

【本論文】

愛媛県来村川水系に生息するタニガワカゲロウ属 幼虫の形態および遺伝的特徴

大本將人¹・山田裕貴²・高木基裕³

¹〒797 - 1211 愛媛県西予市野村町阿下6-2 愛媛県立野村高等学校

²〒790 - 8566 愛媛県松山市樽味3-5-7 愛媛大学大学院連合農学研究科

³〒790 - 0913 愛媛県南宇和郡愛南町船越1289-1 愛媛大学南予水産研究センター

カゲロウ類（昆虫綱；カゲロウ目）は、河川の底生動物群集の中で個体数が多く、しばしば優占種となり、河川の生物調査において重要な分類群であるが、分類・同定上の問題点が少なくなく、分類精度に支障をきたすこともある（石綿ほか, 2013）。これには、カゲロウ類が基本的に幼虫期を水中で過ごし、変態して成虫期を陸上で過ごすことから、成虫、幼虫それぞれが独自に記載されたり、幼虫、成虫いずれかが知られていない種が存在したりするなどの事情によるところも大きい（石綿・竹門, 2005）。

日本産カゲロウ目には13科39属の150種および2亜種が公称されており（Ishiwata, 2017）、このうちヒラタカゲロウ科Heptageniidaeには8属42種が知られる（石綿・竹門, 2005）。タニガワカゲロウ属*Ecdyonurus*は本科内で最も種数の多い12種を擁するグループであるが、多くの種について幼虫・成虫の関連づけがなされておらず、また、複数の未記載種の存在が明らかになっていることなどから、分類学的に課題の多いグループと考えられている（石綿・竹門, 2005）。本属は愛媛県からはキブネタニガワカゲロウ *Ecdyonurus kibunensis*、トラタニガワカゲロウ *Ecdyonurus tigris*、クロタニガワカゲロウ *Ecdyonurus tobiironis*、シロタニガワカゲロウ *Ecdyonurus yoshidae*の4種が記録されている（愛媛県, 2015）。

ヒラタカゲロウ科の幼虫期における属や種の判別には、体側にある葉状鰓と糸状鰓の形状や大きさの違いが重要であり、タニガワカゲロウ属ではシロタニガワカゲロウ、ヒラタカゲロウ

属*Epeorus*ではウエノヒラタカゲロウ*Epeorus curvatulus*、キハダヒラタカゲロウ属*Heptagenia*ではキョウトキハダヒラタカゲロウ*Heptagenia kyotoensis*などで鰓の詳細なスケッチが報告されている（Uéno, 1928；御勢, 1985）。一方で、タニガワカゲロウ属のクロタニガワカゲロウ、トラタニガワカゲロウなどでは幼虫の背面図はあるが（Uéno, 1931；今西, 1940）、鰓の詳細なスケッチは見あたらない。

愛媛県宇和島市を流れる来村川水系には、県内に棲息するタニガワカゲロウ属4種のうちクロタニガワカゲロウ、トラタニガワカゲロウ、シロタニガワカゲロウの3種が確認され、加えてヒラタカゲロウ属のウエノヒラタカゲロウ、ユミモンヒラタカゲロウ*Epeorus nipponicus*、キハダヒラタカゲロウ属のキョウトキハダヒラタカゲロウなどの幼虫が多数生息している（大本, 未発表）。そこで、本研究では、ヒラタカゲロウ科タニガワカゲロウ属の上記3種を中心として、これら来村川に棲息するカゲロウ類6種の主要な分類形質である鰓の形態について、写真撮影による比較観察をおこなうとともに、近縁のコカゲロウ科Baetidaeで属や種の分類形質とされている顎の形状（御勢, 1985）についても同様に観察し、これら形態的特徴から種間の類縁関係を推定した。また、これら同一河川内に出現するカゲロウ類6種について、ミトコンドリアDNA(mtDNA)の部分塩基配列解析により、その遺伝的類縁関係および、種内、種間の遺伝的多様性、分化の程度についてもあわせて検証した。

材料と方法

形態解析 2015年3月に来村川水系の来村川および薬師谷川（図1）において、ヒラタカゲロウ属のウエノヒラタカゲロウ、ユミモンヒラタカゲロウ、タニガワカゲロウ属のクロタニガワカゲロウ、トラタニガワカゲロウ、シロタニガワカゲロウ、キハダヒラタカゲロウ属のキョウトキハダヒラタカゲロウ6種の幼虫（図2）を採集し、活かして持ち帰った後、5–10%ホルマリン溶液で固定した。各種のサンプルから、それぞれ大きい1個体を選び、体各部の観察と解剖を行った。柄付き針を用いて、咀嚼器のうち大顎と小顎を摘出し、光学顕微鏡（×40倍）下で種ごとの形状を比較するとともに、デジタルカメラで撮影した（大顎は右側、小顎は右側または左側）。また、ピンセットを用いてそれら個体の腹部体節からすべての鰓をはずし、双眼実体顕微鏡（×30倍）下で種ごとの鰓の構造を比較するとともに、デジタルカメラで撮影した（種により右側または左側）。また、取り外した鰓は葉状鰓と糸状鰓に分け、それぞれの長軸方向の最大長を顕微鏡下で測定し、体長（尾部をのぞく長軸方向の長さ）に対する大きさの違いを種ごとに比較した。さらに、その中で種による形質の違いが予測された第1鰓について、糸状鰓／葉状鰓の割合を求めた。これらの大きさは6種ともに体の大きい

ものから5個体を選んで測定した。こうして得られた観察および測定情報に関する各種の形質状態（表1）を基に種間のユークリッド距離を求め、得られた距離行列から群平均法（UPGMA法）により形態の類似度に基づく樹形図を作成した。樹形図の作成にはPHYLIP（Felsenstein, 2004）のプログラムパッケージ“neighbor”を使用した。

分子解析 解析に用いたカゲロウ類幼虫の採集地点、採集日、解析個体数および解析個体の略記を表2に示す。形態解析の項で述べた6種に、フタオカゲロウ属*Ameletus*のキョウトヒメフタオカゲロウ*Ameletus kyotensis*、ヒラタカゲロウ属のエルモンヒラタカゲロウ*Epeorus latifolium*、モンカゲロウ属*Ephemera*のフタスジモンカゲロウ*Ephemera japonica*を加えた合計69個体の幼虫を用いた。いずれの個体も採集後、DNAの抽出まで100%エタノールで保存した。

DNAの抽出及び精製はカゲロウ幼虫の片側全鰓を用い、Quick Gene DNA tissue kit（クラスボウ社製）を用いて行った。抽出・精製した全DNAからmtDNAの16SrRNA増幅用の2種類のプライマー5'-TTACGCTGTTATCCCTAA-3'（Kambhampati and Charlton, 1999）と5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'（Simon et al., 1994）を用い、Tojo and Matsukawa (2003)に従いPCR反応を行った。すなわち、PCR反応液の組成は滅菌水17.44 μ L, 10×ExTaq buffer 2.5 μ L, dNTP mix

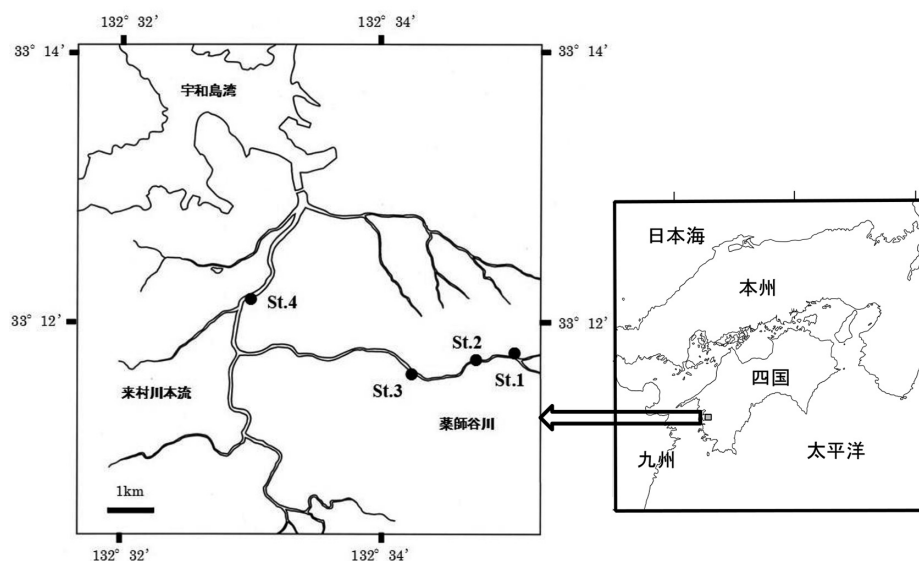


図1. 来村川（本流）及び薬師谷川（支流）におけるカゲロウ類の採集地点（St. 1；薬師谷川雪輪滝，St. 2；薬師谷川万代の滝キャンプ場横，St. 3；薬師谷川大黒橋下，St. 4；来村川来村川橋下）

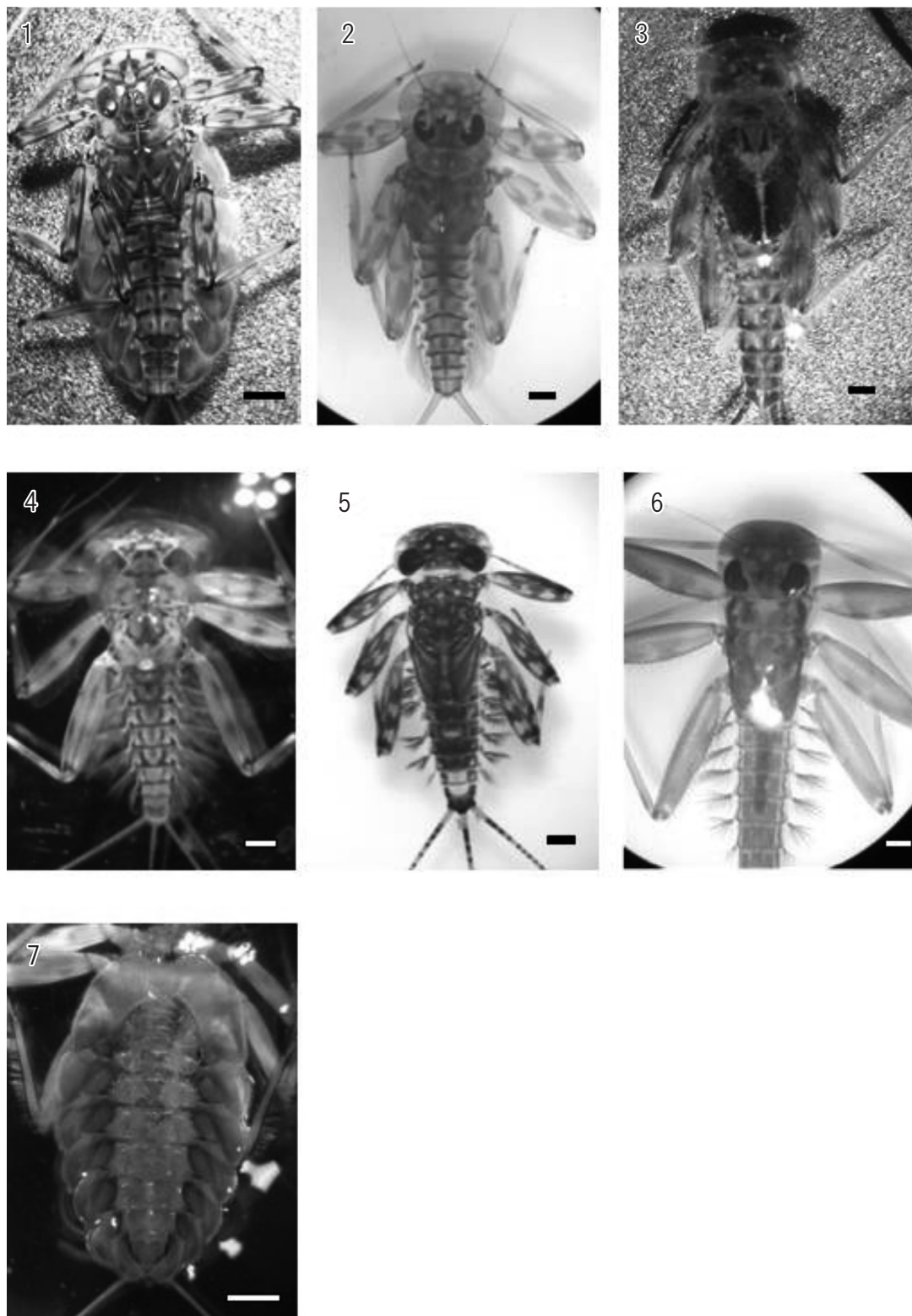


図2. ヒタラカゲロウ科幼虫の背面写真(1-6)およびウエノヒラタカゲロウの腹面写真(7) (1. ウエノヒラタカゲロウ, 2. ユミモンヒラタカゲロウ, 3. クロタニガワカゲロウ, 4. トラタニガワカゲロウ, 5. シロタニガワカゲロウ, 6. キョウトキハダヒラタカゲロウ, バーは全て1.0mm)

表 1. 観察結果に基づく各種カゲロウ類の形質情報 (1: 合致する, 0: 合致しない)

番号	形 質 情 報	ユミモン ヒラタカ ゲロウ	ウエノ ヒラタカ ゲロウ	トラタニ ガワカゲ ロウ	クロタニ ガワカゲ ロウ	シロタニ ガワカゲ ロウ	キョウト キハダ ヒラタカ ゲロウ
1	大顎の外側と内側の2本の犬歯は細長く尖る	0	0	1	1	1	1
	大顎の外側と内側の2本の犬歯は太い	1	1	0	0	0	0
	大顎の内側の犬歯は細く深めに二又し, とともに先端は尖る.	0	0	1	1	1	1
2	大顎の内側の犬歯は太く浅めに二又し, とともに先端が尖る	0	1	0	0	0	0
	大顎の内側の犬歯は太く浅めに二又し, 外側の歯は先端が丸みを帯びる	1	0	0	0	0	0
3	大顎の内側の犬歯の基部に棘毛はない	1	0	0	0	0	0
	大顎の内側の犬歯の基部に棘毛が密生する	0	0	1	1	1	1
	大顎の内側の犬歯の基部にある棘毛は数本と少ない	0	1	0	0	0	0
	大顎の内側の犬歯より内側の縁辺は緩やかに湾曲する.	1	1	0	0	0	0
4	大顎の内側の犬歯より内側の縁辺は緩い「く」の字状に折れ込んでいる.	0	0	1	0	1	0
	大顎の内側の犬歯より内側の縁辺はV字状に鋭く折れ込む.	0	0	0	1	0	0
	大顎の内側の犬歯より内側の縁辺は直線的.	0	0	0	0	0	1
5	小顎内葉の最上部に剛毛が並ぶ	0	0	1	1	1	1
	小顎内葉の最上部に剛毛はなく, 三本の歯が並ぶ	1	1	0	0	0	0
6	体側の鰓は七対で, 全て葉状鰓と糸状鰓からなる.	1	1	0	0	0	1
	体側の鰓は七対で, 七番目の鰓は葉状鰓のみからなる.	0	0	1	1	1	0
7	葉状鰓は第一鰓の腹側で左右が接する.	0	1	0	0	0	0
	各葉状鰓の左右は接しない.	1	0	1	1	1	1
8	葉状鰓は明瞭に小さく, 痕跡的.	0	0	0	0	0	1
	葉状鰓は特に小さくない.	1	1	1	1	1	0
9	糸状鰓は長く, 最大長は体長の10%以上 (第1-6鰓では体長の14%以上)	1	1	1	1	1	0
	糸状鰓は長くない (すべての鰓で最大長は体長の13%以下)	0	0	0	0	0	1
10	糸状鰓の最大長は葉状鰓の1.7倍以上	1	1	1	1	1	0
	糸状鰓の最大長は葉状鰓の1.5倍以下	0	0	0	0	0	1
	第1鰓において糸状鰓の最大長は葉状鰓の5倍以上	0	0	0	0	0	1
11	第1鰓において糸状鰓の最大長は葉状鰓の1.2-1.5倍	0	0	0	0	1	0
	第1鰓において糸状鰓の最大長は葉状鰓の0.3-0.9倍	0	1	1	1	0	0
	第1鰓において糸状鰓の最大長は葉状鰓の0.3倍未満	1	0	0	0	0	0
	第1鰓において葉状鰓はよく発達し, その最大長は体長の30%以上	0	1	0	0	0	0
12	第1鰓において葉状鰓の最大長は体長の10-15%程度	1	0	1	1	1	0
	第1鰓において葉状鰓は痕跡的で, その最大長は体長の5%以下	0	0	0	0	0	1
13	第2-5鰓における糸状鰓の最大長は葉状鰓の0.75倍以上	0	0	0	1	1	1
	第2-5鰓における糸状鰓の最大長は葉状鰓の0.66倍以下	1	1	1	0	0	0

表 2. DNA 解析に用いたカゲロウ類の採集地点, 採集日および解析個体数

種 名	学 名	採集地 点番号*	採 集 日	サンプル略記号・番号**	個体数
ヒラタカゲロウ属					
ウエノヒラタカゲロウ	<i>Epeorus curvatulus</i>	St.2	2016年3月25日	UHK29	7
〃	〃	St.3	2016年4月30日	UHK69-74	
ユミモンヒラタカゲロウ	<i>Epeorus nipponicus</i>	St.1	2016年3月26日	YHK5-7, 41-46	13
〃	〃	St.2	2016年3月25日	YHK22-25	
エルモンヒラタカゲロウ	<i>Epeorus latifolium</i>	St.4	2016年3月25日	EHK61-63	3
タニガワカゲロウ属					
クロタニガワゲロウ	<i>Ecdyonurus tobiironis</i>	St.1	2016年3月26日	KTG1-4, 30-32	8
〃	〃	St.2	2016年3月25日	KTG-26	
トラタニガワカゲロウ	<i>Ecdyonurus tigris</i>	St.1	2016年3月26日	TTG13-16, 33-40, 67-68	16
〃	〃	St.2	2016年3月25日	TTG27-28	
シロタニガワカゲロウ	<i>Ecdyonurus yoshidae</i>	St.4	2016年3月25日	STG17-20, 53-58, 65-66	12
キハダヒラタカゲロウ属					
キョウトキハダヒラタカゲロウ	<i>Heptagenia kyotoensis</i>	St.1	2016年3月26日	KKH9-11, 47-50	7
ヒメフタオカゲロウ属					
キョウトヒメフタオカゲロウ	<i>Ameletus kyotensis</i>	St.1	2016年3月26日	KHH8	2
〃	〃	St.2	2016年3月25日	KHH21	
モンカゲロウ属					
フタスジモンカゲロウ	<i>Ephemera japonica</i>	St.1	2016年3月26日	HSM-51	1

*採集地点番号は図1に対応, **サンプル略記号・番号は図10に対応.

2.0 μ L, Fプライマー (10 μ M) 1.0 μ L, Rプライマー (10 μ M) 1.0 μ L, ExTaq 0.06 μ L, DNAテンプレート 1.0 μ Lとし, サーマルサイクラー (TP600 タカラ社製) により初期熱変成 94°C 5 分の後, 94°C 1 分, 49°C 1 分, 72°C 1 分を 35 サイクル行い, 72°C で 5 分最終反応させた. PCR産物の精製は ExoSAP-IT (GEヘルスケア社製) を用いて行い, Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Thermo Fisher Scientific社製) のプロトコルに従いシーケンス反応を行った後, Big Dye X Terminator 精製キット (Thermo Fisher Scientific社製) により蛍光物質を除去し, ABI 3130 Genetic Analyzer (ライフテクノロジー社製) を用いて塩基配列の決定を行った. 得られた配列は DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録された近縁種の塩基配列とともに Clustal W (Thompson et al., 1994) によりアライメントし, MEGA ver. 6 (Tamura et al., 2013) により, UPGMA法を用いて系統樹を作成した. 系統樹における各枝の信頼度については, ブーツストラップ法による 100 回の反復を行って求めた.

結 果

形態 ヒラタカゲロウ科 6 種の大顎 (図 3a, 1-6) と小顎 (図 3b, 1-6) を示す. タニガワカゲロウ属 3 種とキョウトキハダヒラタカゲロウの大顎の外側と内側の 2 本の犬歯 (canine) はいずれも細長く尖っており, 内側の犬歯は細く鋭い二尖頭であった. また, 内側の犬歯の下には棘毛が密集していた. 一方, ヒラタカゲロウ属は 2 本の犬歯が太く頑丈で, 内側の犬歯は浅く二又しており, 内側の犬歯の下には棘毛はない (ユミモンヒラタカゲロウ) か, あってもわずか (ウエノヒラタカゲロウ) であった. また, ヒラタカゲロウ属のうちウエノヒラタカゲロウは, 内側の犬歯の二尖頭ともに尖っていたが, ユミモンヒラタカゲロウではそのうち外側の先端が丸みを帯びていた. 大顎内側の犬歯より下部の縁辺の形状は, ヒラタカゲロウ属では緩やかに湾曲していたが, タニガワカゲロウ属では「く」の字状に折れ曲がり, とりわけクロタニガワカゲロウではそれが V 字状にさらに鋭角的であった. また, キョウトキハダヒラタカゲロウでは縁辺は

直線状であった. 小顎についてみると, タニガワカゲロウ属 3 種およびキョウトキハダヒラタカゲロウの小顎内葉の最上部には突起が多く並んでいるが, ヒラタカゲロウ属にはそれがなく, 長く曲がった 3 本の鋭い棘状の突起があった.

各種の鰓を図 2-7, 図 4, 図 5 に示す. 6 種の中で, タニガワカゲロウ属 3 種のみ第 7 鰓に糸状鰓が見られなかった (図 5). ヒラタカゲロウ属のうちウエノヒラタカゲロウでは, 第 1 鰓が明瞭に大きく発達し (図 4-1a), 腹側で左右が接していた (図 2-7). また, キョウトキハダヒラタカゲロウでは糸状鰓がよく発達し, 葉状鰓は相対的に小さかった (図 5-4a-g). 各鰓の体長に対する割合を見ると (図 6, 7), 第 1 鰓において葉状鰓はウエノヒラタカゲロウで体長の 30% 以上, キョウトキハダヒラタカゲロウで 6% 以下と, 他 4 種と明瞭に異なっていた. また, 糸状鰓ではキョウトキハダヒラタカゲロウで 10% 以上と長く, 特に第 1-6 鰓では 14% 以上と, 他 5 種と明瞭に異なっていた. 糸状鰓に対する葉状鰓の比率では (図 8), キョウトキハダヒラタカゲロウが平均 2.0 以上と他 5 種より明瞭に長く, 特に第 1 鰓では糸状鰓は葉状鰓の 6-8 倍の長さであった. また, シロタニガワカゲロウでは第 1, 第 2 鰓の糸状鰓がそれぞれ葉状鰓の 1.2 および 1.0 倍以上と他 4 種よりも明瞭に長く, 逆にウエノヒラタカゲロウは第 1 鰓のそれが 0.18 倍以下と, 他種より小さかった.

上記の形態的特徴をまとめると, ヒラタカゲロウ属の 2 種はともに, 大顎の 2 本の犬歯が太く頑丈で, 内側の犬歯は浅く二又すること, 小顎内葉の最上部に長く曲がった 3 本の鋭い棘状の突起があることで他種と区別され, また, 属内ではウエノヒラタカゲロウの大顎内側の犬歯は二尖頭ともに尖ること, 第 1 鰓において, 葉状鰓の最大長が体長の 30% 以上であること, および糸状鰓が葉状鰓の 0.18 倍以下であることでユミモンヒラタカゲロウ (15% 以下および 0.32 倍以上) と区別された. 残る 2 属のうち, キハダヒラタカゲロウ属 (キョウトキハダヒラタカゲロウ) は, 大顎の内側の犬歯より内側の縁辺が直線的であること, 第 7 鰓に糸状鰓があること, 糸状鰓が明瞭に大きく, その最大長は葉状鰓の 1.7 倍以上 (第 1 鰓では 5 倍以上), 第 1-6 鰓では体長の 14% 以上であることでタニガワカゲロウ属 (す

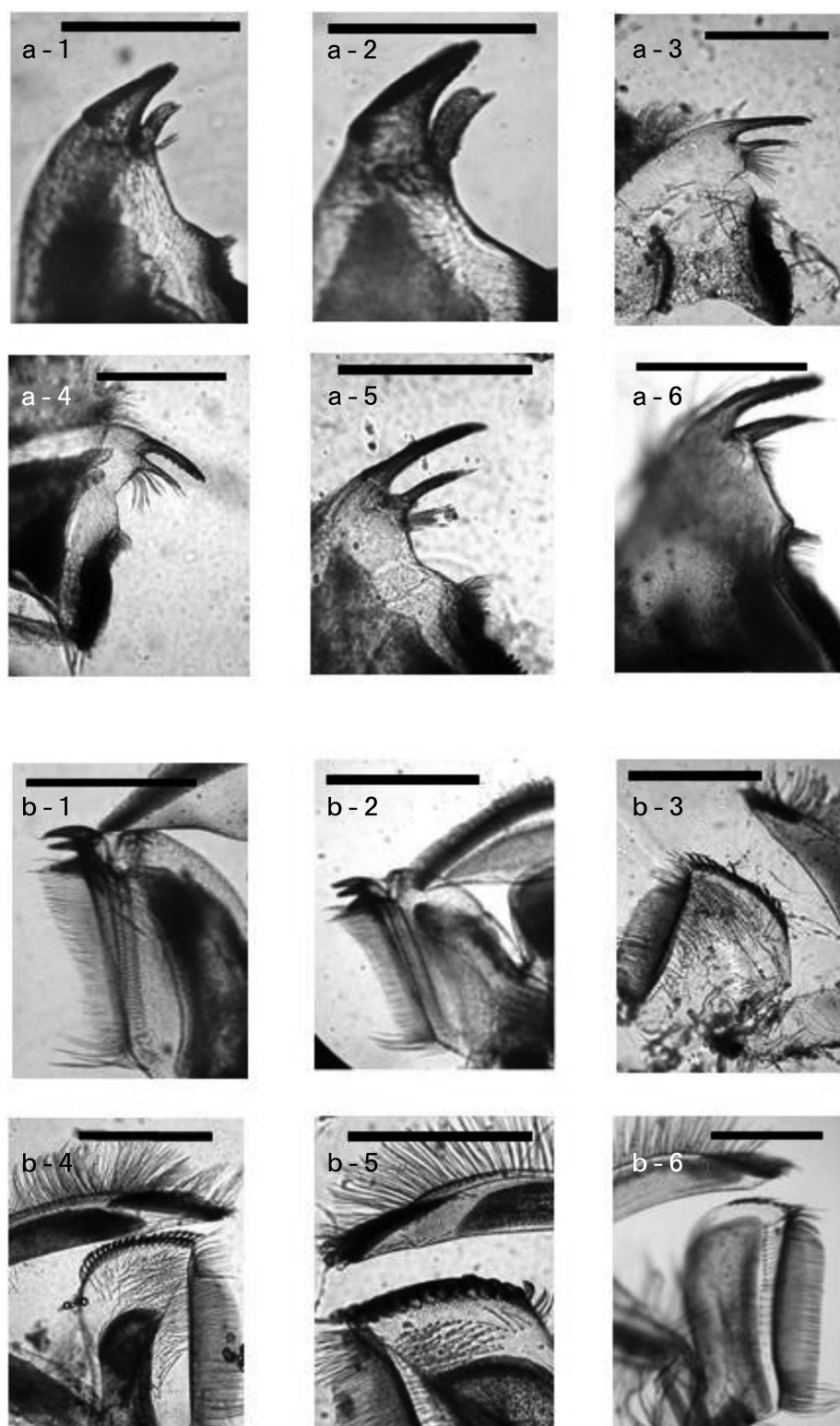


図3. ヒラタカゲロウ科幼虫の大顎と小顎の形態 (1. ウエノヒラタカゲロウ, 2. ユミモンヒラタカゲロウ, 3. クロタニガワカゲロウ, 4. トラタニガワカゲロウ, 5. シロタニガワカゲロウ, 6. キョウトキハダヒラタカゲロウ, a. 大顎 Mandible : 全て右側のみ, b. 小顎 Maxilla : 4と6のみ右側, 後は左側. バーは全て 0.5mm)

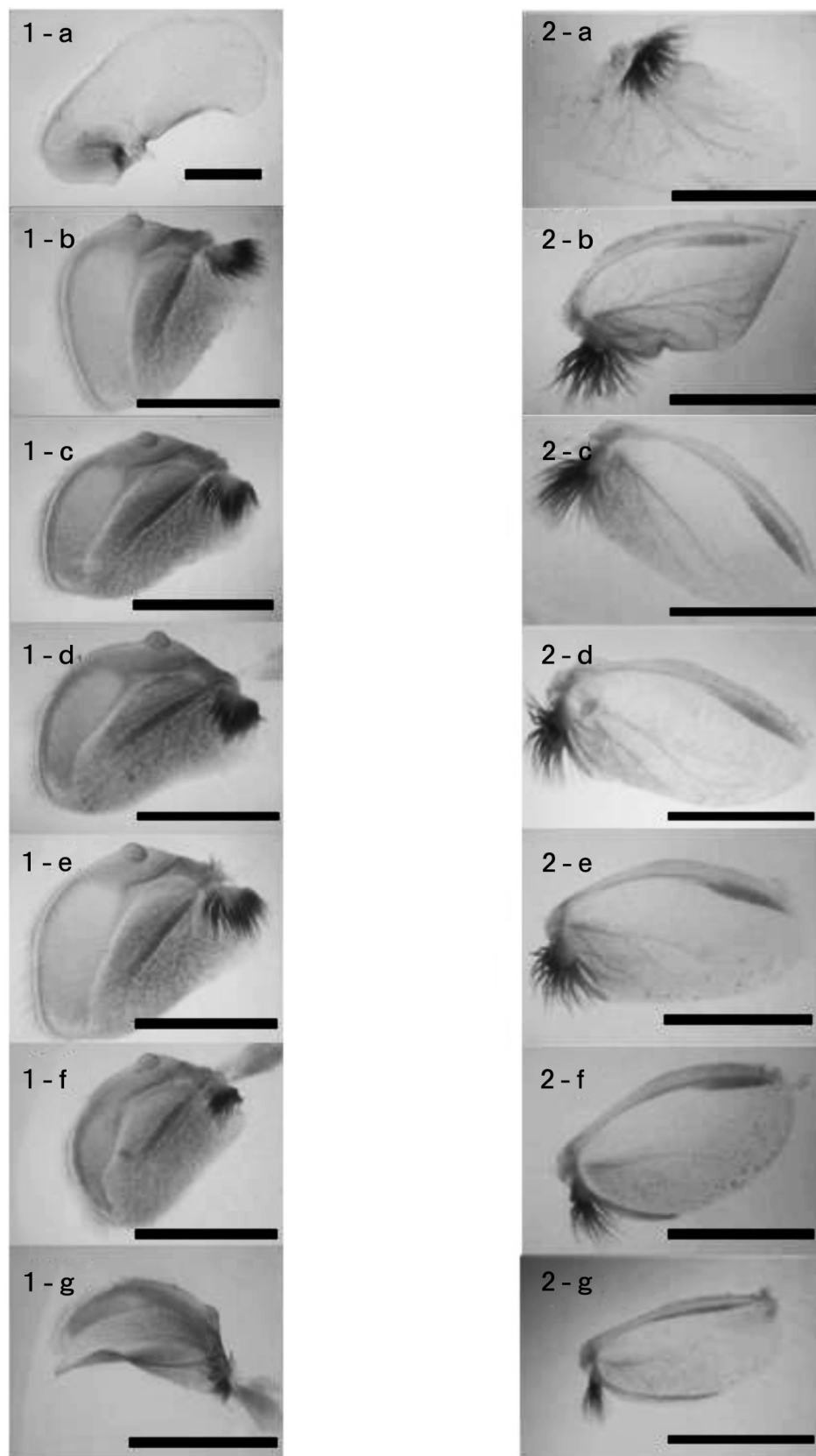


図4. ヒラタカゲロウ属2種の幼虫の鰓の形態 (1. ウエノヒラタカゲロウ, 2. ユミモンヒラタカゲロウ, a. 第一鰓, b. 第二鰓, c. 第三鰓, d. 第四鰓, e. 第五鰓, f. 第六鰓, g. 第七鰓: ウエノヒラタカゲロウは右側の鰓, ユミモンヒラタカゲロウは左側の鰓。バーは全て1.0mm)

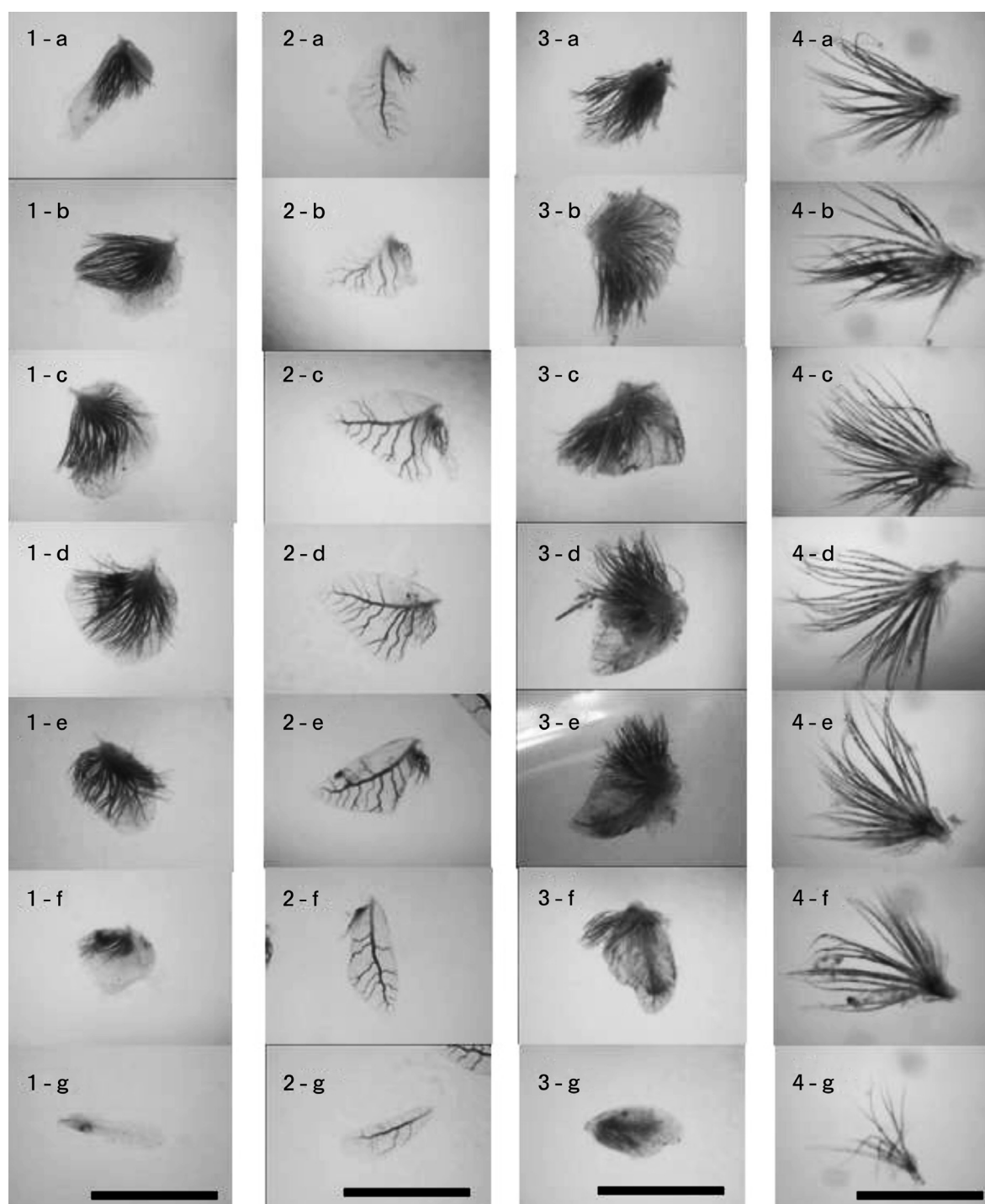


図5. タニガワカゲロウ属3種とキョウトキハダヒラタカゲロウ幼虫の鰓の形態 (1. クロタニガワカゲロウ, 2. トラタニガワカゲロウ, 3. シロタニガワカゲロウ, 4. キョウトキハダヒラタカゲロウ, a. 第一鰓, b. 第二鰓, c. 第三鰓, d. 第四鰓, e. 第五鰓, f. 第六鰓, g. 第七鰓: 全て左側の鰓. バーは1.0mm)

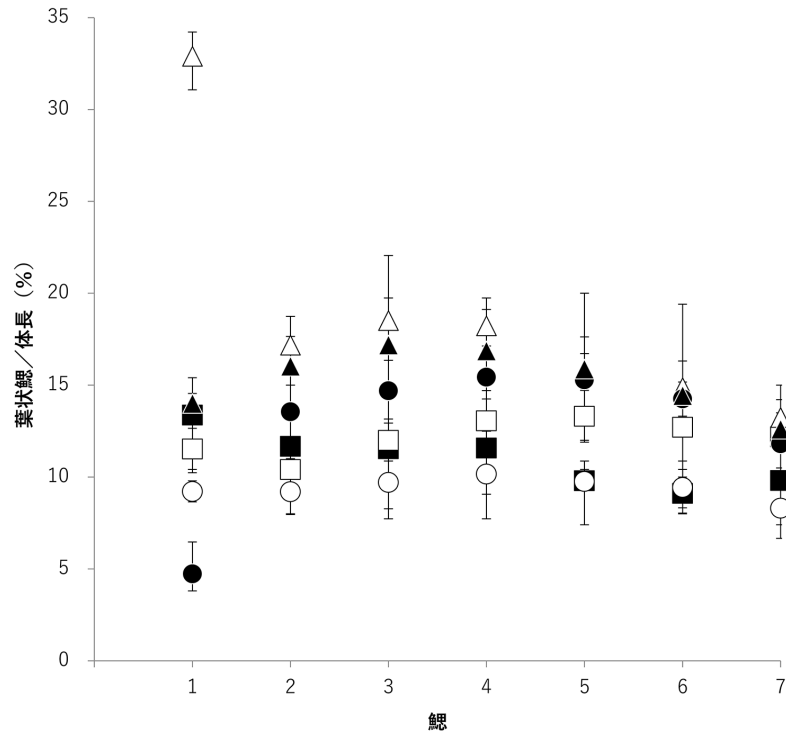


図 6. カゲロウ類の各鰓における体長に対する葉状鰓の長さの比率 (●:キョウトキハダヒラタカゲロウ, ○:シロタニガワカゲロウ, ■:クロタニガワカゲロウ, □:トラタニガワカゲロウ, ▲:ユミモンヒラタカゲロウ, △:ウエノヒラタカゲロウ. 縦棒は範囲. 鰓の数字は頭部側よりみた順序)

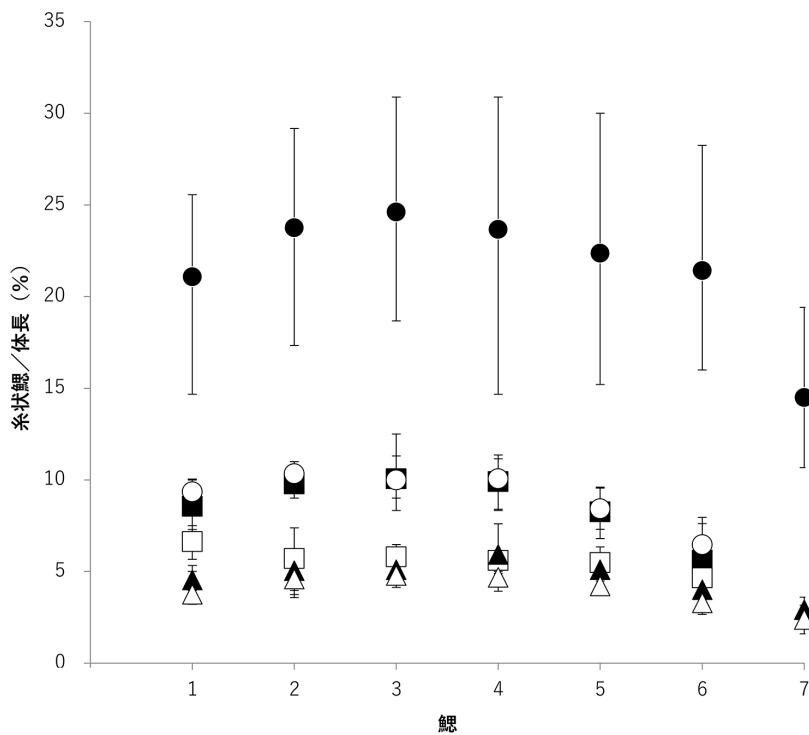


図 7. カゲロウ類の各鰓における体長に対する糸状鰓の長さの比率 (●:キョウトキハダヒラタカゲロウ, ○:シロタニガワカゲロウ, ■:クロタニガワカゲロウ, □:トラタニガワカゲロウ, ▲:ユミモンヒラタカゲロウ, △:ウエノヒラタカゲロウ. 縦棒は範囲. 鰓の数字は頭部側よりみた順序)

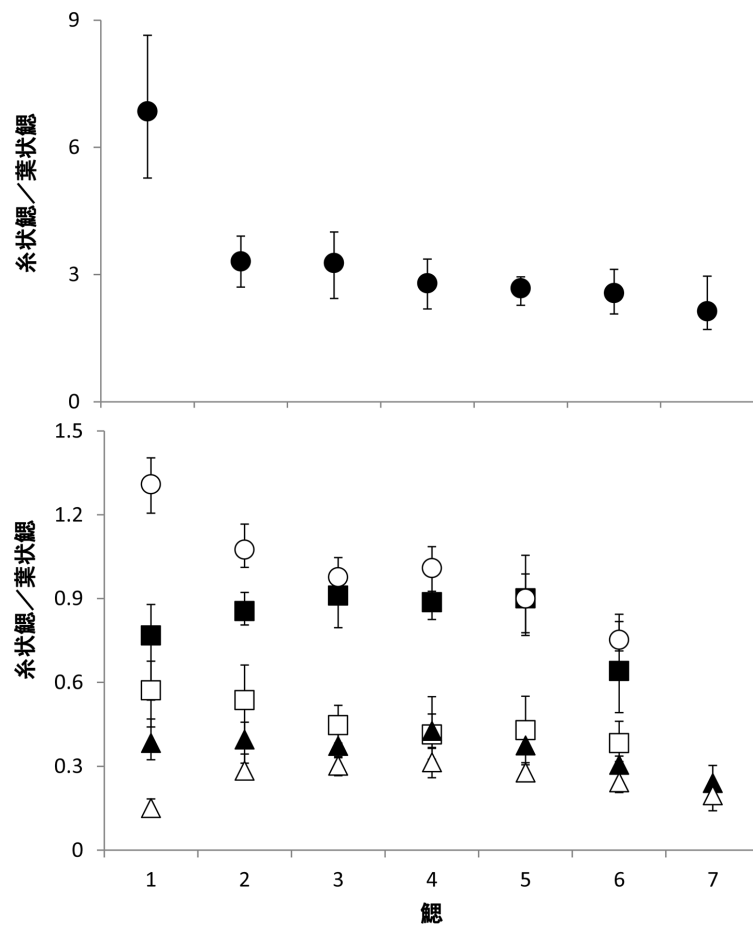


図8. カゲロウ類の各鰭における葉状鰭に対する糸状鰭の長さの比率 (●:キョウトキハダヒラタカゲロウ, ○:シロタニガワカゲロウ, ■:クロタニガワカゲロウ, □:トラタニガワカゲロウ, ▲:ユミモンヒラタカゲロウ, △:ウエノヒラタカゲロウ. 縦棒は範囲, 鰭の数字は頭部側よりみた順序)

すべての鰭で1.5倍以下および12%以下)と区別された。また、タニガワカゲロウ属3種内では、小顎内側縁辺の形状がV字に深く折れ込むことでクロタニガワカゲロウが他2種と区別された。また、鰭の形状から見ると、シロタニガワカゲロウは少なくとも第1, 第2鰭において糸状鰭は葉状鰭と同じかそれ以上であることで他2種(0.9倍以下)と区別され、クロタニガワカゲロウは少なくとも第2-第5鰭において糸状鰭の最大長は葉状鰭の0.75倍以上であることでトラタニガワカゲロウ(0.66倍以下)と区別された。

本研究による形態調査から口器に関して5つ, 鰭に関して8つの形態的特徴が抽出された(表1)。これら諸特徴における各種の形質状態から求めた種間の類似度(表3)に基づき作成したデンドログラムを図9に示す。複数種を観察したヒラタ

カゲロウ属とタニガワカゲロウ属では、すべての種が属内で一つにまとめられ、ヒラタカゲロウ属に対してタニガワカゲロウ属とキハダヒラタカゲロウ属(キョウトキハダヒラタカゲロウ)が姉妹群関係を示した。タニガワカゲロウ属内では、種間で類似度の大きさに違いは認められなかった。

mtDNA解析 本研究で用いたプライマーセットでは、ヒラタカゲロウ属(ウエノヒラタカゲロウ, ユミモンヒラタカゲロウ, エルモンヒラタカゲロウ)についてDNA断片が増幅されず、塩基配列が決定できなかった。塩基配列が決定できた種についてはいずれも配列長は351bpであった。本研究で決定した各種の塩基配列についてはすべてDDBJ (DNA Data Bank of Japan)に登録した(アクセッションナンバー:

表 3. 形質状態 (1/0) に基づくカゲロウ各種間のユークリッド距離

	ユミモンヒラ タカゲロウ	ウエノヒラタ カゲロウ	トラタニガワ カゲロウ	クロタニガ ワカゲロウ	シロタニガ ワカゲロウ	キョウトキ ハダヒラタ カゲロウ
ユミモンヒラタカゲロウ	0.00	2.83	3.74	4.24	4.47	4.47
ウエノヒラタカゲロウ		0.00	4.24	4.69	4.90	4.90
トラタニガワカゲロウ			0.00	2.45	2.83	3.74
クロタニガワカゲロウ				0.00	2.45	3.74
シロタニガワカゲロウ					0.00	3.46
キョウトキハダヒラタカ ゲロウ						0.00

UPGMA



図 9. UPGMA 法による形質状態 (1/0) のユークリッド距離行列に基づくカゲロウ類の形態的類似度

表 4. カゲロウ類 5 種の遺伝的多様度

	クロタニガワ カゲロウ	トラタニガワ カゲロウ	シロタニガワ カゲロウ	キョウトキハダ ヒラタカゲロウ	キョウトヒメ フタオカゲロウ
解析個体数(n)	80	16	12	7	2
ハプロタイプ数	5	8	3	1	2
ハプロタイプ多様度(h)	0.857	0.858	0.318	0	1.000
ヌクレオチド塩基多様度(π)	0.00342	0.00466	0.00096	0	0.14

LC460784-LC460803)。

遺伝的多様性を表4に示す。クロタニガワカゲロウでは5種類、トラタニガワカゲロウで8種類、シロタニガワカゲロウで3種類、キョウトキハダヒラタカゲロウで1種類、キョウトヒメフタオカゲロウで2種類のハプロタイプが出現した。各種内におけるハプロタイプ多様度 (h) はキョウトヒメフタオカゲロウで最も高く (1.000)、キョウトキハダヒラタカゲロウで低かった (0)。タニガワカゲロウ属内ではトラタニガワカゲロウ (0.858)、クロタニガワカゲロウ (0.857)、シロタニガワカゲロウ (0.318) の順で高かった。また、各種内における塩基多様度 (π) は同様にキョウトヒメフタオカゲロウで最も高く (0.136)、キョウトキハダヒラタカゲロウで低かった (0)。タニガワカゲロウ属内ではトラタニガワカゲロウ (0.005)、クロタニガワカゲロウ (0.003)、シロタニガワカゲロウ (0.001) の順で高かった。

フタスジモンカゲロウを外群としたカゲロウ亜目3属5種における類縁関係を図10に示した。タニガワカゲロウ属と *Parafronurus* 属からなるグループ、キハダヒラタカゲロウ属、ヒメフタオカゲロウ属およびモンカゲロウ属の単系統性はいずれも高い確率で支持された (ブートストラップ確率Bp: 88–100%)。タニガワカゲロウ属内ではシロタニガワカゲロウ (およびミナミタニガワカゲロウ *Ecdyonurus hyalinus*) とクロタニガワカゲロウ (および *Parafronurus youi*) がトラタニガワカゲロウ (およびヤエヤママダラタニガワカゲロウ *Ecdyonurus fractus* と *Ecdyonurus dispar*) に対して姉妹群を形成し、それらタニガワカゲロウ属とキハダヒラタカゲロウ属のキョウトキハダヒラタカゲロウが、ヒメフタオカゲロウ属に対して姉妹群関係となっ

た。また、DDBJより取得したタニガワカゲロウ属、キハダヒラタカゲロウ属、ヒメフタオカゲロウ属およびモンカゲロウ属の近縁種の配列データは、それぞれ同属のクラスターに含まれた。なお、本調査で複数個体を解析した種のうち、キョウトヒメフタオカゲロウのみが種のまとまりを形成しなかった。

考 察

本研究で形態的比較をおこなった種について、大顎、小顎の形態的特徴が、ヒラタカゲロウ属とそれ以外 (タニガワカゲロウ属およびキハダヒラタカゲロウ属) の間で大きく異なっていたが、後2者間では大顎内側縁辺の形状以外に明瞭な違いが見られなかった。また、複数種を観察したヒラタカゲロウ属、タニガワカゲロウ属いずれにおいても、大顎、小顎について種間の形態的差異は大きいとはいえなかった。タニガワカゲロウ属とキハダヒラタカゲロウ属では互いに類似するものの、この形質がいくつかの属では特徴的な形質を示し、属内では比較的安定している可能性がある。一方、鰓の形態的特徴においては、葉状鰓が発達して糸状鰓が明瞭に小さいヒラタカゲロウ属、第7鰓が葉状鰓のみからなるタニガワカゲロウ属、葉状鰓に比べて糸状鰓が明瞭に発達するキハダカゲロウ属 (キョウトキハダヒラタカゲロウ) という差異があった。さらに、ヒラタカゲロウ属ではウエノヒラタカゲロウの第1葉状鰓が腹側で左右相接して吸盤状構造をなすのに対し、ユミモンヒラタカゲロウではそうした構造を持たないという点で異なっていた。また、タニガワカゲロウ属ではクロタニガワカゲロウとトラタニガワカゲロウで、糸

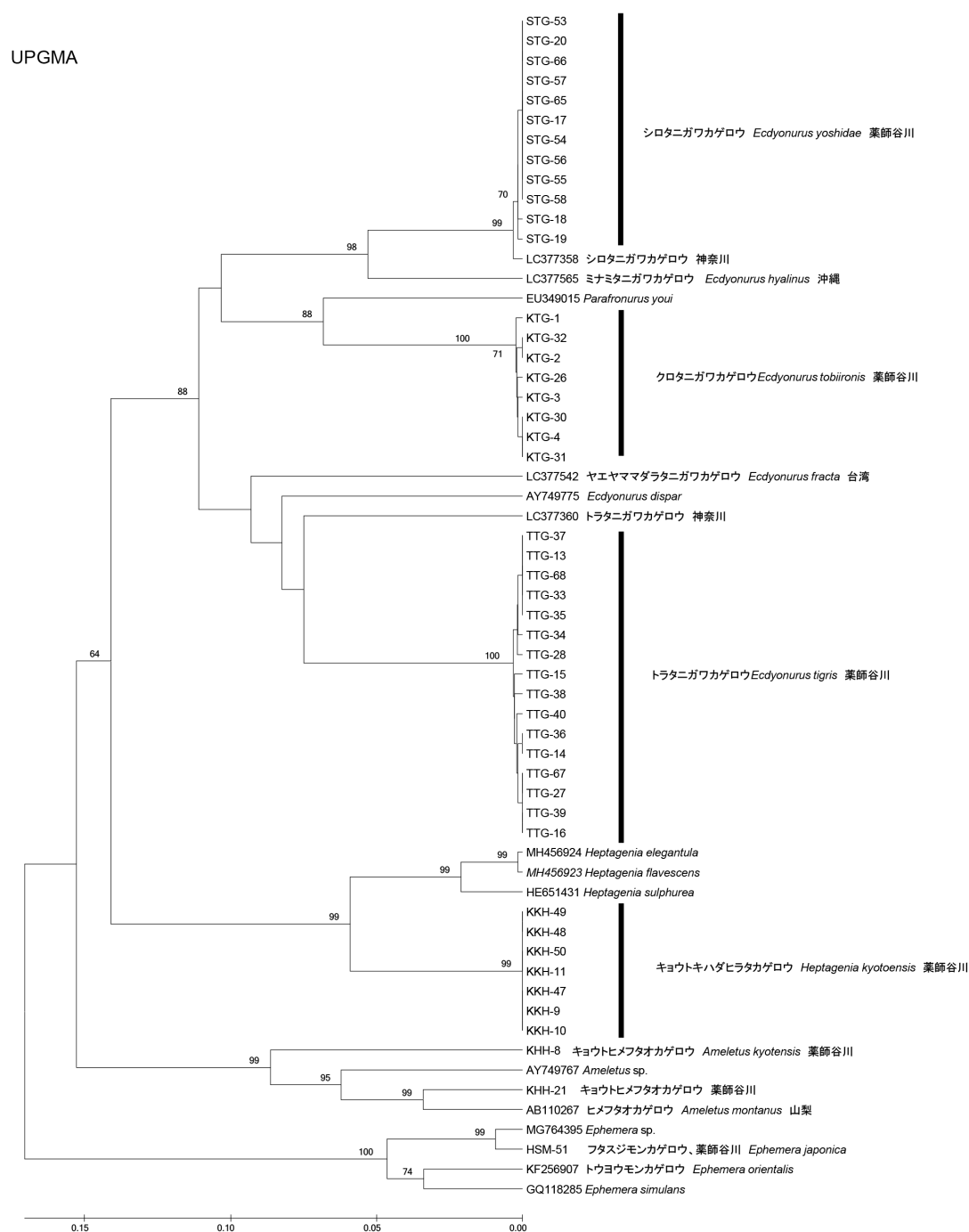


図 10. mtDNA 16S rRNA 遺伝子配列に基づくカゲロウ類の系統樹 (UPGMA 法による。サンプル番号と採集地点は表 2 を参照。学名は川合・谷田, 2005 に準拠した)

状鰓が葉状鰓より短く、シロタニガワカゲロウでは前方数鰓について糸状鰓が葉状鰓と同じかやや長いという特徴を示した。これらのことは、比較した種間では、鰓の形状は属間のみならず種間でも相違し、種を識別する表徴となっていることを示している。今後、各属の他種、およ

び今回観察していない近縁の他属を同様に観察し、今回用いた形質が属や種の違いを示すものであるかどうかを検証する必要がある。

DNA解析において、本研究で用いた16S rRNA領域はカゲロウ類においては科レベルより低次の分類群において類縁関係の推定に有効である

ことが示唆されている (東城, 2005). Tojo and Matsukawa (2003) および東城 (2005) では, 本研究と同じプライマーセットを用いてガガンボカゲロウ科Dipteromimidae, フタオカゲロウ科Sihlonuridae, ヒメフタオカゲロウ科Ameletidae, シロイロカゲロウ科Polymitarciidae, カワカゲロウ科Potamanthidaeの塩基配列を決定している. 本研究でも, ヒラタカゲロウ科のうちタニガワカゲロウ属, キハダヒラタカゲロウ属, モンカゲロウ属については同様に塩基配列が決定できたものの, ヒラタカゲロウ属の三種すべてでDNA断片が増幅されず, 塩基配列が決定できなかった. これは, 同じヒラタカゲロウ科内にあっても属レベルでプライマー領域に変異が見られることを示唆しており, 本科カゲロウ類の遺伝的類縁関係の解明には, さらなるプライマーやターゲット領域の探索が必要であることを示している.

タニガワカゲロウ属と*Parafronurus*属からなるクラスターのうち, ミナミタニガワカゲロウはシロタニガワカゲロウと類縁関係を示した. 両者の形態的な特徴は互いによく似ており, 幼虫ではミナミタニガワカゲロウの各肢腿節後縁に並ぶ刺毛が中央から先端まで存在することと, 胸部の側面に黒斑がないことでシロタニガワカゲロウと区別されている (川合・谷田, 2005). 同様に, ヤエヤママダラタニガワカゲロウはトラタニガワカゲロウと類縁関係を示した. 両者の形態的な特徴も互いによく似ており, 幼虫ではヤエヤママダラタニガワカゲロウの頭部前縁に6個の白色丸斑紋があることでトラタニガワカゲロウと区別されている (川合・谷田, 2005). 日本においてミナミタニガワカゲロウとヤエヤママダラタニガワカゲロウは石垣島と西表島以南に分布し, それぞれ類似するシロタニガワカゲロウおよびトラタニガワカゲロウは九州以北に分布する (川合・谷田, 2005; Ishiwata, 2017). 南西諸島は数回の氷河期の海退, 間氷期の海進を経験し, それに伴って陸水生物の進入, 分散, 隔離, 分化を複雑に繰り返し現在の分布が存在していると考えられている (戸田ほか, 2003). 海退によって本邦と南西諸島が陸続きになっていた時期に両地域に分布していたミナミタニガワカゲロウとシロタニガワカゲロウ, およびヤ

エヤママダラタニガワカゲロウとトラタニガワカゲロウのそれぞれ共通祖先がその後の海進により地理的に隔離され, 南西諸島とそれより北側との間で種分化を起こした可能性がある. なお, 中国大陸産の*Parafronurus youil*はタニガワカゲロウ属のクラスターに内包され, 高い確率でクロタニガワカゲロウと類縁関係を示した. 両種は互いに別属の関係にあるが, その帰属についてもさらに検討が必要であろう.

また, 同じ本邦であっても, 神奈川県産シロタニガワカゲロウと本研究で用いた愛媛県薬師谷川産シロタニガワカゲロウの遺伝的差異は比較的小さいのに対して, 神奈川県産トラタニガワカゲロウと本研究で用いた愛媛県薬師谷川産トラタニガワカゲロウの遺伝的差異は種間の大きさに匹敵した (図10). このことは, 両種の国内における分散年代や分布域形成の過程が大きく異なっている可能性を示す. また, しばしば河川最流域でトラタニガワカゲロウと共存するガガンボカゲロウ (川合・谷田, 2005) は移動・分散能力が極めて低く, 支流間での交流も起こりにくいと考えられている (東城, 2005). 同様に山地流に生息するトラタニガワカゲロウにおいても, おもに中流域に生息するシロタニガワカゲロウに比べて集団が水域ごとにより隔離されやすく, 遺伝的な分化を生じやすいのかもしれない.

来村川水系内におけるタニガワカゲロウ属3種内において, 塩基多様度はいずれも低かったが, このうちトラタニガワカゲロウとクロタニガワカゲロウのハプロタイプ多様度は0.8を超える高いものであった. これらのことは, 水系内においてそれら2種の個体群が比較的近年に一斉放散したことを示している. 一方, シロタニガワカゲロウのハプロタイプ多様度は0.318と低い値を示した. これは, トラタニガワカゲロウとクロタニガワカゲロウに比べてシロタニガワカゲロウの創始者集団サイズが小さかった可能性を示すとともに, 上流域に生息する前2種と中流域に生息するシロタニガワカゲロウとの生態的な差異を反映している可能性もあるため, 各種の移動能力等の生態的知見を含め, 他の河川との比較や遺伝的集団構造等の検討を行う必要がある.

キョウトヒメフタオカゲロウは調査した2個

体でハプロタイプが異なり、ハプロタイプ多様度は1.0、塩基多様度は0.136と最も高い値となった。この2個体間の遺伝的差異の大きさは、シロタニガワカゲロウとクロタニガワカゲロウの大きさに匹敵しており、これは、東城 (2005) における同属のヒメフタオカゲロウ *Ameletus montanus* と同様な傾向である。一方で、本研究においてキョウトヒメフタオカゲロウ2個体は種のまとまりを形成せず、ヒメフタオカゲロウおよび *Ameletus* sp. と入れ子状の関係を示した。こうした結果が得られた要因について今回明らかにすることはできなかったが、さらに個体を追加して詳細に検討する必要がある。

今回観察をおこなった顎と鰓の形態から、タニガワカゲロウ属を含むヒラタカゲロウ科数属において属、種の識別が可能であることが明らかとなった。一方で、形態の類縁度に基づく種間関係と遺伝子の系統樹とでは、属のまとまりや属間の関係は整合したが、タニガワカゲロウ属内の種間関係は一致しなかった。形態の結果については、本研究で用いた形質情報が種間関係を示すためには不十分であることを示しており、今後さらに形質情報を増やして検証する必要がある。また、遺伝子解析についても形態比較で用いたヒラタカゲロウ属の情報が得られないなど課題が残った。今後タニガワカゲロウ属の系統的位置を把握するため、さらに多くの近縁属との遺伝的類縁関係を調査する必要がある。また、ヒラタカゲロウ科における種分化と分布域形成の様式を明らかにするため、本科の分布域全域にわたる集団解析をおこなうとともに、各属、種の移動・分散能力などの生態学的知見を集める必要がある。

引用文献

- 愛媛県. 2015. 昆虫類. 愛媛県ホームページ : <https://www.pref.ehime.jp/h15800/documents/6konncyuurui.pdf> (2019年7月29日参照).
- Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.6. Seattle: Department of Genome Sciences, University of Washington.
- 御勢久右衛門. 1985. 1. 蜉蝣目 (カゲロウ目) Ephemeroptera. 川合禎次編, 日本産水生昆虫検索図説. 東海大学出版会, 東京. 7-32.
- 今西錦司. 1940. 満州・内蒙古並びに朝鮮の蜉蝣類. 関東州及満州国陸水生物調査書, 169-263.
- Ishiwata, S. 2017. An Annotated Catalogue of Japanese Ephemeroptera. Kanagawa Institute of Technology, Division for Environmental Chemistry Research Report 6, Supplement 2: 1-100.
- 石綿進一・竹門康弘. 2005. 日本産カゲロウ類の和名-チェックリストおよび学名についてのノート-. 陸水学雑誌, 66: 11-35.
- 石綿進一・藤谷俊仁・司村宜祥. 2013. スタノ沢のカゲロウ類. 神奈川県自然環境保全センター報告, (10): 177-185.
- Kambhampati, S. and R. Charlton. 1999. Phylogenetic relationship among *Libellula*, *Ladona* and *Plathemis* (Odonata: Libellulidae) based on DNA sequence of mitochondrial 16S rRNA gene. Systematic Entomology, 24: 37-49.
- 川合禎次・谷田一三 (編). 2005. 日本産水生昆虫一科・属・種への検索. 東海大学出版会, 東京. 1342pp.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America, 87(6): 651-701.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680.
- 戸田 守・諸喜田茂充・西田 睦. 2003. 琉球列島の生物相の歴史的成り立ち. 西島信昇 (監) 西田 睦・鹿谷法一・諸喜田茂充 (編), 琉球列島の陸水生物. 東海大学出版会, 神奈川. 25-32.
- Tojo, K. and K. Matsukawa. 2003. A description of the second species of the Family Dipteromimidae (Insecta, Ephemeroptera), and genetic relationship of two dipteromimid mayflies inferred from mitochondrial 16SrRNA gene sequences. Zoological Science, 20: 1249

—1259.

東城幸治. 2005. 河川源流域に棲息する水生昆虫類の遺伝的特性—ガガンボカゲロウ (昆虫綱・カゲロウ目)におけるミトコンドリア16S rRNA遺伝子配列の変異を例に—. 応用生態工学, 7(2) : 119—127.

Uéno, M. 1928. Some Japanese mayfly nymphs. Memories of the College of Science. Kyoto Imperial University, Ser. B, 4: 19—78.

Uéno, M. 1931. Contributions to the knowledge of Japanese Ephemeroptera. Annotationes Zoologicae Japonenses, 13: 189—231.

南予生物19 : 52—67, (2019年8月27日受理)

連絡先 : 大本將人 (e-mail: masapitokun@gmail.com)