.20 mmで、15.3-18.2%。発生後期においても色素が出現していない。



IIA08

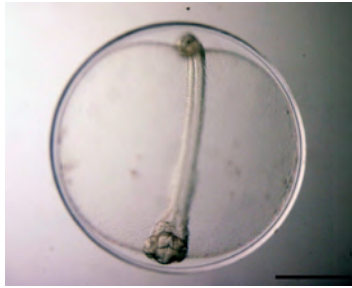
卵は球形で、直径1.22 mm、卵膜は透明で、卵門の周辺が円盤状に盛り上がっている。

Plate 18 Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region



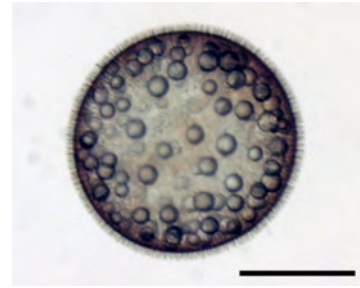
IIC06

卵は球形で、直径 2.52 mm。卵膜は透明で平滑である。油球はない。胚体は卵黄囊に対して小さい。卵内ですでに眼の黒化が始まっている。



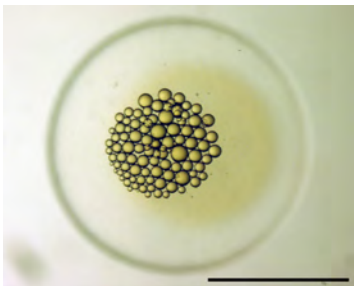
IIC08

卵は球形で、直径は 1.67 mm。油球はない。囲卵腔は狭い。卵膜のすぐ内側に 1 層の内卵膜が認められる。卵形に比べ胚体が細い。発生中期において色素はまったく出現していない。



IIIA01

卵は球形で、卵径 0.95 mm。卵膜表面に長さ約 0.03 mm の微少な棘がほぼ密に分布している。油球は多数 (79 個) あり、その直径は 0.08 mm 以下である。



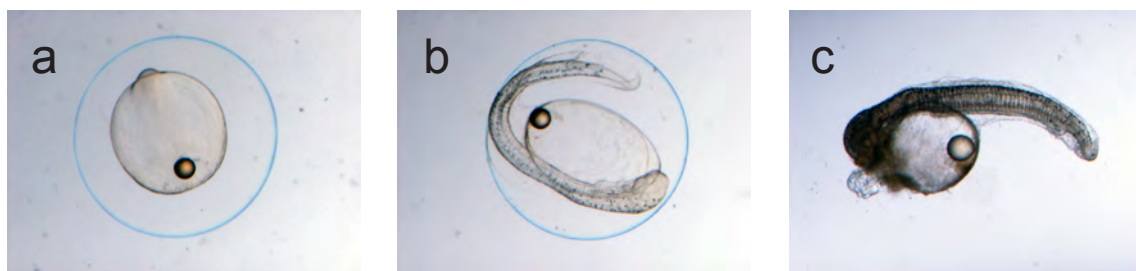
IIIC06

卵は球形で、直径 1.80 mm。卵膜は透明で平滑。囲卵腔は狭い。直径 0.13 mm 以下の黄色い油球が多数 (約 100 個) あり、植物極側に偏在する。

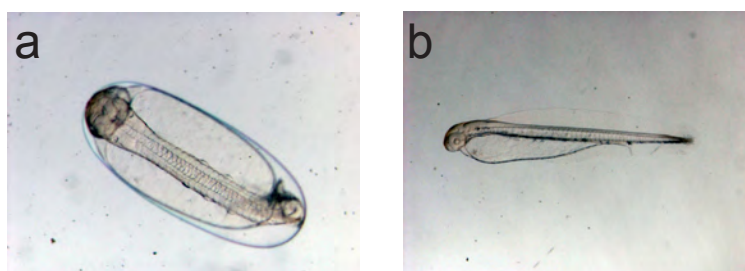
**Plate 19** Morphological descriptions of eggs collected in western Mariana region



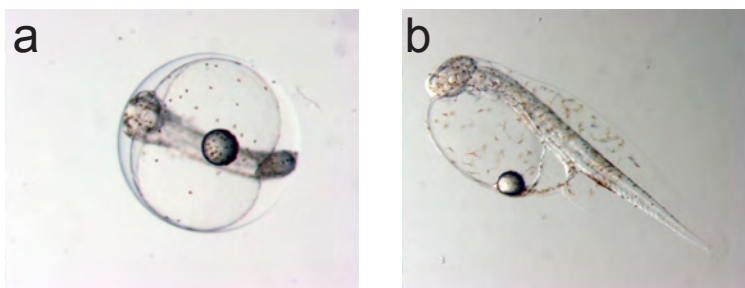
コノシロ *Konosirus punctatus* の卵内発生と孵化仔魚。2005年4月に採集。a 採集直後。b 採集後20時間。c 孵化仔魚。全長3.1 mm。採集後27時間。



マイワシ *Sardinops melanostictus* の卵内発生と孵化仔魚。2005年2月に採集。a 採集直後。b 採集後50時間35分。c 孵化仔魚。採集後62時間20分。仔魚は孵化直後に死んでしまったため、全長は測定していない。

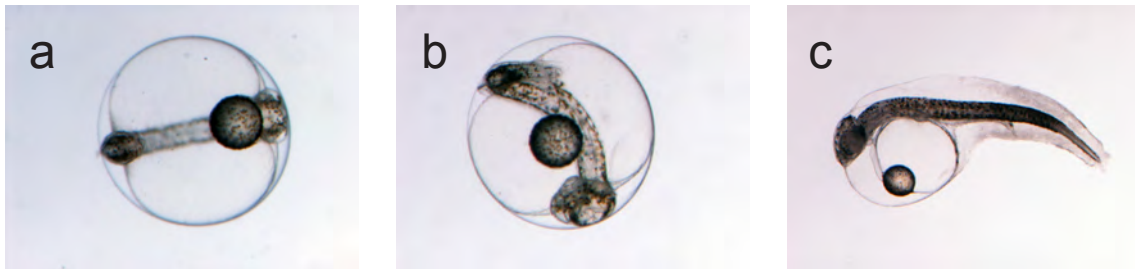


カタクチイワシ *Engraulis japonicus* の卵内発生と孵化仔魚。2004年12月に採集。a 採集直後。b 孵化仔魚。全長3.1 mm。採集後11時間40分。

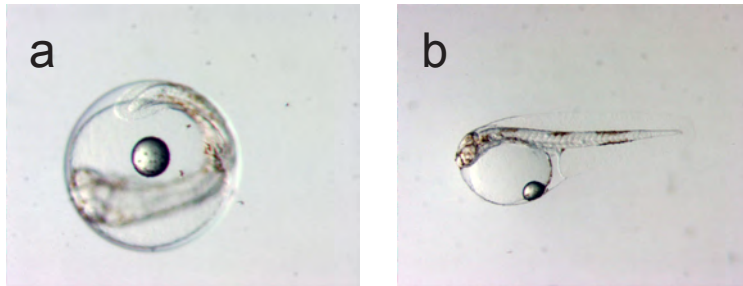


マゴチ *Platycephalus* sp. の卵内発生と孵化仔魚。2005年9月に採集。a 採集直後。b 孵化仔魚。全長1.6 mm。採集後9時間20分。

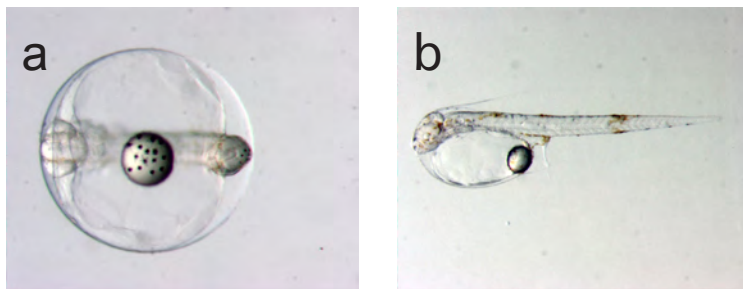
**Plate 20** Morphology of eggs and newly hatched larva. The egg was collected in Lake Hamana and reared in laboratory



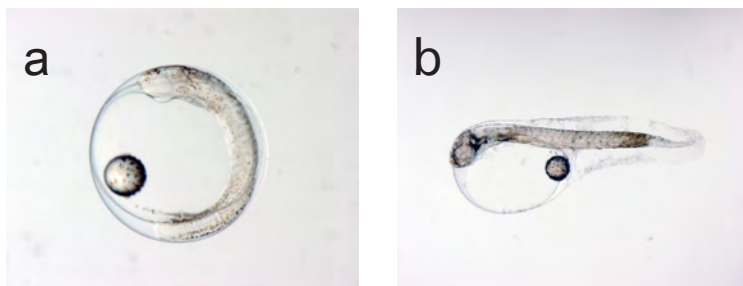
スズキ *Lateolabrax japonicus* の卵内発生と孵化仔魚。2005年2月に採集。a 採集直後、b 採集後15時間30分、c 孵化仔魚。全長2.9 mm。採集後51時間40分。



ヒイラギ *Leiognathus nuchalis* の卵内発生と孵化仔魚。2005年8月に採集。a 採集直後、b 孵化仔魚。全長2.3 mm。採集後4時間。



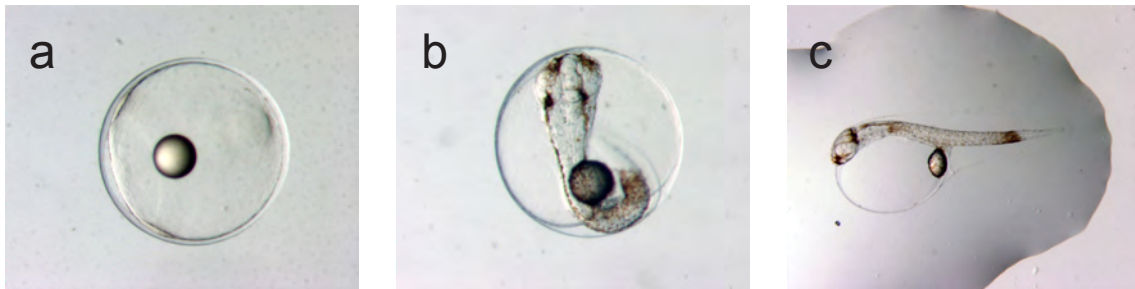
クロサギ *Gerres equulus* の卵内発生と孵化仔魚。2005年7月に採集。a 採集直後、b 孵化仔魚。全長1.9 mm。採集後11時間。



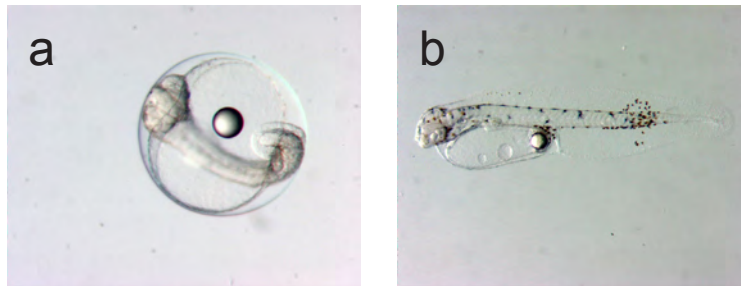
キチヌ *Acanthopagrus latus* の卵内発生と孵化仔魚。2005年10月に採集。a 採集直後、b 孵化仔魚。全長2.1 mm。採集後10時間20分。

**Plate 21** Morphology of eggs and newly hatched larva. The egg was collected in Lake Hamana and reared in laboratory

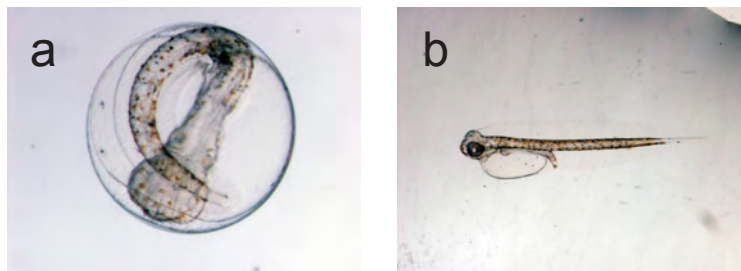




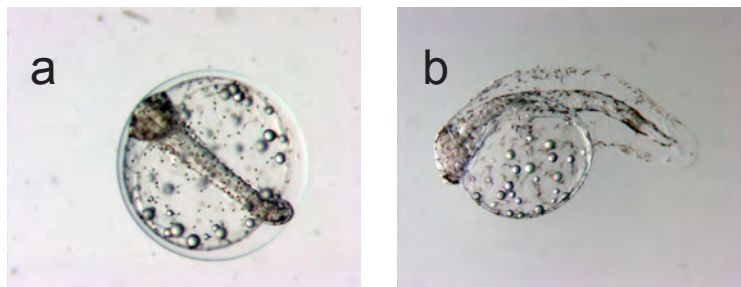
クロダイ *Acanthopagrus schlegelii* の卵内発生と孵化仔魚。2005年4月に採集。a 採集直後、b 採集後11時間55分、c 孵化仔魚、全長2.0 mm、採集後26時間30分。



アラメガレイ *Tarphops oligolepis* の卵内発生と孵化仔魚。2005年9月に採集。a 採集直後、b 孵化仔魚、全長1.7 mm、採集後9時間30分。

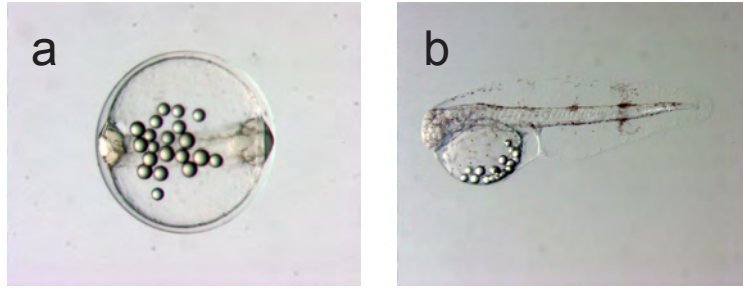


イシガレイ *Kareius bicoloratus* の卵内発生と孵化仔魚。2005年1月に採集。a 採集直後、b 孵化仔魚、全長4.1 mm、採集後48時間30分。

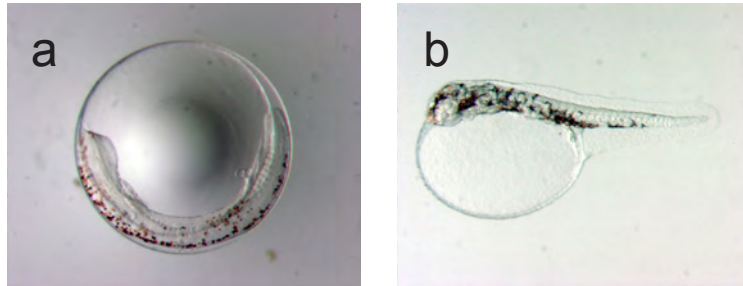


ササウシノシタ *Heteromycteris japonica* の卵内発生と孵化仔魚。2005年4月に採集。a 採集直後、b 孵化仔魚、全長1.2 mm、採集後9時間。

**Plate 22** Morphology of eggs and newly hatched larva. The egg was collected in Lake Hamana and reared in laboratory



クロウシノシタ *Paraplagusia japonica* の卵内発生と孵化仔魚。2005年9月に採集。a 採集直後、b 孵化仔魚、全長 1.6 mm、採集後 9 時間。



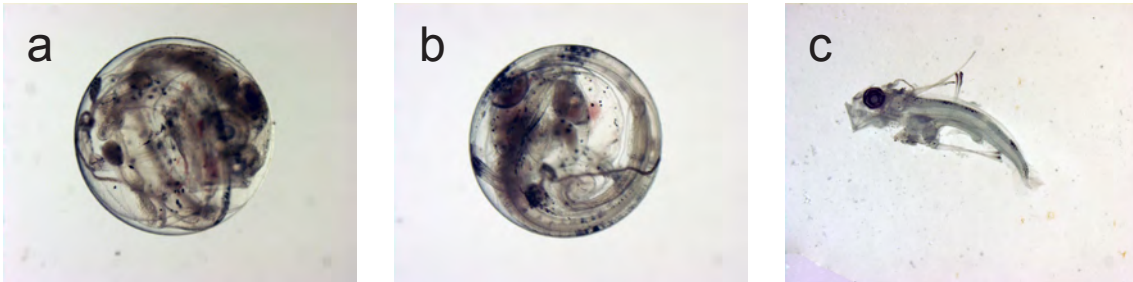
ギマ *Triacanthus biaculeatus* の卵内発生と孵化仔魚。2005年8月に採集。a 採集直後、b 孵化仔魚、全長 1.4 mm、採集後 4 時間。

**Plate 23** Morphology of eggs and newly hatched larva. The egg was collected in Lake Hamana and reared in laboratory





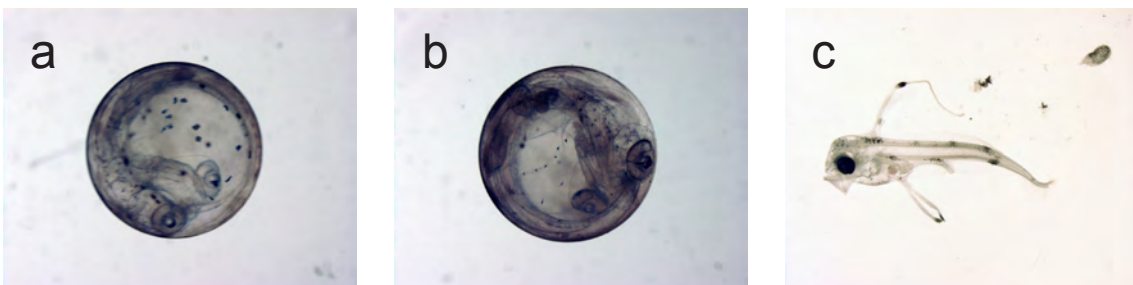
クビナガアナゴ *Derichthys serpentinus* の卵内発生と孵化仔魚. a 採集直後. b 採集後 27 時間. c 孵化仔魚. 全長 9.5 mm. 採集後 62 時間.



アカナマダ *Lophotus capellei* の卵内発生と孵化仔魚. a 採集直後. b 採集後 5 時間 50 分. c 孵化仔魚. 全長 5.0 mm. 採集後 22 時間 20 分.

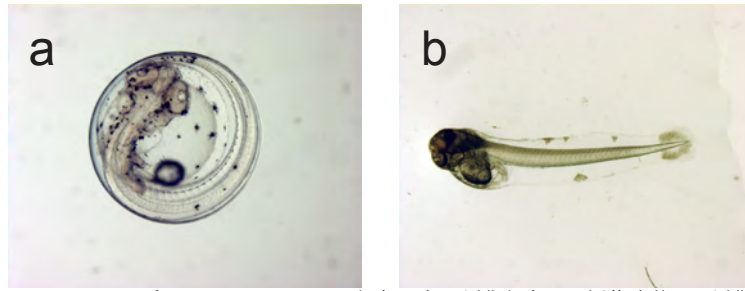


アカマンボウ *Lampris guttatus* の卵内発生と孵化仔魚. a 採集直後. b 採集後 130 時間. c 孵化仔魚. 全長 6.4 mm. 採集後 204 時間.

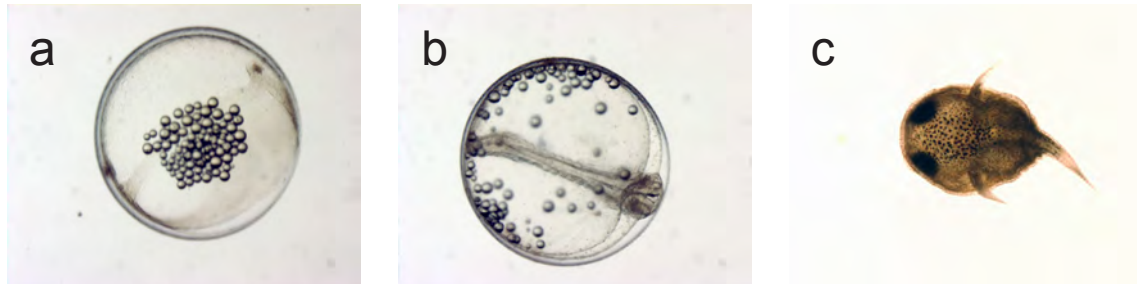


ユキフリソデウオ *Zu cristatus* の卵内発生と孵化仔魚. a 採集直後. b 採集後 44 時間. c 孵化仔魚. 全長 5.5 mm. 採集後 78 時間 10 分.

**Plate 24** Morphology of eggs and newly hatched larvae. The egg was collected in western Mariana region in KH-02-2 Hakuho Maru cruise and reared in laboratory



マルバラシマガツオ *Brama orcini* の卵内発生と孵化仔魚. a 採集直後. b 孵化仔魚. 全長 4.1 mm. 採集後 20 時間 20 分.



ネズミフグ *Diodon hystrix* の卵内発生と孵化仔魚. a 採集直後. b 採集後 30 時間 50 分. c 孵化仔魚. 全長 2.6 mm. 採集後 138 時間.



クサビフグ *Ranzania laevis* の卵内発生と孵化仔魚. a 採集直後. b 採集後 20 時間 20 分. c 孵化仔魚. 全長 2.1 mm. 採集後 117 時間 35 分.

**Plate 25** Morphology of eggs and newly hatched larvae. The egg was collected in western Mariana region in KH-02-2 Hakuho Maru cruise and reared in laboratory

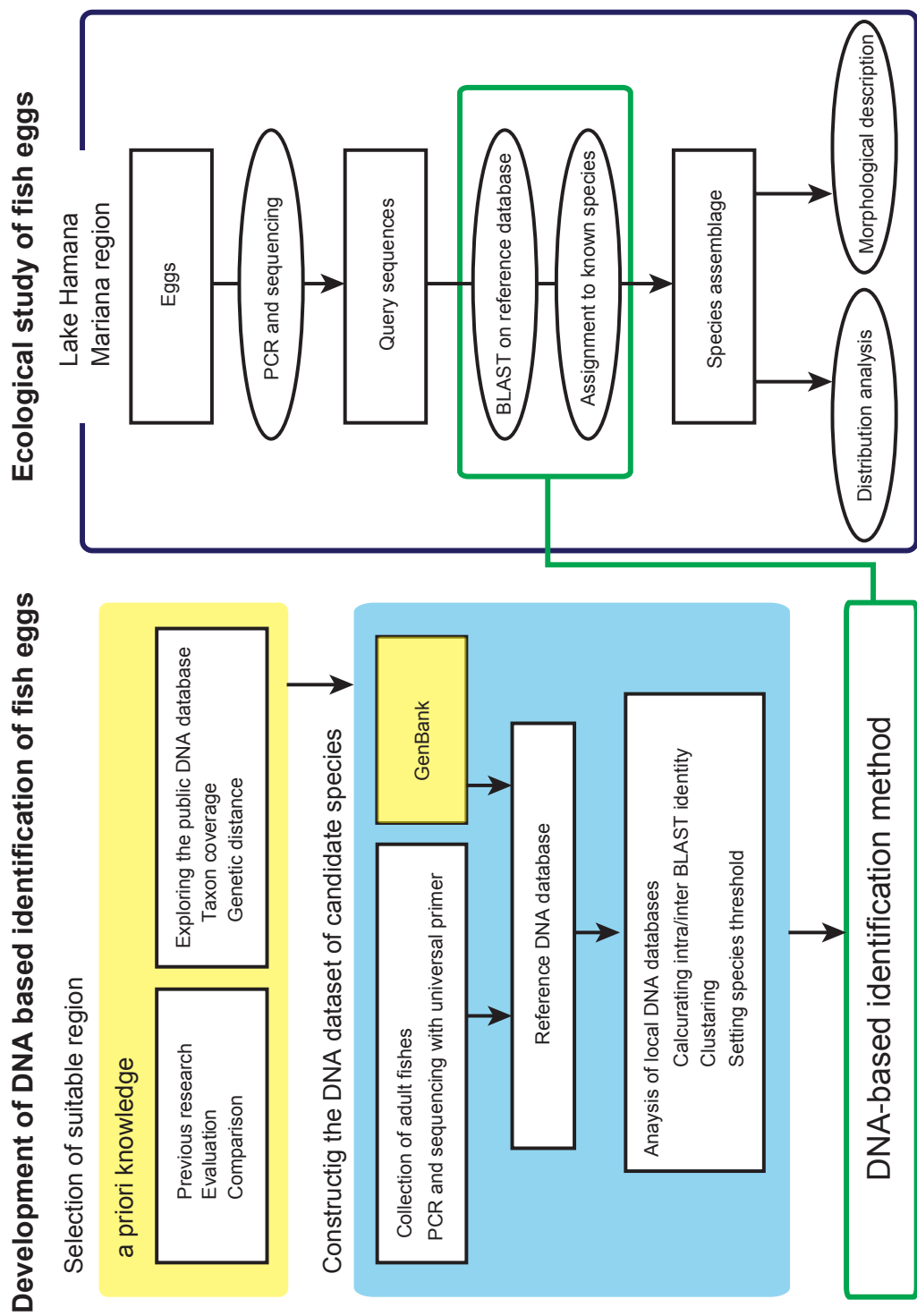
## 第7章 総合考察

本論文では、DNA を分類形質とした魚卵の種査定法の確立と、その種査定法を天然海域で採集された魚卵に適用することで有効性を実証した。さらに浜名湖とマリアナ海域において出現する魚卵の種組成、分布、季節性を明らかにし、それぞれの海域での魚類の産卵生態の一端を明らかにした。また、得られた卵の形態を記載し、形態分類に関する知見も集積した。本章ではこれらの結果をまとめ、DNA 種査定法を基礎とした生態学的研究の展望を論じる（第1節）。次に、天然海域における魚卵研究における DNA 種査定法の有用性と、新たに見つかった問題点を論じる（第2節）。また、浜名湖とマリアナ海域とで魚卵の生態、形態的特徴を比較することにより、魚卵の側面からみた魚類の適応と進化を考察する（第3節）。最後に、本研究によって得られた知見の水産学的意義と今後の展望を述べる（第4節、第5節）。

### 第1節 DNA 種査定法を取り入れた生態学的研究

本論文でおこなった一連の研究の内容を以下にまとめた（Fig. 7-1-1）。まず既存の DNA 種査定法に関する研究をもとに、mtDNA の 16S rRNA を対象領域と定めた（第2章）。次に、DNA データベースの探索と既存データを解析し、16S rRNA を用いた種査定法の方法と種を識別する基準を設定した（第2章）。この種査定法を浜名湖とマリアナ海域で採集した魚卵に適用し、種査定法をおこなった（第4章、第5章）。得られた種査定結果をもとに、16S rRNA を用いた魚卵の種査定法の有効性を評価した。また、両海域における魚卵の出現状況を明らかにし、生息する魚種の産卵生態を考察した。さらに、それらの卵の形態を記載し、形態によるグルーピングを可能にした（第6章）。以上の結果、DNA 種査定法は、野外における魚卵調査に有効であることが実証された（第7章第1節）。

適切な対象領域の選定は DNA バーコーディングの成否を決定づける要因である（Vaugh, 2007）。相同な領域によっても、分類群によって遺伝的変異の蓄積量が異なるため、対象とする分類群で適切な領域を探索する必要がある。これには、GenBank などの既存データを用いた解析をあらかじめおこなうことで候補となる領域が絞り込めるだろう。また、種が完全に既知のデータセットを用いて識別能力をテストする方法もあり、このような領域ごとの比較は魚類だけでなく様々な分類群でおこなわれている（Vences et al., 2005; Liu et al., 2010; Cawthorn et al., 2012; Xia et al., 2012）。また、対象領域の適切さを評価するためには、本研究でおこなったように、対象地域の DNA データの網羅性と、種レベルの分類の再現性で評価することがよいと考えら



**Fig. 7-1-1** Summary of the development of DNA based species identification of fish eggs and its application to ecological study, those were performed in the present study

れる。

これまでの DNA を用いた研究により、多くの DNA データが蓄積されている。しかし、同種であっても遺伝的組成が未知の個体群を扱う場合には、まず対象とする地域でローカルな DNA データベースを作成する必要があるだろう。また、本研究ではシーケンスを比較したが、対象とする分類群がサンプルの中から限定できれば、短時間で大量のサンプルが解析でき、コストも安いビーズアレイ (Gleason and Burton, 2012)、また、食性研究で取り入れられているような次世代シーケンサーを用いた方法 (Valentini et al., 2009) も検討する価値があるだろう。DNA バーコーディングの過去の多くの研究では COI が対象領域となっており、COI においてはデータの取得から解析までの手法が標準化されている (Ratnasingham and Hebert, 2007; Ward et al., 2009)。これまでに DNA バーコーディングに関するモデル的な研究は数多くおこなわれてノウハウが蓄積されており、今後、既存の研究に DNA による種査定法を導入することで、新たな展開と新しい問題の発見などブレイクスルーが期待できる。

## 第2節 DNA による魚卵の種査定の有用性と問題点

### 第1項 DNA 種査定法の有効性

DNA 種査定法の有効性を示す指標として、同定することのできた分類群の割合 (成功率) が考えられる。Ficetola et al. (2010) は GenBank に登録されている配列データをもとに、16S rRNA の分類群識別能 (resolution capacity) を計算し、条鰭類において 0.97 という値を得た。この値は、データベースに登録されている分類群のうち 97% が、ユニークなハプロタイプの集合として識別できることを意味している。従って、この resolution capacity は変異量を考慮していないものの、未同定サンプルの 16S rRNA 配列を、対象とする地域に出現する種を完全に網羅したデータベースで検索すれば、成功率は 97% 前後になることが期待される。過去の DNA バーコーディングの研究で、対象地域と対象分類群を限定して DNA データのライブラリを作成し、そのライブラリを出現候補種とそれらが含むハプロタイプの完全なデータベースであると仮定して、種の識別可能性がテストされている (例えば、Ward et al., 2005; Steinke et al., 2009; Aquino et al., 2011; Lakra et al., 2011)。COI を用いて同様のテストが多く生物群についておこなわれており、95% 以上の種が識別可能であることが示されている (Hebert et al., 2003; Ward et al., 2005; Hajibabaei et al., 2006)。

しかしながら、本研究で浜名湖とマリアナ海域で得られた成功率は、理論上得られると期待される値よりも低かった。本研究では浜名湖とマリアナ海域で採集された魚卵に 16S rRNA による種査定を適用し、それぞれ 16S rRNA 配列によって識別されたクラスタの 58% と 39% で種



が同定された（第4章、第5章）。本研究では種が既知の成魚のDNAデータの解析に基づいて最も種の再現率が高くなる99%の相同性を種を識別する基準として採用しており、この成功率の値は、基準が不適切であるから種に帰属できなかったからではなく、データベースの不完全性により、高い相同性を示す種が見つからなかったことを示していると考えられた。本研究では、オリジナルの成魚DNAデータセットを追加することにより、浜名湖で5種、マリアナ海域で7種が新たに同定された。今後、DNAデータの蓄積に伴って、DNA種査定法の成功率は高まることが予想される。

本研究のように、多種多様な分類群が含まれていると考えられる大量の魚卵のサンプルを、大規模なデータベースを用いて種査定を試みた研究は前例がなく、得られた成功率の値を他の研究と比較することは難しい。しかしながら、メキシコのユカタン半島沿岸で採集された候補種が完全に不明の魚卵で、COIを解析して種査定を試みた結果、25個の卵のうち5個（20%）が種まで同定されたと報告されている（Valdez-Moreno et al., 2010）。この値は本研究で得られた成功率よりもかなり低い。本研究では最も種の再現率が高くなる16S rRNAのresolution capacityがCOIよりも高いこと（Ficetola et al., 2010）、16S rRNAのほうがCOIよりもより広い海産魚の分類群を網羅していること（第2章）から、この成功率の差は、対象としたDNA領域の適性と参照するデータベースの網羅性によって生じたと考えられた。また、種を識別する基準値が変わると同定できた割合も変化することから、種を識別する基準の妥当性は、今後のDNAデータの広範な分類群における変異量の解析で検証されなければならない。以上のことから、今回16S rRNAの解析で得られた成功率は現時点でじゅうぶんに高いと考えられ、DNA種査定法が形態に代わる実用的な種査定法となりうることが示唆された。

魚類11種の卵の形態を比較した結果、形態によって識別できたとしても、そのひとつのグループの中にまったく分類群の異なる複数種を含む可能性があることが示された（第2章）。浜名湖では、形態で分けた35タイプが、DNA解析した結果45クラスタに整理され、マリアナ海域では88タイプが71クラスタに整理された（第4章、第5章）。マリアナ海域では原則として1タイプ1個の解析をしたため、タイプが複数のクラスタに分かれる結果は出ていないものの、魚卵の形態のみによるタイプ分けは、必ずしも遺伝的に識別できるグループとは一致しなかった。つまり、形態のみの分類では、1種として分けたグループに複数種が混在する、もしくは1種を複数のグループに分けてしまう危険性がある。これは、野外で生態学的研究をおこなう際に大きな問題となる。例えば、浜名湖では形態で分けられた1タイプにクロダイとキチヌが含まれていることがDNA解析によって明らかとなり、さらにこの2種の出現時期はそれぞれ春と秋であり、まったく異なっていた（第4章）。同所的に分布するが形態によって卵の分類が困難な種では、このような形態による混同が誤った解釈をもたらす原因ともなる。DNAによるクラスタリングは、種と対応させることができなくとも、ひとつのグループに異なった分類群が混じる危険性を大きく排除できるため、生態学的研究にとって有効な手法となるだろう。

マリアナ海域では、種が同定されたうち、マルバラシマガツオ、クビナガアナゴ、ヨロイギンメ、ヒシコパン、アカナマダの5種で、異なる発生段階にある卵をタイプとして分けており、16S rRNAの解析によってそれぞれ1種に同定することができた(第5章)。DNAの解析によって従来の分類群が整理された例がいくつかある。クジラウオでは、これまで形態によって3科に分けられていた分類群が、形態と16S rRNAの解析により発生段階と性別が異なっていた個体であると判明し、1科にまとめられることが明らかとなった(Johnson et al., 2009)。また、同種であっても、南アフリカ周辺海域とオーストラリア周辺海域に離れて分布する魚種では両個体群に大きな遺伝的変異があり、両海域に分布する1,000種のうち300種が種として分かれることも推定されている(Zemlak et al., 2009)。魚類以外にも、従来1種と考えられていたセセリチョウ科の*Astrartes fulgerator*が、COIの配列を比較することにより10種の複合群であったことが明らかとなるなど(Hebert et al., 2004)、DNA解析により示唆された遺伝的分化を確かめることで、種の分類を再検討することができる。今後、DNAを魚卵の種査定に適用して知見を増やしていくことで、分類学的研究と生物多様性の記載に新たな手法を提供するだろう。

DNA解析は近年著しく普及し、操作なども極めて簡略化できるようになった。さらにDNAに基づく分類は、客観的であり高度な専門的知識を必要としない。このような観点から、DNAを分類に導入することにより、これまで一部の専門家に限られていた魚卵の分類の門戸を一気に広げることができると考える。しかしながら、形態による確実な分類やグルーピングは、DNA解析作業を著しく軽減させる。また、全てにおいて種レベルの分類が必要となることはなく、必要な精度で結果を得るために、研究目的によって形態とDNAを使い分けることが重要であると考えられる。さらには、魚卵の形態にはそれぞれ進化的・生態的意義があり、魚類の初期生態を解明する大きな手がかりが得られると考える。すなわち、双方の情報を確実に蓄積し、総合していくことが重要である。

本研究で、浜名湖とマリアナ海域を合わせ、DNA解析の結果に基づき、種が不明だった卵を含む146種類の魚卵の形態を記載することができた(第4章、第5章、第6章)。浜名湖とマリアナ海域のいずれでも、DNA解析用の保存に先立って、顕微鏡下でデジタルカメラを用いて写真を撮影した。従来は、1個のサンプルでDNA解析と形態の記載は同時にはおこなえなかった。しかし、デジタル写真による記録を用いることで、形態学的特徴を壊してしまうDNA解析と、形態学的な記載を同時におこなうことが可能になった。この方法は、魚卵の生態学的な調査でスタンダードな方法と成りうるだろう。また、魚卵だけでなく、仔魚稚魚でも写真による形態の記載とDNA解析を同時におこなうことで、従来の種が分からないという、分類学的な問題点を解決する糸口となるだろう。今後は、DNAにより同定された卵の形態に関する情報を蓄積し、比較研究をおこなうことにより得られた知見を分類学的研究にフィードバックさせることで、形態によるより簡便な分類法の確立と、その使用の限界を明確にすることができると考えられる。

## 第2項 問題点

本研究では、16S rRNA の相同性を種内と種間で比較し、種レベルの再現性が最も高くなる99%の相同性を、種を識別する閾値として用いた(第3章)。しかしながら、浜名湖でもマリアナ海域でも、検索配列が複数種の配列と99%以上の相同性を示す場合があり、それらは種レベルで同定できなかった(第4章, 第5章)。多くの研究ではCOIを対象領域としているものの、変異量を基準とした場合もハプロタイプを基準とした場合も、単一の遺伝子領域ですべての分類群を完全に種レベルで識別できるわけではない(例えば, Valentini et al., 2009)。遺伝的な変異量は、相同の遺伝子領域でも分類群によって大きく異なることが報告されている(Johns and Avise, 1998)。この原因のひとつに、代謝速度や世代時間、DNA修復機構といった特性が異なるために、生物群によって、また近縁種間においても分子進化速度が異なっていることが考えられる(例えば, Britten, 1986; Li and Tanimura, 1987; Martin and Palumbi, 1993; Krieger and Fuerst, 2002)。その他に、分岐年代が新しい種では変異が少なく、種を識別できないこともDNA分類の限界とされている(Tautz et al., 2003)。以上のことから、全ての分類群に共通する“種の境界”を設定することは不可能である。よって、DNAバーコーディングでは既知の配列に基づいて分類群間で変異量を比較し、DNAのグルーピングによる種レベルの再現性が最も高い基準が良い種の閾値となる(例えば, Ward et al., 2005; Lefebure et al., 2006)。本研究でも、最もよく分類群が再現されるように、同様の手法で基準を決めた。種を識別する基準は、ここで使用した99%は絶対的な基準ではなく、出現候補種の母集団、および対象領域によって、また、より多くのデータを蓄積して再検討する必要があるだろう。

検索配列に近縁な配列がデータベース上に見つからない場合、もしくは変異が少なく同種かどうかの判断が難しい場合、DNAの配列に基づいた近隣結合樹による解析が、このような曖昧な配列を高次分類群に帰属させるために使われる(Paine et al., 2007)。しかし、この近隣結合樹は系統樹ではない。COIで、同種の配列がデータベースに登録されていない場合に高次分類群に帰属できるかを試した報告では、良い成績で高次分類群への帰属が可能であった(Wilson et al., 2011)。

以上のように、DNAバーコーディングにおいては種の基準をどう設定するかが大きな問題となる。DNAバーコーディングにおいて、種を識別することと、種を認識することは別の概念である(Moritz and Cicero, 2004)。DNAバーコーディングでは、ある相同な遺伝子領域の配列を比較して変異を調べる。この変異は、種間の生殖隔離により蓄積されてきた変異であると考えるのが妥当だろう。また、DNAバーコーディングは、系統的な情報を含むことが考えられるものの、種レベルでの識別ができれば、系統を再現することは目的としていない(Hebert and Gregory, 2005)。よって、DNAバーコーディングの有効性の評価は、DNAバーコードによるクラスタリングと、参照する分類体系との一致によって示されるべきだと考えられる。種分化に遺伝子の変異がどのように関わっているかはいまだ疑問が多い(The Marie Curie SPECIATION



Network, 2012). DNA バーコーディングで比較している変異が、種分化に伴って蓄積した変異であるのなら、ある種概念のもとに成立している分類体系をできるだけ正確に再現できることが重要だろう。

### 第3節 沿岸域と外洋域における魚卵形質の適応

卵の形態、卵サイズ、初期発生の過程は産卵生態や生活史の適応を示していると考えられる(後藤・井口, 2001)。第2章において観察した11種の発生過程をまとめた結果、魚種によって形態形成のタイミングがやや異なることがわかった (Fig. 2-4-1)。そこで、第2章で記載した卵と孵化仔魚の形態、および浜名湖とマリアナ海域で採集され飼育された卵と孵化仔魚の形態(第6章)を総合し、計31種で卵径と孵化仔魚のサイズ、孵化時の発達段階の関係を、各種の産卵海域ごとにまとめ比較した (Fig. 7-3-1-3)。なお、浜名湖で採集されたマイワシ卵は、孵化後の死亡により正確な体長が測定できなかったため、解析から除外した。発達段階は、硬骨魚類に一般的なステージングに使われる形態を選び (Kimmel et al., 1995)、多くの魚種に共通してみられたそれらの形成順序(第2章)に基づき、以下の6段階を定義した。

Stage 1) 発生後期

Stage 2) 筋節形成の完了

Stage 3) 胸鰭原基の形成

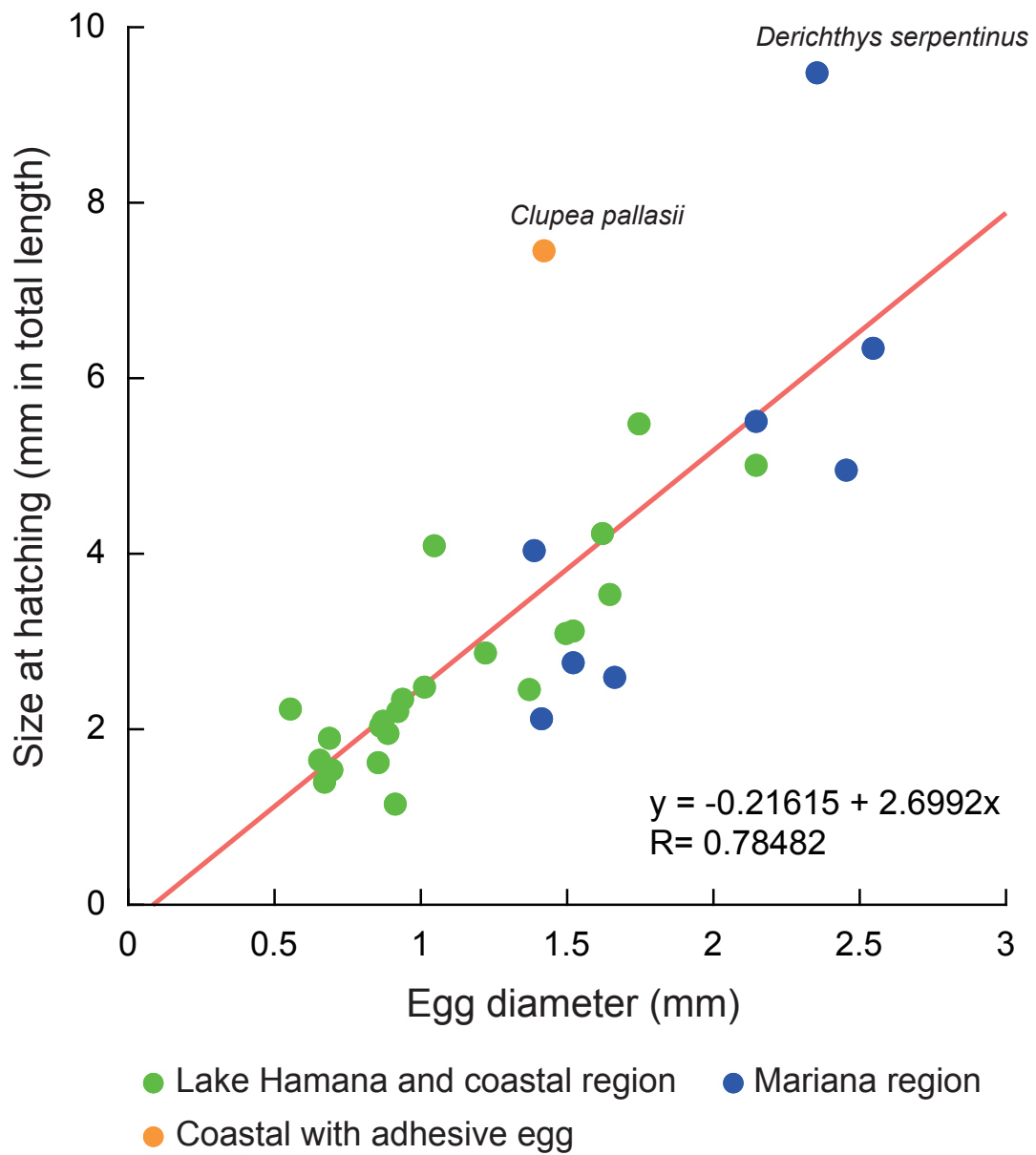
Stage 4) 開口

Stage 5) 眼の黒化

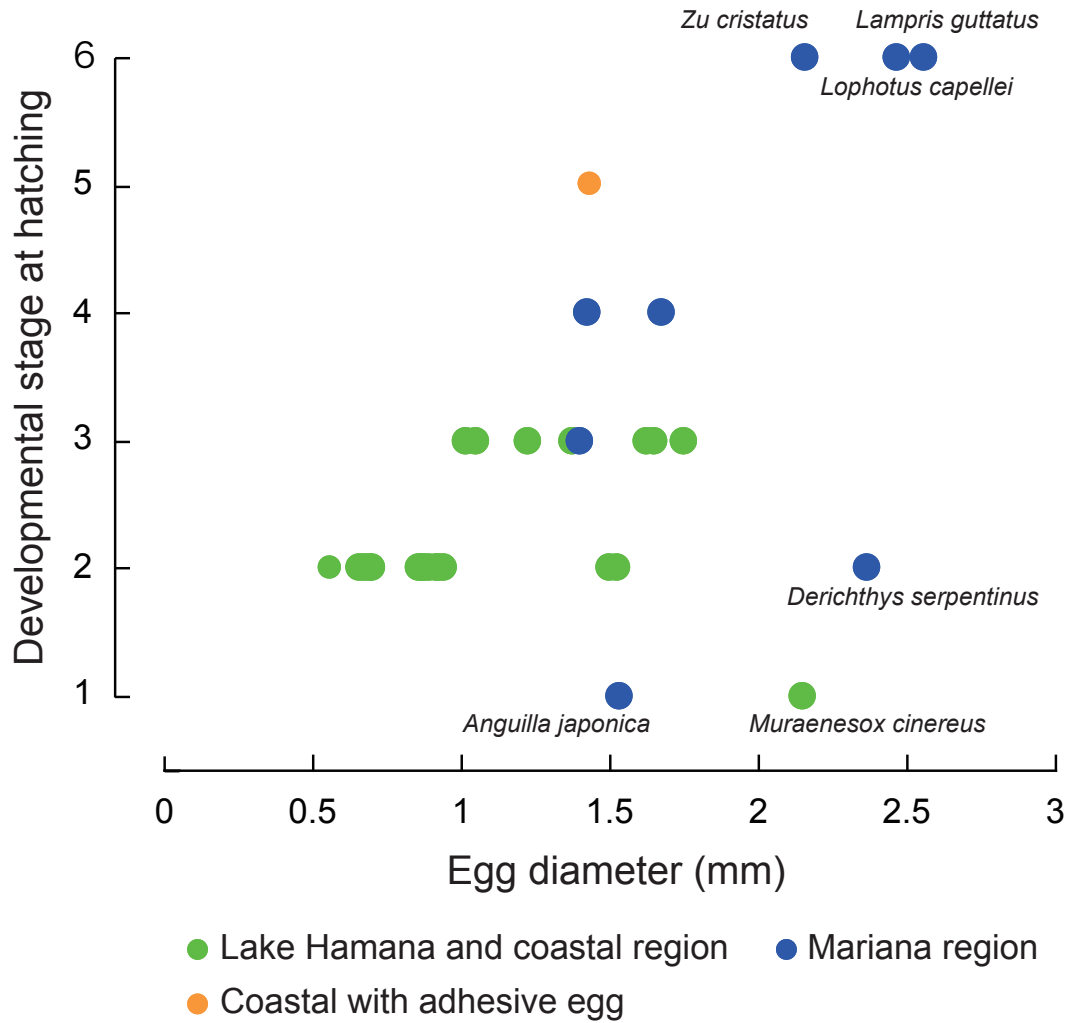
Stage 6) 胸鰭以外の鰭の形成

その結果、まず、卵径と孵化仔魚の全長に正の相関が認められ ( $r = 0.784$ )、より大きな卵ほど孵化仔魚は大きかった (Fig. 7-3-1)。卵径に比して孵化仔魚が著しく大きかったのは、沈性付着卵を産むニシンと、クビナガアナゴだった。次に、卵径と孵化時の発達段階を比較したところ、大きな卵からはより発達した段階の仔魚が産まれる傾向があった (Fig. 7-3-2)。同様に、サイズの大きな仔魚はより発達していた (Fig. 7-3-3)。以上のことから、発達した段階で孵化するには、ある程度大きな卵であることが必要であると考えられた。しかしながら、ウナギ目3種(ニホンウナギ、ハモ、クビナガアナゴ)は、卵径と孵化仔魚のサイズが大きいにも関わらず、筋節形成が完了していない、もしくは胸鰭の形成も始まっていない未熟な段階で産まれた。

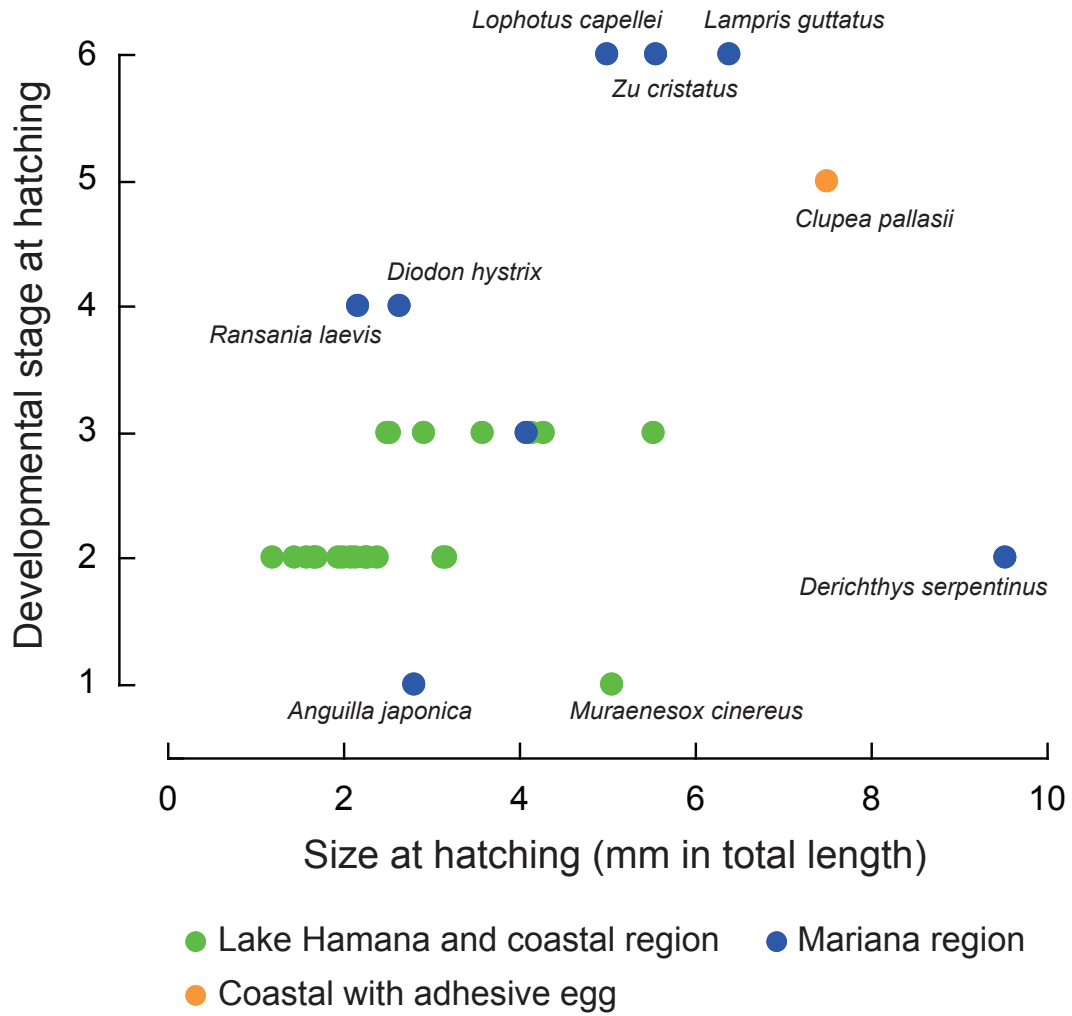
産卵海域ごとに比較すると、浜名湖で採集された卵と、沿岸性の種苗生産対象種の卵は小さく未熟な段階で仔魚が産まれたのに対し、マリアナ海域に出現した卵は、アカマンボウ目3種(ア



**Fig. 7-3-1** Relationships between egg diameter and body size (total length) of newly hatched larvae in 31 fish species from Lake Hamana, aquaculture and western Mariana region. Those species were compared among their spawning environment and egg characteristic



**Fig. 7-3-2** Relationships between egg diameter and developmental stage of newly hatched larvae in 31 fish species from Lake Hamana, aquaculture and western Mariana region. Those species were compared among their spawning environment and egg characteristic



**Fig. 7-3-3** Relationships between body size (total length) and developmental stage of newly hatched larvae in 31 fish species from Lake Hamana, aquaculture and western Mariana region. Those species were compared among their spawning environment and egg characteristic

カマンボウ、ユキフリソデウオ、アカナマダ) に代表されるように、卵のサイズが大きく、仔魚は発達した段階で孵化することがわかった (Fig. 7-3-1-3)。また、例数は少ないものの、同様の卵径であってもマリアナ海域に出現した種の孵化仔魚は、沿岸で産卵する種よりも発達した段階で産まれる傾向にあった。以上のことから、沿岸域の浮遊性魚卵には小さい卵から小さく未熟な仔魚が産まれる、外洋域では大きな卵から発達の進んだ仔魚が産まれるという特徴がそれぞれあることがわかった。

Smith and Fretwell (1974) は親の繁殖投資量と産仔数の間のトレードオフのモデルを提唱し、これは今では生物の繁殖生態や生活史研究において重要な概念のひとつとなっている。魚類においては、星野・西村 (2001) が定着卵の卵サイズとそれによって変化する発生時間、および孵化時の発達段階を考慮した生残モデルを示し、環境によって卵期の長さや孵化時の発達段階を変化させる時間稼ぎ仮説を提唱している。また、アマガエル科の *Agalychnis callidryas* では個体群内で発生速度が同様である卵であっても卵期の長さに大きな幅があり、これは捕食リスクとのトレードオフの関係にあり、孵化のタイミングが生き残りとニッチシフトに重要であると考えられている (Warkentin, 1995)。本研究の結果で明らかになった、種ごとに異なる卵サイズと、孵化サイズ、孵化タイミングとの関係は、沿岸域と外洋域というまったく異なった環境における成魚の産卵戦略の適応を示唆していると考えられる。

魚類仔稚魚期の大きな死亡要因として被食が考えられており、被食を招く要因として飢餓、疾病などの生物学的要因や、輸送などの物理的要因が複合して働くと考えられている (Bailey and Houde, 1989)。一般的に、浜名湖のような沿岸海域では植物プランクトンの一次生産や、動物プランクトンの二次生産など、魚類の餌環境の豊富さに関わる生産力がマリアナ海域のような外洋域に比べて高い (ピネ, 2010)。その結果、生物量も沿岸域で多く、外洋域では少なくなる。このことは、孵化したばかりの仔魚は、沿岸域においては高い摂餌可能性があるが、高い被食リスクもあり、逆に外洋域ではどちらも低いことが予想される。そのため、仔魚の摂餌可能性が高い沿岸域では卵黄量を多くする方向の戦略は進化することが少なく、逆に摂餌可能性が低い外洋域では飢餓耐性を高めるような、卵黄を大きくする方向の戦略もまた、適応的であったのだろう。卵が大きくなれば、それに伴い卵期も長くなる傾向がある。単に浮遊しているだけの卵では、卵期の長さは被食リスクに直接関係するだろう。また、輸送が完全に受動的であることから、仔魚の生残に不適な環境に分散する可能性も高まると考えられる。よって、被食リスクが相対的に低く、環境が均一であり分散による生残率低下の危険性も低い外洋域では、それらが相対的に高い沿岸域とは異なり、大きな卵を産んで長い卵期の後に発達した段階で産まれるという初期生活史上の戦略も、環境への適応として成立し、外洋性の魚類で進化してきたと考えられた。

これまで魚類の繁殖戦略は、主に  $r$  戦略と  $K$  戦略の考え方で解釈されてきた。それはすなわち、繁殖投資量と産卵数、生き残りの関係にトレードオフがあり、大きな卵は生残率が高いが親が

一定の繁殖投資量をもつために少数しか産めず、逆に、小さな卵は生残率が低いが多産むことができ、親の適応度としては釣り合う。従って、これらの結果は、卵のサイズと孵化のタイミングによって示される種ごとの形態の違いによって、魚種ごとの産卵生態および繁殖戦略が表され、個体の適応度を上げるように進化したことを示唆している。しかし、これまでに卵サイズがどのように初期発生に関わり、その変化がどのように生き残りに影響するのは十分に検討がなされていない。環境要因は発生過程に影響を与え、それが表現形の変化と進化につながる (Gilbert and Epel, 2009)。今後、魚類の卵の形態や、初期発生過程に関する知見が蓄積されることにより、環境と分類群ごとの比較が可能になれば、多様な環境に生息する魚類が、初期発生過程を通じてどのように適応しているかという問題に新たな視点を提供するだろう。

#### 第4節 水産学への貢献

魚卵の分布、出現量を正確に推定することは、水産資源学的に最も必要とされる情報である。本研究で取り入れた DNA による種査定法に基づき、魚卵を広範囲に調査することで、産卵海域の正確な推定、産卵量と繁殖個体群の生物量の経年変化、産卵場形成メカニズムを明らかにすることができる。この結果を長期に蓄積することで、いまだ謎の多い資源変動機構の解明につながり、より信頼できる資源量の推定ができ、さらに資源管理の方策や、漁業資源のよりよい保全策の設定の基礎知見ともなるだろう。近年では、大西洋のマグロ資源が急減していることが懸念されている (例えば, Porch, 2005)。産卵個体群を保全する効果を評価する上でも、魚卵の情報は大きく役立つと考えられる。また、天然海域で各種の魚卵が出現する環境を明らかにすることにより、よりよい発生環境が推定でき、種苗生産や養殖にも大きく貢献するだろう。このようなアプローチはすでにニホンウナギの養殖に活かされている。さらに、DNA による種査定法は食品にも応用されており (Teletchea et al., 2008)、水産物のトレーサビリティや原材料チェックにも貢献する。本研究で確立した DNA 種査定法の応用モデルと、そこから得られる知見は、水産上重要種の資源保全策を講じる上で非常に重要な情報であり、水産学的に大きく貢献すると考えられる。

#### 第5節 今後の展望

本研究により魚卵の DNA 種査定法が野外における生態学的調査に有効であり、魚類の産卵生態を解明する上で強力な手法であることを実証することができた。得られた結果から、魚卵の分類学の基礎を充実させることができ、魚類の繁殖戦略の環境への適応、また、適応の発生学的な背景に関して新たな示唆が得られた。しかしながら、種の基準の問題をはじめ、DNA 種



査定法の理論的な背景はじゅうぶんに構築されているとは言い難い。また、既存の DNA データの不足により、天然海域に出現する魚卵を完全には同定できず、今後、DNA の分類への有効性を高めていくために、データベースの充実が求められる。また、マイクロアレイや次世代シーケンサーといった新たな手法を導入することで、生物多様性の新たな側面が見いだせるかもしれない。また、DNA の種査定法に基づいて魚卵の形態を比較することで新たな分類形質が発見できることが予想される。DNA による信頼できるグルーピングに基づいた形態の記載と再検討をおこない、形態と DNA を総合した、より簡便な種査定法の確立が望まれる。

今後、DNA 種査定法を従来の生態学的、分類学的研究に適用していくことにより、いままで分類学的な障壁により手付かずであった魚類の初期発生と初期生活史研究に新たな展開が期待できる。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、その機会を与えていただくとともに、終始温かいご指導を賜った東京大学大気海洋研究所の塚本勝巳教授に深く感謝する。東京大学農学生命科学研究科附属水産実験所の鈴木讓教授には、浜名湖における採集調査についてご指導を頂くと共に、論文審査に際して有益なご指摘を賜った。東京大学大気海洋研究所の西田睦教授、大竹二雄教授、東京大学農学生命科学研究科の山川卓准教授には、論文審査に際して多くの貴重なご指摘を賜った。ここに厚く御礼申し上げます。

東京大学大気海洋研究所の青山潤特任准教授には研究全般にわたって適切なご指導と激励をいただいた。同所の井上潤博士、峰岸有紀博士（現 ZF-screens BV）、北里大学海洋生命科学部の吉永龍起講師には、分子生物学実験に関する知識と技術をご指導いただいたばかりでなく、研究の様々な局面で有益なご助言をいただいた。また、東京大学大気海洋研究所の横内一樹博士（現 Cemagref）、福田野歩人博士（現 内モンゴル大学）、須藤竜介博士には、浜名湖における調査に関し多大なご尽力を賜った。同所の Michael J. Miller 博士には、卵・仔稚魚の顕微鏡写真撮影技術をはじめ、多くの有益なご助言をいただいた。深く謝意を表する。

本研究における卵・仔魚の飼育や標本収集については、水産総合研究センターの各栽培漁業センターの皆様、ひとかたならぬご協力をいただいた。なお、栽培漁業センターは、2011年4月1日をもって水産総合研究センター各研究所と統合されたため、以下に当時の所属を記し、深く謝意を表する。宮古栽培漁業センターの有瀧真人博士には、ババガレイ卵、ヌマガレイ卵、ホシガレイ卵の標本および飼育データのみならず、様々な知識、技術を懇切丁寧に指導いただいた。同センターの大槻観三場長、大河内裕之氏をはじめとする職員の皆様には、ヒラメ卵およびニシン卵の採集に際し、施設の使用許可のみならず、飼育に関する知識をご教示いただいた。同様に、宮津栽培漁業センターの津崎龍雄場長、竹内宏行氏をはじめとする職員の皆様には、アカアマダイ卵の採集・飼育に際し、多大なご尽力をいただいた。また、厚岸栽培漁業センターの鈴木重則氏と森岡泰三氏にはマツカワ卵、伯方島栽培漁業センターの島康洋場長、兼松正衛氏、太田健吾氏にはオニオコゼ卵、五島栽培漁業センターの高橋誠氏と長倉義智氏にはクエ卵について、それぞれ標本と飼育データを快くご提供いただいた。玉野栽培漁業センターの津村誠一氏にはキジハタ卵の標本を提供していただいた。ここに改めて御礼申し上げます。

株式会社いらご研究所の山田祥朗博士、岡村明浩博士、堀江則之博士には、ニホンウナギの採卵および卵・仔魚の飼育についてご教示いただいた。また、同所の赤澤敦司氏にはハモ成魚の標本採集にご尽力いただき、卵・仔魚の飼育についてもご教示いただいた。同研究所の田中

悟前所長（物故）をはじめとする職員各位には、同研究所の設備を快く利用させていただくとともに、様々な便宜を計っていただいた。厚く御礼申し上げます。

東京大学農学生命科学研究科附属水産実験所の技術職員水野直樹氏、城夕香氏ほか職員、学生の皆様には、浜名湖での採集調査に多大なご協力をいただいた。また、東海大学海洋生物学科の庄司隆行教授をはじめ、庄司研究室の学生各位には、浜名湖における魚類採集にご協力いただいた。深く感謝申し上げます。

西部北太平洋における魚卵採集調査は、東京大学海洋研究所研究船白鳳丸（現 海洋研究開発機構）KH-02-2 次航海により実施した。船長、乗組員はじめ乗船研究者の皆様には、サンプリングほか諸事にわたり熱心なご協力を賜った。また、水産総合研究センター中央水産研究所の黒木洋明博士には、水産庁漁業調査船開洋丸 KY-10-02 次航海による魚類採集の機会を与えていただいた。同航海では、船長、乗組員はじめ乗船研究者の皆様には、サンプリングほか諸事にわたる熱心なご協力を賜った。特に、九州大学農学研究院の脇谷量子郎氏と東京大学総合研究博物館の黒木真理助教には、魚類標本の同定作業にひとかたならぬご尽力をいただいた。心より感謝申し上げます。

東京大学大気海洋研究所の技術職員大矢真知子氏には温かい励ましと諸事にわたるご尽力をいただいた。同所の渡邊俊博士、東京医科大学の篠田章講師、畑瀬英男博士、東京大学大気海洋研究所の飯田碧博士（現 琉球大学理学部）、海部健三博士（現 東京大学総合文化研究科）には、研究遂行にあたり有益なご助言とご支援をいただいた。また、東京大学大気海洋研究所の稲垣正助教、木村呼郎博士（現 自営業）、皆川源氏（現 自営業）には乗船調査に関する知識と技術をご指導いただいた。東京大学大気海洋研究所行動生態計測分野の萩原聖士氏、安孝珍氏、眞鍋諒太郎氏、中村政裕氏、東京大学大気海洋研究所国際沿岸海洋研究センター沿岸保全分野の鈴木享子氏には、研究生活と論文作成に多くの御協力をいただいた。心より御礼申し上げます。

最後に、研究生活を常に支え温かく見守ってくれた母と妹に感謝する。

## 引用文献

- Ahlstrom, E. H. and H. G. Moser. 1980. Characters useful in identification of pelagic marine fish eggs. Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep., 21: 121–127.
- Ahlstrom, E. H., H. G. Moser and D. M. Cohen. 1984. Argentinoidei: Development and relationships. pp. 155–169. In: H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall and S. L. Richardson (eds.) Ontogeny and systematics of fishes. Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ. 1.
- 藍沢正宏. 2000. キツネアマダイ科. pp. 784–785. 中坊 徹次 (編) 日本産魚類検索 全種の同定, 第2版, 東海大学出版会, 東京.
- 赤川 泉. 2010. 産卵と子の保護. pp. 223–241. 塚本 勝巳 (編) 魚類生態学の基礎, 恒星社厚生閣, 東京.
- Akimoto, S., S. Itoi, K. Sezaki, P. Borsa and S. Watabe. 2006. Identification of alfonso, *Beryx mollis* and *B. splendens* collected in Japan, based on the mitochondrial cytochrome *b* gene, and their comparison with those collected in New Caledonia. Fish. Sci., 72: 202–207.
- Akimoto, S., S. Kinoshita, K. Sezaki, I. Mitani and S. Watabe. 2002. Identification of alfonso and related fish species belonging to the genus *Beryx* with mitochondrial 16S rRNA gene and its application on their pelagic eggs. Fish. Sci., 68: 1242–1249.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25: 3389–3402.
- Aoyama, J., S. Ishikawa, T. Otake, N. Mochioka, Y. Suzuki, S. Watanabe, A. Shinoda, J. Inoue, P. M. Lokman, T. Inagaki, M. Oya, H. Hasumoto, K. Kubokawa, T. W. Lee, H. Fricke and K. Tsukamoto. 2001. Molecular approach to species identification of eggs with respect to determination of the spawning site of the Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 67: 761–763.
- Aoyama, J., S. Watanabe, M. Nishida and K. Tsukamoto. 2000. Discrimination of catadromous eels of genus *Anguilla* using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of the mitochondrial 16S ribosomal RNA domain. Trans. Am. Fish. Soc., 129: 873–878.
- Aquino, L. M. G., J. M. Tango, R. J. C. Canoy, I. K. C. Fontanilla, Z. U. Basiao, P. S. Ong and J. P. Quilang. 2011. DNA barcoding of fishes of Laguna de Bay, Philippines. Mitochondrial DNA, 22: 143–153.
- 有瀧真人, 鈴木重則, 渡辺研一. 2000. 飼育したマツカワ仔稚魚の形態発育と成長. 日本水産学会誌, 66: 446–453.
- Bailey, K. M. and E. D. Houde. 1989. Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. Adv. Mar. Biol., 25: 1–83.
- Baldo, F., E. Garcia-Isarch, M. P. Jimenez, Z. Romero, A. Sanchez-Lamadrid and I. A. Catalan. 2006. Spatial and temporal distribution of the early life stages of three commercial fish species in the northeastern shelf of the Gulf of Cadiz. Deep-Sea Research Part II - Topical Studies in Oceanography, 53: 1391–1401.
- Bayha, K. M., W. M. Graham and F. J. Hernandez. 2008. Multiplex assay to identify eggs of three fish species from the northern Gulf of Mexico, using locked nucleic acid TaqMan real-time PCR probes. Aquatic Biology, 4: 65–73.
- Bininda-Emonds, O. R. P. 2005. GenBankStrip.pl v2.0, <http://www.molekularesystematik.uni-oldenburg.de/33997.html>.
- Blaxter, M. and R. Floyd. 2003. Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. Trends Ecol. Evol., 18: 268–269.

- Boehlert, G. W. 1984. Scanning electron microscopy. pp. 43–48. In: H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall and S.L. Richardson (eds.) *Ontogeny and systematics of fishes*. Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ. 1.
- Britten, R. J. 1986. Rates of DNA-sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science*, 231: 1393–1398.
- Castle, P. H. J. 1984. Notacanthiformes and Anguilliformes: Development. pp. 62–93. In: H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall and S. L. Richardson (eds.) *Ontogeny and systematics of fishes*. Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ. 1.
- Cawthorn, D. M., H. A. Steinman and R. C. Witthuhn. 2012. Evaluation of the 16S and 12S rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish species in South Africa. *Gene*, 491: 40–48.
- Chen, F. Y., M. Chow, T. M. Chao and R. Lim. 1977. Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) in Singapore. *Singapore Journal of Primary Industries*, 5: 1–21.
- 千葉健治. 1980. 袋網漁獲物よりみた浜名湖の魚類の生態. *水産増殖*, 28: 88–101.
- Chow, S. and H. Kishino. 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): Inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.*, 41: 741–748.
- Collazo, A., J. A. Bolker and R. Keller. 1994. A phylogenetic perspective on teleost gastrulation. *Am. Nat.*, 144: 133–152.
- Collette, B. B., J. R. McDowell and J. E. Graves. 2006. Phylogeny of recent billfishes (Xiphiidae). *Bull. Mar. Sci.*, 79: 455–468.
- Curtis, K. A. 2004. Fine scale spatial pattern of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) and northern anchovy (*Engraulis mordax*) eggs. *Fish. Oceanogr.*, 13: 239–254.
- Daniel, L. B. and J. E. Graves. 1994. Morphometric and genetic identification of eggs of spring-spawning sciaenids in lower Chesapeake Bay. *Fish. Bull.*, 92: 254–261.
- DNA Data Bank of Japan. 2011. 相同性検索プログラム BLAST の内部構造. ([http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/archives/blast\\_doc-j.html](http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/archives/blast_doc-j.html)) (参照 2012-1-10)
- Dower, J. F. and D. L. Mackas. 1996. "Seamount effects" in the zooplankton community near Cobb Seamount. *Deep-Sea Research Part I Oceanographic Research Papers*, 43: 837–858.
- Dower, J. F. and R. I. Perry. 2001. High abundance of larval rockfish over Cobb Seamount, an isolated seamount in the Northeast Pacific. *Fish. Oceanogr.*, 10: 268–274.
- Ebach, M. C. and C. Holdrege. 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature*, 434: 697–697.
- Ebeling, A. W. 1986. Melamphidae. pp. 427–432. In: M. M. Smith and P. C. Heemstra (eds.) *Smiths' sea fishes*, Springer-Verlag, Berlin.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32: 1792–1797.
- Ficetola, G. F., E. Coissac, S. Zundel, T. Riaz, W. Shehzad, J. Bessiere, P. Taberlet and F. Pompanon. 2010. An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11.
- Floyd, R., E. Abebe, A. Papert and M. Blaxter. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.*, 11: 839–850.
- Fox, C. J., M. I. Taylor, R. Pereyra, M. I. Villasana and C. Rico. 2005. TaqMan DNA technology confirms likely overestimation of cod (*Gadus morhua* L.) egg abundance in the Irish Sea: implications for the assessment of the cod stock and mapping of spawning areas using egg-based methods. *Mol. Ecol.*, 14: 879–884.
- Fritzsche, R. A. 1978. Development of fishes of the Mid-Atlantic Bight. an atlas of eggs, larval and juvenile stages. vol.5. Chaetodontidae through Ophidiidae. Fish and Wildlife Service, U.S. Dept. of the Interior, Fort Collins, Colo. 340 pp.
- Froese, R. and D. Pauly. 2011. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (12/2011).

- Fujikura, K., D. Lindsay, H. Kitazato, S. Nishida and Y. Shirayama. 2010. Marine biodiversity in Japanese waters. *Plos One*, 5.
- 藤倉克則, 西田周平, 白山義久. 2009. 海洋生物のセンサス. 日本プランクトン学会報, 56: 131–135.
- Fujikura, K., S. Tsuchida, H. Ueno, J. Ishibashi, W. Gaze and Y. Maki. 1998. Investigation of the deep-sea chemosynthetic ecosystem and submarine volcano at the Kasuga 2 and 3 seamounts in the Northern Mariana trough, Western Pacific. *JAMSTEC J. Deep Sea Res.*, 14: 127–138.
- 藤浪祐一郎, 竹内宏行, 津崎龍雄, 太田博巳. 2003. アカアマダイ漁獲鮮魚から採取した精巢精子の運動活性と冷蔵保存. 日本水産学会誌, 69: 162–169.
- 藤田矢郎, 中原官太郎. 1955. オニオコゼの卵発生と仔魚前期. 九州大学農学部学藝雑誌, 15: 223–228.
- 船田秀之助. 1963. アカアマダイの生物学的研究. 京都府立水産試験場業績, 15: 1–24.
- Garcia-Vazquez, E., P. Alvarez, P. Lopes, N. Karaiskou, J. Perez, A. Teia, J. L. Martinez, L. Gomes and C. Triantaphyllidis. 2006. PCR-SSCP of the 16S rRNA gene, a simple methodology for species identification of fish eggs and larvae. *Scientia Marina*, 70: 13–21.
- Gilbert, S. F. 2003. *Developmental biology* 7th ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 838 pp.
- Glamuzina, B., N. Glavic, P. Tutman, V. Kozul and B. Skaramuca. 2000. Egg and early larval development of laboratory reared goldblotch grouper, *Epinephelus costae* (Steindachner, 1878) (Pisces, Serranidae). *Scientia Marina*, 64: 341–345.
- Glamuzina, B., B. Skaramuca, N. Glavic, V. Kozul, J. Dulcic and M. Kraljevic. 1998. Egg and early larval development of laboratory reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae). *Scientia Marina*, 62: 373–378.
- Gleason, L. U. and R. Burton. 2012. High-throughput molecular identification of fish eggs using multiplex suspension bead arrays. *Mol. Ecol. Res.*, 12: 57–66.
- 後藤 晃, 井口恵一朗 (編). 2001. 水生動物の卵サイズ. 海游舎, 東京. 257 pp.
- Graves, J. E., M. J. Curtis, P. A. Oeth and R. S. Waples. 1990. Biochemical genetics of southern California basses of the genus *Paralabrax* - specific identification of fresh and ethanol-preserved individual eggs and early larvae. *Fish. Bull.*, 88: 59–66.
- Gregory, T. R. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*, 434: 1067–1067.
- Griekspoor, A. and T. Groothuis. 2005. 4Peaks, <http://www.mekentosj.com/science/4peaks>.
- Hajibabaei, M., D. H. Janzen, J. M. Burns, W. Hallwachs and P. D. N. Hebert. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103: 968–971.
- 濱本俊策. 1986. ヤイトハタ *Epinephelus salmoides* (Lacepede) の水槽内産卵と生活史. 栽培技研, 15: 213–218.
- Hanner, R., R. Floyd, A. Bernard, B. B. Collette and M. Shivji. 2011. DNA barcoding of billfishes. *Mitochondrial DNA*, 22: 27–36.
- Hardy, J. D. 1978a. Development of fishes of the Mid-Atlantic Bright. an atlas of eggs, larval and juvenile stages. vol.3. Aphredoderidae through Rachycentridae. Fish and Wildlife Service, U.S. Dept. of the Interior, Fort Collins, Colo. 394 pp.
- Hardy, J. D. 1978b. Development of fishes of the Mid-Atlantic Bright. an atlas of eggs, larval and juvenile stages. vol. 2. Anguillidae through syngnathidae. Fish and Wildlife Service, U.S. Dept. of the Interior, Fort Collins, Colo. 455 pp.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. DeWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 270: 313–321.
- Hebert, P. D. N. and T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.*, 54: 852–859.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen and W. Hallwachs. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 101: 14812–14817.
- Hirai, A. 1988. Fine structure of the micropyles of pelagic eggs of some marine fishes. *Jpn. J. Ichthyol.*, 35: 351–357.



- 平井明夫. 1991. 浮遊性魚卵の同定のための卵膜微細構造の研究. 長崎大学水産学部博士論文. ii+1-69 pp. 41 pls pp.
- Hirai, A. 1993. Fine structure of the egg membranes in four species of pleuronectinae. *Jpn. J. Ichthyol.*, 40: 227-235.
- 星野 昇, 西村欣也. 2001. 水圏生物種に共通の一般原則: モデルで考える. pp. 103-128. 後藤 晃, 井口恵一朗 (編), 水生動物の卵サイズ, 海游舎, 東京.
- Humphreys, R. L. 2000. Otolith-based assessment of recruitment variation in a North Pacific seamount population of armorhead *Pseudopentaceros wheeleri*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 204: 213-223.
- Hyde, J. R., E. Lynn, R. Humphreys, M. Musyl, A. P. West and R. Vetter. 2005. Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlin, shortbill spearfish, and wahoo. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 286: 269-277.
- 池田知司, 水戸 敏. 1988. 卵と孵化仔魚の検索. 沖山宗雄 (編) 日本産稚魚図鑑, 東海大学出版会, 東京.
- 池田知司, 中馬 敏, 沖山宗雄. 1991. ふ化実験による浮遊性魚卵の同定. *魚類学雑誌*, 38: 199-206.
- 生田哲郎, 西広富夫. 1978. アカアマダイの種苗生産に関する基礎的研究 -I 産卵誘発 人工ふ化 仔魚飼育について. 京都府立海洋センタ - 研究報告, 2: 76-90.
- Imai, C. and S. Tanaka. 1987. Effect of sea-water temperature on egg size of Japanese anchovy. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 2169-2178.
- 岩本 浩. 1983. オニオコゼ仔稚魚の形態変化. *栽培技研*, 12: 49-57
- James, C. M., S. A. Al-Thobaiti, B. M. Rasem and M. H. Carlos. 1997. Breeding and larval rearing of the camouflage grouper *Epinephelus polyphkadion* (Bleeker) in the hypersaline waters of the Red Sea coast of Saudi Arabia. *Aquacult. Res.*, 28: 671-681.
- Jerome, M., C. Lemaire, J. M. Bautista, J. Fleurence and M. Etienne. 2003. Molecular phylogeny and species identification of sardines. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 43-50.
- Johns, G. C. and J. C. Avise. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mol. Biol. Evol.*, 15: 1481-1490.
- Johnson, G. D. 1978. Development of fishes of the Mid-Atlantic Bright. an atlas of eggs, larval and juvenile stages. vol.4. Carangidae through Ephippidae. Fish and Wildlife Service, U.S. Dept. of the Interior, Fort Collins, Colo. 314 pp.
- Johnson, G. D., J. R. Paxton, T. T. Sutton, T. P. Satoh, T. Sado, M. Nishida and M. Miya. 2009. Deep-sea mystery solved: astonishing larval transformations and extreme sexual dimorphism unite three fish families. *Biol. Lett.*, 5: 235-239.
- Jones, P. W., F. D. Martin and J. D. Hardy. 1978. Development of fishes of the Mid-Atlantic Bright. an atlas of eggs, larval and juvenile stages. vol.1. Acipenseridae through Ictaluridae. Fish and Wildlife Service, U.S. Dept. of the Interior, Fort Collins, Colo. 366 pp.
- Kamisaka, Y., M. Tagawa and M. Tanaka. 1999. Semi-annual reproductive cycle of a small flounder *Tarphops oligolepis* in Wakasa Bay. *Fish. Sci.*, 65: 98-103.
- 神谷尚志. 1916. 館山湾ニ於ケル浮性魚卵並ニ其稚児. 水産講習所試験報告, 11: 1-92, pls. 1-5.
- 神谷尚志. 1922a. 館山湾ニ於ケル浮性魚卵並ニ其稚児 第二報. 水産講習所試験報告, 18: 1-22, pls. 1-3.
- 神谷尚志. 1922b. 瀬戸内海ニ於ケル浮性魚卵並ニ其稚児. 水産講習所試験報告, 18: 23-39, pls. 4-5.
- 神谷尚志. 1924. 邦産浮性魚卵検索表. *水研誌*, 19: 33-40.
- 神谷尚志. 1925a. 館山湾ニ於ケル浮性魚卵並ニ其稚児 第三報. 水産講習所試験報告, 21: 71-85, pl. 2.
- 神谷尚志. 1925b. 北陸沿岸ニ於ケル浮性魚卵並ニ其稚児. 水産講習所試験報告, 21: 86-106, pls. 3-4.
- 片倉紀夫, 二宮保男. 1988. 浜名湖に出現する魚卵・稚仔魚. *日本海洋生物研究所年報*: 10-18.
- Kamler, E. 2005. Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: An energetics perspective. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 15: 399-421.
- Karaiskou, N., A. P. Apostolidis, A. Triantafyllidis, A. Kouvatzi and C. Triantaphyllidis. 2003. Genetic identification and phylogeny of three species of the genus *Trachurus* based on mitochondrial DNA analysis. *Mar.*

- Biotechnol., 5: 493–504.
- Karaiskou, N., A. Triantafyllidis, P. Alvarez, P. Lopes, E. Garcia-Vazquez and C. Triantaphyllidis. 2007. Horse mackerel egg identification using DNA methodology. *Mar. Ecol. -Evol. Persp.*, 28: 429–434.
- Kawakami, T., J. Aoyama and K. Tsukamoto. 2010. Morphology of pelagic fish eggs identified using mitochondrial DNA and their distribution in waters west of the Mariana Islands. *Environ. Biol. Fishes*, 87: 221–235.
- Kawakami, T., H. Okouchi, M. Aritaki, J. Aoyama and K. Tsukamoto. 2011. Embryonic development and morphology of eggs and newly hatched larvae of Pacific herring *Clupea pallasii*. *Fish. Sci.*, 77: 183–190.
- Kendall, A. W. (ed.). 2011. Identification of eggs and larvae of marine fishes. Tokai University Press, Kanagawa. 379 pp.
- Kendall, A. W., E. H. Ahlstrom and H. G. Moser. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. pp. 11–22. In: H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall and S. L. Richardson (eds.) *Ontogeny and systematics of fishes*. Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ. 1.
- Kendall, A. W. and A. C. Matarese. 1994. Status of early-life history descriptions of marine teleosts. *Fish. Bull.*, 92: 725–736.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling. 1995. Stages of embryonic-development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, 203: 253–310.
- 北島 力. 1991. マハタの卵内発生および飼育による仔稚魚の形態変化. *魚類学雑誌*, 38: 47–55.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial-DNA evolution in animals - amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 86: 6196–6200.
- Krieger, J. and P. A. Fuerst. 2002. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 891–897.
- Lakra, W. S., M. S. Verma, M. Goswami, K. K. Lal, V. Mohindra, P. Punia, A. Gopalakrishnan, K. V. Singh, R. D. Ward and P. Hebert. 2011. DNA barcoding Indian marine fishes. *Mol. Ecol. Res.*, 11: 60–71.
- Lassmann, T., O. Frings and E. L. L. Sonnhammer. 2009. Kalign2: High-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. *Nucleic Acids Res.*, 37: 858–865.
- Leis, J. M. 1978. Systematics and zoogeography of porcupinefishes (Diodon, Diodontidae, Tetraodontiformes), with comments on egg and larval development. *Fish. Bull.*, 76: 535–567.
- Lefébure, T., C. J. Douady, M. Gouy and J. Gibert. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Mol. Phylogen. Evol.*, 40: 435–447.
- Li, W. H. and M. Tanimura. 1987. The molecular clock runs more slowly in man than in apes and monkeys. *Nature*, 326: 93–96.
- Liu, Y., H.-F. Yan, T. Cao and X.-J. Ge. 2010. Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses). *J. Syst. Evol.*, 48: 36–46.
- Maddison, D. R. and W. P. Maddison. 2005. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.08a, <http://macclade.org>.
- Manabe, H. and A. Shinomiya. 2001. Two spawning seasons and mating system of the bastard halibut, *Tarphops oligolepis*. *Ichthyol. Res.*, 48: 421–424.
- Manaresi, S., B. Mantovani and F. Zaccanti. 2001. Egg to adult identification of 13 freshwater fishes from Italy: A biochemical-genetic key. *Aquat. Sci.*, 63: 182–190.
- Martin, A. P. and S. R. Palumbi. 1993. Body Size, Metabolic-rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 90: 4087–4091.
- Martin, F. D. and G. E. Drewry. 1978. Development of fishes of the Mid-Atlantic Bight. an atlas of eggs, larval and juvenile stages. vol.6. Stromateidae through Ogcocephalidae. Fish and Wildlife Service, U.S. Dept. of the Interior, Fort Collins, Colo. 416 pp.

- Martinez, G. M. and J. A. Bolker. 2003. Embryonic and larval staging of summer flounder (*Paralichthys dentatus*). J. Morphol., 255: 162–176.
- Matarese, A. C., A. W. Kendall, D. M. Blood and M. V. Vinter. 1989. Laboratory guide to early life history stages of Northeast Pacific fishes. NOAA Tech. Rep. NMFS 80. 652 pp.
- Matarese, A. C. and E. M. Sandknop. 1984. Identification of fish eggs. pp. 27–31. In: H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall and S. L. Richardson (eds.) Ontogeny and systematics of fishes. Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ. 1.
- 松田義弘. 1999. 浜名湖水のふしぎ. 静岡新聞社, 静岡. 155 pp.
- 松下克巳, 能勢幸雄. 1974. 浜名湖におけるコノシロの産卵生態について. 日本水産学会誌, 40: 35–42.
- McDowell, J. R. and J. E. Graves. 2002. Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. Fish. Bull., 100: 537–544.
- McGowan, M. F. and F. H. Berry. 1984. Clupeiformes: Development and relationships. pp. 108–126. In: H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall and S. L. Richardson (eds.) Ontogeny and systematics of fishes, Allen Press, Inc., Lawrence, Kansas.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. pp. 1–38. In: P.W. Hochacka and T.P. Mommsen (eds.) Molecular Biology Frontiers. Elsevier, Amsterdam., Elsevier, Amsterdam.
- Minegishi, Y., T. Yoshinaga, J. Aoyama and K. Tsukamoto. 2009. Species identification of *Anguilla japonica* by real-time PCR based on a sequence detection system: A practical application to eggs and larvae. ICES J. Mar. Sci., 66: 1915–1918.
- 水戸 敏. 1960. 浮游性魚卵および孵化仔魚の種の同定について. 九州大学農学部学芸雑誌, 18: 61–70, pl. 1.
- 水戸 敏. 1961a. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -I. ニシン亜目, サバヒ - 亜目, ワニトカゲギス亜目, ハダカイワシ目, ウナギ目, ダツ目およびヨウジウオ目. 九州大学農学部学芸雑誌, 18: 285–310, pls. 20–34.
- 水戸 敏. 1961b. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -II. アカマンボウ目, マトウダイ目, ボラ亜目, サバ亜目, アジ亜目およびイボダイ亜目. 九州大学農学部学芸雑誌, 18: 451–466, pls. 39–43.
- 水戸 敏. 1962a. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -IV. ワニギス亜目およびミシマオコゼ亜目. 九州大学農学部学芸雑誌, 19: 369–376, pls. 6–10.
- 水戸 敏. 1962b. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -V. ネズツポ亜目およびアシロ亜目. 九州大学農学部学芸雑誌, 19: 377–380, pls. 11–12.
- 水戸 敏. 1962c. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -VI. ベラ亜目. 九州大学農学部学芸雑誌, 19: 493–502, pls. 16–23.
- 水戸 敏. 1962d. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -VII. チョウチョウウオ亜目, モンガラカワハギ亜目およびハコフグ亜目. 九州大学農学部学芸雑誌, 19: 503–506, pls. 24–25.
- 水戸 敏. 1963a. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -III. スズキ亜目. 魚類学雑誌, 11: 39–64, pls. 1–18.
- 水戸 敏. 1963b. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -IX. コバンザメ目およびカレイ目. 魚類学雑誌, 11: 81–102, pls. 29–41.
- 水戸 敏. 1963c. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -VIII. カジカ亜目. 魚類学雑誌, 11: 65–79, pls. 19–28.
- 水戸 敏. 1963d. 日本近海に出現する浮游性魚卵 -X. タラ目およびアンコウ目. 魚類学雑誌, 11: 103–113, pls. 42–45.
- 水戸 敏. 1966. 魚卵・稚魚. 蒼洋社, 東京. 74 pp.
- 水戸 敏. 1979. 魚卵. 月刊海洋科学, 11: 126–130.
- Miya, M. and M. Nishida. 1996. Molecular phylogenetic perspective on the evolution of the deep-sea fish genus *Cyclothone* (Stomiiformes: Gonostomatidae). Ichthyol. Res., 43: 375–398.
- 望岡典隆, 内海遼一. 2001. ウナギ目卵・仔魚の形態と類縁関係(総特集 魚類の系統類縁 – 個体発生的アプローチ – 子の効用と限界). 海洋, 33: 137–141.
- Moon-van der Staay, S. Y., R. De Wachter and D. Vaulot. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton

- reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 409: 607–610.
- Mora, M. S., E. P. Lessa, M. J. Kittlein and A. I. Vassallo. 2006. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand–dune habitats: Evidence of population expansion. *J. Mammal.*, 87: 1192–1203.
- Moreira, D. and P. Lopez-Garcia. 2002. The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends Microbiol.*, 10: 31–38.
- Moritz, C. and C. Cicero. 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLoS Biol.*, 2: 1529–1531.
- Mork, J., P. Solemdal and G. Sundnes. 1983. Identification of marine fish eggs: A biochemical genetics approach. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40: 361–369.
- Moser, H. G. (ed.). 1996. The early stages of fishes in the California Current region., CalCOFI Atlas No. 33. 1517 pp.
- Moser, H. G., W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall and S. L. Richardson (eds.). 1984. Ontogeny and systematics of fishes. *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ.* 1. 760 pp.
- 本藤 靖, 村上直人, 渡辺 税. 2001. 人工授精によるアカアマダイの種苗生産. *栽培漁業技術開発研究*, 28: 73–79.
- Naganuma, A. 1979. On spawning activities of skipjack tuna in the western Pacific Ocean. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, 40: 1–13.
- 中坊徹次. 2000a. オニオコゼ科. pp. 596–598. 中坊 徹次 (編) 日本産魚類検索 全種の同定 第2版, 東海大学出版会, 東京.
- 中坊徹次. 2000b. カレイ科. pp. 1371–1379. 中坊 徹次 (編) 日本産魚類検索 全種の同定 第2版, 東海大学出版会, 東京.
- 中坊徹次 (編). 2000c. 日本産魚類検索 全種の同定 第2版. 東海大学出版会, 東京. 1748 pp.
- The Marie Curie SPECIATION Network. 2012. What do we need to know about speciation? *Trends Ecol. Evol.*, 27: 27–39.
- Oda, D. 1991. Development of eggs and larvae of California halibut *Paralichthys californicus* and fantail sole *Xytreurys liolepis* (Pisces, Paralichthyidae). *Fish. Bull.*, 89: 387–402.
- 岡田貴彦, 澤田好史. 2000. クエ. pp. 255–263. 熊井 英水 (編) 最新 海産魚の養殖, 湊文社, 東京.
- 奥村重信, 今泉 均. 1996. アカアマダイの卵発生と人工飼育した仔稚魚の発育. *栽培漁業技術開発研究*, 25: 53–58.
- Okumura, S., T. Tanaka and A. Nakazono. 1996. Spawning and mucus–enveloped pelagic eggs of the red tilefish, *Branchiostegus japonicus* (Malacanthidae), reared in captivity. *Copeia*, 1996: 743–746.
- Olney, J. E. 1984. Lampriformes: development and relationships. pp. 368–379. In: H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall and S. L. Richardson (eds.) *Ontogeny and systematics of fishes*, *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ.* 1.
- 大西庸介, 池田知司, 広石信互, 沖山宗雄. 2003. モノクローナル抗体を用いた浮遊性魚卵の同定. *日本水産学会誌*, 69: 170–177.
- Orlowski, S. J., S. S. Herman, R. G. Malsberger and H. N. Pritchard. 1971. Distinguishing cunner and tautog eggs by immunodiffusion. *J. Fish. Res. Board Can.*, 29: 111–112.
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276: 734–740.
- Paine, M. A., J. R. McDowell and J. E. Graves. 2007. Specific identification of western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene region sequences. *Bull. Mar. Sci.*, 80: 353–367.
- Parin, N. V. 1990. Scombridae. pp. 973. In: J.C. Quéro, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.) *Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA)*. JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2.
- ピネ, P. R. 2010. 海洋学 原著第4版 (東京大学海洋研究所監訳). 東海大学出版会, 神奈川.
- Porch, C. E. 2005. The sustainability of western Atlantic bluefin tuna: A warm-blooded fish in a hot-blooded fishery. *Bull. Mar. Sci.*, 76: 363–384.

- Powell, A. B. and T. Henley. 1995. Egg and larval development of laboratory-reared gulf flounder, *Paralichthys albigutta*, and southern flounder, *P. lethostigma* (Pisces, Paralichthyidae). *Fish. Bull.*, 93: 504–515.
- Powell, A. B. and J. W. Tucker. 1992. Egg and larval development of laboratory-reared nassau grouper, *Epinephelus striatus* (Pisces, Serranidae). *Bull. Mar. Sci.*, 50: 171–185.
- Rasband, W. S. 1997–2011. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Ratnasingham, S. and P. D. N. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Mol. Ecol. Notes*, 7: 355–364.
- Rogers, A. D. 1994. The biology of seamounts. pp. 305–350 *Advances in Marine Biology*, Vol 30.
- Russell, F. S. 1976. The eggs and planktonic stages of British marine fishes. Academic Press, New York. 524 pp.
- Saitoh, K., S. Uehara and T. Tega. 2009. Genetic identification of fish eggs collected in Sendai Bay and off Johban, Japan. *Ichthyol. Res.*, 56: 200–203.
- 瀬能 宏. 2000. ハタ科. pp. 690–731. 中坊徹次 (編) 日本産魚類検索 全種の同定 第2版, 東海大学出版会, 東京.
- Sezaki, K., Y. Kuboshima, I. Mitani, A. Fukui and S. Watabe. 2001. Identification of chub and spotted mackerels with mitochondrial cytochrome *b* gene and its application to respective pelagic eggs fixed with formalin. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 67: 17–22.
- Sha, X. S., H. C. Ruan and G. F. He. 1981. The development of the egg and larval stages of the lumpfish, *Inimicus japonicus* (C. and V.). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 12: 365–371, pls. 2.
- Shao, K. T., K. C. Chen and J. H. Wu. 2002. Identification of marine fish eggs in Taiwan using light microscopy, scanning electric microscopy and mtDNA sequencing. *Mar. Freshwater Res.*, 53: 355–365.
- 白山義久, 藤倉克則. 2009. Census of Marine Life のデータベース OBIS. 日本プランクトン学会報, 56: 155–158.
- 静岡県水産技術研究所. 2012. 浜名湖の生物：魚類生物リスト. ([http://fish-exp.pref.shizuoka.jp/04library/4-1hama/4-1-2-f\\_list.html](http://fish-exp.pref.shizuoka.jp/04library/4-1hama/4-1-2-f_list.html)) (参照 2012-3-8)
- Slack, J. 2002. エッセンシャル発生生物学 (大隅典子訳) 羊土社.
- Smith, C. C. and S. D. Fretwell. 1974. Optimal balance between size and number of offspring. *Am. Nat.*, 108: 499–506.
- Smith, P. E. and M. P. Fahay. 1970. Description of eggs and larvae of the summer flounder, *Paralichthys dentatus*. U.S. Fish. Wildl. Serv. Res. Rep., 75: 21 pp.
- Song, L. S., B. Z. Liu, J. H. Xiang and P. Y. Qian. 2001. Molecular phylogeny and species identification of pufferfish of the genus *Takifugu* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Mar. Biotechnol.*, 3: 398–406.
- 水産庁・独立行政法人水産総合研究センター・社団法人全国豊かな海づくり推進協会 (編). 2011. 平成 21 年度 栽培漁業種苗生産・入手放流実績 (全国).
- Steinke, D., T. S. Zemlak, J. A. Boutillier and P. D. N. Hebert. 2009. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar. Biol.*, 156: 2641–2647.
- Stratoudakis, Y., M. Bernal, K. Ganias and A. Uriarte. 2006. The daily egg production method: Recent advances, current applications and future challenges. *Fish Fish.*, 7: 35–57.
- 高井 徹. 1979. 瀬戸内海におけるハモの再生産について. *栽培技研*, 8: 77–82.
- Takemura, I., T. Sado, Y. Maekawa and S. Kimura. 2004. Descriptive morphology of the reared eggs, larvae, and juveniles of the marine atherinid fish *Atherinomorus duodecimalis*. *Ichthyol. Res.*, 51: 159–164.
- 竹内宏行. 2003. 自然産卵による大量採卵が困難な魚種における人工授精法の開発. 平成 14 年度日本栽培漁業協会事業年報, 157–158.
- 田北 徹. 1966. 有明海産サツパの産卵, 卵発生および仔魚について. *長崎大水産研報*, 21: 171–179.
- 田北 徹. 1967. ホシガレイの卵発生およびふ化仔魚について. *長大水研報*, 23: 101–106.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731–2739.



- Tautz, D., P. Arctander, A. Minelli, R. H. Thomas and A. P. Vogler. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 70–74.
- Teletchea, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 19: 265–293.
- Teletchea, F., J. Bernillon, M. Duffraisse, V. Laudet and C. Hanni. 2008. Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *J. Appl. Ecol.*, 45: 967–975.
- 東北区水産研究所八戸支所. 1956. 東北海区の底魚, 東北水研叢書, 第 6 号. 91 pp.
- Tringali, M. D., T. M. Bert and S. Seyoum. 1999. Genetic identification of centropomine fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 128: 446–458.
- Tsukamoto, K., S. Chow, T. Otake, H. Kurogi, N. Mochioka, M. J. Miller, J. Aoyama, S. Kimura, S. Watanabe, T. Yoshinaga, A. Shinoda, M. Kuroki, M. Oya, T. Watanabe, K. Hata, S. Ijiri, Y. Kazeto, K. Nomura and H. Tanaka. 2011. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nature Communications*, 2.
- 内田恵太郎, 今井貞彦, 水戸 敏, 藤田矢朗, 上野雅正, 庄島洋一, 千田哲資, 田福正治, 道津喜衛. 1958. 日本産魚類の稚魚期の研究 第 1 集. 九州大学農学部水産第二教室. viii+89 pp. 86 pls.
- 鶴川正雄, 樋口正毅, 水戸 敏. 1966. キジハタの産卵習性と初期生活史. *魚類学雑誌*, 13: 156–161.
- Umezawa, A., T. Otake, J. Hirokawa, K. Tsukamoto and M. Okiyama. 1991. Development of the Eggs and Larvae of the Pike Eel, *Muraenesox cinereus*. *Jap. J. Ichthyol.*, 38: 35–40.
- Valdez-Moreno, M., L. Vasquez-Yeomans, M. Elias-Gutierrez, N. V. Ivanova and P. D. N. Hebert. 2010. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Mar. Freshwater Res.*, 61: 665–671.
- Valentini, A., F. Pompanon and P. Taberlet. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.*, 24: 110–117.
- Van der Lingen, C. D., D. Checkley, M. Barange, L. Hutchings and K. Osgood. 1998. Assessing the abundance and distribution of eggs of sardine, *Sardinops sagax*, and round herring, *Etrumeus whiteheadi*, on the western Agulhas Bank, South Africa, using a continuous, underway fish egg sampler. *Fish. Oceanogr.*, 7: 35–47.
- Vences, M., M. Thomas, A. van der Meijden, Y. Chiari and D. R. Vieites. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front. Zool.*, 2, 5.
- Virta, V. C. and M. S. Cooper. 2009. Ontogeny and Phylogeny of the Yolk Extension in Embryonic Cypriniform Fishes. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*, 312B: 196–223.
- Ward, R. D., R. Hanner and P. D. N. Hebert. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J. Fish Biol.*, 74: 329–356.
- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last and P. D. N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. T. R. Soc. B*, 360: 1847–1857.
- Warkentin, K. M. 1995. Adaptive plasticity in hatching age – a response to predation risk trade-offs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92: 3507–3510.
- 渡辺研一, 南 卓志. 2000. 人工生産したマツカワの孕卵数. *日本水産学会誌*, 66: 1068–1069.
- 渡辺研一, 鈴木重則. 1999. 水槽内におけるマツカワの自然産卵と卵の発生状況から推定した産卵時刻. *日本水産学会誌*, 65: 408–413.
- Wauth, J. 2007. DNA barcoding in animal species: Progress, potential and pitfalls. *Bioessays*, 29: 188–197.
- White, B. N., R. J. Lavenberg and G. E. McGowen. 1984. Atheriniformes: Development and relationships. pp. 355–362. In: H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall and S. L. Richardson (eds.) *Ontogeny and systematics of fishes*. *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ.* 1.
- Will, K. W. and D. Rubinoff. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 20: 47–55.
- Wilson, J. J., R. Rougerie, J. Schonfeld, D. H. Janzen, W. Hallwachs, M. Hajibabaei, I. J. Kitching, J. Haxaire and P. D. N. Hebert. 2011. When species matches are unavailable are DNA barcodes correctly assigned to higher taxa?



- An assessment using sphingid moths. *BMC Ecol.*, 11: 18.
- Wilson, R. R. J. and R. S. Kaufmann. 1987. Seamount biota and biogeography. pp. 355–377. In: B. Keating, P. Fryer, R. Batiza and G. Boehlert (eds.) Seamounts, islands, and atolls, American Geophysical Union.
- Xia, Y., H. F. Gu, R. Peng, Q. Chen, Y. C. Zheng, R. W. Murphy and X. M. Zeng. 2012. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). *Mol. Ecol. Res.*, 12: 48–56.
- Yamamoto, K. and K. Yamauchi. 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in aquarium. *Nature*, 251: 220–222.
- Yamamoto, K., K. Yamauchi and S. Kasuga. 1975. On the development of the Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 41: 21–28.
- Yoshinaga, T., M. J. Miller, K. Yokouchi, T. Otake, S. Kimura, J. Aoyama, S. Watanabe, A. Shinoda, M. Oya, S. Miyazaki, K. Zenimoto, R. Sudo, T. Takahashi, H. Ahn, R. Manabe, S. Hagihara, H. Morioka, H. Itakura, M. Machida, K. Ban, M. Shiozaki, B. Ai and K. Tsukamoto. 2011. Genetic identification and morphology of naturally spawned eggs of the Japanese eel *Anguilla japonica* collected in the western North Pacific. *Fish. Sci.*, 77: 983–992.
- Zemlak, T. S., R. D. Ward, A. D. Connell, B. H. Holmes and P. D. N. Hebert. 2009. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Mol. Ecol. Res.*, 9: 237–242.
- Zhu, Y., K. Furukawa, K. Aida and I. Hanyu. 1989. Annual reproductive rhythm of the tobinumeri–dragonet *Repromucenns beniteguri* (Callionymidae) in Lake Hamana. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 591–599.
- Zhu, Y., K. Furukawa, K. Aida and I. Hanyu. 1991. Daily spawning rhythm during spring and autumn spawning seasons in the tobinumeri–dragonet *Repromucenus beniteguri*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 1865–1870.
- Zwolinski, J., E. Mason, P. B. Oliveira and Y. Stratoudakis. 2006. Fine–scale distribution of sardine (*Sardina pilchardus*) eggs and adults during a spawning event. *J. Sea Res.*, 56: 294–304.

## 要旨

魚卵の分布、出現時期や量に関する知見は、魚類の産卵生態の解明と資源変動機構の研究において重要な基礎情報となる。しかし、魚卵は特徴的な分類形質に乏しく、発生に伴い著しく形態が変化するため、形態形質に基づく種査定は極めて困難で、これが研究上の大きな障害となっている。一方、近年では、DNA 情報に基づく新たな種査定法が様々な生物群で提唱されるようになった。しかし、DNA による種査定法を実際のフィールド研究へ大規模に適用した例はまだない。そこで本研究では、まず、半閉鎖水域である浜名湖と開放的外洋域であるマリアナ海域で得られた成魚のミトコンドリア DNA (mtDNA) の配列を解析し、魚卵の DNA 種査定法を開発することを目的とした。次にこれを浜名湖とマリアナ海域で得られた魚卵に適用し、魚類の産卵生態に関する新知見を集積した。さらに、本研究で初めて種が明らかになった魚卵の形態を詳しく記載することもねらいとした。

### 1. 形態形質の有効性の検討

魚卵のもつ形態情報の分類形質としての有効性を検討するため、種が既知の 5 目 11 種の魚類（ニホンウナギ、ハモ、ニシン、オニオコゼ、クエ、アカアマダイ、ヒラメ、ババガレイ、ヌマガレイ、マツカワ、ホシガレイ）の受精卵を人工受精、または養成下の自発産卵によって得、卵の形態と胚発生過程を記載した。その結果、種間で卵径、油球の有無とその数、囲卵腔の広さ、胚の色素出現パターンに違いがあることがわかった。さらに、孵化仔魚では胸鰭、口、筋節の形成と眼の黒化の程度に差が認められ、孵化時の発生段階が大きく異なることもわかった。得られた形態に基づき上記 11 種の卵を分類したところ、ニシンは付着性の卵膜をもつことで、またニホンウナギ、ハモ、ヌマガレイ、オニオコゼは油球の有無と卵径で、他種と明確に識別できた。しかし、ヒラメ、アカアマダイ、クエから成るグループと、ホシガレイ、マツカワ、ババガレイから成るグループでは、胚の色素、または孵化仔魚の筋節数とサイズを比較しなければ種を識別できなかった。以上の結果から、発生が進めば識別できる可能性は高まるものの、形態のみによる魚卵の種査定は困難であると考えられた。

### 2. DNA 種査定法の検討

種査定に用いる遺伝子領域を決定するため、まず、多くの魚類が含まれる条鰭類で、mtDNA の 16S rRNA 遺伝子 (16S) と、cytochrome c oxidase subunit I 遺伝子 (COI) の既存の情報量を調べた。その結果、2011 年 6 月 22 日時点で、16S は 42 目 383 科 2065 属 5469 種の計 13221 件、COI は

43 目 360 科 1794 属 4412 種の計 23126 件の配列が GenBank に登録されていた。登録件数は COI の方が多いが、分類学的・生態学的研究の基礎となる科、属、種の数に着目すれば、16S の方で多くの分類群が揃っている。さらに、16S は COI よりも条鰭類の分類群を識別する能力が高いことが報告されており、種査定に用いるには 16S が適切と考えられた。

次に、2004 年 4 月～2005 年 9 月に浜名湖で、2010 年 8～9 月にマリアナ海域で採集した成魚計 181 個体を形態に基づき正確に分類し、16S の部分配列を決定した。浜名湖で得た 15 目 55 科 85 種 142 個体 (778～1226 bp) とマリアナ海域で得た 7 目 20 科 32 種類 39 個体 (916～1181 bp) の配列を BLAST により総当たりで比較したところ、種内相同性は浜名湖で 98.35～100% (n=97)、マリアナ海域で 99.81～100% (n=3) だった。一方、種間相同性は、浜名湖で 77.13～99.89% (n=2819)、マリアナ海域で 77.87～98.35% (n=188) だった。しかし、浜名湖では、1 個体のボラと、種間相同性が高かったトラフグ属 4 種を除くと、種内相同性の最小値は 99.05%、種間相同性の最大値は 97.27% となり、種内と種間の相同性の範囲を明瞭に分けることができた。以上の結果から、浜名湖とマリアナ海域のいずれでも、16S の配列間で 99% 以上の相同性を示す場合には、同種と判断できると考えられた。以降の種査定では、上記で得た 16S 配列と GenBank をデータベースとして、魚卵の配列を BLAST 検索した。

### 3. 浜名湖に出現する魚卵の種組成と分布

浜名湖に出現する魚卵に DNA 種査定法を適用して種組成と分布および季節性を明らかにするため、2004 年 8 月～2005 年 11 月に湖内 8 定点のプランクトンネット調査と潮汐を利用した湖口部のアンカーネット調査を実施し、浮遊性魚卵計 6425 個を採集した。これらの卵は形態で 46 タイプに分けられた。そのうち 35 タイプ 340 個の卵で 16S の部分配列 (840～1231 bp) が得られ、99% の相同性を基準として 45 クラスタに整理された。これらの配列を BLAST 検索した結果、26 クラスタ (58%) 299 個の卵 (88%) が種に同定された。形態タイプと DNA クラスタが一致した 12 種 (セスジボラ、カタクチイワシ、ムシガレイ、クロサギ、メジナ、ササウシノシタ、イシガレイ、スズキ、ダイナンウミヘビ、アラメガレイ、クロウシノシタ、ギマ) のうち、カタクチイワシとアラメガレイの卵はほぼ周年出現したのに対し、スズキ、クロサギ、イシガレイ、ギマ、ササウシノシタの卵はその出現に明瞭な季節性がみられた。その他 5 種の出現数は 1 年を通じて少なかった。カタクチイワシ、イシガレイ、ギマの卵は、湖口部と満潮前後のアンカーネットではわずかしこ出現しなかったのに対し、湖中央部から湖奥部では多数出現したため、主に湖内で産卵していると考えられた。一方、アラメガレイ、スズキ、ササウシノシタ、クロサギの卵は湖口部の定点とアンカーネットに出現が集中したことから、湖口部周辺で産卵していると考えられた。以上の結果から、DNA 種査定法は浜名湖に出現する魚卵に適用可能であり、魚類の産卵生態の解明に有効であることがわかった。

#### 4. マリアナ海域に出現する魚卵の種組成と分布

西マリアナ海嶺の海山域を含む外洋域に出現する魚卵の研究における DNA 種査定法の有効性を検討するため、2002 年 7～8 月に西部北太平洋のマリアナ海域 (7°～18°N, 137°～144°E) で採集した浮遊性魚卵に本法を適用し、種組成と分布の解明を試みた。得られた計 5321 個の卵のうち、死卵を除く 2698 個の卵は形態で 108 タイプに分けられた。そのうち 88 タイプからそれぞれ 1 個ずつ卵を無作為に選び、16S の部分配列 (1037～1190 bp) を得た。これらの卵は、16S の 99% の同一性を基準として 71 クラスタに整理された。これらの卵の配列を BLAST 検索した結果、28 クラスタ (39%) 37 個の卵 (42%) が種に同定された。種が同定できなかった 43 クラスタ (51 個) のうち、6 クラスタ (9 個) の卵は、それぞれトビウオ科、ミサキソコダラ属、ユカタハタ属、マグロ属、マカジキ科、マカジキ属の複数種と高い同一性を示した。このうちマグロ属は遺伝子移入が起きているため 99% の同一性基準では種レベルの識別ができなかったと考えられた。30 個以上の卵が得られた種で分布を比較したところ、カツオ (n=982)、ネズミフグ (n=50)、ヨロイギンメ (n=46) は 72～80% が海山域から採集されており、海山近傍で産卵していると考えられた。一方、マルバラシマガツオ (n=144)、ムカシクロタチ (n=95)、アカマンボウ (n=81)、サヨリトビウオ (n=70)、クサビフグ (n=54)、テンガンムネエソ (n=42)、スジコバン (n=30) は海山域で 23～45% が採集されたが、海山域に集中する傾向はみられず、外洋域の広範囲で産卵していると考えられた。以上の結果から、マリアナ海域においても DNA 魚卵種査定法は適用可能で、これまでほとんど知見がなかった外洋性魚類の産卵生態の解明に有効であることがわかった。

#### 5. DNA 種査定法に基づく卵の形態記載

魚卵の形態と初期発生に関する知見を得るため、DNA を用いて同定できた浜名湖の 26 種とマリアナ海域の 28 種、計 54 種の卵の形態を記載した。これらのうち 21 種では、飼育実験をおこない孵化仔魚の形態も記載した。加えて、種まで判別できなかった卵についても 16S のクラスタで整理し、計 62 種類を記載した。さらに DNA 解析をおこなえなかった 31 タイプの卵も記載した。その結果、浜名湖で計 56 種類、マリアナ海域で計 91 種類の卵の形態を記載し、両海域に出現する浮遊性魚卵の形態によるグルーピングを可能にした。以上の結果、魚卵を新規に記載できた種は、浜名湖で 7 種 (アラメガレイ、アカササノハベラ、ホシササノハベラ、クロサギ、ワニエソ、ササウシノシタ、ダイナンウミヘビ)、マリアナ海域では 15 種 (テンガンムネエソ、マルバラシマガツオ、ネズミフグ、ネッタユメハダカ、フサカザリホシエソ、モヨウモンガラドオシ、ヘラアナゴ、スジコバン、スジハナビラウオ、ヒシコバン、ムカシクロタチ、ヨロイギンメ、モトノコバウナギ、スミクイウオ、ソコイワシ科の 1 種) の計 22 種となった。

本研究は魚卵の DNA 種査定法を確立し、それが半閉鎖水域と開放的外洋域のいずれでも魚

類の産卵生態研究に有効であることを実証した。また計 22 種の新規記載を含む計 54 種の卵の形態を記載すると同時に、種不明卵を含む計 116 種類の卵で DNA による識別を可能にした。これらの結果は魚卵の分類学の基礎を充実させると同時に、魚類の産卵生態の解明と資源変動機構の研究において力を発揮するものと期待される。



## 付属資料

Appendix 1 Summary of morphological characters of 46 types of fish eggs collected in the Lake Hamana

Egg type	No. of eggs collected	No. of eggs measured	Egg shape	Egg diameter (mm)	Oil globule		Ratio of egg diameter and oil diameter	Chorion Color	Surface	Perivitelline space	Yolk	Pigmentation		
					Number	Color						Diameter (mm)	Body	Yolk
IA-01	1	1	Spherical	1.14	1	Transparent	0.19	Transparent	Spine	Narrow	Homogenous	x		
IA-02	21	21	Spherical	1.02-1.27 (1.09 ± 0.06)	1	Yellow	0.07-0.17 (0.12 ± 0.02)	6.8-15.1 (11.5 ± 2.0)	Transparent	Hexagonal	Narrow	Homogenous	x	x
IC-01	16	16	Spherical	0.75-0.87 (0.83 ± 0.03)	1	Transparent	0.15-0.18 (0.17 ± 0.01)	17.2-22.0 (20.0 ± 1.3)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-02	28	27	Spherical	0.9-1.08 (0.97 ± 0.04)	1	Transparent	0.11-0.18 (0.16 ± 0.02)	12.0-17.8 (16.0 ± 1.8)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-02c	23	22	Spherical	0.91-1 (0.96 ± 0.03)	1	Transparent	0.18-0.23 (0.21 ± 0.01)	19.4-23.7 (21.8 ± 1.3)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-03	205	167	Spherical	0.57-0.78 (0.68 ± 0.07)	1	Transparent	0.09-0.14 (0.12 ± 0.01)	14.2-19.0 (16.9 ± 0.9)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	
IC-04	283	283	Spherical	0.78-0.97 (0.88 ± 0.03)	1	Transparent	0.18-0.23 (0.20 ± 0.01)	19.8-25.5 (22.9 ± 1.1)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-05	63	47	Spherical	0.72-0.85 (0.80 ± 0.02)	1	Transparent or yellow	0.13-0.17 (0.15 ± 0.01)	17.2-20.7 (18.9 ± 0.8)	Transparent or yellow	Smooth	Narrow	Homogenous	x	
IC-06	63	63	Spherical	1.2-1.33 (1.27 ± 0.03)	1	Yellowish	0.27-0.39 (0.33 ± 0.02)	21.3-29.2 (26.0 ± 1.7)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-07	47	46	Spherical	1.08-1.27 (1.19 ± 0.05)	1	Transparent	0.21-0.27 (0.24 ± 0.01)	17.5-22.2 (20.1 ± 1.0)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-08	2	2	Spherical	0.95-0.99 (0.97 ± 0.03)	1	Transparent	0.45-0.46 (0.45 ± 0.01)	46.2-47.4 (46.8 ± 0.8)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous		
IC-09	6	6	Spherical	0.82-0.92 (0.87 ± 0.03)	1	Transparent	0.29-0.32 (0.31 ± 0.01)	34.1-36.8 (35.1 ± 1.2)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-10	1158	967	Spherical	0.5-0.74(0.59 ± 0.03)	1	Transparent	0.06-0.16 (0.12 ± 0.01)	9.2-24.6 (21.0 ± 1.1)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-11	201	144	Spherical	0.55-0.74 (0.66 ± 0.04)	1	Transparent	0.14-0.19 (0.16 ± 0.01)	21.9-28.7 (24.5 ± 1.4)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-12	2	2	Spherical	0.97-1.04 (1.01 ± 0.05)	1	Transparent	0.22-0.24 (0.23 ± 0.01)	22.5-22.7 (22.6 ± 0.2)	Yellowish	Smooth	Narrow	Homogenous		
IC-13	5	5	Spherical	0.69-0.77 (0.74 ± 0.03)	1	Transparent	0.13-0.14 (0.14 ± 0)	18.5-19.4 (18.9 ± 0.3)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-14	4	4	Spherical	0.82-0.93 (0.87 ± 0.06)	1	Transparent	0.19-0.21 (0.20 ± 0.01)	22.5-23.3 (23.0 ± 0.4)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-15	2	2	Spherical	0.58-0.65 (0.61 ± 0.05)	1	Transparent	0.13-0.14 (0.13 ± 0)	21.0-22.9 (22.0 ± 1.3)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-16	1	1	Spherical	1.24	1	Transparent	0.21	17.2	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x
IC-17	1	1	Spherical	1.66	1	Transparent	0.39	23.6	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x

Appendix 1 (continued)

Egg type	No of eggs collected	No. of eggs measured	Egg shape	Egg diameter	Oil globule		Ratio of egg diameter and oil diameter	Chorion Color	Surface	Perivitelline space	Yolk	Pigmentation		
					Number	Color						Diameter (mm)	Body	Yolk
IC-complexA	104	103	Spherical	0.7-0.86 (0.77 ± 0.04)	1	Transparent	0.11-0.23 (0.15 ± 0.02)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous			
IC-complexB	398	312	Spherical	0.52-0.78 (0.62 ± 0.06)	1	Transparent	0.11-0.19 (0.14 ± 0.02)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous			
ID-01	660	613	Spherical	1.03-1.83 (1.45 ± 0.08)	1	Transparent or yellow	0.03-0.19 (0.14 ± 0.02)	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous			
II-complex	84	83	Spherical	0.55-0.75 (0.65 ± 0.05)	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous			
II-hatched1	1	1 <sup>a</sup>	-	-	Absent	-	-	-	-	-	Homogenous	x	x	Finfold
II-hatched2	2	2 <sup>a</sup>	-	-	Absent	-	-	-	-	-	Homogenous	x		Finfold
IIA-01	5	5	Spherical	1.11-1.28 (1.20 ± 0.08)	Absent	-	-	Transparent	Hexagonal	Narrow	Homogenous			Eye
IIA-02	66	44	Spherical	0.6-0.79 (0.66 ± 0.06)	Absent	-	-	Transparent	Hexagonal	Narrow	Homogenous	x	x	Finfold
IIB-01	1297	1287	Elipsoidal	0.72-1.52 (1.18 ± 0.08)	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Segmented			
IIC-01	9	9	Spherical	1.07-1.21 (1.15 ± 0.04)	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous			
IIC-02	4	4	Spherical	0.42-0.88 (0.68 ± 0.19)	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x	
IIC-03	1473	1243	Spherical	0.95-1.19 (1.06 ± 0.04)	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x	
IIC-04	1	1	Spherical	1.61	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous			
IIC-05	93	80	Spherical	0.60-0.77 (0.71 ± 0.04)	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x	
IIC-06	1	1	Spherical	1.05	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x	
IIC-07	1	1	Spherical	0.64	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	x	x	
IID-01	3	3	Spherical	2.86-3.07 (3.00 ± 0.12)	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous	x		Eye
IID-02	1	1	Spherical	3.44	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous			
IID-03	1	0	Spherical	-	Absent	-	-	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous			
IIIA-01	8	8	Spherical	1.45-1.56 (1.51 ± 0.04)	Many	Transparent	0.05-0.12 (0.09 ± 0.02)	Transparent	Hexagonal	Narrow	Homogenous	x	x	
IIIB-01	63	51	Spherical	0.82-1.01 (0.92 ± 0.03)	Many	Transparent	0.05-0.10 (0.07 ± 0.01)	Transparent	Smooth	Narrow	Segmented	x	x	

Appendix 1 (continued)

Egg type	No of eggs collected	No. of eggs measured	Egg shape	Egg diameter	Oil globule		Diameter (mm)	Ratio of egg diameter and oil diameter	Chorion Color	Surface	Perivitelline space	Pigmentation			
					Number	Color						Body	Yolk	Oil globule	Other
IIIC-01	12	12	Spherical	0.68-0.76 (0.72 ± 0.03)	Many	Transparent	0.05-0.11 (0.06 ± 0.02)	7.3-15.2 (8.7 ± 2.1)	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous			
IIIC-02	1	0	Spherical	-	Many	Transparent	-	-	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous			
IIID-01	1	1	Spherical	3.54	Many	Yellow	0.12	3.3	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous			
IIID-02	2	2*1	-	-	Many	Transparent	-	-	-	-	-	Homogenous			
IIID-03	2	2	Spherical	3.08-3.11 (3.10 ± 0)	Many	Transparent	0-0.24 (0.12 ± 0.2)	0-7.64 (3.82 ± 5.4)	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous			
Total	6425	5691													

<sup>a</sup> Hatched larvae were observed and measured.



**Appendix 2** Results of DNA species identification of fish eggs collected to the Lake Hamana. The results of comparisons of mitochondrial 16S ribosomal RNA sequences with greater 99% identities are shown

Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.
0408_0004	IIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.41	505	AF488444
0408_0010	IC-01	<i>Platycephalus</i> sp.	99.64	1097	HMN034
0410_0005	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.3	430	AF488457
0410_0006	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.37	475	AF488457
0410_0007	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.39	492	AF488457
0410_0009	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.37	473	AF488457
0410_0016	IC-04	<i>Acanthopagrus latus</i>	99.79–100	937–1111	EF506764 HMN014 HMN148
0410_0017	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.77–99.88	853–866	AB040676 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.17–99.72	360–361	EU848445 GQ365274 GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.19–99.19	369–866	DQ912066 EU410420
0410_0018	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.19	868	DQ912085
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.29–99.79	420–932	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.09–99.55	440–441	EU848445 GQ365274 GQ412304
0410_0019	IIB-01	<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.05–99.14	420–932	AM911212 DQ912066 EU410420
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.14	934	DQ912085
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.57–99.82	469–1082	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
0410_0020	IIB-01	<i>Engraulis australis</i>	99.39–99.8	489–490	EU848445 GQ365274 GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.12–99.4	456–1082	AM911212 DQ912066 EU410420 GQ485306
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.26	1084	DQ912085
0410_0021	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.53–99.79	470–1069	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.19–99.39	491–492	EU848445 GQ365274
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.12–99.4	457–1068	AM911212 DQ912066 EU410420 GQ485306
0410_0022	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.16	1070	DQ912085
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.57–99.81	466–1104	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.38–99.79	486–487	EU848445 GQ365274 GQ412304
0410_0023	IIB-01	<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.39	453–1104	AM911212 AP009137 DQ912066 EU410420 GQ485306
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.28	1106	DQ912085
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.09–99.67	438–989	AB040676 AB246181 HMN036 HMN102 HMN103
0410_0024	IIB-01	<i>Engraulis australis</i>	99.13	459	EU848445
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.76–99.89	850–878	AB040676 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.16–99.72	357–358	EU848445 GQ365274 GQ412304
0410_0025	IIB-01	<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.18–99.2	366–878	DQ912066 EU410420
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.2	880	DQ912085
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.57–99.91	466–1086	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
0410_0026	IIB-01	<i>Engraulis australis</i>	99.38–99.79	486–487	EU848445 GQ365274 GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.08–99.39	453–1086	AM911212 AP009137 DQ912066 EU410420 GQ485306
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.36	1088	DQ912085
0410_0030	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.59–99.91	488–1108	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.41–99.8	508–509	EU848445 GQ365274 GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.42	475–1108	AM911212 AP009137 DQ912066 EU410420 EU552726 GQ485306 GU324162
0410_0031	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.37	1110	DQ912085
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.5–99.9	403–1014	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.29–99.76	423–424	EU848445 GQ365274 GQ412304

Appendix 2 (continued)						
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.	
0410_0033	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.31	1016	DQ912085	
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.59–99.91	490–1146	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.41–99.8	510–511	EU848445 GQ365274 GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.42	477–1146	AM911212 AP009137 DQ912066 EU410420 EU552726	
0410_0035	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.39	1148	GQ485306 GU324162 DQ912085	
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.67–100	460–916	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.17–99.58	480–481	EU848445 GQ365274 GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.02–99.59	447–916	AM911209 AM911211 AM911212 AP009137 DQ912066	
0410_0036	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.24	918	EU410420 EU552726 GQ485306 GU324162 DQ912085	
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.59–99.91	487–1104	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.41–99.8	507–508	EU848445 GQ365274 GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.42	474–1104	AM911212 AP009137 DQ912066 EU410420 EU552726	
0410_0037	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.37	1106	GQ485306 GU324162 DQ912085	
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.64–99.76	842–851	AB040676 HMN036 HMN102 HMN103	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.06–99.16	358–851	DQ912066 EU410420	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.06	853	DQ912085	
0410_0038	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.8–100	489–1123	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.21–99.61	509–510	EU848445 GQ365274 GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.18–99.61	476–1123	AM911209 AM911211 AM911212 AP009137 DQ912066	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.47	1125	EU410420 EU552726 GQ485306 GU324162 DQ912085	
0410_0039	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.57–99.8	464–1075	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.17–99.59	484–485	EU848445 GQ365274 GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.07–99.59	451–1075	AM911209 AM911211 AM911212 AP009137 DQ912066	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.35	1077	EU410420 EU552726 GQ485306 GU324162 DQ912085	
0410_0040	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.66–99.89	853–883	AB040676 HMN036 HMN102 HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.16–99.44	359–360	EU848445 GQ365274	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.21–99.46	368–883	DQ912066 EU410420	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.21	885	DQ912085	
0410_0041	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.79–100	486–1102	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.21–99.61	506–507	EU848445 GQ365274 GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.18–99.61	473–1102	AM911209 AM911211 AM911212 AP009137 DQ912066	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.46	1104	EU410420 EU552726 GQ485306 GU324162 DQ912085	
0410_0042	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.26–99.41	810–841	AB040676 HMN036 HMN102 HMN103	
0410_0044	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.63–100	487–1123	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.21–99.61	507–508	EU848445 GQ365274 GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.02–99.61	474–1123	AM911209 AM911211 AM911212 AP009137 DQ912066	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.29	1125	EU410420 EU552726 GQ485306 GU324162 DQ912085	

Appendix 2 (continued)								
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.			
0410_0045	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.45–99.75	404–995	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.29–99.76	424–425	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.26–99.31	404–433	AM911212	EU410420		
0410_0046	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99	997	DQ912085			
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.55–99.77	855–886	AB040676	HMN036	HMN102	HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.17–99.17	362–363	EU848445	GQ412304		
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.1–99.19	371–886	DQ912066	EU410420		
0410_0047	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.1	888	DQ912085			
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.39–99.8	488–1003	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.21–99.61	508–509	EU848445	GQ365274	GQ412304	
0410_0048	IIB-01	<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.23	488–1003	AM911212	AP009137	DQ912066	EU410420 EU552726
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.2	1005	DQ912085			
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.52–99.76	810–840	AB040676	HMN036	HMN102	HMN103
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.05	840	DQ912066			
0410_0050	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.05	842	DQ912085			
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.39–99.63	488–1126	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.21–99.61	508–509	EU848445	GQ365274	GQ412304	
0410_0051	IIB-01	<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.11–99.23	488–1126	AM911212	DQ912066	EU410420	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.11	1128	DQ912085			
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.57–99.91	464–1081	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
0410_0053	IIB-01	<i>Engraulis australis</i>	99.38–99.79	484–485	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.07–99.39	451–1081	AM911212	AP009137	DQ912066	EU410420 GQ485306
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.35	1083	DQ912085			
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.57–99.81	464–1075	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
0410_0054	IIB-01				HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.38–99.79	484–485	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.11–99.39	451–1075	AM911212	DQ912066	EU410420	GQ485306
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.26	1077	DQ912085			
0410_0055	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.29–99.76	424–425	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.5–99.75	404–994	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.09–99.31	404–994	AM911212	DQ912066	EU410420	
0410_0056	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.1	996	DQ912085			
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.41–99.64	841–841	AB040676	HMN036	HMN102	HMN103
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.18	366	EU410420			
		<i>Engraulis australis</i>	99.16	358	EU848445			
0410_0058	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.57–99.91	464–1078	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.38–99.79	484–485	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.07–99.39	451–1078	AM911212	AP009137	DQ912066	EU410420 GQ485306
0411_0001	IC-05	<i>Engraulis eurystole</i>	99.35	1080	DQ912085			
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.77–100	841–872	AB040676	HMN036	HMN102	HMN103
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.08–99.44	357–872	AP009137	DQ912066	EU410420	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.31	874	DQ912085			
0411_0002	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99–99.73	597–1096	AB121247	AP006019	EU560727	

Appendix 2 (continued)						
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.	
0411_0008	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.11	450	AF488457	
0411_0010	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.15–99.85	658–1171	AB121247	AP006019 EU560727
0411_0011	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.08–99.84	609–1088	AB121247	AP006019 EU560727
0411_0012	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.39	492	AF488457	
0411_0016	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.05–99.29	564–1053	AB121247	AP006019
0411_0017	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.16–99.65	569–1069	AB121247	AP006019
0411_0019	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.15–99.53	569–1055	AB121247	AP006019 EU560727
0411_0020	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.26–99.66	591–1087	AB121247	AP006019
0411_0021	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.17–99.36	594–1090	AB121247	AP006019 EU560727
0411_0023	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.25–99.82	570–1067	AB121247	AP006019
0411_0024	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.01–99.19	613–1114	AB121247	AP006019 EU560727
0411_0028	IC-05	<i>Pseudolabrus eoethinus</i>	99.82–99.84	635–1134	AB121243	EU560728
0411_0029	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.18	367	AF488457	
0411_0031	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.33	448	AF488457	
0411_0033	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.59–99.8	490–1106	AB040676	AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.41–99.8	510–511	EU848445	GQ365274 GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.42	477–1106	AM911212	DQ912066 EU410420 EU552726 GQ485306
					GU324162	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.19	1108	DQ912085	
0411_0039	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.35–99.62	464–1055	AB040676	AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.17–99.59	484–485	EU848445	GQ365274 GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.05–99.14	464–1055	AM911212	DQ912066
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.05	1057	DQ912085	
0411_0041	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.35–99.8	465–1076	AB040676	AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.14–99.26	466–1077	AM911212	DQ912066 EU410420
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.26	1079	DQ912085	
		<i>Engraulis australis</i>	99.18	487	EU848445	
0411_0042	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.54–99.8	439–1006	AB040676	AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.35–99.78	459–460	EU848445	GQ365274 GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.06–99.36	426–1006	AM911212	DQ912066 EU410420 GQ485306
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.21	1008	DQ912085	
0411_0044	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.72–100	464–1075	AB040676	AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.17–99.59	484–485	EU848445	GQ365274 GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.07–99.59	451–1075	AM911209	AM911211 AM911212 AP009137 DQ912066
					EU410420	EU552726 GQ485306 GU324162
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.44	1077	DQ912085	
0411_0045	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.38–99.82	486–1123	AB040676	AB246181 AM911214 HQ592224–26 HMN036 HMN102 HMN103
		<i>Engraulis australis</i>	99.21–99.61	506–507	EU848445	GQ365274 GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.02–99.29	486–1123	AM911212	AP009137 DQ912066 EU410420
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.29	1125	DQ912085	

Appendix 2 (continued)								
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.			
0411_0046	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.78–100	462–1053	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.17–99.59	482–483	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.13–99.59	449–1053	AM911209	AM911211	AM911212	AP009137 DQ912066
				EU410420	EU552726	GQ485306	GU324162	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.43	1055	DQ912085			
0411_0047	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.72–100	464–1075	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.17–99.59	484–485	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.07–99.59	451–1075	AM911209	AM911211	AM911212	AP009137 DQ912066
				EU410420	EU552726	GQ485306	GU324162	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.35	1077	DQ912085			
0411_0049	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.56–99.9	450–1041	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.36–99.79	470–471	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.04–99.37	437–1041	AM911212	AP009137	DQ912066	EU410420 GQ485306
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.33	1043	DQ912085			
0411_0050	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.58–99.91	479–1094	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.4–99.8	499–500	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.09–99.41	466–1094	AM911212	AP009137	DQ912066	EU410420 GQ485306
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.36	1096	DQ912085			
0411_0051	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.63–100	488–1150	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis australis</i>	99.21–99.61	508–509	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.04–99.61	475–1150	AM911209	AM911211	AM911212	AP009137 DQ912066
				EU410420	EU552726	GQ485306	GU324162	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.31	1152	DQ912085			
0411_0060	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.1–99.7	443–1012	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.07–99.36	430–1012	AM911212	DQ912066	EU410420	GQ485306
		<i>Engraulis australis</i>	99.14–99.35	463–464	EU848445	GQ365274		
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.31	1014	DQ912085			
0411_0061	IIB-01	<i>Engraulis australis</i>	99.41–99.8	508–509	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.35–99.8	488–1140	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.42	475–1140	AM911212	DQ912066	EU410420	EU552726 GQ485306
				GU324162				
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.04	1142	DQ912085			
0411_0063	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.59–100	488–1108	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.42	475–1108	AM911212	AP009137	DQ912066	EU410420 EU552726
					GQ485306	GU324162		
		<i>Engraulis australis</i>	99.02–99.41	508–509	EU848445	GQ365274	GQ412304	
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.37	1110	DQ912085			
0411_0064	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.39–99.8	490–1126	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.18–99.23	490–1126	AM911212	DQ912066	EU410420	
		<i>Engraulis australis</i>	99.02–99.22	510–511	EU848445	GQ365274		
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.2	1128	DQ912085			
0411_0065	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.36–99.81	520–1169	AB040676	AB246181	AM911214	HQ592224–26
					HMN036	HMN102	HMN103	



Appendix 2 (continued)							
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.		
		<i>Engraulis australis</i>	99.08–99.45	541–542	EU848445	GQ365274	GQ412304
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.04–99.42	507–1169	AM911209	AM911211	AM911212 DQ912066 EU410420
					EU552726	GQ485306	GU324162
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.06	1171	DQ912085		
0412_0001	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	484–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0002	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	484–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0028	IIA-02	<i>Repomucenus curvicornis</i>	99.82–99.89	914–1082	HMN113	HMN170	
0412_0038	IC-06	<i>Lateolabrax japonicus</i>	99.68–99.83	934–1206	AB122029	HMN023	
0412_0040	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.42–99.75	672–1204	AB121247	AP006019	EU560727
0412_0048	IC-05	<i>Pseudolabrus eoethinus</i>	99.67–99.71	685–1216	AB121243	EU560728	
0412_0062	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.42–99.75	671–1202	AB121247	AP006019	EU560727
0412_0072	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.41–99.58	673–1194	AB121247	AP006019	
0412_0095	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	520–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0096	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.07–99.81	520–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0098	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	520–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0104	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	520–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0105	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.04–99.9	508–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0110	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	520–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0111	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–99.62	520–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0112	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	519–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0114	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.24–100	509–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0115	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	519–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0117	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	520–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0121	IIA-02	<i>Repomucenus curvicornis</i>	99.74–99.78	914–1136	HMN113	HMN170	
0412_0126	IIA-02	<i>Repomucenus curvicornis</i>	99.74–99.78	914–1136	HMN113	HMN170	
0412_0128	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.43	525	AF488457		
0412_0130	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.34–99.85	676–1208	AB121247	AP006019	EU560727
0412_0133	IC-06	<i>Lateolabrax japonicus</i>	99.57–99.83	934–1205	AB122029	HMN023	
0412_0135	IC-05	<i>Pseudolabrus eoethinus</i>	99.75–99.85	671–1203	AB121243	EU560728	
0412_0148	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.09–99.85	676–1208	AB121247	AP006019	EU560727
0412_0149	IC-05	<i>Pseudolabrus sieboldi</i>	99.33–99.67	667–1199	AB121247	AP006019	EU560727
0412_0152	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.16–100	464–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0153	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.07–99.8	520–1012	AB246180	DQ900919	HMN017
0412_0154	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	521–1014	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0161	IC-06	<i>Lateolabrax japonicus</i>	99.68–99.92	934–1208	AB122029	HMN023	
0412_0163	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	520–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0412_0171	IIB-01	<i>Engraulis australis</i>	99.45–99.82	542–543	EU848445	GQ365274	GQ412304
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.62–99.81	522–1198	AB040676	AB246181	AM911214 HMN036 HMN102
					HMN103	HQ592224–26	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.43	509–1198	AM911209	AM911211	AM911212 AP009137 DQ912066
					EU410420	EU552726	GQ485306 GU324162
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.25	1200	DQ912085		
0412_0172	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.04–99.5	520–1205	AB040676	AB246181	AM911214 HMN036 HMN102
					HMN103	HQ592224–26	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.09	1205	DQ912066		
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.09	1207	DQ912085		

Appendix 2 (continued)										
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.					
0412_0174	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.25–100	519–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0501_0005	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.58–100	476–1080	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0019	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.58–100	476–1105	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0033	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.58–100	447–1065	AP002951	AY046951	GU248349	HMN002	HMN003	
					HMN004	HMN111				
0501_0037	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.57–100	433–1052	AP002951	AY046951	GU248349	HMN002	HMN003	
					HMN004	HMN111				
0501_0041	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.58–100	474–1078	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0042	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.37–99.81	474–1078	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0046	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.58–100	473–1076	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0056	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.58–100	476–1081	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0057	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.55–100	450–1068	AP002951	AY046951	GU248349	HMN002	HMN003	
					HMN004	HMN111				
0501_0058	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	511–1122	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0059	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.58–100	476–1079	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0061	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.57–100	433–1022	AP002951	AY046951	GU248349	HMN002	HMN003	
					HMN004	HMN111				
0501_0062	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.58–100	472–1076	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0064	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.58–100	472–1075	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0067	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	512–1162	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0068	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	513–1162	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0069	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.69–99.91	885–1196	AP002951	HMN002	HMN003	HMN004	HMN111	
0501_0070	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.55–99.91	512–1145	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0071	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	513–1162	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0072	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.62–100	524–1177	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0073	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.55–99.91	510–1141	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0074	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.62–100	521–1173	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0075	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	511–1159	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0076	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.59–100	483–1117	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0077	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.55–99.91	512–1160	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0078	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.6–100	498–1109	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0079	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.55–99.91	511–1158	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0080	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.62–100	521–1171	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					
0501_0081	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	510–1143	AP002951	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004	
					HMN111					

Appendix 2 (continued)									
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.				
0501_0082	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–99.91	512–1162	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0083	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	512–1160	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0084	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.41–99.91	512–1161	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
		<i>Psettichthys melanostictus</i>	99.04	521	FJ870405				
0501_0085	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	511–1141	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0086	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	512–1162	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0088	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	510–1145	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0090	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.62–100	522–1173	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0091	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.62–100	521–1171	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0092	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.43–99.91	524–1173	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0093	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	514–1163	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0094	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.62–100	521–1170	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0095	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.61–100	512–1147	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0501_0096	IIC-03	<i>Kareius bicoloratus</i>	99.62–100	520–1168	AP002951 HMN111	AY046951	HMN002	HMN003	HMN004
0502_0001	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.81–100	522–1198	AB040676 HMN036	AB246181 HMN102	AM911214 HMN103	HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.26–99.63	542–543	EU848445	GQ365274	GQ412304		
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.05–99.62	509–1198	AM911209 EU410420	AM911211 EU552726	AM911212 GQ485306	AP009137 GU324162	DQ912066
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.5	1200	DQ912085				
0502_0005	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.43	527	AF488457				
0502_0007	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.37	473	AF488457				
0502_0008	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.37	473	AF488457				
0502_0009	IC-07	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.66	1169	HMN018				
0502_0011	IC-07	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.74	1169	HMN018				
0502_0012	II-hatched1	<i>Eopsetta grigorjewi</i>	99.81	524	AY368896				
0502_0013	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.37	473	AF488457				
0502_0014	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.39–99.63	490–1176	AB040676 HMN036	AB246181 HMN102	AM911214 HMN103	HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.22–99.61	510–511	EU848445	GQ365274	GQ412304		
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.15–99.23	490–1176	AM911212	DQ912066	EU410420		
		<i>Engraulis eurystole</i>	99.15	1178	DQ912085				
0502_0016	IC-06	<i>Lateolabrax japonicus</i>	99.57–99.83	934–1188	AB122029	HMN023			
0502_0022	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.37	473	AF488457				
0502_0023	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.43	526	AF488457				
0502_0025	IIB-01	<i>Engraulis japonicus</i>	99.62–99.91	522–1198	AB040676 HMN036	AB246181 HMN102	AM911214 HMN103	HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.45–99.82	542–543	EU848445	GQ365274	GQ412304		
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99.04–99.43	509–1198	AM911209 EU410420	AM911211 EU552726	AM911212 GQ485306	AP009137 GU324162	DQ912066

Appendix 2 (continued)						
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.	
0502_0026	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.42	1200	DQ912085	
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.59–99.82	490–1125	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26	
		<i>Engraulis australis</i>	99.41–99.8	510–511	HMN036 HMN102 HMN103	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.42	477–1125	EU848445 GQ365274 GQ412304	
0502_0027	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.29	1127	AM911212 AP009137 DQ912066 EU410420 EU552726	
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.59–99.91	490–1166	GQ485306 GU324162	
		<i>Engraulis australis</i>	99.41–99.8	510–511	DQ912085	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.42	477–1166	AB040676 AB246181 AM911214 HQ592224–26	
0502_0028	IIB-01	<i>Engraulis eurystole</i>	99.4	1168	HMN036 HMN102 HMN103	
		<i>Engraulis japonicus</i>	99.24–99.73	524–1200	EU848445 GQ365274 GQ412304	
		<i>Engraulis australis</i>	99.08–99.45	544–545	AM911212 AP009137 DQ912066	
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	99–99.25	524–1200	GQ485306 GU324162	
0502_0029	IC-07	<i>Engraulis eurystole</i>	99.25	1202	DQ912085	
0502_0030	IC-07	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.57	1153	HMN018	
0502_0034	IC-07	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.74	1153	HMN018	
0502_0038	ID-01	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.83	1169	HMN018	
0502_0039	IC-07	<i>Sardinops melanostictus</i>	99.74–100	496–1174	AB032554 AB246173 HMN133	
		<i>Sardinops sagax</i>	99.03–99.42	496–520	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270	
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.23	518	GQ365279 GQ365280 GQ412303 HQ592233–35	
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.18	486	EU848443	
0502_0040	ID-01	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.36	1087	EU552728	
0502_0041	IC-07	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.74–100	484–1160	HMN018	
		<i>Sardinops melanostictus</i>	99.01–99.41	484–508	AB032554 AB246173 HMN133	
		<i>Sardinops sagax</i>	99.01–99.41	484–508	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270	
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.21	506	GQ365279 GQ365280 GQ412303 HQ592233–35	
0502_0043	IC-07	<i>Sardinops ocellatus</i>	99.16	474	EU848443	
0502_0046	IC-03	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.66	1170	EU552728	
0502_0047	IC-03	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.74	1153	HMN018	
0502_0048	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.18	488	AF488457	
0502_0051	IC-06	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.39	495	AF488457	
0502_0052	IC-07	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.39	490	AF488457	
0502_0053	ID-01	<i>Lateolabrax japonicus</i>	99.68–99.91	934–1158	AB122029 HMN023	
0502_0054	ID-01	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.65	1128	HMN018	
0502_0055	ID-01	<i>Sardinops melanostictus</i>	99.74–100	484–1162	AB032554 AB246173 HMN133	
		<i>Sardinops sagax</i>	99.01–99.41	484–508	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270	
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.21	506	GQ365279 GQ365280 GQ412303 HQ592233–35	
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.16	474	EU848443	
0502_0054	ID-01	<i>Sardinops melanostictus</i>	99.74–100	484–1158	EU552728	

Appendix 2 (continued)					
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.
0502_0055	ID-01	<i>Sardinops sagax</i>	99.01–99.41	484–508	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270 GQ365279 GQ365280 GQ412303 HQ592233–35 EU848443
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.21	506	EU848443
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.16	474	EU552728
		<i>Sardinops melanostictus</i>	99.75–100	514–1194	AB032554 AB246173 HMN133
		<i>Sardinops sagax</i>	99.07–99.44	514–538	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270 GQ365279 GQ365280 GQ412303 HQ592233–35 EU848443
0502_0056	ID-01	<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.25	536	EU848443
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.21	504	EU552728
		<i>Sardinops melanostictus</i>	99.74–100	484–1147	AB032554 AB246173 HMN133
		<i>Sardinops sagax</i>	99.01–99.41	484–508	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270 GQ365279 GQ365280 GQ412303 HQ592233–35 EU848443
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.21	506	EU848443
0502_0060	ID-01	<i>Sardinops ocellatus</i>	99.16	474	EU552728
		<i>Sardinops melanostictus</i>	99.72–100	459–1074	AB032554 AB246173 HMN133
		<i>Sardinops sagax</i>	99.14–99.38	459–483	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270 GQ365279 GQ365280 HQ592233–35 EU848443
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.17	481	EU848443
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.11	449	EU552728
0502_0061	ID-01	<i>Sardinops melanostictus</i>	99.73–100	463–1104	AB032554 AB246173 HMN133
		<i>Sardinops sagax</i>	99.15–99.38	463–487	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270 GQ365279 GQ365280 HQ592233–35 EU848443
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.18	485	EU848443
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.12	453	EU552728
		<i>Sardinops melanostictus</i>	99.64–99.88	463–1104	AB032554 AB246173 HMN133
0502_0063	ID-01	<i>Sardinops sagax</i>	99.14–99.18	463–487	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393
		<i>Sardinops melanostictus</i>	99.73–100	463–1104	AB032554 AB246173 HMN133
		<i>Sardinops sagax</i>	99.15–99.38	463–487	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270 GQ365279 GQ365280 HQ592233–35 EU848443
0502_0064	IC-07	<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.12	453	EU552728
		<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.74	1137	HMN018
		<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.83	1153	HMN018
0502_0070	IC-07	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	99.74	1169	HMN018
0502_0071	ID-01	<i>Sardinops melanostictus</i>	99.66–100	498–1178	AB032554 AB246173 HMN133
		<i>Sardinops sagax</i>	99.04–99.43	498–522	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270 GQ365279 GQ365280 GQ412303 HQ592233–35 EU848443
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.23	520	EU848443
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.18	488	EU552728
		<i>Sardinops melanostictus</i>	99.74–100	498–1139	AB032554 AB246173 HMN133
0502_0073	ID-01	<i>Sardinops sagax</i>	99.04–99.43	498–522	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270 GQ365279 GQ365280 GQ412303 HQ592233–35 EU848443
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.23	520	EU848443
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.18	488	EU552728
		<i>Sardinops melanostictus</i>	99.74–100	498–1139	AB032554 AB246173 HMN133
		<i>Sardinops sagax</i>	99.04–99.43	498–522	AB246174 AM911202 EF458392 EF458393 GQ365270 GQ365279 GQ365280 GQ412303 HQ592233–35 EU848443



Appendix 2 (continued)										
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.					
0502_0074	ID-01	<i>Sardinops melanostictus</i>	99.66–100	496–1169	AB032554	AB246173	HMN133			
		<i>Sardinops sagax</i>	99.03–99.42	496–520	AB246174	AM911202	EF458392	EF458393	GQ365270	
					GQ365279	GQ365280	GQ412303	HQ592233–35		
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.23	518	EU848443					
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.18	486	EU552728					
0502_0075	ID-01	<i>Sardinops melanostictus</i>	99.75–100	498–1178	AB032554	AB246173	HMN133			
		<i>Sardinops sagax</i>	99.04–99.43	498–522	AB246174	AM911202	EF458392	EF458393	GQ365270	
					GQ365279	GQ365280	GQ412303	HQ592233–35		
		<i>Sardinops neopilchardus</i>	99.23	520	EU848443					
		<i>Sardinops ocellatus</i>	99.18	488	EU552728					
0504_0241	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.13–100	446–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0242	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.16–100	458–1013	AB246180	DQ900919	HMN017			
0504_0243	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	487–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0257	IC-04	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	99.9–99.9	997–1004	HMN025	HMN026	HMN196			
0504_0258	IC-04	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	100–100	1000–1023	HMN025	HMN026	HMN196			
0504_0259	IC-12	<i>Girella punctata</i>	99.61–100	925–1019	AB208648	AB233479–91		AP011060		
					HMN067	HMN158	HMN176	HMN193		
0504_0260	IIA-02	<i>Repomucenus valenciennei</i>	99.8	978	HMN010					
0504_0265	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.33	451	AF488457					
0504_0269	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	486–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
		<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	99.04	1141	GU581265					
0504_0271	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.15–100	455–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0272	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.26	408	AF488457					
0504_0287	IC-12	<i>Girella punctata</i>	99.59–100	921–983	AB208648	AB233479–91		AP011060		
					HMN067	HMN158	HMN176	HMN193		
0504_0291	IIA-02	<i>Repomucenus valenciennei</i>	99.76	835	HMN010					
0504_0331	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.24–100	510–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0341	IC-09	<i>Chelon affinis</i>	99.62–99.81	931–1065	HMN005	HMN134	HMN150			
0504_0372	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	484–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0373	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	486–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0374	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.19–100	480–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0375	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.17–100	467–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0377	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	485–1013	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0378	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	486–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0380	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	486–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0381	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.01–99.6	488–1012	AB246180	DQ900919	HMN017			
0504_0382	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	485–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0383	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	485–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0385	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.19–100	480–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0386	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	487–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0387	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	487–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0388	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	486–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0389	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99–100	485–1013	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0390	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	485–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0391	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99–99.9	483–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0393	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	484–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0401	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.09–99.9	424–1012	AB246180	DQ900919	HMN017			
0504_0404	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.12–99.77	440–1012	AB246180	DQ900919	HMN017			
0504_0581	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.12–100	440–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0582	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.13–100	443–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017		
0504_0613	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.02–99.9	393–964	AB246180	DQ900919	HMN017			

Appendix 2 (continued)							
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.		
0504_0777	IIA-02	<i>Repomucenus valenciennesi</i>	99.46	919	HMN010		
0504_0779	IIA-02	<i>Repomucenus valenciennesi</i>	99.68	931	HMN010		
0504_0839	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.12–100	440–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0506_0110	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	99.72–100	507–1076	AY541658	HMN044	
0506_0114	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	99.91–100	510–1078	AY541658	HMN044	
0506_0115	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	99.72–100	509–1078	AY541658	HMN044	
0506_0117	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	99.54–99.61	510–1078	AY541658	HMN044	
0506_0158	IIC-05	<i>Triacanthus biaculeatus</i>	99.58–99.65	945–1149	AP009174	HMN011	HMN050
0506_0171	IIC-05	<i>Triacanthus biaculeatus</i>	100–100	943–1152	AP009174	HMN011	HMN050
0506_0239	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	485–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920 HMN017
0506_0339	ID-01	<i>Sardinella zunasi</i>	99.3–99.91	499–1147	AB246175	HMN030	HMN031 HMN129 HMN141
					HMN142	HMN143	
0508_0514	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	99.72–100	543–1078	AY541658	HMN044	
0508_0516	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	99.72–99.82	543–1078	AY541658	HMN044	
0508_0627	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	100	525–1075	AY541658	HMN044	
0508_0629	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	99.81–100	542–1078	AY541658	HMN044	
0508_0663	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	100	524–1078	AY541658	HMN044	
0508_0664	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	100	524–1078	AY541658	HMN044	
0508_0666	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	100	526–1078	AY541658	HMN044	
0508_0674	IC-10	<i>Leiognathus nuchalis</i>	99.72–100	524–1074	AY541658	HMN044	
0509_1000	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	526	AF488444		
0509_1001	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	527	AF488444		
0509_1004	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	526	AF488444		
0509_1005	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.24	526	AF488444		
0509_1006	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	526	AF488444		
0509_1007	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	526	AF488444		
0509_1008	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.05	526	AF488444		
0509_1009	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	526	AF488444		
0509_1010	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.24	525	AF488444		
0509_1012b		<i>Heteromycteris japonica</i>	99.24	526	AF488444		
0509_1030	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.24	526	AF488444		
0509_1031	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	526	AF488444		
0509_1032	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	526	AF488444		
0509_1033	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	526	AF488444		
0509_1045	IIA-02	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.43	523	AF488444		

Appendix 2 (continued)									
Specimen ID	Type	Species name	% identity	Alignment length	Acc. No.				
0509_1053	IIIB-01	<i>Heteromycteris japonica</i>	99.05	526	AF488444				
0509_1063	IC-11	<i>Gerres equulus</i>	99.81–100	551–1033	AY541668	HMN180			
0509_0619	ID-01	<i>Sardinella zunasi</i>	99.53–100	510–1147	AB246175	HMN030	HMN031	HMN129	HMN141
					HMN142	HMN143			
0509_0620	ID-01	<i>Sardinella zunasi</i>	99.3–99.91	521–1147	AB246175	HMN030	HMN031	HMN129	HMN141
					HMN142	HMN143			
0509_0621	ID-01	<i>Sardinella zunasi</i>	99.08–99.65	520–1147	AB246175	HMN030	HMN031	HMN129	HMN141
					HMN142				
0509_0622	ID-01	<i>Sardinella zunasi</i>	99.56–99.9	510–1147	AB246175	HMN030	HMN031	HMN129	HMN141
					HMN142	HMN143			
0509_0901	IC-01	<i>Platycephalus</i> sp.	99.73	1111	HMN034				
0509_0902	IC-01	<i>Platycephalus</i> sp.	99.73	1094	HMN034				
0509_0941	IIID-02	<i>Ophisurus macrorhynchus</i>	99.21	1139	AP002978				
0509_0965	IC-11	<i>Gerres equulus</i>	99.9–100	518–1033	AY541668	HMN180			
0509_0967	IC-10	<i>Sillago japonica</i>	99.69–99.79	955–955	HMN100	HMN114			
0509_0968	IC-11	<i>Gerres equulus</i>	99.9–100	551–1033	AY541668	HMN180			
0509_0969	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.15	473	AF488457				
0509_0970	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.43	528	AF488457				
0509_0972	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.43	526	AF488457				
0509_0975	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.43	528	AF488457				
0509_0977	IC-01	<i>Platycephalus</i> sp.	99.55	1117	HMN034				
0509_0983	IC-01	<i>Platycephalus</i> sp.	99.73	1115	HMN034				
0509_0984	IC-01	<i>Platycephalus</i> sp.	99.64	1116	HMN034				
0509_0985	IC-01	<i>Platycephalus</i> sp.	99.55	1117	HMN034				
0509_0988	IC-04	<i>Acanthopagrus latus</i>	99.79–100	937–1207	EF506764	HMN014	HMN148		
0509_0989	IC-04	<i>Acanthopagrus latus</i>	99.57–99.83	937–1207	EF506764	HMN014	HMN148		
0509_0992	IC-04	<i>Acanthopagrus latus</i>	99.79–100	937–1208	EF506764	HMN014	HMN148		
0509_0993	IC-04	<i>Acanthopagrus latus</i>	99.82–100	937–1208	EF506764	HMN014	HMN148		
0509_0997	IIIC-01	<i>Paraplagusia japonica</i>	99.13–99.62	572–1059	DQ112685	HMN118			
0510_0001	IIC-01	<i>Saurida wanieo</i>	100	454	AB297972				
0510_0002	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.15	473	AF488457				
0510_0003	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.15	473	AF488457				
0510_0004	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.39	494	AF488457				
0510_0005	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.37	476	AF488457				
0510_0006	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.15	473	AF488457				
0510_0008	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.39	493	AF488457				
0510_0009	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.39	490	AF488457				
0510_0011	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.39	493	AF488457				
0510_0012	IC-03	<i>Tarphops oligolepis</i>	99.39	493	AF488457				
0510_0014	ID-01	<i>Konosirus punctatus</i>	99.2–100	485–1012	AB246180	DQ900919	DQ900920	HMN017	

**Appendix 3** Summary of morphological characters of 108 types of fish eggs collected in the West Mariana region.

Morphological type	Specimen ID	Egg shape	Diameter (mm)	Chorion		Surface	Perivitelline space	Yolk	Oil globule		Pigmentation		Note
				Color	Color				Number	Color	Diameter (mm)	Melanophore	
IA-01	KH0137	Spherical	0.85–0.95	Transparent	Transparent	Numerous short spines	?	?	1	Transparent	0.21–0.25	-	-
IA-02	KH0169	Spherical	1.66	Transparent	Transparent	Polygonal surface (ca. 0.03–0.05 mm)	?	?	1	Transparent	0.32	-	-
IA-03	KH0170	Spherical	0.95	Transparent	Transparent	Smooth	Middle	Homogenous	1	Transparent	0.3	-	-
IA-04	KH0381	Ovoid	1.0×1.1	Transparent	Transparent	Protuberance on micropyle (ca. 0.15 mm)	?	?	1	Transparent	0.1	-	-
IA-05	KH0509	Spherical	1.2	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous	1	Transparent	0.26	+	-
IA-06	KH1234	Ovoid	1.35–1.75	Transparent	Transparent	Pustules around micropyle	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.24–0.26	-	-
IB-01	KH0055	Spherical	0.84–0.99	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	?	1	Transparent	0.23–0.29	+	-
IB-02	KH0199	Spherical	0.85–0.95	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Segmented	1–2	Transparent	0.15–0.22	-	-
IB-03	KH0499	Spherical	1.17–1.41	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous or segmented?	1	Transparent or yellow?	0.22–0.32	+	-
IB-04	KH1211	Spherical	1.22–1.29	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Yellow	0.28–0.30	+	-
IB-05	KH1329	Spherical	1.27	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Segmented	1	Transparent	0.22	-	-
IB-06	KH2615	Spherical	0.9	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Segmented	1	Transparent	0.18	-	-
IC-01	KH0001	Spherical	1.21–1.48	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.16–0.25	+	-
IC-02	KH0035	Spherical	1.68–1.87	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.42–0.53	+	-
IC-03	KH0036	Spherical	1.41–1.54	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.29–0.33	+	-
IC-04	KH0037	Spherical	1.90–2.27	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Yellow	0.06–0.16	+	-
IC-05	KH0045	Spherical	0.84–1.02	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.12–0.16	+	-
IC-06	KH0046	Spherical	1.4	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.25	-	-
IC-07	KH0049	Spherical	1.32–1.47	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.31–0.32	-	-
IC-08	KH0053	Spherical	0.83–1.03	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Yellow	0.16–0.25	+	-
IC-09	KH0063	Spherical	1.4	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.25	-	-
IC-10	KH0067	Spherical	0.94–1.01	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.20–0.25	+	-
IC-11	KH0073	Spherical	0.95–0.96	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.21–0.22	-	-
IC-12	KH0128	Spherical	0.85–0.94	Transparent	Transparent	Smooth	?	?	1	Transparent	0.21–0.28	-	Inner egg membrane
IC-13	KH0227	Spherical	0.77	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.11	-	-
IC-14	KH0279	Spherical	0.78–0.9	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.15–0.20	+	-
IC-15	KH0527	Spherical	1.25–1.42	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.27–0.34	+	-
IC-16	KH0667	Spherical	1.54–1.65	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.36–0.42	+	-

Appendix 3 (continued)

Morphological type	Specimen ID	Egg shape	Diameter (mm)	Chorion		Surface	Perivitelline space	Yolk	Oil globule		Pigmentation		Note
				Color	Number				Color	Diameter (mm)	Melanophore	Xanthophore	
IC-17	KH0693	Spherical	1.18-1.46	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.25-0.35	+	-
IC-18	KH0948	Spherical	1.57-1.69	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.36-0.40	-	-
IC-19	KH0953	Spherical	1.06	Transparent	Transparent	Smooth	?	Homogenous	1	Transparent	0.24	+	-
IC-20	KH1055	Spherical	0.83-0.86	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.18-0.20	+	-
IC-21	KH1059	Spherical	1.02	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.25	+	-
IC-22	KH1146	Spherical	1.75-1.82	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Yellow	0.35-0.36	+	-
IC-23	KH1356	Spherical	0.65-0.68	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous?	1	Transparent	0.18	+	-
IC-24	KH1428	Spherical	0.95-1.00	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.20-0.22	+	-
IC-25	KH1459	Spherical	0.90-0.93	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.19-0.23	+	-
IC-26	KH1534	Spherical	1.08-1.09	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.20-0.22	+	-
IC-27	KH1544	Spherical	0.70-0.76	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.21-0.25	-	-
IC-28	KH1569	Spherical	1.36	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.25	-	-
IC-29	KH2621	Spherical	0.96	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.15	+	-
IC-30	KH2692	Spherical	0.84-0.95	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.18-0.36	+	-
IC-31	KH2679	Spherical	1.08-1.15	Transparent	Transparent	Smooth	Middle	Homogenous	1	Transparent	0.28-0.31	+	-
IC-32	KH2699	Spherical	0.62-0.71	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.12-0.14	-	-
IC-33	KH2716	Spherical	0.65-0.78	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.17-0.21	-	-
IC-34	KH2979	Spherical	1.04	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.25	+	-
IC-35	KH3253	Spherical	0.97-1.00	Transparent	Transparent	Smooth	?	?	1	Orange	0.17	?	-
IC-36	KH3288	Spherical	2.1	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Yellow	0.35	+	-
IC-37	KH3961	Spherical	1.53	Transparent	Transparent	Smooth	Middle	Homogenous	1	Transparent	0.33	-	-
IC-38	KH5466	Spherical	0.96	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.14	+	-
IC-39	KH5513	Spherical	1.36	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.29	+	-
IC-40	-	Spherical	0.73-1.25	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	1	Transparent	0.15-0.30	+	-
ID-01	KH0013	Spherical	2.24-2.76	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous	1	Yellow	0.28-0.40	-	-
ID-02	KH0060	Spherical	0.87-0.96	Transparent	Transparent	Smooth	Middle	Homogenous	1	Transparent	0.19-0.25	-	-
ID-03	KH0771	Spherical	2.17-2.24	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Segmented	1	Transparent	0.33	-	-
ID-04	KH0946	Spherical	1.37-1.47	Transparent	Transparent	Smooth	Middle	Segmented?	1	Transparent	0.18	-	-
ID-05	KH1029	Spherical	0.92-1.10	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous	1	Transparent	0.23-0.25	-	-
ID-06	KH1060	Spherical	2.20-2.34	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Segmented	1	Transparent	0.32-0.35	-	-
ID-07	KH1187	Spherical	2.4	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Segmented	1	Transparent	0.48	-	-



Appendix 3 (continued)

Morphological type	Specimen ID	Egg shape	Diameter (mm)	Chorion		Surface	Perivitelline space	Yolk	Oil globule		Pigmentation		Note
				Color					Number	Color	Diameter (mm)	Melanophore	
ID-08	KH1250	Spherical	2.37	Transparent		Smooth	Wide	Segmented	1	Yellow	+	-	-
ID-09	KH1293	Spherical	1.96	Transparent		Smooth	Wide	Segmented	1	Transparent	-	-	-
ID-10	KH1310	Spherical	1.65	Transparent		Smooth	Wide	Segmented	1	Transparent	-	-	-
ID-11	KH1327	Spherical	1.65	Transparent		Smooth	Wide	Segmented	1	Transparent	+	-	-
ID-12	KH1337	Spherical	1.28-1.30	Transparent		Smooth	Wide	Segmented	1	Yellow	+	-	-
ID-13	KH1620	Spherical	1.64	Transparent		Smooth	Wide	Segmented	1	Transparent	-	-	-
ID-14	KH1750	Spherical	0.95-1.32	Transparent		Smooth	Wide	Homogenous	1	Transparent	-	-	-
ID-15	KH2570	Spherical	2.5	Transparent		Smooth	Wide	Segmented	1	Transparent	-	-	-
ID-16	KH3583	Spherical	2.17	Transparent		Smooth	Wide	Homogenous	1	Transparent	-	-	-
ID-17	KH5233	Spherical	1.10-1.18	Transparent		Smooth	Middle	Homogenous	1	Yellow	-	-	-
IIA-01	KH0158	Spherical	0.90-1.15	Transparent		Polygonal surface (ca. 0.03-0.04 mm)	Narrow	Homogenous	Absent	-	-	-	-
IIA-02	KH0281	Spherical	2.09-2.36	Transparent		Numerous short spines (ca. 0.04 mm)	Narrow	Homogenous	Absent	-	-	-	-
IIA-03	KH0445	Spherical	1.74-2.21	Transparent		Numerous short spines (ca. 0.08 mm)	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	-
IIA-04	KH0496	Spherical	1.89-2.15	Transparent		Numerous filament (ca. 0.5-0.9 mm)	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	-
IIA-05	KH0535	Spherical	1.82	Transparent		Numerous filament (ca. 0.07-0.09mm)	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	-
IIA-06	KH0544	Spherical	2.13-2.44	Transparent		Numerous short spines (ca. 0.02-0.05 mm)	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	-
IIA-07	KH1285	Spherical	1.72-1.82	Transparent		Numerous filament (ca. 0.2-0.4 mm)	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	-
IIA-08	KH2952	Spherical	1.22	Transparent		Pustules around micropyle	?	?	Absent	-	?	-	-
IIB-01	KH1727	Ovoid	0.61-0.62x1.05-1.30	Transparent		Smooth	Narrow	Segmented	Absent	-	-	-	-
IIB-02	KH2604	Spherical	1.14-1.23	Transparent		Smooth	Narrow	Homogenous or segmented?	Absent	-	-	-	-
IIC-01	KH0005	Spherical	2.64-2.99	Transparent		Smooth	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	-
IIC-02	KH0011	Spherical	2.08-2.64	Transparent		Smooth	Narrow	Homogenous	Absent	-	-	-	-
IIC-03	KH0444	Spherical	2.09	Transparent		Smooth	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	-
IIC-04	KH0514	Spherical	2.71-2.88	Transparent		Smooth	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	-

Appendix 3 (continued)

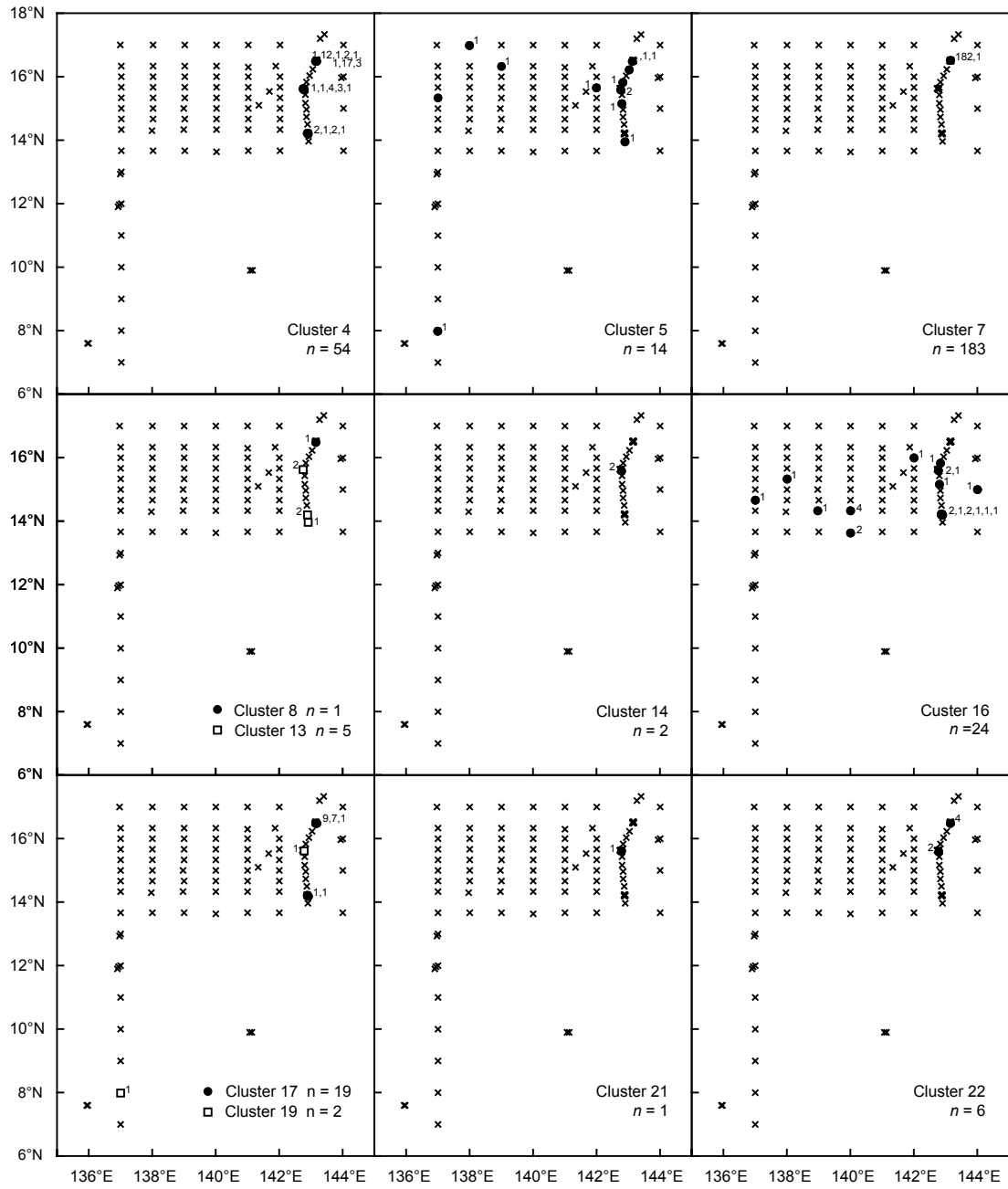
Morphological type	Specimen ID	Egg shape	Diameter (mm)	Chorion		Surface	Perivitelline space	Yolk	Oil globule		Pigmentation		Note
				Color	Color				Number	Color	Melanophore	Xanthophore	
IIC-05	KH0864	Spherical	0.69–0.70	Transparent	Transparent	Smooth	Middle	Homogenous	Absent	-	-	-	
IIC-06	KH1176	Spherical	2.52	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Absent	-	-	-	
IIC-07	KH1264	Spherical	2.10–2.14	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	
IIC-08	KH1586	Spherical	1.62–2.00	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Absent	-	+	-	
IID-01	KH0002	Spherical	2.58–3.86	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous	Absent	-	-	-	
IID-02	KH0198	Spherical	2.42–2.55	Transparent	Transparent	Smooth	Middle	Homogenous	Absent	-	+	-	
IID-03	KH0467	Spherical	2.10–2.30	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	?	Absent	-	-	-	
IID-04	KH0488	Spherical	2.12	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Segmented	Absent	-	-	-	
IID-05	KH1266	Spherical	1.83–2.17	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Segmented	Absent	-	-	Inner egg membrane	
IID-06	KH5655	Spherical	1.75	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Homogenous	Absent	-	-	-	
IIIA-01	KH0853	Spherical	0.95	Transparent	Transparent	Numerous short spines (ca. 0.03 mm)	Narrow	?	Numerous Transparent	<0.08	-	-	
IIIA-02	KH1343	Ovoid	1.31 × 1.35	Transparent	Transparent	Numerous small pustules? around mycropyle	?	?	Present	Transparent	-	-	
IIIA-03	KH1267	Spherical	1.08–1.18	Transparent	Transparent	Numerous short spines (ca. 0.02 mm)	Narrow	Segmented	Numerous Transparent	0.02–0.33	-	-	
IIIB-01	KH0841	Spherical	0.86–0.97	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Segmented	Multiple	Transparent	0.02–0.19	-	
IIIB-02	KH0854	Spherical	0.88	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Numerous	Transparent	<0.07	-	
IIIB-03	KH0956	Spherical	1.08–1.15	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous or segmented?	Multiple	Transparent	0.05–0.09	-	
IIIB-04	KH0982	Spherical	2.26–2.47	Transparent	Transparent	Smooth	Wide	Segmented	Multiple	Transparent	0.04–0.49	-	
IIIC-01	KH1209	Spherical	1.35–1.55	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Numerous	Yellow	0.02–0.10	+	
IIIC-02	KH0278	Spherical	1.23–1.41	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Numerous	Transparent	0.03–0.14	-	
IIIC-03	KH3744	Spherical	1.56–1.89	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Numerous	Transparent	-	-	
IIIC-04	KH0562	Spherical	2.24–2.62	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Numerous	Transparent	<0.08	+	
IIIC-05	KH1190	Spherical	2.37–2.45	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Numerous	Transparent	<0.10	+	
IIIC-06	KH1745	Spherical	1.8	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Numerous	Yellow	<0.13	-	
IIIC-07	KH2690	Spherical	0.99–1.09	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Multiple	Yellow	<0.08	-	
IIID-01	KH0983	Spherical	2.30–2.40	Transparent	Transparent	Smooth	Narrow	Homogenous	Numerous	Transparent	0.02–0.24	-	

**Appendix 4** Summary of the results of DNA species identification of fish eggs collected to the west of the Mariana Islands. The results of comparisons of mitochondrial 16S ribosomal RNA sequences with greater than 99% identities are shown

Specimen ID	Species name	% identity	Alignment length	Accession no. of reference sequence
KH0005	<i>Exocoetus monocirrhus</i>	100.00	460	AY693465 AY693466
KH0011	<i>Lampris guttatus</i>	99.77	433–1059	DQ027908 AP002924 EU099476 KY23401 KY23402
KH0013	<i>Myrichthys maculosus</i>	99.83–99.87	787–1181	AP010862 DQ645692
KH0036	<i>Remora osteochir</i>	99.40	1175	FJ374801
KH0053	<i>Katsuwonus pelamis</i>	99.82	1119	AB101290 GU256527
KH0055	<i>Scombrolabrax heterolepis</i>	99.63	1075	KY12204
KH0060	<i>Thunnus alalunga</i>	99.81	1075	AB101291 GU256526
	<i>Thunnus albacares</i>	99.44	1075	GU256528
	<i>Thunnus maccoyii</i>	99.53	1075	GU256523
	<i>Thunnus obesus</i>	99.44	1075	GU256525 GQ461734
	<i>Thunnus orientalis</i>	99.81	1075	AB185022 GU256524
	<i>Thunnus thynnus</i>	99.53	1075	GU256522
	<i>Thunnus thynnus thynnus</i>	99.53	1075	AB097669 AY302574 EU078992
	<i>Thunnus tonggol</i>	99.63	1075	GU325784
KH0063	<i>Brama orcini</i>	99.32	1036	KY13627
KH0128	<i>Argyropelecus hemigymnus</i>	99.52	413	EU099497
KH0169	<i>Ventrifossa garmani</i>	99.09	438–1051	AB298273 DQ648433 AP008991
	<i>Ventrifossa longibarbata</i>	99.14	465	DQ648434
KH0199	<i>Scopelogadus mizolepis</i>	99.56–99.72	1078–1127	AP002934 KY12206
KH0278	<i>Brama orcini</i>	99.71	1034	KY13627
KH0281	<i>Regalecus glesne</i>	99.61	383–518	EU099465 AY368296 DQ532951 HQ127659
KH0445	<i>Oxyporhamphus micropterus</i>	99.28	419	AY693460 AY693459
KH0496	<i>Cheilopogon cyanopterus</i>	99.75	403	AB444862
	<i>Cheilopogon dorsomacula</i>	100.00	416	AY693467 AY693468
	<i>Cheilopogon pinnatibarbatus</i>	99.24	393–403	AY846746 AB444860
	<i>Cheilopogon spilonotopterus</i>	99.04	417	AY693473
	<i>Cypselurus pinnatibarbatus japonicus</i>	99.19	370	AB188717
	<i>Hirundichthys marginatus</i>	99.04	417	AY693461 AY693462
KH0535	<i>Cheilopogon cyanopterus</i>	99.78	447	AB444862
	<i>Cheilopogon dorsomacula</i>	100.00	460	AY693467 AY693468
	<i>Cheilopogon pinnatibarbatus</i>	99.33	447	AB444860
	<i>Cheilopogon spilonotopterus</i>	99.13	461	AY693473
	<i>Hirundichthys marginatus</i>	99.13	461	AY693461 AY693462
KH0562	<i>Lphotus capellei</i>	100.00	952	KY23404
KH0667	<i>Xiphias gladius</i>	99.81	532–1188	GU324166 GQ273738 AB470301
KH0693	<i>Istiophorus platypterus</i>	99.02	1117	AB470306
	<i>Makaira indica</i>	99.19	787–1117	AB470305 GQ282626
	<i>Makaira mazara</i>	99.91	1116	AB470304
	<i>Tetrapturus audax</i>	99.10	1117	AB470302
KH0841	<i>Scopelogadus mizolepis</i>	99.63	1079–1084	KY12206 AP002934

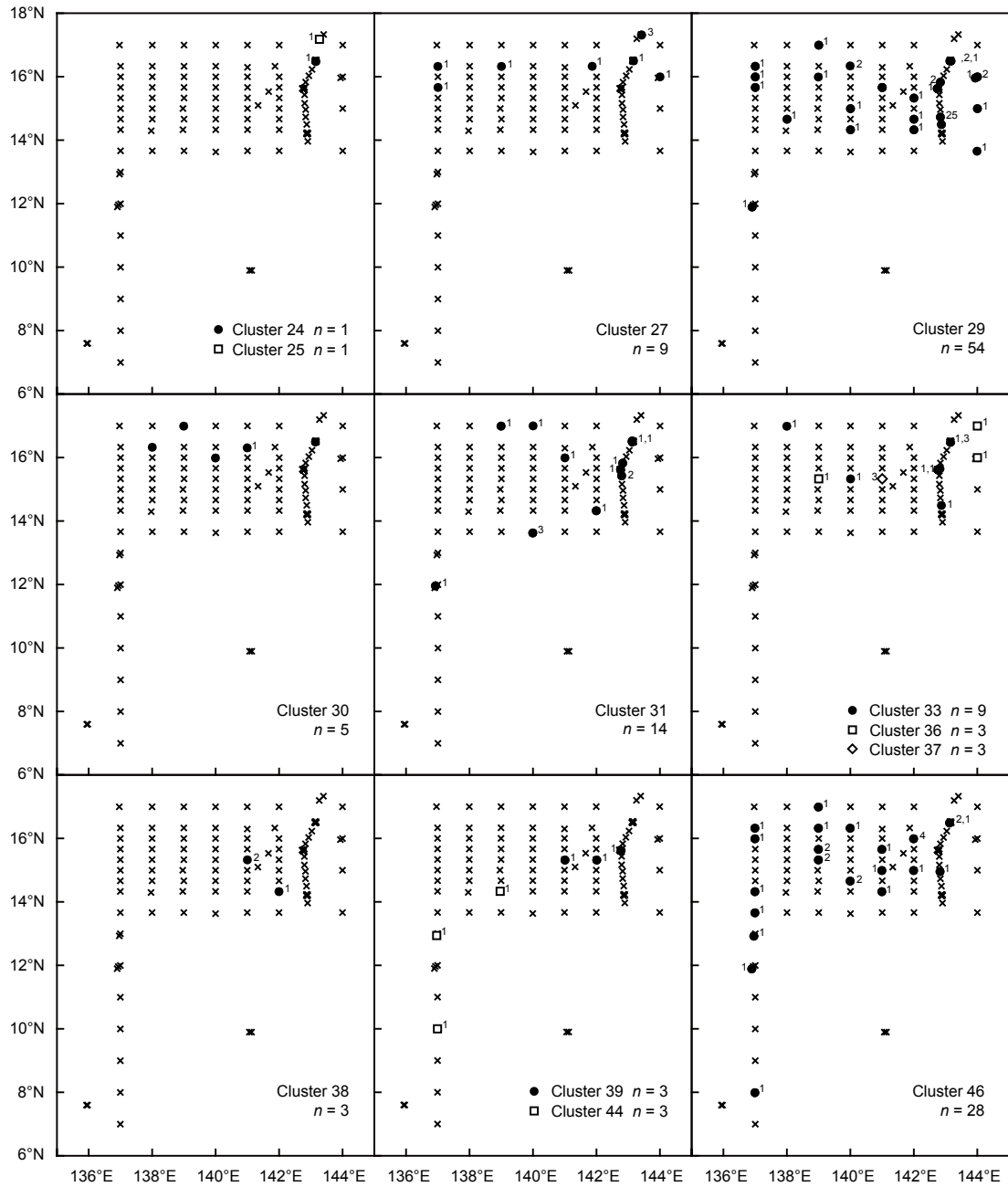
Appendix 4 (continued)

Specimen ID	Species name	% identity	Alignment length	Accession no. of reference sequence
KH0854	<i>Scopelogadus mizolepis</i>	99.44	1078–1081	AP002934 KY12206
KH0954	<i>Psenes cyanophrys</i>	100.00	1104	AP011067
KH0956	<i>Diplophos taenia</i>	99.44	429–1065	AB034825 AB026031 EU099499 KY12409 KY12602
KH0982	<i>Derichthys serpentinus</i>	99.19	737–1080	DQ645696 AP010851
KH0983	<i>Derichthys serpentinus</i>	99.32	739–1082	DQ645696 AP010851
KH1060	<i>Serrivomer sector</i>	99.26	1084	AP007250
	<i>Serrivomeridae sp. 975</i>	99.34	453	AB049581
	<i>Serrivomeridae sp. 995</i>	99.56	453	AB049582
KH1187	<i>Derichthys serpentinus</i>	99.32	739–1083	DQ645696 AP010851
KH1204	<i>Phtheirichthys lineatus</i>	99.56	1134	FJ374803
KH1209	<i>Ranzania laevis</i>	100.00	1190	AP006047
KH1210	<i>Brama orcini</i>	99.71	1034	KY13627
KH1211	<i>Tetrapturus angustirostris</i>	99.92	1180	AB470303
	<i>Tetrapturus audax</i>	99.07	1181	AB470302
KH1263	<i>Lphotus capellei</i>	99.89	952	KY23404
KH1264	<i>Zu cristatus</i>	99.63	1076	KY13602
KH1267	<i>Microstomatidae sp.</i>	99.53	1066	KY12213
KH1285	<i>Cheilopogon cyanopterus</i>	99.55	440	AB444862
	<i>Cheilopogon dorsomacula</i>	99.78	453	AY693467 AY693468
	<i>Cheilopogon pinnatibarbatus</i>	99.09	415–440	AB444860 AY846746
	<i>Cypselurus pinnatibarbatus japonicus</i>	99.02	407	AB188717
KH1337	<i>Eustomias enbarbatus</i>	99.52	1052	KY13606
KH1343	<i>Lactoria diaphana</i>	100.00	1117	AP009187
KH1356	<i>Synagrops japonicus</i>	99.81	1075	KY13603
KH1524	<i>Remora osteochir</i>	99.26	1074	FJ374801
KH1727	<i>Encrasicholina punctifer</i>	100.00	1071	AP011561
KH2570	<i>Nessorhamphus ingolfianus</i>	99.91	1083	AP010850
KH2692	<i>Thunnus alalunga</i>	99.53	1075	AB101291 GU256526
	<i>Thunnus albacares</i>	99.72	1075	GU256528
	<i>Thunnus maccoyii</i>	99.81	1075	GU256523
	<i>Thunnus obesus</i>	99.72	1075	GU256525 GQ461734
	<i>Thunnus orientalis</i>	99.72	1075	GU256524 AB185022
	<i>Thunnus thynnus</i>	99.81	1075	GU256522
	<i>Thunnus thynnus thynnus</i>	99.81	624–1075	AB097669 AY302574 EU078992
	<i>Thunnus tonggol</i>	99.91	1075	GU325784
KH2716	<i>Cephalopholis formosa</i>	99.34	455	AY704910
	<i>Cephalopholis sonnerati</i>	99.59	485–495	AF297307 DQ088037
KH3744	<i>Diodon hystrix</i>	99.80	488	AY679637
KH3961	<i>Remora osteochir</i>	99.54	1090	FJ374801
KH5655	<i>Fistularia commersonii</i>	99.31	434–1066	AP005987 GQ902000–GQ902011

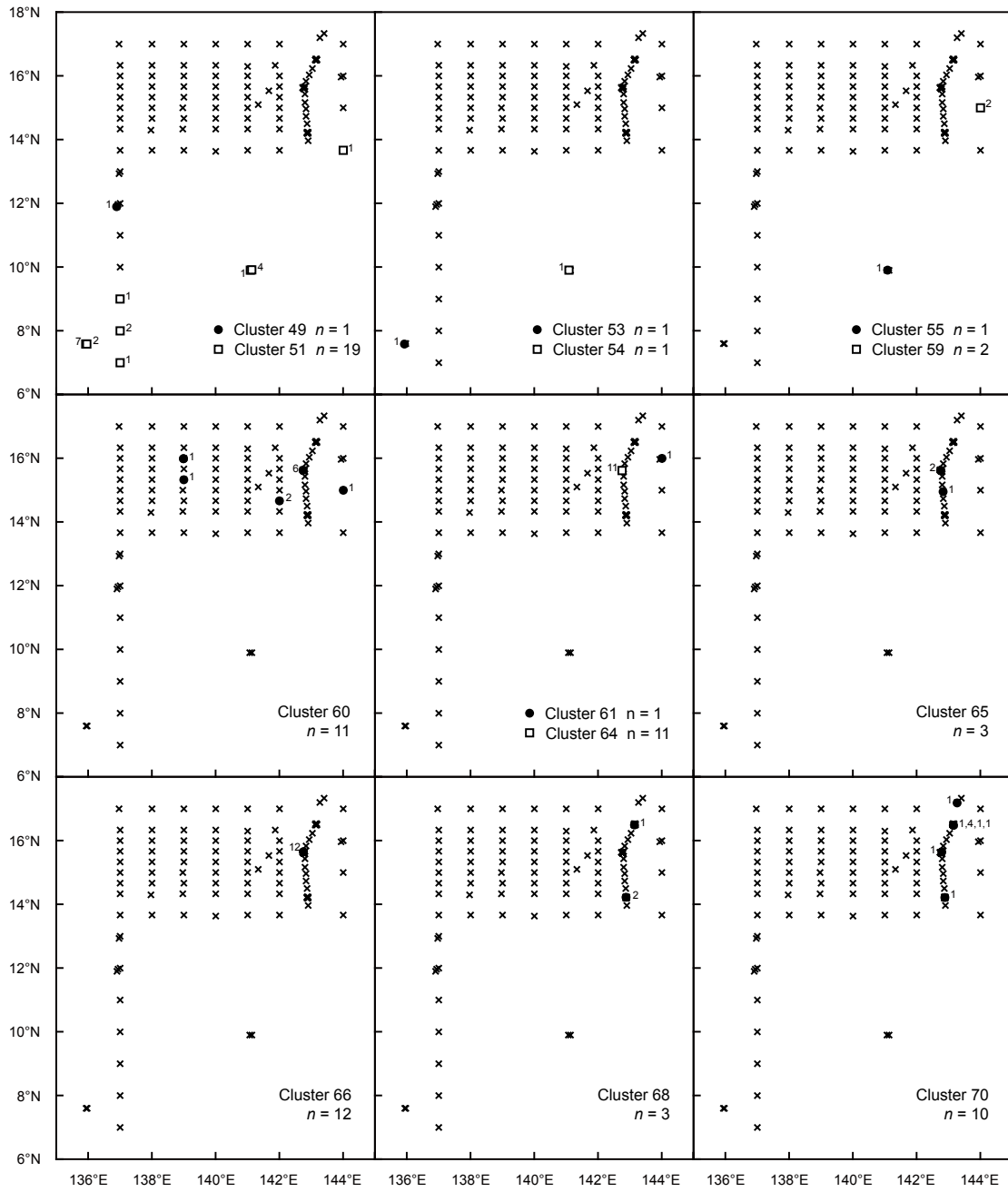


**Appendix 5** Presence of eggs classified as 10 clusters (4, 5, 7, 8, 14, 16, 17, 19, 21 and 22) based on 16S ribosomal RNA sequences, during the KH-02-2 sampling survey. Each symbols and crosses indicate present and absent stations, respectively. Numerals indicate the number of eggs collected

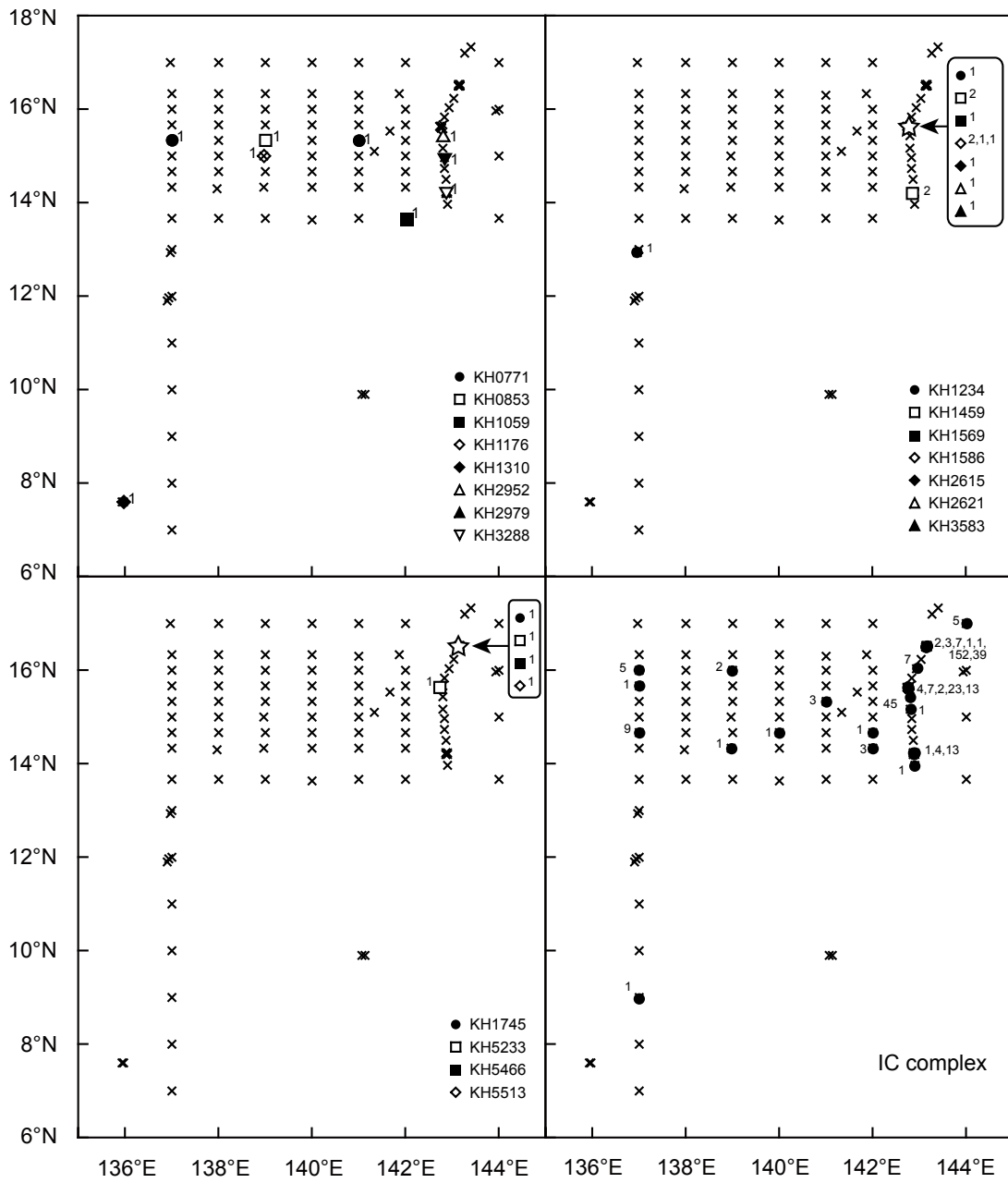




**Appendix 6** Presence of eggs classified as 13 clusters (24, 25, 27, 29, 30, 31, 33, 36, 37, 38, 39, 44 and 48) based on 16S ribosomal RNA sequences, during the KH-02-2 sampling survey. Each symbols and crosses indicate present and absent stations, respectively. Numerals indicate the number of eggs collected



**Appendix 7** Presence of eggs classified as 13 clusters (49, 51, 53, 54, 56, 59, 60, 61, 64, 65, 66, 68 and 70) based on 16S ribosomal RNA sequences, during the KH-02-2 sampling survey. Each symbols and crosses indicate present and absent stations, respectively. Numerals indicate the number of eggs collected



**Appendix 8** Presence of eggs those were morphologically divided into 20 types during the KH-02-2 sampling survey. Those eggs were not subjected for 16S ribosomal RNA analysis. Each symbols indicate presence of each morphological type and crosses are absent stations. Numerals indicate the number of eggs collected