

急峻な山岳地形を有する室戸半島の河川における水生昆虫の流程分布

竹中將起（筑波大学・菅平高原実験所）

現在世界中で生物の多くが絶滅の危機に瀕しており、生物の保全は急務の課題である (Ceballos et al., 2015; Dirzo et al., 2014). 効果的な保全対策のためには、その地域の生物多様性を把握することは不可欠である。生物多様性には、「生態系の多様性」、「種の多様性」、そして「遺伝的多様性」の3つのレベルがあり、自然環境を守ることや、種を保全するだけでなく「遺伝的多様性」にも注目しなくてはならない。特に、国外の外来種問題だけでなく国内外来種の問題についても注目されている（国内の異なる地域の集団が在来集団の生態系を破壊してしまう問題）。日本列島は、世界の中でも種多様性や固有性が高く、生物多様性のホットスポットに指定されている (Marchese, 2015; Motokawa & Kajihara, 2017; Tojo et al., 2017). その中でも、室戸半島のようなジオパークは、より活発な地殻変動の影響を経験し、日本列島の中での生物多様性のホットスポット、つまり、ホットスポット内のホットスポット地域であるといえる。特に、室戸半島は四国山地や太平洋に囲まれ他の地域から隔離されがちは半島であることから、室戸半島の生物多様性を理解することは急務の課題と言える。

本研究課題においては、新しい角度から室戸半島の生物多様性を解き明かすことを目的とした。生物の高い種多様性や遺伝的多様性は、種分化後に、多くの種や系統が同じ空間に共存しなければ、高い多様性は維持されない。近縁種が異なる環境に適応することで同じ河川に共存する「多種共存」に着目した生物多様性の理解を目指す。河川は、上流から下流にかけて劇的に環境を変化し、各流程にはそれぞれの環境に適応した種が生息している流程分布が知られている (Ogitani and Nakamura 2008; Ogitani et al. 2011; Okamoto and Tojo 2021; Okamoto et al. 2022a). そこで、上流から下流域にかけて生物群集の流程分布を理解することで河川生態系全域の生物多様性の理解を試みる。

さらに、本研究では特殊な河川における生物の流程分布の傾向について調べることで、生物がいかに関それぞれの環境に適応しているのかについて調べる。島嶼や半島のような特殊な環境では、上流域的な環境のまま海に流れるような特殊な環境があることが多い。特に、室戸半島は急峻な山岳地域であり太平洋に突出した半島である。つまり、下流域環境がなく下流域の種が不在の場合、種間相互作用の影響が変わってくるのが期待される。室戸半島の対照河川として、先行研究において詳細にモンカゲロウ属とチラカゲロウの流程分布が調べられている岡山県旭川を選んだ。岡山県の旭川において、モンカゲロウ属3種の流程分布は詳細に調査されている (Okamoto et al., 2022a). また、チラカゲロウは、日本列島内に大きく2つの隠蔽種が報告されており (Saito and Tojo, 2016), 2つの隠蔽種は、旭川において上流と下流域に流程分布していることが示してきた (未発表). Okamoto et al. (2022a) は、モンカゲロウ属のフタスジモンカゲロウ *Ephemera*

japonica が上流に、モンカゲロウ *Ephemera strigata* が中流に、そしてトウヨウモンカゲロウ *Ephemera orientalis* が下流に分布する傾向を示した。また、これら3種の分布は大きくオーバーラップしていることも明らかにした。さらに、長野県松本市の女鳥羽川において、モンカゲロウ属の分布には種間相互作用が強く影響していることを示唆している (Okamoto et al., 2022b)。つまり、岡山県旭川の流程分布についても種間相互作用が各種の分布に影響しており、潜在的な適応環境は広いことが予想される。そこで、下流環境のない室戸半島において各種の流程分布を調査することで、下流域種が不在時に中流域種や上流域種がどのような分布パターンかを調べることで、各種の適応している環境と、種間相互作用との関連について詳細に考察できると考えている。下流域の近縁種の不在時における生物の分布傾向について調べることは、その生物がいかに関与を決定しているのかを追究する最適な条件であると言える。

本研究課題では、室戸半島の河川棲生物を対象に河川流程を考慮した生物多様性、および遺伝的多様性について調べた。1つ目は、急峻な山岳地域であり太平洋に突出した室戸半島において、下流環境の有無や下流域種の分布、そして急峻な河川における流程分布について調べる。その結果と、これまでに岡山県で報告されている結果と比較し、室戸半島の河川棲生物の流程分布について考察する。2つ目に、多くの河川棲生物が河川流程のそれぞれの環境に適応しているが、流域内に広域的に生息している種群も稀に知られている。このような広域分布を示す種を対象に分子系統解析を実施した結果、流程ごとに遺伝的に分化していることが示唆されてきた (例、エルモンヒラタカゲロウ *Epeorus latifolium* やマツムラヒラタカゲロウ *Epeorus l-nigrus* : Ogitani et al., 2011, キイロヒラタカゲロウ: Takenaka et al., 2021)。私たちの室戸半島の河川における調査の結果、シロハラコカゲロウ *Baetis thermicas* は飛沫帯から源流域、上流域、そして下流域の広域から採集できた。そこでシロハラコカゲロウを対象に遺伝子解析を実施した。また、昨年度の助成により未記載種の存在が示唆されていたトビイロカゲロウ類について調べた。最後に、河川流程のそれぞれの環境は上流から下流にかけて劇的に変化していくが、各環境の空間的な配置も大きく異なる。生物の適応する環境の空間的な配置と、その生物の遺伝構造は大きく関連している (Arribas et al., 2012; Hof et al., 2012; Takenaka et al., 2021b)。河川上流域の環境は、下流域の環境と比べて孤立・散在的なパッチ状の分布傾向にあり、上流域の集団サイズは比較的小さい。下流域の環境は連続的に存在しているため、集団間の接続性が強くなり遺伝子流動が頻繁に生じて遺伝的な均質化が生じやすい。また、上流域に適応した種の集団サイズは小さくなりがちであり、比較的遺伝的浮動の影響を受けて遺伝的に固定化しやすい。これらのことから上流域に適応した種は地理的に近い場合であっても遺伝的に分化しやすく、遺伝的な地域性を検出しやすい (Hughes et al., 2013; Tojo et al., 2017; Takenaka and Tojo, 2019)。これらのことから、適応する環境の空間的配置は、その種の遺伝構造に影響している。さらに本研究の新しい試みとして、上流、中流、下流域という抽象的な概念ではなく、環境データに基に河川

の流程を評価することで、各環境とそこに適応する生物集団との関連をより詳細に理解する。

これらの大きく3つの課題を解明するために、室戸半島において定量調査と定性的な調査を合わせて、室戸の河川における生物の流程分布に着目した生物多様性を理解する。

方法

2022年1月7日から13日において室戸半島で定量調査と定性調査を実施した。本研究は、河川の流程に沿った生物の流程分布と種多様性と遺伝的多様性を評価することであるため、室津川、東の川、佐喜浜川の各流程において調査を計画した。しかし、河川流路が10kmの室津川において中流から上流の約5kmが伏流し、河道が干上がっていた。そのため、河川流程にそった生物の調査は困難となった。同じ頃にニュースで室戸の河川が水不足により干上がっていることが報道されており、特に雨の少ない年だったのかもしれない。そこで、計画を一部変更し室戸市内の河川から室戸半島広域を対象に広げ、東の川、奈半利川、安芸川、海部川、そしてこれらの太平洋に注ぐ河川と分水嶺を超えた物部川と那賀川を含めた6河川に変更した(表1; 末尾参照)。これらの河川を用いることで、流程分布だけでなく河川間の関係や、分水嶺を超えた河川間の遺伝的な関係性についても評価が可能となった(図1)。

また、6つの河川のうち東の川、安芸川においては、上流2箇所、中流2箇所、下流

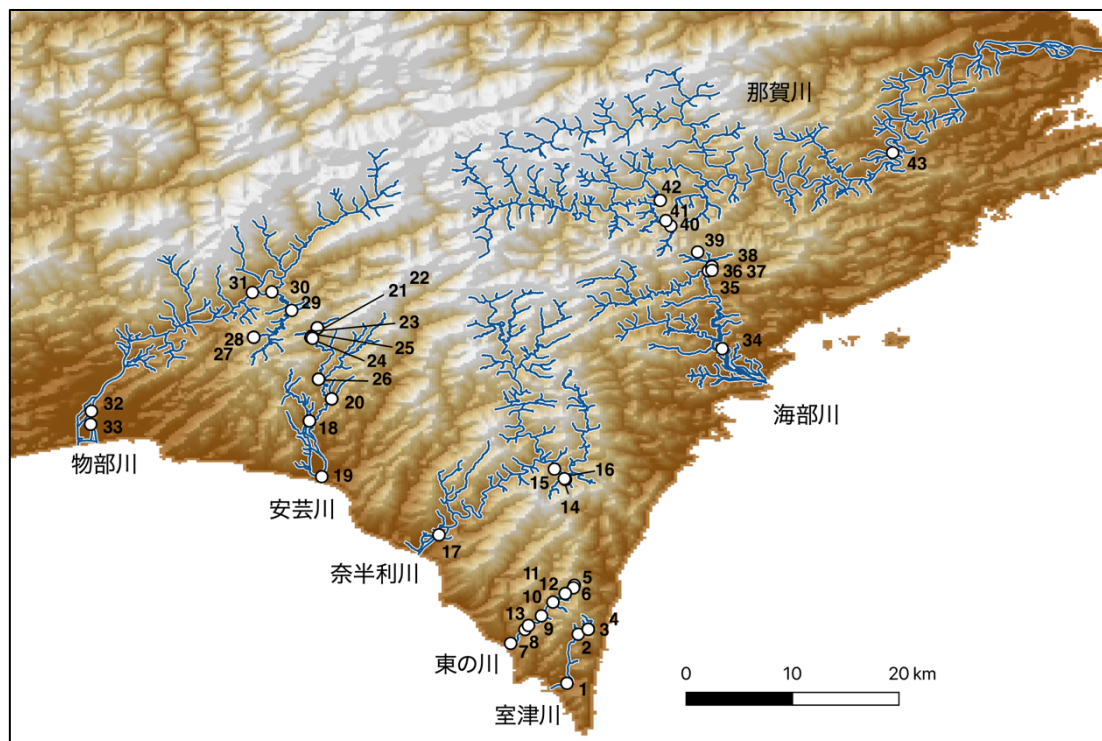


図1. 室戸半島において調査した河川、室戸半島およびその周辺の河川を含めた6つの河川を対象とした。すべての河川において飛沫帯、源流、上流、中流、そして下流域の各流程を調査地点とした。

2箇所において、30cm×30cmのコドラートを瀬4回、淵4回の定量調査と、定性的な調査を実施した。また、源流域と飛沫帯において定性調査を実施した。この2つの河川を選定した理由としては、東の川と安芸川が対照的な河川だからである。東の川は、上流から下流にかけて急峻な勾配のまま海に降る河川であり、安芸川の最下流域は安芸市の平野を流れるため勾配が緩くなる。さらに、そのほかの4河川においては飛沫帯、源流、上流、中流、下流域の定性調査を実施した。本報告書においては、全ての河川の結果を反映させるために、定性調査の結果を示す。また、本研究の特色として河川環境を上流、中流、下流と区分するのではなく、環境データに基づいて評価した。環境データに関しては、標高や河川規模に影響せず（相関しない）、河川の「上流らしさ」や「下流らしさ」を表す指標として用いられている底質粗度と勾配を用いて評価した。

定量調査、および定性調査において、全ての群集を把握するのではなく、大まかに分類群を絞って調査した。なぜなら、河川上流から下流にかけて流程分布する傾向に関しては、多くの論文が整理している。しかし、生物の分布はその環境だけでなく、その分類群ごとの進化の歴史にも大きく影響する。そのため、流程分布の傾向や、種ごとの分布、遺伝的多様性を比較するとき、近縁種を比較しなくては、環境ごとの生物多様性の変化か、分類群ごとの進化の歴史の違いかをわけることができない。そこで、河川流程に沿って流程分布することが知られているモンカゲロウ属 *Ephemera*、ヒラタカゲロウ属 *Epeorus* を対象とした。また、広い河川流程において単一種が生息するチラカゲロウ *Isonychia japonica*、シロハラコカゲロウ *Baetis thermicas*、トビイロカゲロウ属 *Paraleptophlebia* を加えた。

採集したサンプルは、現地で99.5%エタノールに保存し、研究室に持ち帰った。

持ち帰ったサンプルは、Takenaka and Tojo (2019)や Takenaka et al. (2021)を参考に遺伝子解析を実施し、系統解析に関しても同様に実施した。遺伝子領域は、昆虫類の一般的なDNA barcoding 領域であり、多型を検出しやすいことが知られているミトコンドリア遺伝子 COI 領域を解析した。遺伝構造を調べるためのネットワーク解析は、PopART (Population Analysis with Reticulate Trees; <http://popart.otago.ac.nz/index.shtml>)を用いて、系統樹作成にはMEGA 7 (Kumar et al., 2016)を用いた。

結果・考察

特殊な河川における河川棲生物種群の流程分布

室戸半島は、急峻な山岳地形が太平洋に面しているため、河川が急勾配のまま海に降る。つまり、一般的な河川と異なり下流域環境が欠けていると期待される。岡山県の旭川における先行研究において、モンカゲロウ属3種の流程分布 (Okamoto et al., 2022a)と、チラカゲロウの2つの隠蔽種が旭川の上流と下流域で流程分布していることを示している (未発表)。そこで、一般的な旭川と特殊な室戸半島の河川を比べ、河川棲生物の流程分布の傾向について調べた。

室戸半島の各調査地点と先行研究の旭川の調査地点の環境データを基にクラスター解析を実施した結果、上流と下流、そして中流域内で上流よりと下流よりの環境の4つのクラスターに分かれた(図2)。上流環境と評価された地点にはフタスジモンカゲロウが多く採集され、中流(下)にはモンカゲロウのみが採集され、これら2つの間に位置する中流(上)には、両種が採集され、旭川と同様の傾向を示した(図2)。

そして、本研究の注目している下流環境に関しては、室戸半島の河川からは検出されなかった。唯一、st. 43 の那賀川の下流域は室戸半島の河川と分水嶺をこえた河川として選定した那賀川である。しかし、この地点を含めて下流域種であるトウヨウモンカゲロウは採集できずに、中流域種であるモンカゲロウが採集される結果となった。

つまり、室戸半島は、当初の予想通り下流環境が欠けた特殊な河川であるため、トウヨウモンカゲロウは分布していないと考えられる。一方で、旭川においては中流域においてもトウヨウモンカゲロウは分布している。それらの地点と類似した地点 [st. 17 (奈半利川), 18 (安芸川)] は、室戸半島の河川にも存在しているが、室戸半島においては、モンカゲロウのみが採集された。同様に、チラカゲロウの2つの隠蔽種についても同様の傾向が示された。Saito and Tojo (2016) は、チラカゲロウ旭川において上流と下流において異なる遺伝系統群が分布しているが、室戸半島の河川においては、上流系統のみが検出された。トウヨウモンカゲロウと同様に下流環境がかけているため、下流系統が生息できないと考えられる。

室戸半島の急峻な河川においては、勾配が急であり下流環境が存在しないために、下流域に適応した種や系統は生息できないと考えられる。また、旭川において下流域種や系統が生息している環境と類似していたとしても、下流域の種や系統が分布できない要因については、今後詳細に調べていく必要はあるが、水生昆虫の特徴から説明できる。水生昆虫の幼虫は、上流から下流に移動することは容易であるが、その逆は困難である。そのため、成虫期に遡上する行動が知られている。しかし、室戸半島には下流域種が生息できる環境はほんの一部しか存在していないために、流下しながら海にまで降ってしまい生存に適する下流域の範囲が足りないことも予想される。また、st. 43 のように下流域の環境であっても下流域の種が不在であるため、上流や中流域に適応した種や系統が分布域を拡大していることが示唆される。本研究においては、室戸半島のどの地点においても下流環境が存在しなかったため、明確な傾向は示すことができなかったが、下流域種が不在時の河川棲生物の流程分布を初めて示すことができた。

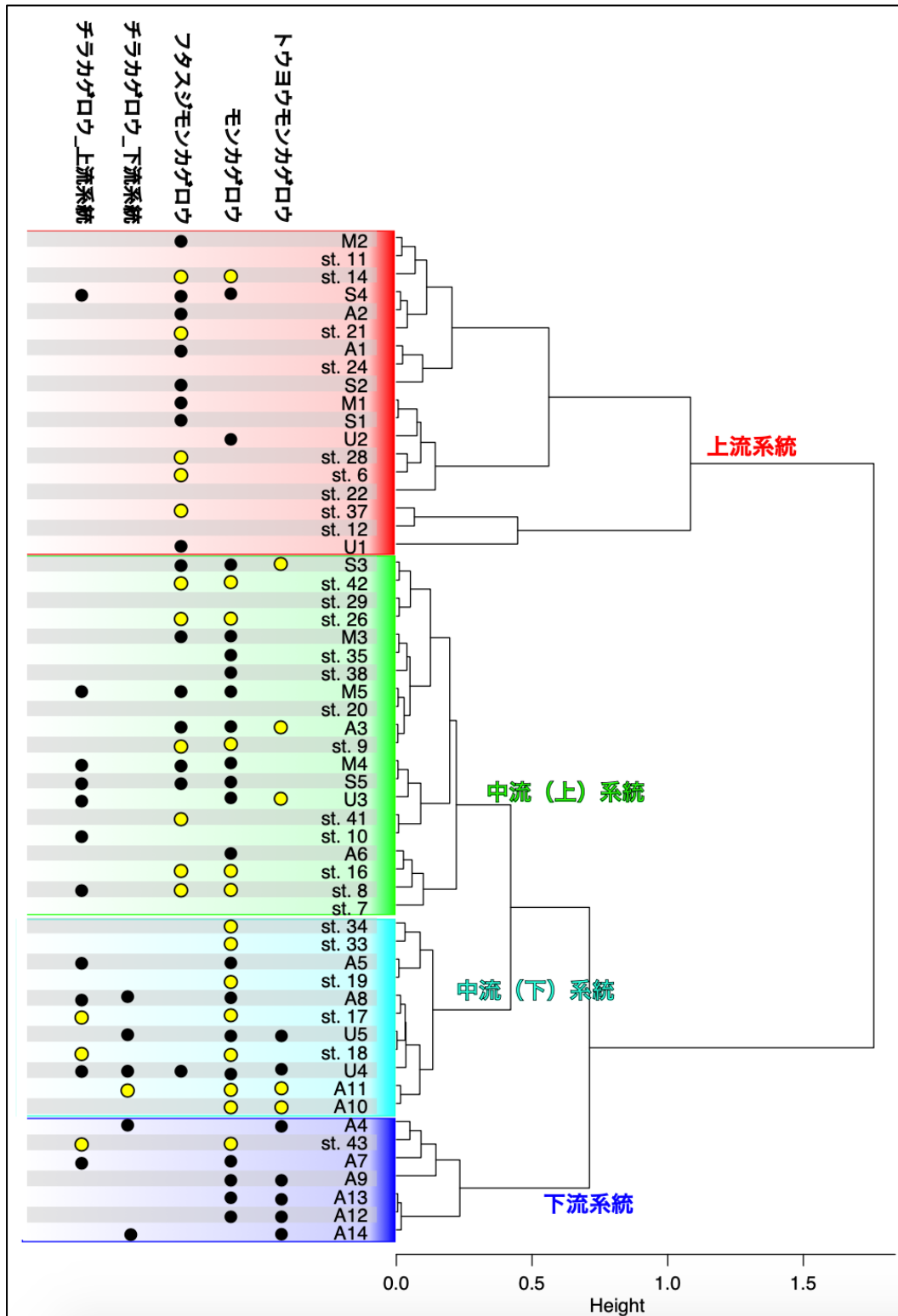


図2. 室戸半島の調査地点における環境データを基にクラスター解析を実施した結果。環境データ () を基に、上流、より上流よりの中流(上)と下流よりの中流(下)、そして下流の4つのクラスターに分かれた。室戸半島の各河川と旭川におけるモンカゲロウ属3種とチラカゲロウの2つの隠蔽種(上流系統と下流系統)の採集された地点をプロ

河川流程に沿った隠蔽種の発見

広域な分布域や、広域の環境に適応する種を対象に、分子系統解析を実施した結果、地域ごとや環境ごとに未記載種や隠蔽種の発見が報告されている (Ueda et al. 2012; Yano et al. 2019). そこで、室戸半島において飛沫帯から下流域にかけて分布していることが確認されたシロハラコカゲロウと昨年度の助成において未記載種を発見したトビイロカゲロウを対象に遺伝子解析を実施した.

シロハラコカゲロウは、河川の上流から下流域にかけて広範囲の環境に生息しているだけでなく、日本列島において琉球列島の離島も含めて広域の地域に分布している広域分布種である. シロハラコカゲロウの遺伝子解析の結果、「飛沫系統」「上流系統」「下流系統」の大きく3つの遺伝系統群を検出した. これらの遺伝系統群間の遺伝的分化の程度は大きく、すでに別種に相当している. つまり、河川の広域に適応していると考えられてきたシロハラコカゲロウは、河川の流程ごとに種分化していることを明らかにし、少なくとも2つの未記載種、もしくは隠蔽種を発見することができた. 今後、これらの地点において成虫を採集し、分類学的な研究を進めていく予定である.

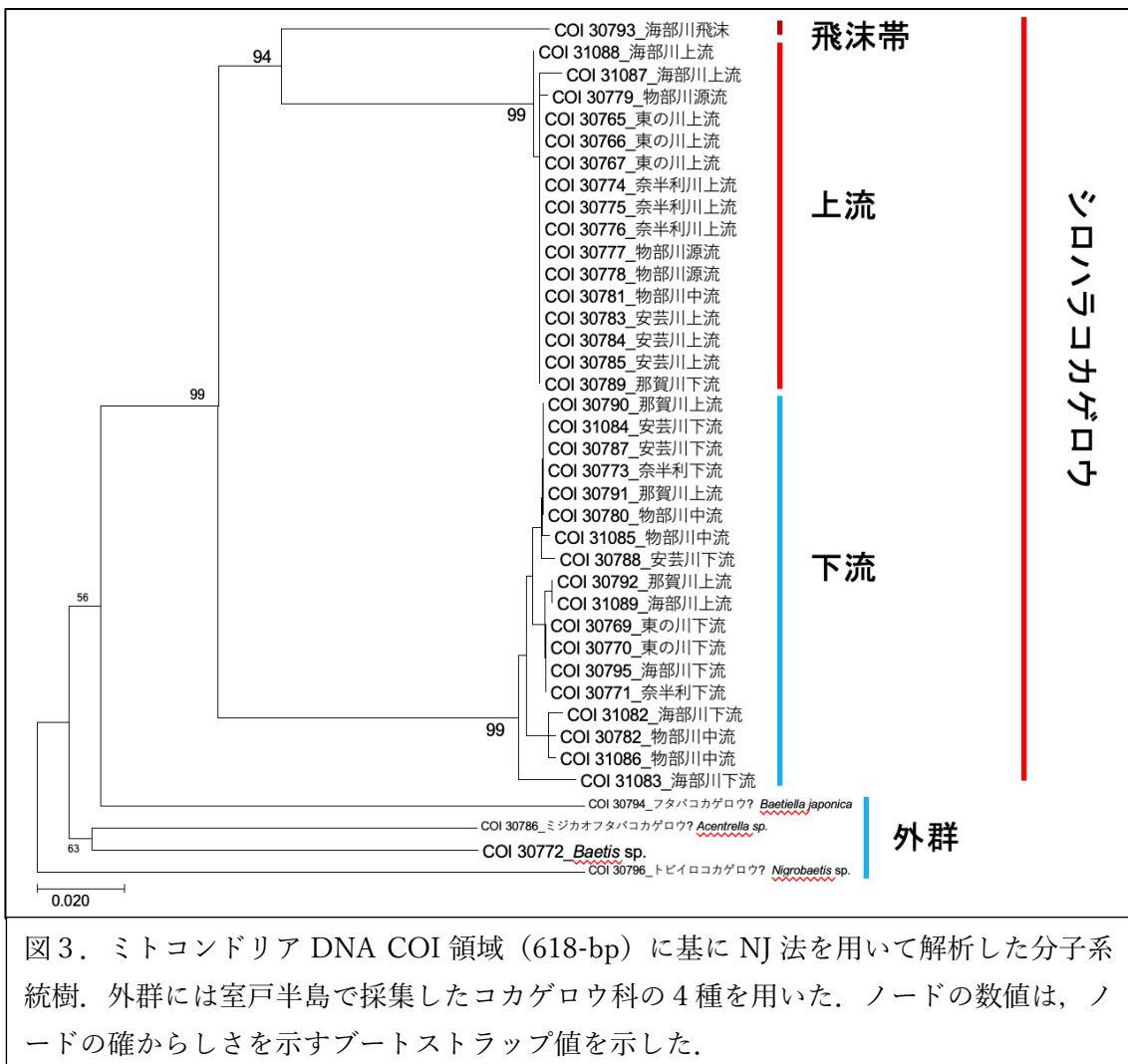


図3. ミトコンドリア DNA COI 領域 (618-bp) に基に NJ 法を用いて解析した分子系統樹. 外群には室戸半島で採集したコカゲロウ科の4種を用いた. ノードの数値は、ノードの確からしさを示すブートストラップ値を示した.

日本列島広域におけるトビイロカゲロウの遺伝子解析の結果、8つの遺伝系統群に分化していることが示唆され、それぞれの系統が各環境に適応していることが示唆されている。昨年度の成果において、8つのうちの1つの系統（クレード8）が室津川から検出されていた。本年度の調査の結果、東の川と安芸川の上流域から異なる系統（クレード2と3）が、検出された。今回の調査期間である1月には、トビイロカゲロウの採集を効率よく実施できなかつたため、網羅的な解析結果を得られなかつたものの、昨年度からさらに2つの遺伝系統群（未記載種；いわゆる新種）を発見することができた（サンプル数が少ないために系統樹は示していない）。

河川流程ごとの集団の遺伝構造

生物の適応する環境の空間的な配置と、その生物の遺伝構造は大きく関連している (Arribas et al., 2012; Hof et al., 2012; Takenaka et al., 2021b)。これまでに河川の各流程に適応する種の遺伝構造を比較した研究はいくつか報告されているが、近縁種間を比較した研究事例は多くない。はじめにも述べたが、遺伝構造は様々な要因が影響しているた

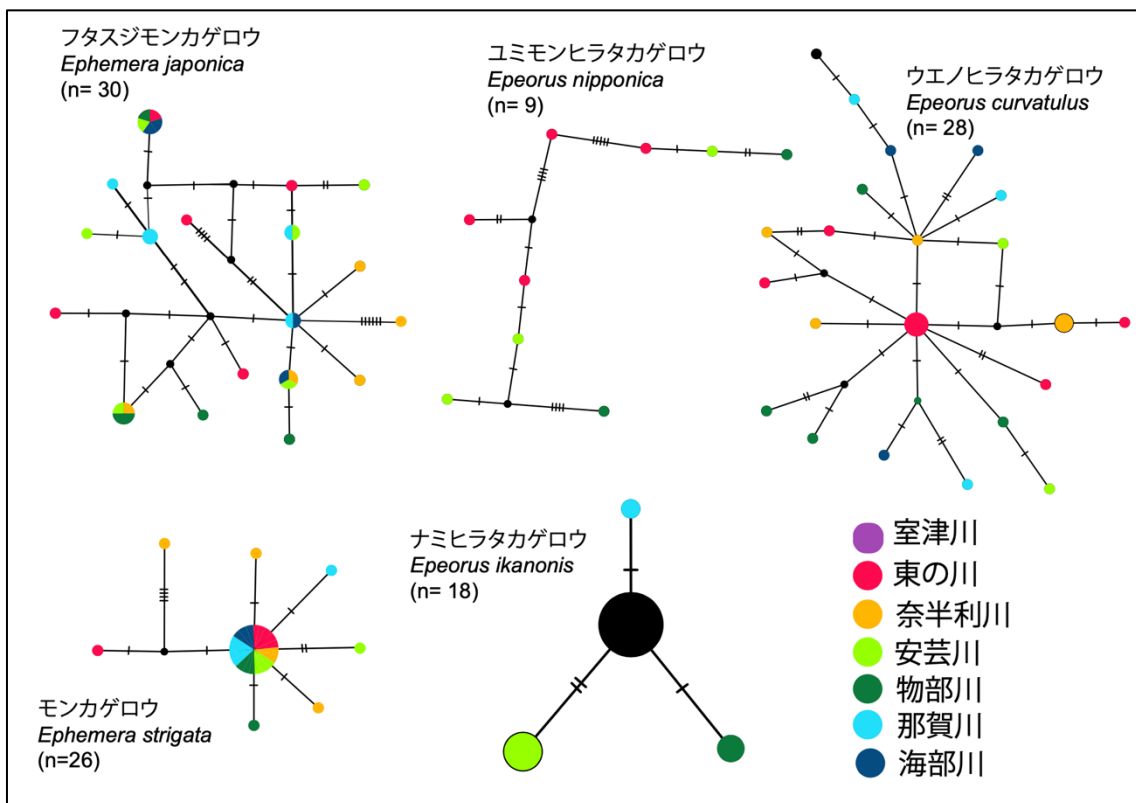


図4. ミトコンドリア遺伝子 COI 領域を基に作成したハプロネットワーク図. モンカゲロウ属2種とヒラタカゲロウ属3種を示した. 基本的に6つの河川において各種5個体を目指して解析を実施した. 円のひとつが、一つの遺伝子型（ハプロタイプ）を示し、一つ円どうしの関係は塩基配列の違いを示している. 黒い丸や棒線は今回の解析では検出しなかつた仮想ハプロタイプ.

め、近縁種との間で比較することで、適応する環境の影響を調べることができる。そこで、本研究ではモンカゲロウ属2種の遺伝構造を比較し、同様にヒラタカゲロウ属3種の遺伝構造を比較した。その結果、上流域種のフタスジモンカゲロウの遺伝構造は、ハプロタイプ間の遺伝的な差異は大きく、特定のハプロタイプに優占するようなことはなく、多くのハプロタイプが検出される遺伝構造を示した。一方で、モンカゲロウは1つのハプロタイプ(大きな円)が多くのサンプルから検出され、そのハプロタイプから数塩基違いのハプロタイプで構成されており、比較的遺伝的に均質化していることが確認できた。同様にヒラタカゲロウ属3種の遺伝構造についても類似した傾向が見られた。ユミモンヒラタカゲロウ、ウエノヒラタカゲロウ、ナミヒラタカゲロウは山地溪流(上流)～平地中流に分布している(川合・谷田, 2005)。Ogitani and Nakamura (2008)は、長野県伊那市の小黒川においてヒラタカゲロウ類の流程分布を調べ、ユミモンヒラタカゲロウが比較的上流に、ウエノヒラタカゲロウはユミモンヒラタカゲロウより下流域に生息していることが示されている。ナミヒラタカゲロウに関しては他2種との流程分布の傾向については不明であるが、小黒川より下流域の天竜川本流に分布していると予想される。つまり、ユミモンヒラタカゲロウが最も上流に生息し、ウエノヒラタカゲロウ、ナミヒラタカゲロウの順番に流程分布している。ただし、ヒラタカゲロウ属3種に関しては、分布は大きくオーバーラップしており、河川の縦方向だけでなく、同じ流程の中の横断面の棲み分けも知られていることから、これらの種の流程分布に関してはより詳細な調査が必要である。その中で、これら3種の遺伝構造に関して、ユミモンヒラタカゲロウとウエノヒラタカゲロウは、フタスジモンカゲロウに類似した遺伝構造を示した。ユミモンヒラタカゲロウは、室戸半島の河川において多くを採集できなかったため、サンプル数が少ないためウエノヒラタカゲロウよりも遺伝分化が少ないように見えるが、ハプロタイプ間の遺伝的距離は大きいため、遺伝的に大きく分化していると考えられる。一方で、ナミヒラタカゲロウは、均質的な遺伝構造を示し、モンカゲロウのような遺伝構造を検出した。

これらのように、流程ごとに適応する種の遺伝構造が異なることを示した。日本広域を対象に遺伝構造を示した知見はあるが、河川に焦点を絞った研究例は少なく(例えば、八重樫ら, 2012)、地域スケールに焦点を当て複数河川に着目し、かつ流程ごとの遺伝構造を示した例はない。今回は2つの分類群のみを扱いその遺伝構造を示したが、今回扱ったシロハラコカゲロウの上流系統や下流系統、トビイロカゲロウの各系統、そして他のカワゲラ(今回の調査で採集できたトウゴウカワゲラや、オオヤマカワゲラとヒメオオヤマカワゲラ、ノギカワゲラ類)類やトビケラ類(今回の調査で採集できたヤマトビケラ属やナガレトビケラ属、タニガワトビケラ属)を加えることで、水生昆虫における流程ごと環境や各環境の空間配置と各種の遺伝構造の関係について一般性のある知見を導き出せると考えている。また、河川流程ごとに遺伝構造が異なる点については、遺伝的多様性を考慮した保全対策の際に、遺伝的多様性の解釈や対策、方針が変わって

くるため、この知見は極めて重要であると考えている。

本研究課題は、室戸半島の急峻な地形を流れる特殊な河川における生物多様性を流程分布という概念を取り入れて評価することを試みた。本成果として、一般的な河川と異なり下流環境が欠如していることから、下流域種や下流系統が不在であることを示した。一方で、単一種で下流域から中流や上流域に広域に分布するヒゲナガカワトビケラやチラカゲロウは確認できたことから、室戸半島の下流環境の欠如に関しては、下流域に特に適応している種にとって生息できない要因があると考えられる。実際に、チラカゲロウに関しては下流域から検出する系統は確認できなかった。また、2つ目の成果として、流域内に広域に分布するシロハラコカゲロウは、少なくとも3つの別種に相当する系統群に分化していることを発見した。これは、単一種が広域環境に適応しているように思われていたが、各流程の環境ごとに適応放散していることを意味している。上記にあげたヒゲナガカワトビケラは遺伝子解析の対象に含めなかったが、我々のこれまでの研究から日本列島内に6つの系統群が存在することもわかっている。今後も広域分布種を対象にすることで隠蔽種や未記載種の発見につながり、今まで明らかにできていなかった室戸半島の河川の生物多様性を掘り出すことになるだろう。最後に、近縁種間で流程分布する2つの分類群を対象に適応する流程ごとの遺伝構造を比較した結果、大きく異なる遺伝構造のパターンを示すことができた。これは、生息している環境の空間的な配置によってその種の生態、行動範囲などに強く影響していることが示唆されることから、それぞれの環境ごとに異なる遺伝的多様性の解釈が必要となるだろう。今後、これら3つの成果をひとつにまとめていくことで、河川の生物多様性の創出、維持機構を理解していき、これらの知見を基に河川生態系の保全に重要な知見の蓄積に貢献していく。

室戸半島において、急峻な河川における様々な環境には、それぞれの環境に適応した生物しゅや系統群が分布していることを示してきた。つまり、ある河川のある地域のみを守っていても生物多様性は守れない。また、市民の皆さんにとっては少し川を移動するだけで、少し違った景色や生物多様性に触れることができる。さらに、目には見えない遺伝的多様性に関しても内包されている。このことは、未来への子供たちにとっての環境教育に関しては貴重な財産であると言える。近縁は遺伝的多様性を考慮した環境教育に関しても需要が出てくると考えており、これらを総合的に学ぶには、最適な地域であると考えている。

最後に、本研究課題において、信州大学理学部東城幸治教授の研究室の岡本聖矢博士、上木岳氏、鈴木啓久氏、吉田匠氏には現地調査と遺伝子解析や環境データの解析に大きく尽力していただいた。また、東城幸治教授には様々なご助言をいただいた。ここでお礼を申し上げる。また、本研究課題ではこれまでに2度採択していただき室戸半島において研究を展開していく中でうまれたアイデアを実現することができた。本年度の助成と合わせて重ね重ね感謝申しあげる。

参考文献

- Arribas, P., Velasco, J., Abellán, P., Sánchez-Fernández, D., Andujar, C., Calosi, P., ... & Bilton, D. T. (2012). Dispersal ability rather than ecological tolerance drives differences in range size between lentic and lotic water beetles (Coleoptera: Hydrophilidae). *Journal of Biogeography*, 39(5), 984-994.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M., & Palmer, T. M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science advances*, 1(5), e1400253.
- Dirzo, R., Young, H. S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N. J., & Collen, B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *science*, 345(6195), 401-406.
- Hof, C., Brändle, M., Dehling, D. M., Munguía, M., Brandl, R., Araújo, M. B., & Rahbek, C. (2012). Habitat stability affects dispersal and the ability to track climate change. *Biology Letters*, 8(4), 639-643.
- Marchese, C. (2015). Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation*, 3, 297-309.
- Hughes, J. M., Huey, J. A., & Schmidt, D. J. (2013). Is realised connectivity among populations of aquatic fauna predictable from potential connectivity?. *Freshwater Biology*, 58(5), 951-966.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Motokawa, M., & Kajihara, H. (Eds.). (2017). *Species diversity of animals in Japan*. Tokyo: Springer Japan.
- Ogitani, M., Sekiné, K., & Tojo, K. (2011). Habitat segregation and genetic relationship of two heptageniid mayflies, *Epeorus latifolium* and *Epeorus l-nigrus*, in the Shinano-gawa River basin. *Limnology*, 12(2), 117-125.
- 扇谷正樹, & 中村寛志. (2008). 天竜川支流小黒川におけるヒラタカゲロウ科幼虫の流程分布と季節変動 (Doctoral dissertation, Shinshu University Library).
- Okamoto, S., & Tojo, K. (2021). Distribution patterns and niche segregation of three closely related Japanese ephemerid mayflies: a re-examination of each species' habitat from "megadata" held in the "National Census on River Environments". *Limnology*, 22(3), 277-287.
- Okamoto, S., Saito, T., & Tojo, K. (2022). Geographical fine-scaled distributional differentiation caused by niche differentiation in three closely related mayflies. *Limnology*, 23(1), 89-101.
- Takenaka, M., & Tojo, K. (2019). Ancient origin of a dipteromimid mayfly family endemic to the Japanese Islands and its genetic differentiation across tectonic faults. *Biological Journal of the Linnean Society*, 126(3), 555-573.

- Takenaka, M., Shibata, S., Ito, T., Shimura, N., & Tojo, K. (2021a). Phylogeography of the northernmost distributed *Anisocentropus* caddisflies and their comparative genetic structures based on habitat preferences. *Ecology and evolution*, 11(9), 4957-4971.
- Takenaka, M., Yano, K., Suzuki, T., & Tojo, K. (2021b). Development of novel PCR primer sets for DNA metabarcoding of aquatic insects, and the discovery of some cryptic species. *bioRxiv*.
- Tojo, K., Sekiné, K., Takenaka, M., Isaka, Y., Komaki, S., Suzuki, T., & Schoville, S. D. (2017). Species diversity of insects in Japan: their origins and diversification processes. *Entomological Science*, 20(1), 357-381.
- 八重樫咲子, 渡辺幸三, 高橋真司, 永峯賢人, & 大村達夫. (2012). 河川ハビタット構造と水生昆虫モンカゲロウの遺伝的多様性の関係. *土木学会論文集 G (環境)*, 68(7), III_611-III_616.

表 1. 本研究課題で調査した地点情報

site	地名	河川	GPS		調査
st. 1	高知県室戸市領家	室津川下流	33.29218	134.16068	定性
st. 2	高知県室戸市室津	室津川上流	33.34158	134.17208	定性
st. 3	高知県室戸市室津	室津川上流	33.34652	134.18218	定性
st. 4	高知県室戸市室津	室津川源流	33.34652	134.18218	定性
st. 5	高知県室戸市佐喜浜町	東の川飛沫	33.39079	134.16807	定性
st. 6	高知県室戸市佐喜浜町	東の川上流	33.38827	134.16728	定量
st. 7	高知県室戸市吉良川町甲	東の川下流	33.33238	134.10399	定量
st. 8	高知県室戸市吉良川町甲	東の川下流	33.34629	134.11847	定量
st. 9	高知県室戸市吉良川町甲	東の川中流	33.36003	134.13502	定量
st. 10	高知県室戸市吉良川町甲	東の川中流	33.37386	134.14661	定量
st. 11	高知県室戸市吉良川町甲	東の川上流	33.38250	134.15898	定量
st. 12	高知県室戸市吉良川町甲	東の川源流	33.38250	134.15898	定性
st. 13	高知県室戸市吉良川町甲	東の川滝	33.35037	134.12195	定性
st. 14	高知県安芸郡北川村弘瀬	奈半利川上流	33.49733	134.15916	定性
st. 15	高知県安芸郡北川村弘瀬	奈半利川飛沫	33.49809	134.15813	定性
st. 16	高知県安芸郡北川村弘瀬	奈半利川中流	33.50775	134.14811	定性
st. 17	高知県安芸郡北川村野友甲	奈半利川下流	33.44159	134.03174	定性
st. 18	高知県安芸市栃ノ木	安芸川下流	33.55626	133.90126	定量
st. 19	高知県安芸市港町	安芸川下流	33.50014	133.91368	定性
st. 20	高知県安芸市安芸ノ川甲	安芸川中流	33.57844	133.92364	定量
st. 21	高知県香美市物部町中津尾	安芸川上流	33.64996	133.90922	定量
st. 22	高知県香美市物部町中津尾	安芸川源流	33.64996	133.90922	定性
st. 23	高知県安芸市舞川	安芸川飛沫	33.64146	133.90360	定性
st. 24	高知県安芸市舞川	安芸川上流	33.64030	133.90267	定量
st. 25	高知県安芸市舞川	安芸川飛沫	33.63943	133.90431	定性
st. 26	高知県安芸市安芸ノ川乙	安芸川中流	33.59821	133.91046	定量
st. 27	高知県香南市香我美町舞川	物部川飛沫	33.64045	133.84511	定性
st. 28	高知県香南市香我美町舞川	物部川源流	33.64045	133.84511	定性
st. 29	高知県香美市物部町仙頭	物部川中流	33.66750	133.88338	定性
st. 30	高知県香美市物部町山崎	物部川飛沫	33.68618	133.86339	定性
st. 31	高知県香美市香北町蕨野	物部川中流	33.68561	133.84378	定性
st. 32	高知県香南市野市町深淵	物部川中流	33.56604	133.68153	定性
st. 33	高知県南国市物部	物部川中流	33.55289	133.68080	定性
st. 34	徳島県海部郡海陽町	海部川下流	33.62897	134.31721	定性

st. 35	徳島県海部郡海陽町小川皆ノ瀬	海部川中流	33.70735	134.30327	定性
st. 36	徳島県海部郡海陽町小川皆ノ瀬	海部川飛沫	33.71156	134.30685	定性
st. 37	徳島県海部郡海陽町小川皆ノ瀬	海部川源流	33.71156	134.30685	定性
st. 38	徳島県海部郡海陽町小川皆ノ瀬	海部川上流	33.70782	134.30696	定性
st. 39	徳島県海部郡海陽町小川	海部川飛沫	33.72628	134.29247	定性
st. 40	徳島県那賀郡那賀町海川	那賀川飛沫	33.75247	134.26547	定性
st. 41	徳島県那賀郡那賀町海川	那賀川上流	33.75787	134.26046	定性
st. 42	徳島県那賀郡那賀町海川ミヤノクボ	那賀川中流	33.77821	134.25483	定性
st. 43	徳島県那賀郡那賀町築ノ上原田	那賀川下流	33.82650	134.48901	定性