

日本列島に生息するシロタニガワカゲロウ *Ecdyonurus*  
*yoshidae* Takahashi, 1924 (カゲロウ目ヒラタカゲロウ科タ  
ニガワカゲロウ属) の遺伝的構造の解明

神奈川工科大学大学院工学研究科博士後期課程

応用化学・バイオサイエンス専攻

1693001 金子裕明

## 目次

略語表	4
第 1 章 緒言	6
第 2 章 シロタニガワカゲロウの cytochrome c oxidase subunit I 遺伝子と 16S ribosomal RNA 遺伝子の進化速度の推定	9
2-1 はじめに	9
2-2 方法	10
2-2-1 採集地点と標本数	10
2-2-2 ゲノム抽出、増幅、シーケンスの方法	10
2-2-3 アッセンブル、マルチプルアライメント、ハプロタイプの決定、遺伝的多様性の検出	11
2-2-4 平均分子進化速度の推定	11
2-3 結果と考察	11
2-3-1 ミナミタニガワカゲロウの遺伝的構造	11
2-3-2 シロタニガワカゲロウの平均分子進化速度と種間関係	12
第 3 章 日本列島に分布するシロタニガワカゲロウの遺伝的構造	13
3-1 はじめに	13
3-2 方法	13
3-2-1 採集地点と標本数	13
3-2-2 系統の定義、遺伝的多様性、分岐年代の推定	13
3-2-3 歴史的集団サイズ動態の推定	14
3-3 結果	15
3-3-1 シロタニガワカゲロウの系統と分布	15
3-3-2 遺伝的多様性	16

3-3-3 分岐年代の推定	16
3-3-4 歴史的集団サイズ動態	16
3-4 考察	17
3-4-1 列島への侵入経路	17
3-4-2 侵入後の移動・分散	17
3-4-3 東西集団の分布	18
3-4-4 気候変動と歴史的集団サイズ動態	18
第 4 章 淀川水系に分布するシロタニガワカゲロウの遺伝的構造と琵琶湖個体群の特異性	20
4-1 はじめに	20
4-2 方法	20
4-2-1 ミトコンドリア DNA	20
4-2-1-1 採集地点と標本数	20
4-2-1-2 ミトコンドリア DNA の解析	20
4-2-2 核DNA	21
4-2-2-1 採集地点と標本数	21
4-2-2-2 核 DNA の解析	21
4-3 結果	21
4-3-1 ミトコンドリア DNA の解析	21
4-3-1-1 系統とハプロタイプ	21
4-3-1-2 遺伝的多様性	23
4-3-1-3 歴史的集団サイズ動態	23
4-3-2 核 DNA <i>28S rRNA</i> による系統解析	24
4-4 考察	24

4-4-1	ハプログループの分布	24
4-4-2	琵琶湖集団および北岸集団の特異性	25
第5章	相模川水系に分布するシロタニガワカゲロウの遺伝的構造	27
5-1	はじめに	27
5-2	方法	28
5-2-1	採集地点と標本数	28
5-2-2	遺伝的構造の解析	28
5-2-3	歴史的集団サイズ動態の推定	28
5-3	結果	28
5-3-1	ハプロタイプと遺伝的多様性	28
5-3-2	AMOVA 解析と Mantel 検定	29
5-3-3	歴史的集団サイズ動態	29
5-4	考察	30
5-4-1	ハプログループ C の由来	30
5-4-2	メタ個体群構造	30
5-4-3	歴史的河川形態と歴史的集団サイズ動態	31
第6章	終章	32
6-1	要約	32
6-2	系統分化の説明仮説	32
6-3	本研究で得られた知見の工学的な活用	33
6-4	謝辞	35
6-5	参照	35
Tables		47
Figures		105

## 略語表

(i) : imago (成虫)

(si) : subimago (亜成虫)

*16S rRNA* : mitochondrial DNA 16S ribosomal RNA gene (ミトコンドリア DNA 16S リボゾーム RNA 遺伝子)

*26S rRNA* : nuclear DNA 28S ribosomal RNA gene (核 DNA 26S リボゾーム RNA 遺伝子)

85-C : *26S rRNA* 85 番目の塩基シトシン

85-T : *26S rRNA* 85 番目の塩基チミン

AMOVA : Analysis of Molecular Variance (分子分散分析)

An : Accession number

BIC : Bayesian information criterion

bp : base pair (塩基長)

CI : 95% confidence Interval (95%信頼区間)

*COI* : mitochondrial DNA cytochrome c oxidase I gene (ミトコンドリア DNA チトクロム c オキシダーゼサブユニット 1 遺伝子)

*E* : evenness (ハプロタイプの均衡性指数  $0 < E \leq 1$ )

EBSP : Extended Bayesian Skyline Plots

ESS : Effective Sample Size (有効サンプルサイズ)

*h* : ハプロタイプ多様度

HPDI : 95% Highest Posterior Density Interval (最高事後密度信用区間)

*Hr* : Haplotype richness (ハプロタイプリッチネス)

*H'* : Shannon-Wiener diversity index (Shannon の多様度指数)

KCT : Knob terminated Coiled Threads (コイル状付着糸)

Ma : Mega annum (百万年あるいは百万年前)

NA : Not Analyzed

NCBI : National Center for Biotechnology Information

*n/N* : number of specimen (標本数)

*p* : probability value

PCR : Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

*SD* : Standard Deviation (標準偏差)

*SSD* : Sum of Squared Deviation (偏差平方和)

*S* : 全ハプロタイプ数

*Tau* : date of growth or decline measured in units of mutational time calculated by Arlequin.

Time: Time of population expansion calculated based on the sudden expansion model from the evolutionary rates of mitochondrial DNA *COI* and *16S rRNA*.

ペアワイズ *Fst* : 二地点間の遺伝的分化程度を表す固定化指数  $0 < Fst \leq 1$

ミッシングハプロタイプ：解析に供した標本からは検出されなかったハプロタイプ、あるいは絶滅したハプロタイプ

$\pi$ ：塩基多様度

礫河原：礫質の河原

## 第1章 緒言

カゲロウ目(Ephemeroptera)は最古の有翅昆虫であり古生代石炭紀の地層からも化石が出土している(Hubbard, 1990)。卵と幼虫の段階は水中生活し、亜成虫と成虫の段階は陸上生活するが、成虫期間は数時間から数日である。また、不完全変態であり蛹の段階がなく亜成虫の段階を有する唯一の生物である。現生種は37科376属3083種が世界から、13科39属150種2亜種が日本から知られている(Brittain & Sartori, 2003; Ishiwata, 2018)。

カゲロウは平安時代には二十四節季の白露(太陽暦九月)の頃に現れる虫、「白露虫」の名がある。長野県には「豊年虫」の地方名があり、志賀直哉は小説「豊年蟲」(1927)にオオシロカゲロウ *Ephoron shigae* (Takahashi) の大発生の様子を書き、生物暦として伝承されていたことがうかがえる。秋田県と岩手県では群飛(swarm)の様子を表す「アガリサガリ」、山口県では夕暮れに羽化する、あるいは群飛する「ユウグレムシ」の地方名がある。これら地方名の存在からカゲロウが古来、人の生活に近く有用な昆虫であったことがうかがえる(齋藤, 1996)。

高度経済成長期に社会問題となった産業・生活排水による水質汚濁の問題に対して、河川中に生息する底生生物の種類や個体数、生息状況を調査し、その情報をもとに水質を評価する生物学的水質判定が盛んにおこなわれた。特定の底生生物を指標生物とし、その出現状況や個体数の変化を観察することで水質汚濁の度合いや傾向を把握することができる。簡便な手法で、あるいは市民も参加して水質の判定や啓もうに繋がる重要な手法として位置づけられた。生物学的水質判定は日本の水環境保全において重要な役割を果たしており、現在でも継続的に行われている。「全国水生生物調査」(環境省 a) など市民参加による調査も全国各地で実施され、以降カゲロウは河川環境を評価する指標生物としても重要であることが知られるようになった。

1983年ポリメラーゼ連鎖反応法 Polymerase Chain Reaction (以下、PCR) が発明され、比較的容易に遺伝子の塩基配列を決定できるようになった。移動分散能力の低い森林性昆虫であるオサムシ(コウチュウ目オサムシ科, Coleoptera Carabidae : Su *et al.* 1998)や淡水性ヒラマキガイ(水棲目ヒラマキガイ科, Hygrophila Planorbidae : Saito *et al.*, 2018)、有翅昆虫ではあるが移動分散能力は低いと考えられオオシロカゲロウ (Sekiné *et al.*, 2013)、チラカゲロウ *Isonychia japonica* (Ulmer) (Saito *et al.*, 2016 a)などは複雑な日本列島の地形や地史を反映した遺伝的構造を示すことが明らかとなった。

シロタニガワカゲロウは本州、四国、九州 (Ishiwata, 2018)、国外では朝鮮半島4地点、中国東北地方6地点(今西, 1940)、ロシア極東地域 (Tiunova, 2009)から記録されている。幼虫は日本列島では、主に沖積平野の河川中流域の緩流帯および湖岸にある礫に生息する。中流域にある生息地の多くは個体密度が高く、「普通種」という表現が適し、幼虫の採集は容易である場合が多い。幼虫の体形は他のヒラタカゲロウ科(Heptageniidae)と同様に扁平で終齢幼虫は体長10mm以上の個体が多い。頭部前縁に4個の白斑があり、胸部は左右に

やや発達し、腹節には糸状および葉状の鰓がある。尾糸を含め体色は淡黄色に褐色から茶色の斑がある。各肢腿節後縁のすべてに長毛と刺毛が配列することが本種幼虫を近縁種から区別する同定キーである(Figs. 1-1, 1-2, and 1-3)。雄亜成虫の体色は黄色から黄緑色、翅は暗黒色不透明である。雌亜成虫の体色は黄緑色から赤褐色で、前翅前縁はやや黄緑色を帯びる。雌雄ともに成虫の複眼は黄緑色で赤褐色の細い帯が取り巻き、体色は黄緑色から赤褐色、前翅前縁は黄緑色を帯びる。前翅基部に小黑斑と各肢付け根付近の胸部側面に複数の黒斑があり、近縁種から区別する同定キーである。成虫の体長は約 10mm、尾糸は約 25mm である (Figs. 1-4 and 1-5)。水中で羽化した亜成虫は流下しながら水面まで達し、水面から飛び立つ。産卵は濃赤褐色の卵塊を空中から産み落とす(岡崎, 1997)。卵は球体で、卵殻の表面にある small-KCT (コイル状付着糸: Knob terminated Coiled Threads) は両極に集中し、中央部に large-KCT が分布する。ただし、琵琶湖個体の卵殻の表面構造は、他の湖・河川個体と異なり、中央部の平滑面が少ない特徴がみられる (Fig.1-6, 石綿・藤谷, 2018 より引用; 石綿, 2022)。小林(1986)はその化性を年 1 化とするが、詳細は不明である。本種の相模川における羽化の盛期は 4 月から 5 月であるが、その後も初冬まで少数の個体の羽化が観察される。相模川中流 (Fig. 5-1, Sampling site code 2) において 2023 年 4 月 25 日から 5 月 7 日までに観察した群飛は、川岸の草むらの上空およそ 2m~4m を本種雄多数が飛び交い、その中へ雌が飛び込むもので、薄暗くなった 18 時 15 分から 18 時 50 分にかけて観察した。

本種は円礫に付着する藻類や微小な有機物(デトリタス)を主な餌資源とする低次消費者であり、魚類・鳥類などの高次消費者の餌資源でもある。神奈川県中央に位置する相模川中流域は、急流河川が作り出した礫質の河原(以下、礫河原)が広がり、本種の個体密度は高く、そのバイオマスも大きいことが想像され、食物連鎖系において重要な種であると考えられる。神奈川県水産総合研究所内水面試験場(1996, 1999)が相模川で行った魚類の消化管内容物調査によれば、シマヨシノボリ *Rhinogobius nagoyae* Jordan & Seale、トウヨシノボリ分類群 *Rhinogobius* spp、オオヨシノボリ *Rhinogobius fuluviatilis* Tanaka、ウキゴリ *Gymnogobius urotaenia* (Hilgendorf)、カジカ *Cottus pollux* Gunther、オイカワ *Opsariichthys platypus* (Temminck & Schlegel)、ヌマチチブ *Tridentiger brevispinis* Katsuyama, Arai & Nakamura から本種幼虫が検出されている。

本研究は、日本列島に分布するシロタニガワカゲロウの遺伝的構造を解明することを目的とした。第 2 章では平均分子進化速度の推定を、第 3 章では日本列島スケールでの種内系統の解明を、第 4 章では高い遺伝的多様性が認められた淀川水系の遺伝的構造と琵琶湖個体群の特異性の解明を、第 5 章では特異な海底地形から気候変動の影響が河川形態に強く現れる相模川水系集団を用い、気候変動と集団サイズの関係性を明らかにするとともに遺伝的構造を解明することを目的とした。

シロタニガワカゲロウが分子系統樹において単系統であることを確認するため、NCBI(National Center for Biotechnology Information)のデータベースから近縁と考えられ



る種のミトコンドリア DNA チトクロム c オキシダーゼサブユニット 1 遺伝子(以下、*COI*)の一部塩基配列を取得し、IQTREE ver.1.6.12 (Nguyen *et al.*, 2015)により最尤系統樹を構築した (Fig. 1-7)。その結果、日本列島から得られたシロタニガワカゲロウはひとつのクレードを構成し、ひとつの共通祖先とその子孫すべてを合わせた単系統群であることを確認した。

なお、カゲロウ目の上位分類は属を広義あるいは狭義に定義するかにより、研究者により異なった属名が与えられる。シロタニガワカゲロウは Ishiwata (2018)によれば *Ecdyonurus yoshidae* であるが、遺伝子情報を集積する機関である NCBI では *Afronurus yoshidae* である。NCBI の Taxonomy database は、生物名の表記を統一することに主眼をおいて構築されており、登録者の分類学的主張とは異なる。そのためシロタニガワカゲロウは NCBI のデータベース上では *Afronurus yoshidae* (Taxonomy ID: 1187870) として登録した。

本研究は、以下の論文を全般にわたり引用・参照した。

Kaneko H., Ishiwata S., Liao YC., Takamura-Enya T. (2018) The genetic diversities and phylogenetic relationships of two genera, *Ecdyonurus* and *Afronurus*, of Heptageniidae (Ephemeroptera) in the Yaeyama Islands and Taiwan. *Biogeography*, 20: 6–20. doi: 10.11358/bioge0.20.6

Kaneko H., Ishiwata S., Bae YJ., Takamura-Enya T. (2021) Genetic characteristics and phylogeography of the habitat generalist mayfly *Ecdyonurus yoshidae* (Ephemeroptera: Heptageniidae) in the Japanese archipelago. *Entomological Research*, 51: 238–250. doi: 10.1111/1748-5967.12498

Kaneko H., Ishiwata S., Takamura-Enya T. (2022) The fine-scale genetic structure and dispersal ability of the mayfly *Ecdyonurus yoshidae* Takahashi (Ephemeroptera: Heptageniidae) in the Sagami River system, southern Kanto Region, Japan. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 25: 101996. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.101996>

金子裕明・高村岳樹. (2022) 琵琶湖産シロタニガワカゲロウの生い立ち. 西野麻知子. (編) 琵琶湖の生物はいつどこから来たのか? サンライズ出版, 彦根. 211–223.

## 第 2 章 シロタニガワカゲロウの cytochrome c oxidase subunit I 遺伝子と 16S ribosomal RNA 遺伝子の進化速度の推定

### 2-1 はじめに

生物地理区における旧北区および東洋区に位置する日本列島・台湾島・アジア大陸・朝鮮半島・ロシア極東地域に分布するタニガワカゲロウ属 Genus *Ecdyonurus* あるいは Genus *Afronurus* のうち、日本列島には 11 種類が分布する (Bae & Yoon, 1997; Ishiwata, 2018; Kang & Yang, 1994; Quan *et al.*, 2002; Soldán *et al.*, 2009; Tiunova, 2009)。形態的特徴から日本列島周辺にはシロタニガワカゲロウの同属近縁種と考えられる以下の 3 種が分布する。ミドリタニガワカゲロウ *Ecdyonurus viridis* (Matsumura) は北海道・本州・四国・九州・沖縄本島、ミナミタニガワカゲロウ *Ecdyonurus hyalinus* (Ulmer) は台湾島と八重山諸島 (石垣島・西表島)・中国、*Ecdyonurus levis* Navás は朝鮮半島・中国・ロシア・モンゴルに分布する。これら 3 種は幼虫、亜成虫、成虫の各発育段階でシロタニガワカゲロウと形態的特徴から識別が可能である (石綿ほか, 2018; Navás, 1912)。以下、「近縁種」はこれら 4 種を指す。

日本列島は、凡そ 2500 万年前にアジア大陸東辺縁から分離し、その後プレートテクトニクスあるいは海水準の変動により、大陸との結合と分離を繰り返し経験した (Santosh・千秋, 2011)。太平洋プレートとフィリピン海プレートの沈み込みを成因とする東西圧縮を強く受け起伏に富んだ日本列島の地形を形成している (Takahashi, 2017)。これら特異な地形・地史を持つ日本列島の水生生物は高い多様性を示すことが知られる (例えば、Tominaga *et al.*, 2016)。

同種であっても遺伝的交流のない集団間には形態的差異が生じる場合がある。あるいは、形態的な差異が認められない場合でも、地域性のある遺伝的変異が検出され、さらに隔離が進んだ場合は種分化を生じる場合もある。塩基配列の差異を基に系統や種を比較する分子系統学の発展により昆虫の進化や多様性に新たな視点が生まれた。地球の歴史が刻まれる地層や化石などの地史的情報と生物の歴史が刻まれる遺伝的情報を用い、種や系統が分化した年代や侵入経路などを推定することができる。特異な地形・地史を持つ日本列島周辺は生物の多様性とその成立過程を知ることができる貴重な地域である。

九州の西側から台湾島の北方にかけて、琉球列島の西側に沿ったエリアで、約 1,000km にわたり東シナ海が急速に沈降し、これによって沖縄トラフが形成された。沖縄トラフ形成に伴い八重山諸島と台湾島の間には黒潮が流入し、両島は  $155 \pm 0.154$  (平均  $\pm$  標準偏差) 万年前に海によって隔てられ (Osozawa *et al.*, 2012)、八重山諸島と台湾島に分布するミナミタニガワカゲロウは生息地が分断され集団の分化が生じた。ミナミタニガワカゲロウと近縁種を用い、ミトコンドリア DNA にある *COI* と 16S ribosomal RNA 遺伝子 (以下 *16S rRNA*) の塩基配列と両島の分離を年代校正に用いて BEAST2.5 (Bouckaert *et al.*, 2019) により分子時計を仮定したベイズ (Bayesian inference) 系統樹を構築し、シロタニガワカゲロウ近縁種の平均分子進化速度を推定した。

## 2-2 方法 (以下各章に共通する)

### 2-2-1 採集地点と標本数

ハンドピックアップ法により幼虫、あるいはライトトラップ法で亜成虫および成虫を採集し、99.5%エチルアルコールで固定後、室温保存した。種の同定は石綿ほか(2018)、Navás(1912)に従い顕微鏡下(OLYMPUS SZ61, 東京、Nikon LABOPHOTO, 東京)で行った。解析に用いた標本はミナミタニガワカゲロウ: 石垣島 3 河川 3 地点 29 個体、西表島 6 河川 6 地点 55 個体、台湾 5 河川 5 地点 17 個体、合計 101 個体(Accession numbers 以下、Ans. LC377318–LC377350、LC377553–LC377572)、シロタニガワカゲロウ: 本州・四国・九州 66 河川 109 地点 209 個体(Ans. LC512933–LC513141、LC513428–LC513636)、*Ecdyonurus levis*: 朝鮮半島 1 河川 1 個体(Ans. LC513637、LC513639)、ミドリタニガワカゲロウ: 北海道 1 河川 1 個体(Ans. LC513638、LC513640)である(Tables 1-1 and 1-2, Figs. 2-1 and 2-2)。

### 2-2-2 ゲノム抽出、増幅、シーケンスの方法

ミトコンドリア DNA にある *COI* と *16S rRNA* をマーカーとして解析に用いた。ゲノムの抽出は PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 70  $\mu$ L に標本の胸部から切り取った小切片を加え 100°C で 10 分間、室温で 3 分間インキュベート、12,000 rpm で 3 分間遠心後、上清 50  $\mu$ L を PCR 反応溶液のテンプレート DNA とした。増幅は、KOD FX Neo ポリメラーゼ(TOYOBO, Osaka, Japan)を用い、プライマーとして *COI* は LCO1490, 5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' : HCO2198, 5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer *et al.*, 1994)、*16S rRNA* は 16Sar, 5' -CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3' : 16S2, 5' -GGAGCTCCGGTTTGAAGTCAGATC-3' (Palumbi *et al.*, 2002; France & Kocher, 1996)を用い、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) によった。PCR 反応液の組成は全量で 50  $\mu$ L とし、Buffer 25  $\mu$ L、dNTP MIX 2 mM 10  $\mu$ L、プライマー 10 pM をそれぞれ 1  $\mu$ L、FX Neo ポリメラーゼ 1  $\mu$ L、テンプレート DNA 1  $\mu$ L、滅菌水 11  $\mu$ L とした。

PCR 条件は以下の 3 ステップとした。

初期熱変性: 94 °C 3 分

熱変性: 94 °C 30 秒、アニーリング: 45 °C (*16S rRNA*、*28S rRNA* は 50 °C) 60 秒、伸長: 74 °C 60 秒を 30 サイクル

最終伸長: 72 °C 7 分

目的領域の増幅を確認するため、1.5%アガロースゲルを用い電気泳動を行い、増幅断片を目視で確認した。増幅産物から残ったヌクレオチドとプライマーを取り除くため ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて精製した。前述のプライマーを用いて、FASMAC Co., Ltd. (厚木, 日本) により Big dye Terminator ver. 3.1

(Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。

### 2-2-3 アッセンブル、マルチプルアライメント、ハプロタイプの決定、遺伝的多様性の検出

決定した塩基配列は、Gene Studio Pro ver. 2.2.0.0 (GeneStudio, Inc., Suwanee, GA, USA)を用いてアッセンブルし、生成された配列データを目視によりチェックし、シーケンスリードエラーを修正した。BioEdit ver. 7.1.9 (Hall, 1999)に実装される ClustalW (Larkin *et al.*, 2007)によりマルチプルアライメントを行った。遺伝子解析は、*COI* の 658 サイト、*16S rRNA* の 510 サイトを使い行った。*COI* と *16S rRNA* は近縁なカゲロウ目 *Parafronurus youi* (An. EU349015)の転写鎖、それぞれ 1521bp ~2178bp、13039bp ~13601bp と一致した。

DnaSP ver. 5.10 (Librado & Rozas, 2009)によりハプロタイプを決定した。ハプロタイプ間の関係を表すハプロタイプネットワーク図を Network ver. 4.6 (Fluxus Technology Ltd., Sudbury, UK)により構築した。ハプロタイプ多様度( $h$ )は Arlequin ver. 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010)、塩基多様度( $\pi$ )は MEGA ver. 7.0.20 (Kumar *et al.*, 2016)により求めた。

### 2-2-4 平均分子進化速度の推定

八重山諸島と台湾島間の遺伝的分化の程度を推定するため、ペアワイズ  $F_{st}$  値 (二地点間の遺伝的分化程度を表す固定化指数  $0 < F_{st} \leq 1$ ) を Arlequin により求めた。10,000 回の permutation test (危険率 5%) によりその有意性を検定した。

BEAST 2.5 により分子進化速度を推定した。塩基進化モデルは MEGA に実装される Find Best DNA Model により Bayesian information criterion (以下、BIC)に基づいて HKY モデル (Hasegawa *et al.*, 1985)、クロックモデルは relaxed clock lognormal clock モデル (Ho & Duchêne, 2014)、プライヤーは Yule モデル (Yule process: Yule, 1925; Gernhard, 2008) とし、八重山諸島と台湾島間の隔離年代である 155 万年前を校正点とした。マルコフ連鎖モンテカルロ法により 2 億世代の二つの独立したチェーンを生成し、その 10 % を burn-in として廃棄後、二つのチェーンを結合した。収束は Tracer v.1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018) により、全てのパラメーターの有効サンプルサイズ (以下、ESS: Effective Sample Size) が 200 以上であることを確認し、収束の判断とした。平均分子進化速度と標準偏差を求めシロタニガワカゲロウのそれとした。Tree は TreeAnnotator ver.1.7.5 (BEAST パッケージに同包) により構築し、FigTree ver.1.4.3 (Rambaut, 2017) により作図した。

## 2-3 結果と考察

### 2-3-1 ミナミタニガワカゲロウの遺伝的構造

ミナミタニガワカゲロウ 101 個体の *COI* および *16S rRNA* から、それぞれ 34、20 のハプロタイプが検出された。八重山諸島から検出された *COI* のハプロタイプ数は 25、*16S*

*rRNA* は 15、台湾島から検出された *COI* のハプロタイプ数は 9、*16S rRNA* は 5 であった。両島間で共有されるハプロタイプは無く、各島に固有であった。ハプロタイプネットワーク図を Fig. 2-3 に示した。*COI* は 61、*16S rRNA* は 17 のミッシングハプロタイプ（解析に供した標本からは検出されなかった、あるいは絶滅したハプロタイプ）が両島集団に存在した。

*COI* と *16S rRNA* の平均塩基多様度はそれぞれ、八重山諸島内  $0.0051 \pm 0.0185$ 、 $0.0039 \pm 0.0159$ 、台湾島内  $0.0060 \pm 0.0102$ 、 $0.0014 \pm 0.0034$  であった。両島間の平均遺伝的距離は  $0.1196 \pm 0.0146$ 、 $0.0380 \pm 0.0119$ 、*Fst* は  $0.96$  ( $p < 0.0001$ )、 $0.91$  ( $p < 0.0001$ ) であった (Table 1-3)。これらの結果からミナミタニガワカゲロウは八重山諸島と台湾島間で遺伝子流動は検出されず、十分に分断・隔離された集団であると評価した。

### 2-3-2 シロタニガワカゲロウの平均分子進化速度と種間関係

BEAST2.5 による推定の結果、近縁 4 種の *COI* と *16S rRNA* の各枝の平均分子進化速度は、それぞれ  $0.0156 \pm 0.0041$ 、 $0.0059 \pm 0.0016$  と推定された。それらは Papadopoulou *et al.*, (2010) の推定値  $0.0169 \pm 0.0019$ 、 $0.0049 \pm 0.0008$  と近似した。以下、これらの値をシロタニガワカゲロウの平均分子進化速度とした。

*COI* と *16S rRNA* を連結した 1168 塩基から構築したベイズ系統樹を Fig. 2-4 に示した。近縁 4 種は 4 クレードに分かれ、形態による分類を支持した。4 種間の分岐は、事後確率は低い鮮新世後期から更新世前期に生じたと推定された。

## 第3章 日本列島に分布するシロタニガワカゲロウの遺伝的構造

### 3-1 はじめに

源流域や飛沫帯などに生息するカゲロウは、遺伝子流動がほとんど生じず、遺伝的浮動の影響も受けやすく、特異な遺伝的構造を示すことが知られる(Takenaka & Tojo, 2019)。一方、シロタニガワカゲロウは本州以南の主に沖積平野を流れる礫河原に広く生息し、その生息密度が高いため「普通種」という表現が適した種である。年間を通じて容易に幼虫を採集できる場合も多い。沖積平野を流れる河川中下流域では、河川間で活発な遺伝子流動が生じ、その遺伝的構造は地理的特徴を持たない可能性も考えられる。

礫河原はカワラノギク (*Aster kantoensis* Kitam) やカワラバツタ (*Eusphingonotus japonicus* Saussure) に代表される貴重種のみならず、多様な植物群落、多くの水生・地表性昆虫 (Fujisawa *et al.*, 2012) の生息場所である。礫河原は定期的な土砂移動や出水により消失と再生が繰り返されるため、生物の生息環境も攪乱を生じながら維持される特徴がある。近年では堰堤およびダムによる土砂移動の制限、流量調節の結果、礫河原面積が減少し、全国的な課題となっている (五味・大平, 2019)。

礫河原の普通種である本種は指標生物として最適であり、日本列島スケールで得られる遺伝的構造の情報は河川管理への応用も期待でき、その有用性は高いと考えられる。そのため本研究では、日本列島に生息する普通種シロタニガワカゲロウの遺伝的構造を解明するとともにその成立過程を数量的なモデルである系統樹・EBSP (後述)・Tajima's *D* (後述) などから推論することを目的とした。

### 3-2 方法

#### 3-2-1 採集地点と標本数

2015年から2019年の間、日本列島の主要河川に加え、朝鮮半島の一部河川を採集調査し、台湾本島は採集調査のご協力と標本のご提供を頂いた。その結果、本種は本州・四国・九州に分布した。61河川と中禅寺湖・湯の湖・芦ノ湖・木崎湖・琵琶湖の5湖から採集したシロタニガワカゲロウ 209 個体を解析に供した。標高の最も高い分布地点は湯の湖 (栃木県) 1488 m、河川では信濃川支流滑津川 (長野県) 712 m、最も低い分布地点は佐敷川 (熊本県) 6 mであった。最北のそれは雄物川水系朝日川 (北緯 39° 46'02.01")、最南のそれは大淀川 (北緯 31° 55'15.69") であった (Table 1-2)。

#### 3-2-2 系統の定義、遺伝的多様性、分岐年代の推定

ゲノム抽出、増幅、シーケンス、アッセンブル、マルチプルアライメント、ハプロタイプの決定、ハプロタイプネットワーク図構築、遺伝的多様性の検出は「2-2-2」および「2-2-3」に従った。加えて、種内の系統を識別するため、MrBayes ver. 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) を使いマルコフ連鎖モンテカルロ法により 5 千万世代を生成し、初期の世

代の 25 %を burn-in として廃棄し、ベイズ系統樹を構築した。COI と 16S rRNA を連結した配列の塩基進化モデルは、MEGA に実装されている Find Best DNA Model により BIC に従い HKY+G+I モデルとした。Tracer により収束を確認し、FigTree により作図した。

ハプログループの中で、それぞれのハプロタイプどうしがどの程度の塩基置換距離をもつかを頻度分布で表したミスマッチ分布図（遺伝距離分布図）を示し、ハプログループの構造を可視化した。頻度のピークは放散の時期に、ピーク間の谷はボトルネックなどの集団サイズが減少した時期に相当する。また、ピークが 0 あるいは 1 にある単峰型は一斉放散を、緩やかな単峰型は長期間集団が維持されてきたことを、二峰型（多峰型）は集団サイズの減少と回復を示唆する（小池・松井, 2003）。各ハプログループの塩基置換数のピークと分岐の深さの指標となる平均塩基置換数（図中に▲で示した）をペアワイズで求め、ハプロタイプネットワーク構造を理解するための指標とした。

遺伝的多様性の指標としてサンプルサイズが異なる場合に単位個体数当たり期待されるハプロタイプ数を rarefaction method (El Mousadik & Petit, 1996) により推定するハプロタイプリッチネス ( $H_r$ ) を Excell アドインソフト HAPLOTYPE ANALYSIS ver. 1.05 (Eliades & Eliades, 2009) により求めた。同様に遺伝的多様性の指標として、Shannon の多様性指数 ( $H'$ : Shannon-Wiener diversity index,  $0 < H' \leq \ln(S)$ , Shannon, 1948)、ハプロタイプの均衡性指数 ( $E$ : evenness,  $0 < E \leq 1$ , Pielou, 1969) を次式より求めた。

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i * \ln(p_i) \quad (\text{式 1})$$

$p_i$ : 地点のハプロタイプ  $i$  の出現頻度

$S$ : 地点の全ハプロタイプ数

$$E = H' / \ln(S) \quad (\text{式 2})$$

### 3-2-3 歴史的集団サイズ動態の推定

Tajima's  $D$  は自然選択に中立、個体数一定、各個体が任意に交配する理想集団モデルを仮定すると、遺伝子の突然変異に自然選択がはたらいていない場合は塩基多様性と配列中の多型的な塩基部位数の期待値は等しいとする統計量である。自然選択がはたらかない任意交配集団を仮定すると、統計量  $D$  が有意に負の場合、集団の個体数が増加したと解釈される (Tajima, 1989)。Arlequin により、10,000 回の permutation test (危険率 5%) を実施し、集団サイズの増減を推定した。

Arlequin により、ミスマッチ分布の期待値を 10,000 回の bootstrap 反復によって生成し、集団拡大モデル (sudden expansion model, Schneider & Excoffier, 1999) への適合を偏差平方和 (以下、SSD: sum of squared deviation) の検定により判断した。推定されたパラメーター  $\tau$  から集団の拡大を経験してからの時間を本種の 1 世代を 1 年とし、次式より求めた。

$$T = \tau / 2\mu k \quad (\text{式 3})$$

$\tau$ : アルルカンにより推定されたパラメーター

$T$ : 集団サイズの拡大からの推定世代数

$\mu$  : 平均分子進化速度 第 2 章で求めた値 *COI*: 0.0156 ± 0.0041、*16S rRNA*: 0.0059 ± 0.0016

$k$  : 塩基長 *COI*: 658 bp *16S rRNA*: 510 bp

本種の歴史的集団サイズ動態をコアレセント理論 (Kingman, 2000) に基づき過去に遡って再構築する Extended Bayesian Skyline Plots (以下、EBSP: Heled, 2015) を BEAST2.5 により推定した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 シロタニガワカゲロウの系統と分布

Fig. 3-1 に示すベイズ系統樹から、209 個体は 11 のクレードに分岐したが、2 個体 (Specimen code : 48\_2 および 88\_1, Table 2-2) はそれぞれ単一の個体で構成されるクレード (以下、monophyletic clade) であった。これら幼虫 2 個体の形態には他との違いは認められなかった。これら 2 個体を除くと日本列島には遺伝的に明瞭に区別できる 9 系統が分布した。それらを系統 A~系統 I と定義した。系統 A~系統 I は以下、ハプログループ A~ハプログループ I に対応する。検出された 145 のハプロタイプからなるハプロタイプネットワーク図 (Fig. 3-2) は、東部本州 (中部・東海・関東・東北地方)・中央本州 (近畿地方)・西部本州 (中国地方)・四国・九州・五島列島福江島の 6 地域に色分けした。各ハプログループ間にはミッシングハプロタイプが存在し、ハプログループ I とハプログループ G の間には 30 のミッシングハプロタイプが存在した。9 ハプログループの分布を Fig. 3-3 に示した。

ハプログループ A は 61 個体 34 ハプロタイプで構成され、飛騨山脈・木曾山脈・赤石山脈 (中央高地) 以北から津軽海峡以南に分布した。

ハプログループ B は 17 個体 11 ハプロタイプで構成され、関東北部山地 (阿武隈山地・八溝山地・帝釈山地・三国山脈・飯豊山地・越後山脈) 以北から津軽海峡以南および湯ノ湖・中禅寺湖に分布した。東北地方の 4 地点でハプログループ A と同所的に分布した。

ハプログループ C は 27 個体 17 ハプロタイプで構成され、近畿三角帯 (Huzita, 1962 : 後述) から関東北部山地で囲まれた地域と淀川水系の 4 地点に分布し、6 地点でハプログループ A と同所的に分布した。

ハプログループ D は 15 個体 12 ハプロタイプで構成され、瀬戸内海・豊後水道・紀伊水道に囲まれた四国と淀川水系 3 地点、揖斐川水系牧田川 1 地点に分布した。

ハプログループ E は 6 個体 3 ハプロタイプからなり、飛騨山地・飛騨山脈・両白山地に囲まれた能登半島に分布した。

ハプログループ F は 10 個体 10 ハプロタイプで構成され、琵琶湖にのみ分布した。

ハプログループ G は 45 個体 34 ハプロタイプで構成され、西部本州・九州・淀川水系 3 地点に分布し、1 地点でハプログループ D と同所的に分布した。

ハプログループ H は 25 個体 18 ハプロタイプで構成され、西部本州と淀川水系 7 地点に分布し、7 地点でハプログループ G と、3 地点でハプログループ C、1 地点でハプログループ



プDと同所的に分布した。

ハプログループIは2個体2ハプロタイプで構成され、福江島にのみ分布した。

各ハプログループの分布は地域性を示したが、西部本州にはハプログループGとHの2ハプログループが同所的に分布した。各地点では、1ハプログループのみが分布するのは84地点、2ハプログループが同所的に分布するのは25地点であった。各水系は1あるいは2ハプログループが分布するが、淀川水系は5ハプログループが分布した。

Fig. 3-4 にミスマッチ分布図を示した。ハプログループBは多峰型を示しボトルネックが生じた可能性を示唆した。他は単峰型を示した。各ハプログループの塩基置換数のピークとハプロタイプ間の分岐の深さの指標となる平均塩基置換数(図中に▲で示した)は、ハプログループA: 2と2.3、ハプログループB: 3と5.0、ハプログループC: 1と1.9、ハプログループD: 1と3.4、ハプログループE: 1と0.9、ハプログループF: 2と3.1、ハプログループG: 4と4.2、ハプログループH: 2と2.5であった。

### 3-3-2 遺伝的多様性

ハプロタイプ多様度( $h$ )は、 $0.83 \pm 0.05$  (ハプログループA)から $1.00 \pm 0.04$  (ハプログループF・I)であった。塩基多様度( $\pi$ )は、 $0.0008 \pm 0.0002$  (ハプログループE)から $0.0046 \pm 0.0005$  (ハプログループB)であった。ハプロタイプリッチネス( $H_r$ )は、0.70 (ハプログループE)から1 (ハプログループF・I)、Shannonの多様度指数( $H'$ )は、0.69 (ハプログループI)から3.34 (ハプログループG)、均衡性指数( $E$ )は、0.77 (ハプログループA)から0.95 (ハプログループG)、1.00 (ハプログループF・I)であった (Table 2-1)。これらよりハプログループAおよびEの遺伝的多様性は他に比べて低かった。

### 3-3-3 分岐年代の推定

Fig. 2-4 ベイズ系統樹より、シロタニガワカゲロウは近縁3種と鮮新世後期(360~258.8万年前)から更新世前期(更新世前期は258~78万年前、中期は78~12.6万年前、後期は12.6~1.17万年前、日本学術会議地球惑星科学委員会 IUGS ほか, 2010)に分岐し、日本列島内の種内系統は沖縄トラフの北西端に位置する福江島に分布する系統Iが他の系統の祖先集団と分岐したのは114万年前(中央値: 以下省略: Node A)、95% Highest Posterior Density Interval (以下、HPDI: 最高事後密度信用区間)は178~55万年前の更新世前期から中期であった。その他の系統は100~59万年前に分岐したと推定された。

### 3-3-4 歴史的集団サイズ動態

Tajima' $D$ はハプログループA・C・D・F・G・Hが有意に負の値を示し、過去に急激な集団サイズの拡大を経験したことを示唆した。集団拡大モデルへの適合を判断する観察値と推定値のSSDの $p$ 値はハプログループIを除くすべてのハプログループで0.05以上であり信頼区間内であった。集団の拡大を経験してからの時間Tと信頼区間をTable 2-1に示

した。ハプログループ G および B を除き他のハプログループは約 12.4 万年前以降に集団サイズを拡大した。ハプログループ A・C・G について収束を確認し、EBSP 図を構築し Fig. 3-5 に示した。ハプログループ A および C は約 8 万年前から、ハプログループ G は約 12 万年前から集団サイズの拡大が生じた。

### 3-4 考察

#### 3-4-1 列島への侵入経路

Fig. 2-4 ベイズ系統樹からシロタニガワカゲロウの共通祖先は近縁種であるミナミタニガワカゲロウ、ミドリタニガワカゲロウ、*Ecdyonurus levis* の共通祖先と鮮新世後期から更新世前期頃に種分化したと推定した。アジア大陸・西南日本弧・琉球弧に関する地質学・古生物学・生物系統地理学などの関連諸分野の研究成果を統一的に説明できる古地理図の完成には至っていないが古川・藤谷 (2014)、木崎・大城(1977)、氏家(1986)、木村(1996)、Ota (1998) は、九州北部は鮮新世から更新世前期にアジア大陸と陸続きであったと推定している。福江島のハプログループ I は本種の最も祖先的な日本列島内の系統であり、これらの地質学の先行研究からアジア大陸と福江島、九州を結ぶ陸橋を経路として日本列島に鮮新世後期から更新世前期に侵入したと推定した。そして、福江島のハプログループ I とそれ以外のハプログループの共通祖先は、福江島と九州が五島灘によって隔てられたことにより 114 万年前(95%: HPDI 55–178 万年前, Fig. 2-4) に分化したと推定した。五島灘は沖縄トラフの北端に位置する(Katsura & Nagano, 1982; Tonai *et al.*, 2008)。本研究では沖縄トラフの開裂を 155 万年前とする Osozawa(2012)の仮説を校正年代として年代推定をしたが、沖縄トラフは 200-150 万年前以降に形成され(木村 1990)、沖縄トラフの南西部が 200 万年前からその原型が形成された(Furukawa *et al.*, 1991)とする仮説とも推定した年代は矛盾しない。

#### 3-4-2 侵入後の移動・分散

九州より南に位置する屋久島および種子島からは本種の記録は無く、生物分布境界線の一つである三宅線以北に分布した(注)。三宅線以南には移動・分散しなかった、あるいは海水準の変動により絶滅したと考えられる。九州以北の更新世前期中期の古地理は、Takahashi (2017)、鹿野ほか (1991)、吉田 (1992) から西日本は比較的起伏のない平坦な地形が続き、東日本の一部は多島海であったと考えられる。本種は日本列島侵入後、本州北部まで移動・分散したと推定した。津軽海峡は、鳥類や哺乳類の分布および系統地理学的構造が特徴づけられるブラキストン線にあたる(増田, 1999)。大嶋 (1980, 1991) は海底地形の解析から、本州と北海道を分断する津軽海峡の成立は 15 万年前から 10 万年前であるとした。また、Koizumi ら(2012)は、現在は北海道と東北の一部にのみ分布する淡水生物であるニホンザリガニ *Cambaroides japonicus* De Haan のミトコンドリア DNA *16S rRNA* を用いた解析から、津軽海峡の成立を 90 万年前から 120 万年前と推定した。Segawa ら(2021)は、かつて本州に分布したヒグマ *Ursus arctos* Linnaeus は、34 万年よりも古い時代と 14 万年

前の2回にわたってユーラシア大陸から本州に渡来し、14万年前の集団はユーラシア大陸から北海道を経由し本州に侵入したことをDNA解析と化石記録から明らかにした。これらの先行研究から、更新世に北海道と本州の間には数度の陸橋が存在したと考えられる。本種は北海道からは記録されていないが、本州から津軽海峡を渡り、あるいはサハリンを経由し北海道へ、さらに津軽海峡を渡り本州に移動・分散した可能性は否定できない。Tiunova (2009)はロシア極東アムール川とサハリンから本種を記録し、今西錦司は北海道札幌で本種を採集した(注)。

ハプログループBの高緯度、高標高の遺存的分布はその可能性を示唆する。ハプログループBおよびGの塩基多様度は、 $0.0046 \pm 0.0141$  および  $0.0037 \pm 0.0024$ 、平均塩基置換数は、5.0 および 4.2 であり他に比較して著しく高い値を示した。またそのネットワーク図はボトルネック型および安定維持型であり、北海道および九州から本州に向かって移動・分散した可能性は十分考えられる。

北海道、朝鮮半島、中国大陸、ロシア極東地域の分布の確認は今後の重要な課題である。

### 3-4-3 東西集団の分布

Fig. 3-3 より富山湾と紀伊水道を結ぶ線以東にはハプログループA・B・Cが分布し、以西にはハプログループD・E・F・G・H・Iが分布する。中央本州付近はHuzita (1962) が唱える近畿三角帯に相当し、南を中央構造線、東を敦賀-伊勢湾の線、西を敦賀-淡路島の線で境界された山地と盆地に富んだ三角形状の地域を指す。主に南北方向に走る活断層によって境界された隆起部(鈴鹿・比良・養老・生駒・六甲山地など)と、その間にはさまれた沈降部(京都・奈良・近江盆地)が複雑に配列している。近畿三角帯の隆起と沈降は50万年ほど前から活発となり現在まで継続している(藤田・笠間, 1982; 三好・石橋, 2008)。近畿三角帯と飛騨・木曾・赤石山脈などの中央高地付近の隆起により(原山, 2014; 森山・光野, 1989)、東西集団間の遺伝子流動が妨げられたと考えられる。昆虫では東西集団間で遺伝的構造が異なることは、よく知られている(例えば、シギゾウムシ Family Curculionidae, Aoki *et al.*, 2009; ゲンジホタル *Luciola cruciata* Motschulsky, Yoshikawa *et al.*, 2001)。チラカゲロウの遺伝的構造は、日本列島広域から検出された集団は、糸魚川静岡構造線を境界に東西集団に分けられ、本種の構造と類似する(Saito & Tojo, 2016 a, b; Saito *et al.*, 2016)

### 3-4-4 気候変動と歴史的集団サイズ動態

ハプロタイプネットワーク図・塩基置換数のピーク・Tajima's *D* から、ハプログループA・C・D・F・G・Hは集団サイズの拡大を経験し、さらにEBSP図は、ハプログループA・C・Gは最終間氷期(およそ12.4万年前、Igarashi & Oba, 2006)後に集団サイズ拡大の始まりを示唆する。間氷期には温暖化に伴う降水量の増大と海面上昇が起これ(秋山, 2008)その結果礫河原の減少が、氷期には河川の上流で浸食が起これ下流では海水準の低下により下刻が生じ(貝塚, 1977)、礫河原の拡大が起これ(第5章に詳述する)。シロタニガワカ

ゲロウは最終間氷期に生息地と集団サイズの減少を、その後の最終氷期に中下流域に出現した礫河原の生息地と集団サイズの拡大を経験したと考察した。ハプログループによる集団サイズ動態の違いは、南北に長い日本列島では氷期-間氷期サイクル (Shackleton *et al.*, 1990) による気候変動の影響が異なること (Miyoshi *et al.*, 1999; 百原, 2017; 竹内, 2000)、加えて地域により大陸棚の発達程度が異なり気候変動および海水準変動から受ける河川形態の変化の程度も異なること (久保, 1997, 2008) が、集団サイズ動態の違いとして検出されたと考えられる。

(注) 今西(1940) p.252 に、「南は台湾 (老溪、宮地博士採集) から北は北海道 (札幌、筆者採集) まで及んでいることが知られていた。」とある。

## 第4章 淀川水系に分布するシロタニガワカゲロウの遺伝的構造と琵琶湖個体群の特異性

### 4-1 はじめに

淀川水系は、東は伊吹山地、鈴鹿山脈、布引山地、高見山地、和泉山地、西は野坂山地、比良山地、丹波山地に囲まれた地域を集水域とし、集水面積は日本列島では7番目に大きい8,240 km<sup>2</sup>である。淀川水系は962の支川を持つが、瀬田川は琵琶湖からの唯一の自然流出河川である。京都府に入り宇治川と名を変え、左岸からの木津川、右岸からの桂川と合流し淀川となり、大阪湾に注ぐ。その中心に位置し、43万年前に出現した日本最大面積を持つ現琵琶湖は、近江盆地とその西方の比良山地を境とする西側の隆起、東側の沈降する逆断層の活動により誕生した。(国土交通省; Meyers *et al.*, 1993)。

第3章では、近畿三角帯付近が日本列島シロタニガワカゲロウ東西集団の境界であること、琵琶湖には固有系統Fが、その流出入河川には系統C・D・G・Hが分布し、淀川水系は日本列島の他の河川および湖に比較し、高い遺伝的多様性を保存することを明らかにした。本章では淀川水系集団の遺伝的構造の詳細とその成立過程を推論した。さらに琵琶湖個体群の特異性を検討した。

### 4-2 方法

#### 4-2-1 ミトコンドリア DNA

##### 4-2-1-1 採集地点と標本数

琵琶湖流入16河川18地点、流出1河川(支流を含め)7地点、琵琶湖北岸5地点、東岸2地点からシロタニガワカゲロウ幼虫を採集した。解析に供した標本は以下である。淀川水系琵琶湖流入河川である姉川10個体、矢倉川7個体、芹川10個体、犬上川1個体、愛知川10個体、佐久良川10個体、野洲川7個体、目田川10個体、雄琴川10個体、真野川10個体、和爾川2個体、鴨川10個体、安曇川3地点17個体、石田川3個体、知内川3個体、大川10個体、流出河川である瀬田川10個体、宇治川2個体、流出河川に注ぐ支流である三田川2個体、大戸川1個体、小泉川1個体、木津川1個体、(宇治川支流)長代川2個体、琵琶湖湖岸にある片山10個体、宮ヶ浜2地点19個体、海津10個体、大浦10個体、菅浦10個体、飯浦10個体、合計32地点218個体。第2・3章で解析したそれ以外の地域から採集したシロタニガワカゲロウ175個体を加え合計393個体を解析に供した(Table 3-1 and Fig. 4-1)。

##### 4-2-1-2 ミトコンドリア DNA の解析

ゲノム抽出、増幅、シーケンス、アッセンブル、マルチプルアライメント、ハプロタイプの決定、ハプロタイプネットワーク図構築、遺伝的多様性の検出、ミスマッチ分布図は「2-2-2」・「2-2-3」・「3-2-2」に従った。外群としてミドリタニガワカゲロウを加え、最尤系統樹をIQTREEにより構築し各個体の系統を決定した。連結したCOIと16S rRNAの塩基進化

モデルは、IQTREE に実装される ModelFinder により BIC に従い TN モデルとした (Tamura & Nei, 1993)。

歴史的集団サイズ動態の解析として Tajima's  $D$ 、集団拡大モデルへの適合と集団の拡大を経験してからの時間、EBSP を「3-2-3」に従い推定した。

#### 4-2-2 核 DNA

##### 4-2-2-1 採集地点と標本数

流入河川である犬上川 1 個体、愛知川 2 個体、目田川 2 個体、真野川 2 個体、安曇川 2 個体、大川 1 個体、流出河川である瀬田川 1 個体、宇治川 2 個体、流出河川の支流である三田川 1 個体、大戸川 1 個体、木津川 1 個体、小泉川 1 個体、琵琶湖湖岸である片山、宮ヶ浜 1、海津、大浦、菅浦、飯浦各 3 個体、淀川以外の水系として中禅寺湖 1 個体、湯ノ湖 1 個体、芦ノ湖 1 個体のほか河川から得られた 11 個体合計 55 個体、外群としてオオシロカゲロウ、近縁種間の関係を明らかにするため同属種としてミドリタニガワカゲロウ、*Ecdyonurus levis*、ミナミタニガワカゲロウ、トラタニガワカゲロウ *Ecdyonurus tigris* Imanishi、クロタニガワカゲロウ *Ecdyonurus tobiironis* Takahashi、各 1 個体を加え解析に供した (Table 3-3)。

##### 4-2-2-2 核 DNA の解析

核 DNA にある 28S ribosomal RNA 遺伝子(以下 *28S rRNA*)の一部塩基配列 (654 塩基)をプライマー 28SFF, 5'-GGGACCCGTC TTGAAACAC: 28SDD, 5'-TTACACA CTCCTTAGCGGAT (Monaghan *et al.*, 2007)を用いて「2-2-2」「2-2-3」に従い増幅、塩基配列を決定した。RaxML-NG (Alexey *et al.*, 2019)を用いて最尤系統樹を構築した。*28S rRNA*の塩基進化モデルは、RAxML に実装される Best Model に従い GTR モデル (Posada & Crandall, 1998)とした。

#### 4-3 結果

##### 4-3-1 ミトコンドリア DNA の解析

###### 4-3-1-1 系統とハプロタイプ

最尤系統樹を Fig. 4-2 に示した。淀川水系 218 個体の内、Abbreviation を赤文字で示した 7 個体は monophyletic clade を示し (ただしそのうちの 1 クレードは 2 個体からなる)、他の 211 個体は第 3 章で定義した系統 C・D・F・G・H に分けられた。

淀川水系における 5 ハプログループの分布を Fig. 4-3 に示した。琵琶湖湖岸にある 7 地点 (Sampling site code (本章内、以下略) 26・27・28・29・30・31・32) からハプログループ F が検出された。

琵琶湖流入河川である姉川 (1) からハプログループ C・D・H を、矢倉川 (2) からハプログループ C・G・H を、芹川 (3) からハプログループ C・D・G・H を、犬上川 (4) か

らハプログループ H を、愛知川 (5) からハプログループ C・D・G・H を、佐久良川 (6) からハプログループ D・H を、野洲川 (7) からハプログループ C、H を、目田川 (8) からハプログループ C・D・H を、雄琴川 (9) からハプログループ D・G・H を、真野川 (10) からハプログループ D・G・H を、和爾川 (11) からハプログループ G を、鴨川 (12) からハプログループ D・G・H を、安曇川 (13・14・15) からハプログループ D・G・H を、石田川 (16) からハプログループ G・H を、知内川 (17) からハプログループ G・H を、大川 (18) からハプログループ C・D・H が検出された。

琵琶湖流出河川である瀬田川 (19) からハプログループ C・G・H を、宇治川 (20) からハプログループ H が検出された。流出河川の支流である三田川 (21) からハプログループ G、大戸川 (22) から C、小泉川 (23) からハプログループ D、木津川 (24) からハプログループ H、長代川 (25) からハプログループ G・H が検出された。

12 ハプロタイプから構成されるハプログループ C、23 個体は琵琶湖東岸流入河川 14 個体 (姉川 3 個体、矢倉沢 2 個体、芹川 2 個体、愛知川 2 個体、野洲川 3 個体、目田川 2 個体)、北岸流入河川大川 3 個体、流出河川 6 個体 (瀬田川 5 個体、大戸川 1 個体) から検出された。

10 ハプロタイプから構成されるハプログループ D、17 個体は琵琶湖東岸流入河川 9 個体 (姉川 3 個体、芹川 1 個体、愛知川 2 個体、佐久良川 2 個体、目田川 1 個体)、北岸流入河川大川 1 個体、琵琶湖西岸流入河川 6 個体 (雄琴川 2 個体、真野川 1 個体、鴨川 1 個体、安曇川 2 個体)、流出河川木津川 1 個体から検出された。

48 ハプロタイプから構成されるハプログループ F、69 個体は琵琶湖北岸 5 地点 50 個体 (片山 10 個体、海津 10 個体、大浦 10 個体、菅浦 10 個体、飯浦 10 個体)、東岸 2 地点 19 個体 (宮ヶ浜 1 : 9 個体、宮ヶ浜 2 : 10 個体) から検出された。

16 ハプロタイプから構成されるハプログループ G、24 個体は琵琶湖東岸流入河川 4 個体 (矢倉沢 1 個体、愛知川 2 個体、芹川 1 個体) 琵琶湖西岸流入河川 16 個体 (雄琴川 2 個体、真野川 5 個体、和爾川 2 個体、鴨川 2 個体、安曇川 3 個体、石田川 1 個体、知内川 1 個体、) と流出河川 4 個体 (瀬田川 1 個体、三田川 2 個体、長代川 1 個体) から検出された。

41 ハプログループ H、78 個体は琵琶湖東岸流入河川 35 個体 (姉川 4 個体、矢倉沢 2 個体、芹川 5 個体、犬上川 1 個体、愛知川 4 個体、佐久良川 8 個体、野洲川 4 個体、目田川 7 個体)、琵琶湖西岸流入河川 30 個体 (雄琴川 6 個体、真野川 3 個体、鴨川 6 個体、安曇川 11 個体、石田川 2 個体、知内川 2 個体)、琵琶湖北岸流入河川大川 5 個体、流出河川 8 個体 (瀬田川 4 個体、宇治川 2 個体、小泉川 1 個体、長代川 1 個体) から検出された。

日本列島集団 393 個体のハプロタイプ間の関係を示すハプロタイプネットワーク図を Fig. 4-4 に示した。淀川水系から得られたハプロタイプは黒、それ以外の水系から得られたそれは黄色で示した。最尤系統樹から monophyletic clade とした淀川水系 7 個体 (Abbreviation; YGR\_1, YGR\_5, SRI\_7, MAN\_5, KMG\_9, OOK\_19, ADO5\_3) は赤で、淀川水系以外 2 個体 (Abbreviation; SHU\_1, KTO\_2) は黄色で示し、それらはハプログループ E・D・A・H の

間に位置した。ハプログループ D は淀川水系集団と分水嶺を超えた揖斐川水系牧田川 (Abbreviation; IBI\_5) がサブハプログループを構成した。Fig. 4-5 に淀川水系集団 218 個体のハプロタイプネットワーク図を示した。ハプログループ F は、優先的なハプロタイプである F4 を中心に多くの 1 塩基置換によるハプロタイプが派生する一斉放散型のネットワーク構造であった。ハプログループ G および H は集団の歴史の長さを示唆するハプロタイプが複雑に交差する安定維持型を示した (小池・松井, 2003)。

Fig. 4-6 ミスマッチ分布図より、ハプログループ C は 1 から 6 塩基置換、ピークが 2 塩基置換にある二峰型を、ハプログループ D は 1 から 9 塩基置換、ピークが 2 塩基置換にある二峰型を示した。ハプログループ F は 1 から 8 塩基置換、ピークが 2 塩基置換にある単峰型を、ハプログループ G は 1 から 8 塩基置換、ピークが 2 塩基置換にある単峰型を、ハプログループ H は 1 から 12 塩基置換、ピークが 2 塩基置換にある単峰型を示した。ハプロタイプ間の分岐の深さの指標となる平均塩基置換数は、水系全体では 11.4、ハプログループ C : 1.9、D : 2.8、F : 2.7、G : 3.6、H : 3.1 であった。ミスマッチ分布図中に観察値の平均塩基置換数を▲で示した。

#### 4-3-1-2 遺伝的多様性

淀川水系集団と比較するため日本列島スケール集団を加え Table 3-2 に示した。淀川水系集団全体のハプロタイプ多様度は  $0.99 \pm 0.00$  であり、日本列島スケール集団全体  $0.92 \pm 0.01$  に比較して高い多様性を示した。塩基多様度は淀川水系全体と日本列島全体では  $0.0100 \pm 0.2411 : 0.0103 \pm 0.2059$  であり近似した。Shannon の多様度指数は  $4.51 : 4.57$ 、均衡性指数は  $0.93 : 0.92$  であり、淀川水系全体と日本列島全体では近似した。

ハプログループごとの多様度は、日本列島スケール集団と比較し、ハプログループ C  $0.78 \pm 0.09 : 0.90 \pm 0.06$ 、ハプログループ D  $0.84 \pm 0.087 : 0.94 \pm 0.05$ 、ハプログループ G  $0.93 \pm 0.04 : 0.98 \pm 0.01$ 、ハプログループ H  $0.96 \pm 0.01 : 0.93 \pm 0.05$  であり、淀川水系集団はハプログループ F および H を除き低い傾向にあった。同様にハプログループ内の塩基多様度も近似する傾向を示したが、ハプログループ H は  $0.0027 \pm 0.0323 : 0.0022 \pm 0.0075$  であり、淀川水系集団は高い塩基多様度を示した。Shannon の多様度指数および均衡性指数はハプログループ F および H は、それぞれ  $3.59, 3.38$  および  $0.93, 0.91$  であり淀川水系集団は高い遺伝的多様性を示した。

#### 4-3-1-3 歴史的集団サイズ動態

Tajima's  $D$  は淀川水系全体および各ハプログループともに有意に負の値を示し、過去に急激な集団サイズの拡大を経験したことを示唆した (Table 3-2)。集団拡大モデルへの適合を検定する SSD の  $p$  値はすべてのハプログループで危険率 0.05 以上であり信頼区間内であった。ハプログループ F 及び H について、EBSP 図を構築し Fig. 4-7 に示した。共に、最終間氷期後、およそ 10 万年から集団サイズの拡大を示した。



#### 4-3-2 核 DNA 28S rRNA による系統解析

Fig. 4-8 最尤系統樹は、外群であるオオシロカゲロウに対してトラタニガワカゲロウ、クロタニガワカゲロウ、ミナミタニガワカゲロウ、ミドリタニガワカゲロウ、*Ecdyonurus levis*、シロタニガワカゲロウは種ごとに単系統群を示し、形態による分類の結果を支持した。ミトコンドリア DNA を解析したシロタニガワカゲロウ 69 個体の内、17 個体を解析した結果、琵琶湖北岸 5 地点から得られた 14 個体はサブクレードを構成した。シロタニガワカゲロウの塩基配列は、琵琶湖以外の個体は 85 番目の塩基はシトシン・ホモ (C/C) (以下 85-C/C) であったが、琵琶湖北岸集団の個体は 85-C と 85-T の対立遺伝子が存在した。琵琶湖北岸に位置する片山 (26)、海津 (29)、大浦 (30)、菅浦 (31)、飯浦 (32) のそれは 85-T/T、あるいは 85-Y (C/T) であった。東岸に位置する宮ヶ浜 1 (27) は河川個体と同じ 85-C/C のみが検出された。琵琶湖 17 個体中 T/T は 5 個体(28%)、Y (C/T) は 9 個体(53%)、C/C は 3 個体(18%)であり、遺伝子型頻度は T/T : 0.29、Y(C/T) : 0.53、C/C : 0.21 であった。

#### 4-4 考察

##### 4-4-1 ハプログループの分布

淀川水系集団に近年の移住がないと仮定した場合、その祖先集団は気候変動を等しく経験し、それによる遺伝的変異は塩基配列に記録されている。EBSP、集団拡大モデルおよび Tajima's *D* の有意に負の値から淀川水系集団はボトルネックを経験し、その後に集団サイズが拡大した集団である (Table 3-2 and Fig. 4-7)。しかし monophyletic clade である流入河川の Abbreviation; YGR\_1, YGR\_5, SRI\_7, MAN\_5, KMG\_9, OOK\_19, ADO5\_3 は、ハプログループ A・H・D・E をつなぐ位置から検出され、ボトルネックの影響を受けずに絶滅を免れたハプロタイプである可能性がある (Figs. 4-2, 4-4, and 4-5)。いずれも幼虫であるこれら標本に他との形態的差異は見いだせなかった。

琵琶湖固有であるハプログループ F は、琵琶湖の誕生による他集団からの分断によって生じた異所的系統分化と考えられる。一斉放散型のハプロタイプネットワーク図(Fig. 4-5)は創始者効果によるものと推定した。優先的なハプロタイプである F4 を中心にその後の集団サイズの増加により、多くの 1 塩基置換によるハプロタイプが派生した。そのため、ハプロタイプ多様度は  $0.97 \pm 0.013$  と高い値を示すが、塩基多様度は  $0.0023 \pm 0.0184$  であり、他と比較しても低い多様度を示す(Table 3-2)。

ハプログループ C は、琵琶湖東北岸に流入する河川にのみ分布する。現琵琶湖が移動障壁として機能し、その出現年代として推定される 43 万年前以降に系統分化の中心部から不完全な移動障壁を超えて淀川水系に分散したと考えられる。

ハプログループ D は、琵琶湖流出入河川集団がサブハプログループを構成し(ただし、揖斐川水系牧田川 1 個体 (ハプロタイプ D3, Specimen code : 54-2) もそれに含まれた。伊吹山地と鈴鹿山脈の間にある地形的に低い場所である関ヶ原付近の不完全な移動障壁を超え揖斐川への遺伝子流動と考えられる。)、四国集団と明瞭に分化している。しかし、淀川水

系雄琴川 1 個体(ハプロタイプ D19, Specimen code : 9-10) は四国集団に含まれた。大阪平野は約 1.2~1.3Ma 以降に 10 回の大阪湾の侵入・後退があり (市原, 1993 ; 吉川・三田村 1999)、過去に四国集団との接触があった可能性が考えられる。ミスマッチ分布の二峰型は二次的接触の可能性を支持する。淀川水系には現琵琶湖出現以前から分布し、最終間氷期のボトルネック以降は大阪湾が移動障壁となり四国集団とは遺伝子流動は生じていないと考えられる。

ハプログループ G は、琵琶湖流出入河川に分布する。近畿三角帯東側の山地が移動障壁であり、日本列島スケールでも分布域の東縁である。日本列島スケールと同様に淀川水系内においても、ハプロタイプ多様度、塩基多様度は高い多様性を示した。ハプロタイプネットワーク図のミッシングハプロタイプを含んだ安定維持型および平均塩基置換数からも現琵琶湖出現以前に系統分化の中心部から移動・分散した集団であると考えられる。

ハプログループ H は、琵琶湖流出入河川に広く分布し、日本列島スケールに比較し遺伝的多様性が高いこと、およびハプロタイプネットワーク図が 1 塩基置換の多い一斉放散型であることに加えミッシングハプロタイプを持つ複雑な型であること、平均塩基置換数が 3.1 と大きいことから淀川水系は系統分化の中心であった可能性がある。

古琵琶湖堆積盆周辺の古淀川水系の成立は約 100 万年前以降であり、伊吹山地に続く鈴鹿山脈北部と養老山地が隆起し分水嶺となり、それまで伊勢湾方向に流出していた古水系は、京都方向に流出を始めたことによる (里口, 2017)。古淀川水系 100 万年前誕生仮説は、本研究の推定系統分化年代と概ね一致する。更新世中期に不完全な移動障壁を超えた系統 D・G が古淀川水系に分布し、その後 50 万年前以降に隆起が顕在化した近畿三角帯山地 (三好・石橋, 2008)・現琵琶湖・瀬戸内海・大阪湾・紀伊水道などの海域の出現により、ハプログループ C・F・H が淀川水系に隔離された。これらが淀川水系に高い遺伝的多様性が保存された要因と推定した。今後、より詳細な遺伝情報の収集および古地理学により検討を行う必要がある。

#### 4-4-2 琵琶湖集団および北岸集団の特異性

ミトコンドリア DNA を解析した 69 個体の内、17 個体の *28S rRNA* を解析した結果、琵琶湖北岸集団からのみ 85-T が検出された。琵琶湖北岸集団には対立遺伝子 85-T と 85-C が存在し、東岸集団には 85-C のみが存在した。Fig. 4-2 最尤系統樹、Fig. 4-3 ネットワーク図のハプログループ F の部分を拡大したものを Fig. 4-9、Fig. 4-10 に示した。赤で示した 14 のミトコンドリア DNA 遺伝子型は *28S rRNA* が 85-T であることを示し、Abbreviations MGH が東岸の個体である (Fig. 4-9)。琵琶湖北岸集団と東岸集団には遺伝的交流はなく、85-T の突然変異は北岸集団中のみ広がっている。

北岸岩礁帯に分布する 85-T 集団は魚類ヒガイ分類群の分布様式と重なる。すなわち、マイクロサテライトとミトコンドリア DNA cytochrome b 遺伝子の解析により、琵琶湖固有亜種であるピワヒガイ *Sarcocheilichthys variegatus microoculus* Mori は琵琶湖流入河川を

含む西南日本の河川に広く分布するカワヒガイ *Sarcocheilichthys variegatus variegatus* (Temminck & Schlegel) から進化し、琵琶湖北湖にのみ分布するアブラヒガイ *Sarcocheilichthys biwaensis* Hosoya はビワヒガイから進化した琵琶湖北湖固有種であることが明らかにされている(Hosoya, 1982; Komiya *et al.*, 2014; 渡辺, 2021)。また、水生昆虫であるマルヒラタドロムシ (*Eubrianax ramicornis* Kiesenwetter) は日本列島では東北から九州に広く分布し、幼虫は主に河川の中流から下流域に分布し、止水環境では唯一琵琶湖の岩礁帯湖岸にのみ分布する。河川ではシロタニガワカゲロウと同所的に分布する場合も多く、主に流水環境に分布するなどの共通点がある。Kondo ら(2022)は、COIの解析から、その遺伝的構造は琵琶湖とそれ以外の地域の2系統に分かれ、琵琶湖集団は北岸の岩礁帯と東岸の宮ヶ浜にのみ分布することを明らかにした。異なる分類群から得られたこれらの共通する結果は、シロタニガワカゲロウ琵琶湖集団の岩礁環境への適応を示唆する。北岸と東岸の一部に発達する岩礁帯の環境は、河川の流水環境に似て風と波が卓越し、多くの固有種が分布する(西野, 2017)。

琵琶湖集団固有の遺伝構造と卵殻の表面構造の違い(Fig. 1-6)、河川集団とは異所的分布であることに加え、群飛行動の差異が観察されている。すなわち、河川での観察例は、晩春から初夏にかけて、日没後の暗くなった時間帯である(今西, 1945; 小林, 1986; 金子未発表, 第1章参照)。一方、琵琶湖岸では日中に群飛が観察されている(石綿・西野私信)。利根川に同所的に分布するシロイロカゲロウ属の例では、アカツキシロカゲロウ *Ephoron eophilum* Ishiwata の群飛は日の出前に行われ、オオシロカゲロウの群飛は日没後に行われる(青柳ほか, 1998)。このように近縁な種間では、繁殖行動に伴う時間や場所を違える生殖前隔離が生じることがある。これらのことから、琵琶湖集団はシロタニガワカゲロウ隠ぺい種の可能性があるかと推定した。

## 第5章 相模川水系に分布するシロタニガワカゲロウの遺伝的構造

### 5-1 はじめに

本州中央部に位置し、太平洋に向けて開けた湾である相模湾は、フィリピン海プレートの沈み込み帯であるため大陸棚が発達せず、河口から約2 km 沖の海底は相模トラフから分かれた平塚海底谷につながり水深は100 mにもなる。そのため氷河期の海退時も海岸線の後退はほとんど見られない。氷期-間氷期サイクルに伴う気候変動の影響が河川形態や河床勾配に顕著に表れる特異な河川である。更新世後期最終氷期は、相模川中流に日本有数といわれる扇状地性の河岸段丘（相模原台地）を発達させた（第3章3-4-4参照）。下流から河口域にも地表下に埋没する河岸段丘が認められる。また、12.4 万年前の最終間氷期には、海岸線が内陸に侵入し堆積した下末吉層が相模川、中津川、小鮎川合流付近西側、現海岸線から約15 km 地点に確認される（久保, 1997; 松島, 1999; 佐藤・久保, 2016; 佐藤ほか, 2021）。

相模川水系は急峻な丹沢山塊から豊富な礫の供給を受け、上流は谷底平野と峡谷、中流には礫河原が広がり、急勾配の支流を持ち、加えて地球規模の気候変動の影響を河川形態に強く受ける特徴がある。第3章では、シロタニガワカゲロウは最終間氷期に生息地と集団サイズの減少を、その後の最終氷期に中下流域に出現した礫河原の生息地と集団サイズの拡大を経験したことを明らかにした。気候変動によって生じる河川形態の変動が遺伝的構造へ与える影響の詳細を解明するため、相模川水系を研究対象河川として選定した。

相模川は山中湖を水源とし、関東山地と丹沢山塊の間を東流したのち、丹沢山塊の東端に沿って南流し、相模湾にそそぐ幹線流路延長113 km、集水域1,680 km<sup>2</sup>の河川である（国土交通省河川局, 2000）。山梨県にある上流域は桂川と呼ばれ、笹子峠を源流とする笹子川と合流する。富士吉田市から笹子川合流までは完新世に堆積した富士火砕岩が作る桂川谷底平野が発達する（産総研地質調査総合センター）。大月から相模湖までは、丹沢山塊や小仏山地を浸食する深い溪谷や峡谷、桂川河岸段丘が分布する。この間、関東山地を集水域とする葛野川・鶴川・沢井川が左岸に合流する。相模湖と津久井湖を経て沖積平野である相模平野を南流し、丹沢山塊核心部を水源し、宮ヶ瀬ダム上流はV字谷の溪谷である最大の支流中津川と小鮎川に合流する。その下流約5 kmで玉川と合流する。小鮎川と玉川は、丹沢山塊前衛に位置する大山(1,252 m)から関東山地と丹沢山塊を分ける経ヶ岳付近に伸びる尾根で分水された斜面を集水域とする流程の短い小河川であり、沖積平野部の下流域にも顕著な礫河原は発達しない。一方、沖積平野部を流下する相模川と中津川は丹沢山塊から浸食・運搬された礫により円礫河原が発達する。玉川合流地点から下流約4 kmにある寒川堰が、汽水域と淡水域を分けている（神奈川県 a, b, c）。相模川の河床勾配は、下流の感潮区間では1/2000であり、その上流の城山ダムまでは1/1200から1/150、相模ダムより水源の山中湖までは1/40~1/100である。流域の年間降水量は、山中湖の年降水量が約2,300 mm（1979~2004年の平均値）であり、日本の平均約1,700 mmと比較すると水源となる上流域は多雨地域である（国土交通省河川局, 2000）。

## 5-2 方法

### 5-2-1 採集地点と標本数

採集調査は2015年から2022年の間に寒川堰下流の汽水域から本流および支流の上流まで実施した。Fig. 5-1、Table 4-1 に示す相模川本流8地点 83 個体、玉川2地点 10 個体、小鮎川3地点 23 個体、中津川5地点 70 個体、中津川支流水沢川1地点 1 個体、串川2地点 10 個体、秋山川1地点 1 個体、笹子川1地点 6 個体、菅野川1地点 1 個体、合計 226 個体を解析に供した (Ans. LC603425-LC603611, LC512973, LC730080, LC30117)。

Sampling site code 10 および 19 はそれぞれ玉川、中津川支流水沢川の堰堤上流側に位置する。Sampling site code 22 および 24 はそれぞれ秋山川のダム下流、桂川支流菅野川に形成された谷底平野に位置する。これらの地点は微小面積の生息地であった。継続した調査では、これらの4地点からは新たな標本は得られなかった。採集地点の標高と河口からの直線距離を河川ごとに Fig. 5-2 に示した。

### 5-2-2 遺伝的構造の解析

遺伝子解析は *COI*658 塩基を用いた。ゲノム抽出、増幅、シーケンス、アッセンブル、マルチプルアライメント、ハプロタイプの決定、ハプロタイプネットワーク図構築、遺伝的多様性の検出は「2-2-2」・「2-2-3」に従った。それらに加え、2地点間の遺伝的距離 (Nei's *D*) と地理的直線距離の傾向を把握するため、Mantel test (Mantel, 1967) を Excell アドインソフト XLSTAT (LUMIVERO, Denver, USA) で行い 10,000 回のモンテカルロ・シミュレーションを生成し有意性を検定した。遺伝的な差異が集団の階層構造のどこに存在するかを把握するため、ハプロタイプ頻度の差を定量化し解析する AMOVA (分子分散分析 Analysis of Molecular Variance : Excoffier *et al.*, 1992) を Arlequin で行った。10,000 回の permutation test (危険率 5%) によりその有意性を検定した。相模川・玉川・小鮎川・中津川・串川・笹子川を各グループとし、階層は、グループ間・グループ内の地点間・全ての地点内とした。地点間の遺伝的分化の程度を推定するため 2 地点間のペアワイズ *F<sub>st</sub>* 値を Arlequin により求めた。有意性の検定は、危険率 5% (ボンフェローニ補正後 0.00005%、Bonferroni, 1936)) で 10,000 回の permutation test で行った。

### 5-2-3 歴史的集団サイズ動態の推定

推定された遺伝子流動が現在の個体の交流の結果であるか、あるいはボトルネックなどの歴史的背景があるかを区別するため、「3-2-3」に従い Tajima's *D*・集団拡大モデルへの適合・EBSP を日本列島スケールと比較した。

## 5-3 結果

### 5-3-1 ハプロタイプと遺伝的多様性

Fig. 5-3 ベイズ系統樹から、203 個体は 3 章で定義した系統 A に、20 個体は系統 C を構

成した。小鮎川の2個体と中津川の1個体はそれぞれ monophyletic clade を構成し系統 J・L・K と定義し、集団解析から除いた。相模川水系 24 地点 226 個体から 41 のハプロタイプが検出された。Fig. 5-4 にハプロタイプネットワーク図を示した。ハプログループ A は、優先的なハプロタイプである A1 を中心に多くの 1 塩基置換によるハプロタイプが派生する一斉放散型のネットワーク構造であった。一方、ハプログループ C はミッシングハプロタイプを含んだ。ハプログループ A は全ての地点 (9 河川 24 地点) から検出されたが、ハプログループ C は 5 河川の中流域 13 地点からのみ検出され、ハプログループ C のみが検出された地点はなかった (Fig. 5-1)。各地点のハプロタイプ多様度を Table 4-1 に示した。6 河川のハプロタイプ多様度、塩基多様度、Shannon の多様度指数を Table 4-2 に示した。上流にある笹子川 (Sampling site code 23) は、いずれの多様性も他の河川や地点に比して著しく低かった。ハプログループ内のハプロタイプリッチネス、Shannon の多様度指数、均衡性指数、ハプロタイプ多様度、塩基多様度およびハプログループ間の塩基多様度を Table 4-3 に示した。ハプログループ A の塩基多様度は  $0.00196 \pm 0.0250$  であり日本列島スケールの他の系統に比較して、低い多様度であった。

### 5-3-2 AMOVA 解析と Mantel 検定

AMOVA 解析の結果、河川間と河川内の地点間の差異は少なく、変異の 99% は地点間の差異によるものであった (Table 4-4)。2 地点間のペアワイズ  $F_{st}$  は Bonferroni 補正後に有意に分化が認められる地点間はなかった (Table 4-5)。Mantel test は負の相関 ( $p < 0.0001$ ,  $r = -0.235$ ) を示した (Fig. 5-6)。

### 5-3-3 歴史的集団サイズ動態

河川ごとの Tajima's  $D$  を Table 4-2、ハプログループごとのそれを Table 4-3 に示した。玉川・中津川・ハプログループ A・水系全体集団は有意に負の値を示し、近年の集団サイズの拡大を示唆した。ミスマッチ分布 (Fig. 5-5 and Table 4-3) のピークおよび平均塩基置換数は、ハプログループ A は 0 と 1.2 の単峰型、ハプログループ C はピークが 0 と 3 にある二峰型を示し平均塩基置換数は 1.6 であった (Fig. 5-5)。集団拡大モデルからの有意な逸脱はいずれも認められなかった (Table 4-3)。集団サイズ拡大の推定年代はハプログループ A・C がそれぞれ 0.04Ma (95%信頼区間、以下、CI: 0.03–0.07Ma)、0.14Ma (CI: 0.02–0.26Ma) であった。一方、日本列島スケールでは、ハプログループ A・C は Tajima's  $D$  は有意に負の値を示し近年の集団サイズの拡大を示唆した。集団拡大モデルからの有意な逸脱はいずれも認められず、集団サイズ拡大の推定年代はハプログループ A・C がそれぞれ 0.10Ma (CI: 0.04–0.17Ma)、0.07Ma (CI: 0.05–0.10Ma) であった (Table 2-1)。

EBSP は、相模川水系のハプログループ A は約 6 万年前から集団サイズが拡大したことを示すが、ハプログループ C は 12 万年前から集団サイズは平衡にあることを示した (Fig. 5-7)。一方、日本列島スケールではともに約 8 万年前から集団サイズの拡大を示した (Fig. 3-

5)。

#### 5-4 考察

##### 5-4-1 ハプログループ C の由来

相模川水系の中流にはハプログループ A および C が同所的に分布した。第 3 章でハプログループ C は本州の内陸部の河川にも分布することを示した。すなわち、天竜川支流新山川 (Sampling site code 本章内以下略: 45, LC513012, LC513507; LC513027, LC513522; LC513028, LC513523) にはハプログループ C のみが、信濃川支流犀川(42, LC513021, LC513516; LC513022, LC513517)、女鳥羽川(43, LC513037, LC513532)、利根川(24, LC513011, LC513506)およびその支流鬼怒川(22, LC513026, LC513521)はハプログループ A と同所的に分布する。一方、相模川水系上流からはハプログループ C は検出されなかった。Tajima's  $D$ ・集団サイズ拡大モデル・EBSP は、日本列島スケールのハプログループ C は歴史的に集団サイズを拡大したことを示唆する一方、集団サイズ拡大モデルを以外は、相模川水系のハプログループ C の歴史的集団サイズ拡大を示唆しない (Table 2-1 and Fig. 3-5)。Mantel test の負の相関は、地理的距離が小さい地点間の一部に遺伝的距離が大きい地点間があることを示し、ハプログループ A および C が中流域で同所的に分布する結果を反映していると考えられる。これらからハプログループ C は、隣接する水系から相模川水系中流への近年の遺伝子流動の可能性があると推定した。しかし、より広範囲の水系を長期間調査する必要がある、今後の課題である。

##### 5-4-2 メタ個体群構造

Sampling site code 8・23・24 に本種が分布するためには相模湖から笹子川合流間の分布不連続域を超えて、個体が移動・分散する能力を持たなければならない。加えて遺伝的均一性を維持するためには地点間でスムーズな遺伝子流動が生じる必要がある。水系全体に及ぶ遺伝子流動は、高い遺伝的連続性と低い遺伝的分化をもたらし、集団サイズ動態のプロセスは水系スケールの遺伝的構造に影響する (Finn *et al.*, 2007 ; Monaghan *et al.*, 2002)。ハプロタイプネットワーク図・ミスマッチ分布のピーク・Tajima's  $D$ ・集団サイズ拡大モデル・EBSP からハプログループ A は、ボトルネック後の急激な集団サイズ拡大および 1 塩基置換による派生手的ハプロタイプが生じ、強い遺伝子流動水により水系全体に遺伝的均一性がもたらされたと推定した。

ハプログループ A の歴史的な集団サイズの拡大と遺伝子流動は、相模川水系全体のシロタニガワカゲロウの遺伝的構造と現在の分布に影響を及ぼしている。また、上流域に存在する局所個体群は、中流域からの多数の移動・分散個体によって維持されていると考えられ、水系全体をメタ個体群の単位として捉えることができる。メタ個体群は不完全に分断された地域個体群の集合であり、各地域個体群間で少数の個体、遺伝子の交流がある個体群全体を指す概念である。個々の個体群が孤立して存在している場合と比較して、特定の個体群が

単独で存続できない状況でも、他の地域からの移入によって存続が可能となることで、全体的な生存性が向上すると考えられる。これにより、全体の個体数も増加することが期待される(Levins, 1969)。

保全生態学で多く用いられる概念であり、いくつかのメタ個体群動態モデルが提案され、絶滅に影響を及ぼす要因を評価し、具体的には保全方法の指針を与えている(例えば、Hastings & Harrison, 1994; Viana & Chase, 2019)。本種と同様に相模川の礫河原を代表する昆虫カワラバッタの遺伝的構造もメタ個体群構造である可能性があるが、その生息地の多くは既に失われ確認することはできない(竹内・藤田裕, 1998)。相模川、多摩川、鬼怒川にのみ分布する維管束植物カワラノギク(環境省レッドリスト絶滅危惧II類、環境省b; 神奈川県レッドリストIA類、神奈川県d)は、相模川と多摩川両水系を単位としたメタ個体群の遺伝的構造を示すことが知られている(倉本, 1997; Maki *et al.*, 1996)。カゲロウ目チラカゲロウは千曲川-信濃川水系でメタ個体群の遺伝的構造を示すことが明らかにされている(Saito & Tojo, 2016 b)。

Bohonak & Jenkins (2003)は、淡水無脊椎動物の多くは、頻繁にかつ広範囲に受動的に分散するメタ個体群であるとした。相模川水系に本種と同所的に分布することが多いマツムラヒラタカゲロウ *Epeorus l-nigrum* Matsumura などの遺伝的構造の検討が必要であろう。また、本種がメタ個体群構造であることを移動・分散から裏付ける上流に位置する微小生息地の消長など、継続した調査も今後の課題である。

#### 5-4-3 歴史的河川形態と歴史的集団サイズ動態

集団サイズ拡大モデルおよびEBSP (Extended Bayesian Skyline Plot) による推定時期である約60,000年前以降の期間は、海洋酸素同位体ステージ(Shackleton, 1995) 4から5(約70,000~17,000年前)の一部に相当する。この期間、相模地方は氷期の寒冷な気候下であったことが明らかとなっている(辻ほか, 1984)。この寒冷な期間には、海水面が現在より80mから110m低下し、相模川の河口も現在の位置からわずかに延長され、約2km沖に位置した。河口の延長が限定的であったため、海水面が低下すると、速やかに相模川下流域の河床は浸食され、河床勾配が増加した。その結果、中流から下流域にかけて、礫を基質とする10段以上の扇状地性の河岸段丘が形成された(久保, 1997)。

最終氷期の寒冷な気候は、相模川水系中下流域にシロタニガワカゲロウの好生息地となる広大な礫河原をもたらした。その結果、集団サイズの拡大および派生的なハプロタイプの出現、分布域の拡大をもたらしたと推定した。



## 第6章 終章

### 6-1 要約

源流域や飛沫帯などに分布が隔離された種は個体数が少なく遺伝子流動が起きにくく、集団分化が起きやすいことが知られている。対照的に、沖積平野の河川中流に分布するシロタニガワカゲロウは、水系間の高い遺伝子流動も予測できる。東北以南の礫河原の発達する多くの河川では個体密度が高い「普通種」であることが多い。本種は礫河原の指標生物として最適であり、日本列島スケールで得られる遺伝的構造の情報は河川管理への応用も期待でき、その有用性は高いと考えられる。本研究では、シロタニガワカゲロウの遺伝的構造とその成立過程を解明することを目的とした。

シロタニガワカゲロウとその近縁種であるミナミタニガワカゲロウ、ミドリタニガワカゲロウ、*Ecdyonurus levis* のミトコンドリア DNA *COI* および *16S rRNA* の塩基配列、およびミドリタニガワカゲロウの八重山諸島集団と台湾集団が 155 万年前に与那国海峡の成立によって両島集団が分断されたとする仮説を年代校正に用い分子時計を仮定した系統樹を構築し平均分子進化速度を推定した。推定値は  $0.0156 \pm 0.0041$ 、 $0.0059 \pm 0.0016$  であり、これは初めて明らかにされたカゲロウ目の分子進化速度である。

日本列島に分布するシロタニガワカゲロウは、地域性を持つ9系統の遺伝的構造を示し、中央高地と近畿三角帯付近が移動障壁となり、東日本集団と西日本集団に分けられた。最も祖先的である系統 I と他の系統の共通祖先は、更新世前期から中期に分化し、その後更新世中期に各系統が分化した。更新世中後期から活発となる東西圧縮運動により山地や海域など移動障壁の出現による分布域の分断と集団の隔離、系統の分化、および氷期間氷期サイクルによる集団サイズの増減の結果、突然変異の集団への固定が生じ、地域性のある系統分化が生じたと推定した。

近畿三角帯の山地と海域により分布地が隔離される淀川水系には 5 系統が分布し、高い遺伝的多様性が存在した。系統 C・D・G は不完全な移動障壁時代の移動・分散により、系統 F・H は淀川水系内で系統分化したと推定した。系統 F は琵琶湖の環境に適応した集団であり、さらに琵琶湖北岸集団には核遺伝子 *28S rRNA* に 85-C と 85-T の二つの対立遺伝子が存在した。琵琶湖東岸集団・河川集団・湖集団のそれは、85-C/C であった。シロタニガワカゲロウは、種としては普通種であるが、系統 E・F・I は分布地および個体数が少ない貴重な地域集団であり、系統 F は生殖隔離された隠ぺい種である可能性がある。

相模川水系では、系統 A は全ての地点から、系統 C は中流からのみ検出された。歴史的個体群動態の解析から、系統 C は隣接する水系から相模川水系中流への近年の遺伝子流動による可能性があるとして推定した。主要なハプロタイプである A1 は河口から直線距離 10 km、標高 7 m の Sampling site code 1 から 80 km、530 m の Sampling site code 24 まで水系全体に及ぶ広い範囲から検出された。遺伝的構造と歴史的個体群動態の解析は、遺伝子流動による強い遺伝的均一性を示唆した。上流にある孤立した生息地の消失を中流域にある多くの

生息地からの移動・分散個体によって回復する水系全体を単位としたメタ個体群構造であると推定した。

## 6-2 系統分化の説明仮説

本種が日本列島内で9系統に分化したことを説明する仮説として以下のように考察した。更新世中期の約100万年前まで、比較的起伏の少なかった日本列島は、更新世中期の約50万年前より山地の隆起、瀬戸内海や紀伊水道などの海域の形成、琵琶湖の出現(吉田, 1992; 吉川・三田村, 1999; Meyers, 1993)など現在の地形に通じる起伏のある列島へと変化し、地理的分断そして集団の隔離が生じた。隔離された集団の系統分化すなわち異所的系統分化(Avise, 2000)が生じた。

異所的系統分化が生じる要因として突然変異、創始者効果、自然選択による環境への適応、ボトルネック、遺伝的浮動、生物間相互作用などがあげられる。これら要因が複合的に作用して集団への固定が生じると考えられる。主な仮説として、地理的に隔離された集団がそれぞれの環境に適応し、生存に有利な変異が自然選択される自然選択説、地理的に隔離された集団に自然選択に対して中立な変異がランダムに独立して生じ遺伝的浮動によって集団に固定される中立説がある。系統 F 琵琶湖固有集団の分化は創始者効果に加え、他の湖にはない強風と高く強い波が押し寄せる琵琶湖岩礁帯の環境に適応した適応進化であり、他の系統と異なる系統 F の卵の表面構造が琵琶湖の環境に適応的である可能性が考えられる。各系統の分化と分布地の環境との関係については、今後の検討課題である。

## 6-3 本研究で得られた知見の工学的な活用

1997年改正の河川法は、治水・利水に加え「河川環境の整備と保全」が目的に加えられた。また、2008年に制定された生物多様性基本法は、生物多様性に配慮した事業活動の促進を強く求めている。河川管理および生態系の保全を行うに当たっては、生物の生息状況や種の多様性などの基本的な情報に加え、生物種ごとに異なる保全単位を把握し、その遺伝的多様性や遺伝的構造の特徴をも保全することが重要である。普通種であるシロタニガワカゲロウの遺伝的構造の解明から得られた河川環境の保全に関する知見は、本種の保全単位は相模川水系の場合は水系全体であり、メタ個体群の存続にはソース個体群(Dias, 1996)の生息基盤である礫河原の重要性である。

日本列島には急峻な山地から礫が河床に供給され、その結果中流に円礫河原が発達する河川が多く、相模川もその一つである(Figs. 6-1 (A), (B), (C), and (D))。相模川は円礫河原の水生生物を代表する鮎の漁場としても名を馳せ、鎌倉時代には「鮎河」と呼ばれ、支流に「小鮎川」の名を残す(相模川流砂系総合土砂管理推進協議会, 2015)。丹沢山塊がもたらす豊富な流水と礫が水生昆虫と藻類を育み、シロタニガワカゲロウ、カワラバツタ、コアジサシ、カワラノギク(Figs. 6-2 (A) and (B) : 平塚市博物館 HP より引用, (C) : 桂川・相模川流域協議会 HP より引用)などに代表される礫河原の生物とその生態系を支えてきた。明治・

大正・昭和初期の相模川中流域には広大な礫河原が広がり、流量も豊かであったことが写真からもうかがえる(Figs. 6-3 (A), (B), and (C))。一方現在の中流域では、礫河原の消失は顕著であり、低水路の固定化と高水路の樹林化が進んでいる(Fig. 1-2)。

相模川の集水域である丹沢山塊は関東大震災(1923年)および丹沢地震(1924年)により甚大な被害を受けた。その直後から現在まで、斜面の崩壊などによる土砂流出対策として非常に多くの治山・砂防堰堤等が丹沢山中に建設された(Fig. 6-4: 内山・鈴木, 2007より引用, 図中灰色の円で示した点が1基の工作物を表す)。また、相模川の河川水は飲用水・工業用水・農業用水として高度に利用されており、取水のための主なダムとしては、沼本ダム(1943年運用)、道志ダム(1955年運用)、相模ダム(1947年運用)、城山ダム(1965年運用)、宮ヶ瀬ダム(2000年運用)がある。さらに農業用水取水のための主な頭首工としては、相模川には諏訪森下頭首工、葉山島頭首工、清水下頭首工、小沢頭首工、磯部頭首工、中津川には坂本頭首工、才戸頭首工、金田牛久保頭首工、昭和用水頭首工がある。これらは用水・治山・治水・砂防などおおよそ市民生活に寄与するが、全て河川横断工作物であり、土砂移動の障害および河川流量の減少の原因と考えられる。中津川では宮ヶ瀬ダムの完成に伴い、出水時に流下する洪水の規模が変化し、平均年最大流量は、宮ヶ瀬ダムへの流入量 $470\text{ m}^3/\text{s}$ 程度に対し、中流の才戸橋では $180\text{ m}^3/\text{s}$ 程度となった。相模川では、定点調査地点であるSampling site code 2の200 m上流に位置する相模大橋において約 $10,000\text{ m}^3/\text{年}$ 程度の通過土砂量であり、昭和30年代の通過土砂量の約20%となった(相模川流砂系総合土砂管理推進協議会, 2015)。このような堰堤やダムなどの河川横断工作物とそれによる出水の調整と土砂移動の制限は、礫河原の面積の減少、高水敷の樹林化、低水路の固定化、河川の分断などによる生態系への影響などが指摘されている(例えば、五味・大平, 2019)。生物の生息基盤となる礫河原の減少と河道形態の改変は、時間の進行に伴って食物連鎖を通じ多くの生物種群へ影響することが懸念される。昭和30年代までは、相模川と中津川に広く分布したカワラノギクは、現在では低水路内の自生地は知られていない。礫河原の面積の減少は局所個体群消滅の一因とも推測されている(秋山, 2006; 伊藤, 1988; 倉本, 2016)。

礫河原固有生物の減少は全国的な課題であり(池田ほか, 2013)、各地で礫河原再生の取り組みもはじまっている(悴熊ほか, 2012)。例えば、ダム下流への置き砂は(Fig. 6-5 (A))、ダムに流入堆砂した土砂の一部を掘削後、ダム下流河道へ運搬仮置きし、洪水とともに仮置きした土砂を下流河川へ移動させるもので、河川環境や海岸線の後退などの課題改善に成果を上げている。また、スリット式堰堤は(Fig. 6-5 (B))、流れをさえぎることなく平常時には土砂を流下させ、洪水時には流量が大きくなって流れがせき上げられると土砂を一時的に堆積させる機能を持ち、河川上流域の小溪流に設置されることが多い。これらの対策を普及するとともに総合的根本的な土砂管理を行い土砂移動の連続性の確保、ひいては礫河原と浮石河床環境の回復創出が今後の課題である。

一方、この10年にわたり、私たちはこれまで経験したことのない温暖化による降水量の増加がもたらす生存の危機と直面し、高度に土地利用される沖積平野は、本来は氾濫原であ

ったことを再認識するに至った。心ならずも、気候変動がもたらすシロタニガワカゲロウの歴史的集団サイズ動態をわずか 10 年の間に目の当たりにした感がある。将来にわたる総合的かつ根本的な河川土砂管理として、沖積平野の利用方法を再考し、氾濫原としての役割を再認識することが極めて重要である。

#### 6-4 謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始ご指導ご配慮頂きました神奈川県工科大学工学部教授高村岳樹博士に厚く御礼申し上げます。神奈川県工科大学工学部客員研究員石綿進一氏には、本研究を始めるきっかけと研究全般にわたる数々のご支援ご指導を頂きました。放送大学教養学部教授二河成夫博士、大阪公立大学大学院理学研究科教授加藤幹男博士には、遺伝子解析についてご助言ご指導を頂きました。元びわこ成蹊スポーツ大学スポーツ学部教授西野麻知子博士、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター職員の方々には、情報のご提供など様々な便宜をお諮りいただきました。平塚市博物館学芸員野崎篤博士には、地質についてご助言ご指導を頂きました。小松将也氏には採集と解析にご協力を頂きました。ほかにも多くの方々から標本や情報、ご指導ご助言を頂いたことに御礼申し上げます。

#### 6-5 参照

英文

- Alexey MK., Diego D., Tomáš F., Benoit M., Alexandros S. (2019) RAxML-NG: A fast, scalable, and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, btz305. doi:10.1093/bioinformatics/btz305
- Aoki K., Kato M., Murakami N. (2009) Phylogeographical patterns of a generalist acorn weevil: insight into the biogeographical history of broadleaved deciduous and evergreen forests. *BMC evolutionary biology*, 9 (1): 1–11.
- Avisé, JC. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press, Cambridge, USA. 464pp.
- Bae YJ., Yoon IB. (1997) A revised catalogue of the Ephemeroptera of Korea. *Entomological Research Bulletin*, 23: 43–53.
- Bonferroni CE. (1936) Statistical theory of classification and calculation of the probability. *Publication of the R Institute Superiore of the Science of Economy and Commerce of Florence*, 8: 3–62.
- Bohonak AJ., Jenkins DG. (2003) Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecology letters*, 6(8): 783–796.
- Bouckaert R., Vaughan TG., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., *et al.*, (2019) BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 15: e1006650.

- Brittain JE., Sartori M. (2003) Ephemeroptera (Mayflies). Resh, V.H., Cardé, R.T. (eds.), *Encyclopedia of Insects*, Academic Press, San Diego, USA. 1168 pp.
- Dias PC. (1996) Sources and sinks in population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(8): 326–330.
- El Mousadik A., Petit RJ. (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and applied genetics*, 92: 832–839.
- Excoffier L., Lischer HE. (2010) Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Excoffier L., Smouse PE., Quattro J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131 (2): 479–491. doi: 10.1093/genetics/131.2.479
- Finn DS., Blouin MS., Lytle DA. (2007) Population genetic structure reveals terrestrial affinities for a headwater stream insect. *Freshwater Biology*, 52: 1881 – 1897. doi: 10.1111/j.1365-2427.2007.01813.x
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.
- France SC., Kocher TD. (1996) Geographic and bathymetric patterns of mitochondrial 16S rRNA sequence divergence among deep-sea amphipods. *Eurythenes gryllus*. *Marine Biology*, 126: 633–643.
- Fujisawa, T., Lee, C.M., Ishii, M. (2012) Species diversity of ground beetle assemblages in the distinctive landscapes of the Yodo River flowing through northern Osaka Prefecture, central Japan. *Japanese Journal of Environmental Entomology and Zoology*, 23(2): 89–100.
- Furukawa M., Tokuyama H., Abe S., Nishizawa A., Kinoshita H. (1991) Report on DELP 1988 cruises in the Okinawa Trough Part 2. Seismic reflection studies in the southwestern part of the Okinawa Trough. *Bulletin of the Earthquake Research Institute University of Tokyo*, 66: 17–36.
- Gernhard T. (2008) The conditioned reconstructed process. *Journal of theoretical biology*, 253 (4): 769–778.
- Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41: 95 – 98. doi: 10.4236/sgre.2015.64007
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. (1985) Dating the human-ape split by a molecular clock

- of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160–174.
- Hastings A., Harrison S. (1994) Metapopulation dynamics and genetics. *Annual review of Ecology and Systematics*, 25 (1): 167–188.
- Heled J., Drummond AJ. (2012) Calibrated tree priors for relaxed phylogenetics and divergence time estimation. *System Biology*, 61 (1): 138–49.
- Ho SY., Duchêne S. (2014) Molecular - clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Molecular ecology*, 23 (24): 5947–5965.
- Hosoya K. (1982) Classification of the Cyprinid Genus *Sarcocheilichthys* from Japan, with Description of a New Species 19810507. *Japanese Journal of Ichthyology*, 29(2): 127–138.
- Huelsenbeck JP., Ronquist F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- Huzita K. (1962) Tectonic development of the median zone (Setouti) of Southwest Japan since Miocene. *Journal of Geosciences Osaka City University*, 6: 103–144.
- Igarashi Y., Oba T. (2006) Fluctuations in the East Asian monsoon over the last 144 ka in the northwest Pacific based on a high-resolution pollen analysis of IMAGES core MD01-2421. *Quaternary Science Reviews*, 25(13-14): 1447–1459.
- Kaneko H., Ishiwata S., Bae YJ., Takamura-Enya T. (2021) Genetic characteristics and phylogeography of the habitat generalist mayfly *Ecdyonurus yoshidae* (Ephemeroptera: Heptageniidae) in the Japanese archipelago. *Entomological Research*, 51: 238–250. doi: 10.1111/1748-5967.12498
- Kaneko H., Ishiwata S., Liao YC., Takamura-Enya T. (2018) The genetic diversities and phylogenetic relationships of two genera, *Ecdyonurus* and *Afronurus*, of Heptageniidae (Ephemeroptera) in the Yaeyama Islands and Taiwan. *Biogeography*, 20: 6–20. doi: 10.11358/bioge0.20.6
- Kaneko H., Ishiwata S., Takamura-Enya T. (2022) The fine-scale genetic structure and dispersal ability of the mayfly *Ecdyonurus yoshidae* Takahashi (Ephemeroptera: Heptageniidae) in the Sagami River system, southern Kanto Region, Japan. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 25: 101996. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.101996>
- Kang SC., Yang CT. (1994) Heptageniidae of Taiwan (Ephemeroptera). *Journal of Taiwan Museum*, 47: 5–36.
- Katsura T., Nagano M. (1982) Geomorphology of Goto shelf channels off northern Kyusyu, Japan. *Report of hydrographic researches*, 17: 71–92.
- Kingman, JF. (2000). Origins of the coalescent: 1974-1982. *Genetics*, 156(4), 1461–1463.
- Koizumi I., Usio N., Kawai T., Azuma N., Masuda R. (2012) Loss of genetic diversity means loss of geological information: the endangered Japanese crayfish exhibits remarkable historical footprints. *PloS one*, 7(3): e33986.

- Komiya T., Fujita-Yanagibayashi S., Watanabe K. (2014) Multiple colonizations of Lake Biwa by *Sarcocheilichthys* fishes and their population history. *Environmental biology of fishes*, 97: 741–755.
- Kondo NI., Nishino M., Uenishi M., Ishikawa K., Nakajima N., Takamura N. (2022) Genetic differentiation of water penny beetles may be associated with the formation process of the ancient Lake Biwa. *bioRxiv*, 2022–11.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Larkin MA., Blackshields G., Brown N.P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam. *et al.*, (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23 (21): 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404
- Levins R. (1969) Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *American Entomologist*, 15 (3): 237–240.
- Librado P., Rozas J. (2009) DnaSP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btg359
- Maki M., Masuda M., Inoue K. (1996) Genetic diversity and hierarchical population structure of a rare autotetraploid plant, *Aster kantoensis* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 83 (3): 296–303.
- Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27 : 209–220.
- Meyers PA., Takemura K, Horie S. (1993) Reinterpretation of Late Quaternary sediment chronology of Lake Biwa, Japan, from correlation with marine glacial-interglacial cycles. *Quaternary Research*, 39: 154–162.
- Hubbard MD. (1990) *Mayflies of the world. : A Catalogue of the Family and Genus Group Taxa (Flora and Fauna Handbook)*, CRC Press. Boca Raton, Florida. USA. 136pp.
- Miyoshi N., Fujiki T., Morita Y. (1999) Palynology of a 250-m core from Lake Biwa: a 430,000-year record of glacial–interglacial vegetation change in Japan. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 104 (3-4): 267–283.
- Monaghan MT., Inward DJG., Hunt T., Vogler AP. (2007) A molecular phylogenetic analysis of the Scarabaeinae (dung beetles). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 674–692. doi: 10.1016/j.ympev.2007.06.009
- Monaghan MT., Spaak P., Robinson CT., Ward JV. (2002) Population genetic structure of 3 alpine stream insects: influences of gene flow, demographics, and habitat fragmentation. *Journal of the North American Benthological Society*, 21: 114–131. doi: 10.2307/1468304

- Navás L. (1912) Quelques Névroptères de la Sibirie méridionale-orientale. Review. *Russian Entomological Journal*, 12(3): 414–422.
- Nguyen LT., Schmidt HA., Von Haeseler A., Minh BQ. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32 (1): 268–274.
- Osozawa S., Shinjo R., Armid A., Watanabe Y., Horiguchi T., Wakabayashi J. (2012) Palaeogeographic reconstruction of the 1.55 Ma synchronous isolation of the Ryukyu Islands, Japan, and Taiwan and inflow of the Kuroshio warm current. *International Geology Review*, 54: 1369–1388. doi: 10.1080/00206814.2011.639954
- Ota H. (1998) Geographic patterns of endemism and speciation in amphibians and reptiles of the Ryukyu Archipelago, Japan, with special reference to their paleogeographical implications. *Researches on Population Ecology*, 40: 189-204.
- Palumbi SR., Martin A., Romano S., McMillan WO., Stice L., Grabowski G. (2002) *The simple fool's guide to PCR*, ver. 2.0. University of Hawaii, Honolulu.
- Papadopoulou A., Anastasiou I., Vogler AP. (2010) Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 1659–1672. doi: 10.1093/molbev/msq051
- Pielou, EC. (1969) *An introduction to mathematical ecology*, Wiley-Inter-science. New York, USA. 286pp.
- Posada D., Crandall KA. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817–818.
- Quan YT., Bae YJ., Jung JC., Lee JW. (2002) Ephemeroptera (Insecta) fauna of Northeast China. *Insecta Koreana*, 19: 241–269.
- Rambaut A., Drummond AJ., Xie D., Baele G., Suchard MA. (2018) Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67: 901–904. doi: 10.1093/sysbio/syy032
- Saito T., Hirano T., Prozorova L., Tu Do V., Sulikowska-Drozd A., Sitnikova T., *et al.*, (2018) Phylogeography of freshwater planorbid snails reveals diversification patterns in Eurasian continental islands. *BMC evolutionary biology*, 18: 1–13.
- Saito R., Jo J., Sekiné K., Bae YJ., Tojo K. (2016) Phylogenetic analyses of the isonychiid mayflies (Ephemeroptera: Isonychiidae) in the northeast palearctic region. *Entomological Research*, 46: 246–259.
- Saito R., Tojo K. (2016) a. Complex geographic-and habitat-based niche partitioning of an East Asian habitat generalist mayfly *Isonychia japonica* (Ephemeroptera: Isonychiidae) with reference to differences in genetic structure. *Freshwater Science*, 35(2): 712–723.
- Saito R., Tojo K. (2016) b. Comparing spatial patterns of population density, biomass, and



- genetic diversity patterns of the habitat generalist mayfly *Isonychia japonica* Ulmer (Ephemeroptera: Isonychiidae) in the Chikuma–Shinano River basin. *Freshwater Science*, 35 (2): 724–737.
- Schneider S., Excoffier L. (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079–1089.
- Segawa T., Yonezawa T., Mori H., Akiyoshi A., Allentoft ME., Kohno A., *et al.*, (2021) Ancient DNA reveals multiple origins and migration waves of extinct Japanese brown bear lineages. *Royal Society Open Science*, 8(8): 210518.
- Sekiné K., Hayashi F., Tojo K. (2013) Phylogeography of the East Asian polymitarcyid mayfly genus *Ephoron* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae): a comparative analysis of molecular and ecological characteristics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109: 181–202.
- Shackleton NJ. (1995) New data on the evolution of Pliocene climatic variability. Vrba ES., Denton GH., Partridge TC., Burckle LH. (eds) *Paleoclimate and evolution with emphasis on human origins*. Yale University Press, London. UK. 242–248.
- Shackleton NJ., Berger A., Peltier WR. (1990) An alternative astronomical calibration of the lower Pleistocene timescale based on ODP Site 677. *Earth and environmental science transactions of the royal society of Edinburgh*, 81(4): 251–261.
- Shannon CE. (1948) A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*, 27: 379–423. doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x
- Soldán T., Enktaivan S., Godunko RJ. (2009) Commented checklist of mayflies (Ephemeroptera) of Mongolia. In: International Perspectives in Mayfly and Stonefly Research Proceedings of the 12th International Conference on Ephemeroptera and the 16th International Symposium on Plecoptera, Stuttgart 2008. *Aquatic Insects*, 31: Supplement 1, 653–670.
- Su ZH., Tominaga O., Okamoto M., Osawa S. (1998) Origin and diversification of hind wingless *Damaster* ground beetles within the Japanese Island as deduced from mitochondrial ND5 gene sequence (Coleoptera, Carabidae). *Journal of Molecular Evolution*, 15: 1026–1039.
- Tajima F. (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 597–601. doi: 10.1093/genetics/123.3.597
- Takahashi M. (2017) The cause of the east-west contraction of Northeast Japan. *Bulletin of the Geological Survey of Japan*, 68 (4): 155–161.
- 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. doi: 10.1093/biolinnean/bly192

- Tamura K., Nei M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10 (3): 512–526.
- Tiunova TM. (2009) Biodiversity and distribution of mayflies (Ephemeroptera) in the Russian Far East. *Aquatic insects*, 31 supplement 1: 671–691.
- Tominaga K., Nakajima J., Watanabe K. (2016). Cryptic divergence and phylogeography of the pike gudgeon *Pseudogobio esocinus* (Teleostei: Cyprinidae): a comprehensive case of freshwater phylogeography in Japan. *Ichthyological Research*, 63 (1): 79–93.
- Tonai S., Oiwane H., Kiyokawa S. (2008) Geologic structure and paleostress analysis in the Northern part of Koshikijima Islands, West Kyushu, Japan. *Journal of the Geological Society of Japan*, 114: 547–559.
- Viana DS., Chase JM. (2019) Spatial scale modulates the inference of metacommunity assembly processes. *Ecology*, 100 (2): e02576.
- Yoshikawa T., Ide K., Kubota Y., Nakamura Y., Takebe H., Kusaoke H. (2001) Intraspecific genetic variation and molecular phylogeny of *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae) inferred from the mitochondrial ND5 gene sequences. *Japanese journal of entomology*, 4: 117–127.
- Yule GU. (1925) II.—A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J.C. Willis, FR S. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, containing papers of a biological character*, 213 (402–410): 21–87.

## 和文

- 秋山幸也. (2006) 相模原のカワラノギク—衰退と復活、そして再生へ—. *相模原市立博物館研究報告*, 15: 85–90.
- 秋山雅彦. (2008) 最終間氷期とその気候変動について. *地球科学*, 62 (1): 5–15.
- 青柳育夫, 手塚マサ子, 中村和夫. (1998) アカツキシロカゲロウの生活史と若齢幼虫形態について. *陸水学雑誌*, 59 (2): 185–198.
- 古川雅英, 藤谷卓陽. (2014) 琉球弧に関する更新世古地理図の比較検討. *琉球大学理学部紀要*, 98: 1–8.
- 五味高志, 大平充. (2019) 生態系ネットワークのインターフェースとしての礫河原 流域の時空間スケール整理. *日本緑化工学会誌*, 44 (3): 489–493.
- 原山智. (2014) 北アルプスをつくった大噴火: 槍穂高カルデラとは (特集 日本をおそった巨大噴火). *科学*, 84 (1): 69–73.
- 平塚市博物館. (2009) 山と海を結ぶ道: 相模川・相模湾の水運: 周期特別展. 平塚市博物館, 平塚. 64pp.
- 市原実 (編著) . (1993) *大阪層群*. 創元社, 大阪. 340pp.

- 池田裕一, 穴戸彩, 飯村耕介. (2013) 急流礫床河川の大礫砂州上における植生分布に関する基礎的調査. 環境システム委員会. (編) *環境システム研究論文発表会講演集*, 土木学会, 41: 385-390.
- 今西錦司. (1940) 満州 内蒙古並びに朝鮮の蜉蝣類. 川村多実二. (編) *関東州及満州国陸水生物調査書*. 169-263.
- 今西錦司. (1945) カゲロウ類. 古川晴男. (編) *日本生物誌* 第5巻 昆虫下巻. 研究社, 東京. 405-434.
- 石綿進一. (2022) 琵琶湖のカゲロウ類の特徴：卵の表面構造の地域間比較. 西野麻知子. (編) *琵琶湖の生物はいつどこから来たのか?*. サンライズ出版, 彦根. 198-210.
- 石綿進一, 竹門康弘, 藤谷俊仁. (2018) カゲロウ目. 川合禎次, 谷田一三. (編) 第二版 *日本産水生昆虫 科・属・種への検索*. 東海大学出版, 東京. XVI + 47-149. pp.
- 伊藤洋. (1988) 神奈川県植物誌調査会. 神奈川県立博物館. (編) *神奈川県植物誌*. 神奈川県立博物館, 横浜. 1442 pp.
- 貝塚爽平. (1977) *日本の地形-特質と由来*. 岩波書店, 東京. 234 pp.
- 神奈川県水産総合研究所内水面試験場. (1996) *平成7年度相模川水系魚類生息状況調査報告書*. 神奈川県水産総合研究所内水面試験場, 相模原. 107 pp.
- 神奈川県水産総合研究所内水面試験場. (1999) *平成10年度相模川水系魚類生息状況調査報告書*. 神奈川県水産総合研究所内水面試験場, 相模原. 115 pp.
- 金子裕明・高村岳樹. (2022) 琵琶湖産シロタニガワカゲロウの生い立ち. 西野麻知子. (編) *琵琶湖の生物はいつどこから来たのか?*. サンライズ出版, 彦根. 211-223.
- 倅熊公子, 前野詩朗, 瀬島美香, 山村明. (2012) 手取川における水制群設置による礫河原再生効果の検討. *土木学会論文集 B1 (水工学)*, 68 (4): 1165-1170.
- 木村政昭. (1990) 沖縄トラフの発生と形成 (堆積盆地と褶曲構造-形成機構とその実験的研究-). *地質学論集*, 34: 77-88.
- 木村政昭. (1996) 陸橋とヒトと生物の渡来 琉球弧の第四紀古地理. *地学雑誌*, 105(3): 259-285.
- 木崎甲子郎・大城逸朗. (1977) 琉球列島の古地理. *海洋科学*, 9: 542-549.
- 小林紀雄. (1986) カゲロウ類の生態. *インセクタリウム*, 23: 198-203.
- 小池裕子, 松井正文. (2003) *保全遺伝学*, 東京大学出版. 東京. 299pp.
- 久保純子. (1997) 相模川下流平野の埋没段丘からみた酸素同位体ステージ 5a 以降の海水準変化と地形発達. *第四紀研究*, 36 (3): 147-163. doi.org/10.4116/jaqua.36.147
- 久保純子. (2008) 平野と海岸の地形. 高橋日出夫, 小泉武栄. (編) *自然地理学概説*, 朝倉出版. 東京. 106-116.
- 増田隆一. (1999) 遺伝子から検証する哺乳類のブラキストン線. *哺乳類科学*, 39(2): 323-328.
- 松島義章. (1999) 完新世海成堆積物からみた相模湾沿岸地域の地形変動. *第四紀研*

- 究, 38(6): 503–514.
- 三好崇之, 石橋克彦. (2008) 沈み込んだフィリピン海プレートの形状からみた近畿三角帯周辺のネオテクトニクス. *第四紀研究*, 47 (4): 223–232.
- 百原新. (2017) 鮮新・更新世の日本列島の地形発達と植生・植物相の変遷. *第四紀研究*, 56 (6): 251–264.
- 森山昭雄, 光野克彦. (1989) 伊那谷南部, 伊那層の堆積構造からみた木曾・赤石両山脈の隆起時期. *地理学評論*, Ser. A, 62(10): 691–707.
- 西野麻知子, 秋山道雄, 中島拓男. (編) (2017) *琵琶湖岸からのメッセージ 保全・再生のための視点*, サンライズ出版. 彦根. 248pp.
- 岡崎博文. (1997) *カゲロウのすべて*. トンボ出版, 大阪. 55 pp.
- 大嶋和雄. (1991) 第四紀後期における日本列島周辺の海水変動. *地学雑誌*, 100(6): 967–975.
- 大嶋和雄. (1980) 海峡地形に記された海水準変動の記録. *第四紀研究*, 19(1): 23–37.
- Santosh M., 千秋博紀. (2011) 超大陸と日本列島の起源. *地学雑誌*, 120 (1): 100–114.
- 佐藤善輝, 久保純子. (2016) 相模川下流平野における第四系地下地質に関する研究 (予報). *地質調査総合センター速報 No. 71. 平成27年度沿岸域の地質・活断層調査研究報告*, 139–142.
- 齋藤慎一郎. (1996) *虫と遊ぶ 虫の方言誌*, 大修館書店. 東京. 249pp.
- 里口保文. (2017). 古琵琶湖堆積盆周辺の古水系変化の検討. *化石研究会会誌*, 50(2): 60–70.
- 鹿野和彦, 加藤碩一, 柳沢幸夫, 吉田史郎. (1991) 日本の新生界層序と地史. *地質調査所報告*, 274: 1–114.
- 竹内将俊, 藤田裕. (1998) 神奈川県におけるカワラバッタ *Eusphingonotus japonicus* (Saussure) の生息地の状況. *日本応用動物昆虫学会誌*, 42(4): 197–200.
- 竹内貞子. (2000) 東北地方における後期新生代の植物相および植生の変遷 故鈴木敬治, 故相馬寛吉両先生の業績をもとにして. *植生史研究*, 8(1): 3–13.
- 辻誠一郎, 南木睦彦, 大沢進. (1984) 相模地域における後期更新世の植物相と古環境. *第四紀研究*, 22 (4): 279–296.
- 内山佳美, 鈴木雅一. (2007) 丹沢山地における土砂災害の実態とその履歴. 丹沢大山総合調査団. (編) *丹沢大山総合調査学術報告書*, 平岡環境科学研究所. 相模原. 460–473
- 氏家宏. (1986) 琉球弧の海底 - 低質と地形 -. *シリーズ沖縄の自然* 5, 新星図書出版, 那覇. 120pp.
- 吉田史郎. (1992) 瀬戸内区の発達史一第一・第二瀬戸内海形成期を中心に一. *地質調査所月報*, 43(1-2): 43–67.
- 吉川周作, 三田村宗樹. (1999) 大阪平野第四系層序と深海底の酸素同位体比層序との対比. *地質学雑誌*, 105 (5): 332–340.
- 渡辺勝敏 (2021) 琵琶湖の固有魚類の進化: 遺伝子からのアプローチ. 西野麻知子. (編) *琵琶湖の生物はいつどこから来たのか?*. サンライズ出版, 彦根. 58–68.

電子文献

- Eliades D., Eliades N. (2009) Haplotype Analysis: software for analysis of haplotype data. 2009. <https://www.uni-goettingen.de/en/134935.html> DOI: 10.13140/RG.2.2.19029.93922 (Cited 25 Apr. 2023)
- 藤田和夫, 笠間太郎. (1982) 大阪西北部地域の地質. 通商産業省工業技術院地質調査所 (編) 地域地質研究報告 (5万分の1図幅), [https://www.gsj.jp/data/50KGM/PDF/GSJ\\_MAP\\_G050\\_11038\\_1995\\_D.pdf](https://www.gsj.jp/data/50KGM/PDF/GSJ_MAP_G050_11038_1995_D.pdf) (Cited 27 Jan. 2018)
- Heled J. (2015) Extended Bayesian skyline plot tutorial for BEAST 2. Tutorial. <https://evomics.org/wp-content/uploads/2016/01/ebsp2-tut.pdf> (Cited 17 Jan. 2018)
- 平塚市博物館. [https://hirahaku.jp/hakubutsukan\\_archive/seibutsu/00000032/101.html](https://hirahaku.jp/hakubutsukan_archive/seibutsu/00000032/101.html) (Cited 18 Dec. 2022)
- Ishiwata S. (2018) An Annotated Catalogue of Japanese Ephemeroptera. Revised Edition. *Division for Environmental Chemistry Research Report Kanagawa Institute of Technology*, 7: Supplement 1, 1 – 103. <https://kaitchem.sharepoint.com/guestlink/Shared%20Documents/Forms/AllItems.aspx?id=%2Fguestlink%2FShared%20Documents%2Fephemeroptera%2F180804%2F%E3%82%AB%E3%82%B1%E3%82%99%E3%83%AD%E3%82%A6%E3%82%AB%E3%82%BF%E3%83%AD%E3%82%AF%E3%82%99%28revised%20ver%2E%29%2Epdf&parent=%2Fguestlink%2FShared%20Documents%2Fephemeroptera%2F180804&p=true&ga=1> (Cited 10 Jun. 2019)
- 石綿進一・藤谷俊仁. (2018) 日本産カゲロウ類の卵. <https://kaitchem.sharepoint.com/guestlink/Shared%20Documents/Forms/AllItems.aspx?id=%2Fguestlink%2FShared%20Documents%2Fephemeroptera%2F180804%2F%E6%97%A5%E6%9C%AC%E7%94%A3%E3%82%AB%E3%82%B1%E3%82%99%E3%83%AD%E3%82%A6%E9%A1%9E%E3%81%AE%E5%8D%B5%2Epdf&parent=%2Fguestlink%2FShared%20Documents%2Fephemeroptera%2F180804&p=true&ga=1> (Cited 10 Jun. 2019)
- 環境省 a. 全国水生生物調査. <https://water-pub.env.go.jp/water-pub/mizu-site/mizu/suisei/>, and <https://www.env.go.jp/content/900543703.pdf> (Cited 25 Oct. 2022)
- 環境省 b. (2019) レッドデータブック・レッドリスト. 維管束植物. <https://ikilog.biodic.go.jp/Rdb/booklist> (Cited 25 Feb. 2021)
- 桂川・相模川流域協議会. [http://katurasagami.net/11\\_kawaranogiku\\_1/kawaranogikuhozen.html](http://katurasagami.net/11_kawaranogiku_1/kawaranogikuhozen.html) (Cited 18 Dec. 2022)

- 国土交通省 .  
[https://www.mlit.go.jp/river/shinngikai\\_blog/tisuinoarikata/dai33kai/dai33kai\\_siryou2-1-2.pdf](https://www.mlit.go.jp/river/shinngikai_blog/tisuinoarikata/dai33kai/dai33kai_siryou2-1-2.pdf) (cited 29 Jul. 2023)
- 国土交通省 湯沢砂防事務所. <https://www.hrr.mlit.go.jp/yuzawa/sabo/shisetsu3.html>  
(Cited 17 May. 2023)
- <https://www.hrr.mlit.go.jp/yuzawa/sabo/shisetsu3.html>
- 国土交通省 河川局 . (2000) 相模川水系河川整備基本方針 .  
[https://www.mlit.go.jp/river/toukei\\_chousa/kasen/jiten/nihon\\_kawa/0309\\_sagami/0309\\_sagami\\_00.html](https://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen/jiten/nihon_kawa/0309_sagami/0309_sagami_00.html) (cited 3 Dec. 2022)
- 神奈川県 a. 相模川・中津川の概要 .  
<https://www.pref.kanagawa.jp/docs/ck2/cnt/f440028/p80887.html> (Cited 10 Jan 2021.)
- 神奈川県 b. 河川について .  
<https://www.pref.kanagawa.jp/docs/ck2/cnt/f440028/p589885.html> (Cited 10 Jan 2021)
- 神奈川県 c. 流砂系の概要. <https://www.pref.kanagawa.jp/documents/10586/795860.pdf>  
(Cited 10 Jan 2021)
- 神奈川県 d. 神奈川県レッドリスト 2020. 植物編 . <https://www.pref.kanagawa.jp/docs/t4i/cnt/f12655/p1196500.html> (Cited 19 Dec. 2021)
- 倉本宣. (1997) カワラノギクの保全生物学と保全実務. *保全生態学研究*, 2(1): 43-53.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/hozen/2/1/2\\_KJ00006452609/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/hozen/2/1/2_KJ00006452609/_pdf) (Cited 22 Nov. 2022)
- 倉本宣. (2016) 河川環境の特性を活かしたカワラノギクの礫河原生態系の再生手法の開発. 公益財団法人とうきゅう環境財団. *研究助成・学術研究*, 45.  
<https://foundation.tokyu.co.jp/environment/wp-content/uploads/2017/02/A319.pdf>  
(Cited 22 Nov. 2022)
- 日本学術会議地球惑星科学委員会 IUGS ほか. (2010) 年代層序単元と地質年代単元. 日本学術会議地球惑星科学委員会, <http://quaternary.jp/news/tangen.jpg> (Cited 4 Aug. 2023)
- Rambaut A. (2017) FigTree-version 1.4. 3, a graphical viewer of phylogenetic trees. *Computer program distributed by the author*, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> (Cited 12 May 2018)
- 相模川流砂系総合土砂管理推進協議会. (2015) 相模川流砂系総合土砂管理計画. 相模川流砂系総合土砂管理推進協議会 ,  
[https://www.ktr.mlit.go.jp/ktr\\_content/content/000636080.pdf](https://www.ktr.mlit.go.jp/ktr_content/content/000636080.pdf) (Cited 18 Dec. 2022)
- 佐藤善輝. 水野清秀. 久保純子. 中島礼. (2021) 相模川下流平野における第四紀地下地質と埋没段丘面分布. *海陸シームレス地質情報集 S-7*, 産総研地質調査総合センター.  
<https://www.gsj.jp/researches/project/coastal-geology/results/s-7.html> (Cited 17 Jan. 2023)

産総研地質調査総合センター. 20 万分の 1 日本シームレス地質図 V2. , 産総研地質調査総合センター. (地質図更新日 : 2022 年 3 月 11 日) . <https://gbank.gsj.jp/seamless> (Cited 1 Aug. 2022)

Table 1-1 Specimens information of *Ecdyonurus hyalinus* for mitochondrial DNA analysis.

Sampling site code	Country	River name	Latitude N, Longitude E	Altitude (m)	Sampling date	Sample size	Specimen code: Abbreviation, <i>COI</i> Haplotype: Accession number, <i>16S rRNA</i> Haplotype: Accession number
1	Japan	Miyayoshi R.	24°25'33.38", 124°12'00.71"	61	2016.11.9	10	1_1: MYY_3
							H1: LC377318, H2: LC377554
							1_2: MYY_4
							H2: LC377319, H3: LC377555
							1_3: MYY_5
							H1: LC740874, H1: LC740942
							1_4: MYY_6
							H3: LC377320, H5: LC377557
							1_5: MYY_7
							H2: LC377321, H4: LC740943
2	Japan	Shiromizu R.	24°25'07.05", 124°09'35.05"	21	2016.11.9	9	1_6: MYY_8
							H1: LC740875, H2: LC740944
							1_7: MYY_9
							H1: LC740876, H1: LC377553
							1_8: MYY_10
							H1: LC740877, H2: LC740945
							1_9: MYY_12
							H1: LC740878, H2: LC740946
							1_10: MYY_13
							H1: LC740879, H2: LC740947
2	Japan	Shiromizu R.	24°25'07.05", 124°09'35.05"	21	2016.11.9	9	2_1: SMZ_1
							H1: LC740880, H1: LC740948
							2_2: SMZ_3
							H1: LC740881, H2: LC740949



---

								2_3: SMZ_4
								H2: LC740882, H3: LC740950
								2_4: SMZ_5
								H1: LC740883, H2: LC740951
								2_5: SMZ_6
								H1: LC740884, H2: LC740952
								2_6: SMZ_7
								H2: LC740885, H4: LC377556
								2_7: SMZ_8
								H2: LC740886, H3: LC740953
								2_8: SMZ_9
								H1: LC740887, H2: LC740954
								2_9: SMZ_10
								H2: LC740888, H3: LC740955
								3_1: NBR_1
								H2: LC740889, H3: LC740956
								3_2: NBR_2
								H1: LC740890, H2: LC740957
								3_3: NBR_3
								H5: LC377322 , H5: LC740958
3	Japan	Nebura R.	24°24'38.93", 124°11'06.23"	73	2016.11.9	10		3_4: NBR_4
								H6: LC377323 , H5: LC740959
								3_5: NBR_5
								H2: LC740891, H3: LC740960
								3_6: NBR_6
								H1: LC740892, H2: LC740961
								3_7: NBR_7
								H1: LC740893, H2: LC740962

---

---

							3_8: NBR_8
							H1: LC740894, H2: LC740963
							3_9: NBR_9
							H1: LC740895, H2: LC740964
							3_10: NBR_10
							H5: LC740896, H5: LC740965

---

							4_4: GED_1
							H4: LC740897, H2: LC740966
							4_2: GED_3
							H7: LC377324, H2: LC740967
							4_3: GED_4
							H8: LC377325, H14: LC377566
							4_4: GED_8
							H9: LC377326, H6: LC377558
							4_5: GED_9
							H10: LC377327, H6: LC740968
4	Japan	Geda R.	24°23'34.95", 123°51'40.67"	9	2016.11.8	12	4_6: GED_10
							H10: LC740898, H6: LC740969
							4_7: GED_11
							H11: LC377328, H2: LC740970
							4_8: GED_13
							H10: LC740899, H6: LC740971
							4_9: GED_14
							H10: LC740900, H3: LC740972
							4_10: GED_15
							H10: LC740901, H6: LC740973
							4_11: GED_16
							H12: LC377329, H15: LC377567

---

							4_12: GED_17 H11: LC740902, H7: LC740974
							5_4: OMY_1 H1: LC740903, H6: LC740975 5_2: OMY_2 H13: LC377330, H13: LC740976 5_3: OMY_3 H14: LC377331, H10: LC377562 5_4: OMY_4 H9: LC740904, H6: LC740977 5_5: OMY_7 H15: LC377332, H6: LC740978 5_6: OMY_9 H14: LC740905, H2: LC740979 5_7: OMY_16 H16: LC377333, H6: LC740980 5_8: OMY_21 H17: LC377334, H13: LC377565
5	Japan	Omishya R.	24°23'33.49", 123°51'55.73"	29	2016.11.7	8	
							6_1: YTN_1 H11: LC740906, H7: LC740981 6_2: YTN_2 H18: LC740907, H6: LC740982 6_3: YTN_4 H14: LC740908, H2: LC740983 6_4: YTN_5 H15: LC740909, H6: LC740984 6_5: YTN_6 H14: LC740910, H2: LC740985
6	Japan	Yutsun R.	24°22'47.67", 123°53'06.28"	10	2016.11.7	13	

---

							6_6: YTN_7
							H14: LC740911, H9: LC377561
							6_7: YTN_8
							H14: LC740912, H2: LC740986
							6_8: YTN_9
							H11: LC740913, H7: LC740987
							6_9: YTN_11
							H11: LC740914, H7: LC740988
							6_10: YTN_14
							H14: LC740915, H10: LC740989
							6_11: YTN_15
							H19: LC377335, H7: LC377559
							6_12: YTN_16
							H9: LC740916, H6: LC740990
							6_13: YTN_18
							H20: LC377336, H11: LC377563

---

							7_1: AIR_14
							H14: LC740917, H2: LC740991
							7_2: AIR_15
							H21: LC377337, H6: LC740992
							7_3: AIR_16
7	Japan	Aira R.	24°20'19.17", 123°54'53.16"	9	2016.11.7	9	H11: LC740918, H7: LC740990
							7_4: AIR_17
							H17: LC740919, H8: LC377560
							7_5: AIR_18
							H22: LC377338, H6: LC740994
							7_6: AIR_21
							H15: LC740920, H6: LC740995

---

							7_7: AIR_26 H11: LC740921, H7: LC740996
							7_8: AIR_27 H15: LC740922, H6: LC740997
							7_9: AIR_28 H15: LC740923, H6: LC740998
							8_1: AKI_2 H15: LC740924, H7: LC740999
							8_2: AKI_3 H16: LC740925, H6: LC741000
8	Japan	Akaida R.	24°17'56.75", 123°53'44.11"	15	2016.11.8	5	8_3: AKI_4 H23: LC377339, H6: LC741001
							8_4: AKI_5 H20: LC740926, H7: LC741002
							8_5: AKI_7 H14: LC740930, H6: LC741003
							9_1: NKM_2 H15: LC740928, H6: LC741004
							9_2: NKM_3 H24: LC377340, H7: LC741005
							9_3: NKM_5 H14: LC740929, H9: LC741006
9	Japan	Nakama R.	24°18'12.16", 123°51'33.82"	11	2016.11.8	8	9_4: NKM_7 H15: LC740930, H6: LC741007
							9_5: NKM_8 H4: LC740931, H12: LC377564
							9_6: NKM_9 H15: LC740932, H6: LC741008

							9_7: NKM_10 H25: LC377341, H6: LC741009 9_8: NKM_11 H11: LC740933, H7: LC741007
							10_1: TBB2_5 H26: LC377342, H17: LC377569 10_2: TBB2_7 H26: LC740934, H17: LC741011 10_3: TBB2_8 H26: LC740935, H17: LC741012 10_4: TBB2_9 H26: LC740936, H17: LC741013 10_5: TBB2_10 H26: LC740937, H17: LC741014 10_6: TBB2_11 H26: LC740938, H19: LC377571 10_7: TBB2_12 H26: LC740939, H17: LC741015 10_8: TBB2_13 H26: LC740940, H17: LC741016
10	Taiwan	Beishi R.	24°56'18.8", 121°44'07.0"	283	2017.4.9	8	
							12_1: GHH2_3 H27: LC377343, H18: LC377570 12_2: GHH2_9 H28: LC377344, H17: LC741017 12_3: GHH2_10 H29: LC377345, H17: LC741018
12	Taiwan	Dezikou R.	24°49'52.0", 121°44'49.7"	160	2017.4.8	3	
							14_1: TWN3_1 H30: LC377346, H20: LC377572
14	Taiwan	Jilian R.	23°39'44.5", 121°31'54.8"	165	2017.4.21	1	

15	Taiwan	Beishi R. of Zhuoshui basin	23°40'27.30", 120°47'24.65"	1126	2017.4.11	2	15_1: SGB3_2
							H31: LC377347, H17: LC741019
16	Taiwan	Beishi R. of Zhuoshui basin	23°41'26.73", 120°47'5.60"	850	2017.4.11	3	15_1: SGB3_4
							H32: LC377348, H17: LC741020
							16_1: SGB1_1
							H33: LC740941, H16: LC377568
							16_2: SGB1_2
							H34: LC377350, H17: LC741021
							16_3: SGB1_3
							H33: LC377349, H17: LC741022
Overall						101	

Table 1-2 Specimens information of *Ecdyonurus yoshidae*, *Ecdyonurus viridis* and *Ecdyonurus levis* for mitochondrial DNA analysis.

Sampling site code	Region / Country	River name	River system name	Latitude N, Longitude E	Altitude (m)	Sampling date	Sample size	Specimen code: Abbreviation, Concatinated haplotype, Accession number <i>COI</i> , <i>16S rRNA</i>
1	eastern Honshu	Asahi R.	Omono R.	39°46'02.01", 140°10'26.23"	35	2017.6.19	2	1_1: OMN3_4, B1, LC512994, LC513489 1_2: OMN3_3, B6, LC513007, LC513502
2	eastern Honshu	Tamagawa R.	Omono R.	39°31'06.33", 140°30'22.00"	26	2017.6.16	2	2_1: OMN1_3, A1, LC512933, LC513428 2_2: OMN1_4, B5, LC513006, LC513501
3	eastern Honshu	Kurosawa R.	Omono R.	39°17'52.17", 140°37'51.70"	121	2017.6.16	1	3_1: OMN2_3, A1 LC512934, LC513429
4	eastern Honshu	Toyosawa R.	Kitakami R.	39°22'45.39", 141°03'20.71"	241	2017.6.16	2	4_1: KTK2_1,A7, LC512964, LC513459 4_2: KTK2_2, B1, LC512995, LC513490
5	eastern Honshu	Sarugaishi R.	Kitakami R.	39°20'01.80", 141°31'12.00"	256	2017.6.17	3	5_1: KTK3_5, A1, LC512935, LC513430 5_2: KTK3_4, B2, LC513001, LC513496 5_3: KTK3_6, B3, LC513004, LC513499
6	eastern Honshu	Kinryu R.	Kitakami R.	38°50'23.19", 141°10'48.22"	23	2018.6.9	2	6_1: KNR_3,A24, LC512983, LC513478 6_2: KNR_2,B4, LC513005, LC513500
7	eastern Honshu	Ichihhasama R.	Kitakami R.	38°45'02.00", 140°56'33.93"	41	2018.6.8	2	7_1: SKK_3, A35, LC512981, LC513476 7_2: SKK_2, B2, LC513002, LC513497
8	eastern Honshu	Eai R.	Kitakami R.	38°39'19.01", 140°52'31.81"	50	2018.6.8	2	8_1: KTK4_4, A1, LC512936, LC513431 8_2: KTK4_1, A23, LC512982, LC513477
9	eastern Honshu	Hanakawa R.	Naruse R.	38°32'04.50", 140°50'06.40"	48	2018.6.8	2	9_1: NRS_3, A1, LC512937, LC513432 9_2: NRS_4, A1, LC512938, LC513433
10	eastern Honshu	Nanakita R.	Nanakita R.	38°19'14.50", 140°51'35.28"	21	2018.6.8	2	10_1: NNK_1, A1, LC512939, LC513434 10_2: NNK_2, A26, LC512985, LC513480
11	eastern Honshu	Natori R.	Natori R.	38°12'19.85", 140°51'05.97"	14	2018.6.7	2	11_1: NTR1_2, A1, LC512940, LC513435 11_2: NTR1_3, A1, LC512941, LC513436



12	eastern Honshu	Otori R.	Akagawa R.	38°36'33.36", 139°49'56.28"	84	2016.9.4	1	12_1: OTR_1, B2, LC513003, LC513498
13	eastern Honshu	Shiroishi R.	Abukuma R.	38°00'38.88", 140°37'06.88"	48	2018.6.7	2	13_1: ABU3_2, A1, LC512942, LC513437 13_2: ABU3_1, A6, LC512962, LC513457
14	eastern Honshu	Abukuma R.	Abukuma R.	37°56'47.15", 140°47'34.02"	12	2018.6.7	2	14_1: ABU1_2, A28, LC512987, LC513482 14_2: ABU1_3, A29, LC512988, LC513483
15	eastern Honshu	Shitoki R.	Samekawa R.	36°55'20.01", 140°44'24.96"	6	2017.6.10	1	15_1: SAM_1, A14, LC512971, LC513466
16	eastern Honshu	Naka R.	Naka R.	36°31'20.78", 140°22'03.38"	15	2017.6.10	1	16_1: NAK_2, A10, LC512967, LC513462
17	eastern Honshu	Tainai R.	Tainai R.	38°02'25.00", 139°28'25.80"	78	2016.9.3	3	17_1: TNK_3, A19, LC512976, LC513471 17_2: TNA_4, A20, LC512977, LC513472 17_3: TNK_5, A21, LC512978, LC513473
18	eastern Honshu	Nagatsu R.	Miomote R.	38°13'26.96", 139°34'24.47"	67	2016.9.3	1	18_1: NGT_15, A11, LC512968, LC513463
19	eastern Honshu	Kumaide R.	Kaji R.	37°59'42.18", 139°27'03.14"	60	2016.9.3	2	19_1: KMD_5, A1, LC512943, LC513438 19_2: KMD_1, A6, LC512963, LC513458
20	eastern Honshu	Lake Yunoko	Tone R.	36°47'54.40", 139°25'42.50"	1488	2019.05.18	4	20_1: YNK_1, B10, LC512996, LC513491 20_2: YNK_2, B10, LC512997, LC513492 20_3: YNK_4, B10, LC512998, LC513493 20_4: YNK_5, B11, LC513000, LC513495
21	eastern Honshu	Lake Chuzenji	Tone R.	36°44'27.10", 139°29'13.8"	1271	2019.05.06	4	21_1: TYK_1, B7, LC513008, LC513503 21_2: TYK_2, B8, LC513009, LC513504 21_3: TYK_4, B9, LC513010, LC513505 21_4: TYK_6, B10, LC512999, LC513494
22	eastern Honshu	Kinu R.	Tone R.	36°41'55.76", 139°55'56.19"	173	2017.6.10	3	22_1: TON_6, A1, LC512944, LC513439 22_2: TON_3, A22, LC512979, LC513474 22_3: TON_5, C16, LC513026, LC513521

23	eastern Honshu	Akiyama R.	Tone R.	36°24'27.00", 139°36'22.70"	99	2018.11.25	2	23_1: TON6_1, A1, LC512945, LC513440 23_2: TON6_2, A22, LC512980, LC513475
24	eastern Honshu	Tone R.	Tone R.	36°18'46.70", 139°07'14.80"	67	2018.12.13	2	24_1: TON3_2, A1, LC512946, LC513440 24_2: TON3_1, C1, LC513011, LC513506
25	eastern Honshu	Edo R.	Tone R.	35°56'25.00", 139°50'52.00"	5	2017.4.16	2	25_1: TON10_2, A1, LC512947, LC513442 25_2: TON10_3, A33, LC512992, LC513487
26	eastern Honshu	Tama R.	Tama R.	35°41'06.84", 139°23'49.11"	71	2017.3.2	2	26_1: TAM_1, A25, LC512984, LC513479 26_2: TAM_2, A32, LC512991, LC513486
27	eastern Honshu	Anazawa R.	Sakaikawa R.	35°36'19.20", 139°17'42.34"	173	2016.05.13	2	27_1: SKI2_2, A1, LC512948, LC513443 27_2: SKI2_8, A18, LC512975, LC513470
28	eastern Honshu	Katsuragawa R.	Sagami R.	35°34'25.20", 138°54'59.17"	433	2016.06.09	1	28_1: KTR1_12, A8, LC512965, LC513460
29	eastern Honshu	Nakatsu R.	Sagami R.	35°30'41.95", 139°19'43.50"	52	2015.5.1	2	29_1: NKT4_12, A12, LC512969, LC513464 29_2: NKT4_19, A13, LC512970, LC513465
30	eastern Honshu	Sagami R.	Sagami R.	35°27'51.41", 139°22'46.78"	16	2016.3.21	3	30_1: SGM4_1, A15, LC512972, LC513467 30_2: SGM4_2, A16, LC512973, LC513468 30_3: SGM4_6, A17, LC512974, LC513469
31	eastern Honshu	Kaname R.	Kaname R.	35°21'32.50", 139°17'52.90"	20	2016.4.30	2	31_1: KNM1_3, A1, LC512949, LC513444 31_2: KNM1_10, C6, LC513034, LC513529
32	eastern Honshu	San-no R.	San-no R.	35°16'06.12", 139° 08'19.09"	27	2016.05.23	2	32_1: SNN_3, C13, LC513023, LC513518 32_2: SNN_4, C14, LC513024, LC513519
33	eastern Honshu	Kawauchi R.	Sakawa R.	35°22'42.07", 139°01'48.79"	170	2016.3.20	2	33_1: KWU1_7, A1, LC512950, LC513445 33_2: KWU1-3, A30, LC512989, LC513484
34	eastern Honshu	Hayakawa R.	Hayakawa R.	35°14'00.30", 139°06'31.90"	81	2016.05.23 , 2018.5.15	2	34_1: HYK_15, A1, LC512951, LC513446 34_2: HYK_16, A2, LC512958, LC513453
35	eastern Honshu	Lake Ashinoko	Hayakawa R.	35°12'09.91", 139° 01'32.23"	727	2019.6.13	3	35_1: ASK_1, A1, LC512952, LC513447 35_2: ASK_3, A1, LC512953, LC513448

								35_3: ASK_4, A1, LC512954, LC513449
36	eastern Honshu	Kano R.	Kano R.	35°01'29.26", 138°56'32.30"	14	2016.7.15	1	36_1: KAN1_6, C4, LC513032, LC513527
37	eastern Honshu	Kazusawa R.	Kano R.	34°54'56.3", 138°53'31.0"	258	2018.4.26	1	37_1: KAN2_2, A5, LC512961, LC513456
38	eastern Honshu	Yokokawa R.	Inozawa R.	34°43'1.30, 138°54'16.60"	66	2018.4.26	3	38_1: INU_5, A1, LC512955, LC513450 38_2: INU_4, A3, LC512959, LC513454 38_3: INU_6, A4, LC512960, LC513455
39	eastern Honshu	Shibakawa R.	Fuji R.	35°15'40.07", 138°33'30.53"	211	2017.6.3	1	39_1: FJK2_1, C3, LC513031, LC513526
40	eastern Honshu	Fuji R.	Fuji R.	35°11'15.22", 138°36'18.56"	32	2017.6.3	1	40_1: FJK1_1, C2, LC513030, LC513525
41	eastern Honshu	Lake Kizaki	Shinano R.	36°33'38.70", 137°49'56.50"	764	2019.9.16	1	41_1: KZK2_6, A34, LC512993, LC513488
42	eastern Honshu	Saigawa R.	Shinano R.	36°20'04.60", 137°55'01.40"	530	2018.5.18	3	42_1: SAI2_11, A1, LC512956, LC513451 42_2: SAI2_9, C11, LC513021, LC513516 42_3: SAI2_10, C12, LC513022, LC513517
43	eastern Honshu	Metoba R.	Shinano R.	36°14'19.20", 137°58'44.50"	595	2016.9.5	3	43_1: MTB_2, A1, LC512957, LC513451 43_2: MTB_3, A9, LC512966, LC513461 43_3: MRB_4, C9, LC513037, LC513532
44	eastern Honshu	Namezu R.	Shinano R.	36°13'58.50", 138°30'55.90"	712	2018.5.19	1	44_1: TKM2_1, A31, LC512990, LC513485
45	eastern Honshu	Niiyama R.	Tenryu R.	35°49'31.23", 138°01'24.62"	710	2019.5.5	3	45_1: MIB5_14, C1, LC513012, LC513507 45_2: MIB5_17, C17, LC513027, LC513522 45_3: MIB5_16, C18, LC513028, LC513523
46	eastern Honshu	Tenryu R.	Tenryu R.	34°49'24.10", 137°49'30.60"	23	2017.6.3	2	46_1: TNR_3, A27, LC512986, LC513481 46_2: TNR_4, C15, LC513025, LC513520
47	eastern Honshu	Yahagi R.	Yahagi R.	35°04'56.49",	39	2017.6.3	1	47_1: YHG_5, C1, LC513013, LC513508

	Honshu			137°09'57.21"				
48	eastern Honshu	Shogawa R.	Shogawa R.	36°40'28.05", 137°00'14.53"	29	2017.5.22	1 (1)	48_1: SHU_2, C1, LC513018, LC513513 48_2: SHU_1, ㊦, LC513140, LC513635
49	eastern Honshu	Hakkagawa R.	Hakkagawa R.	37°15'10.33", 136°49'17.00"	150	2017.5.21	2	49_1: HKE_6, E1, LC513053, LC513548 49_2: HKE_7, E2, LC513054, LC513549
50	eastern Honshu	Sakami R.	Sakami R.	37°11'17.99", 136°42'53.94"	43	2017.5.21	2	50_1: SKM_2, E2, LC513055, LC513550 50_2: SKM_1, E3, LC513057, LC513552
51	eastern Honshu	Iburihashi R.	Shinbori R.	36°18'49.58", 136°23'18.34"	5	2017.5.21	2	51_1: IBU1_6, E2, LC513056, LC513551 51_2: IBU1_7, E3, LC513058, LC513553
52	eastern Honshu	Daito R.	Shingu R.	33°49'16.18", 135°47'11.28"	47	2017.6.6	1	52_1: KMN2_1, C5, LC513033, LC513528
53	eastern Honshu	Migiaizu R.	Aizu R.	33°46'01.71", 135°24'42.35"	25	2017.6.4	1	53_1: MAZ_1, C7, LC513035, LC513530
54	central Honshu	Makita R.	Ibi R.	35°19'59.35", 136°31'22.03"	32	2017.6.3	2	54_1: IBI_7, C1, LC513014, LC513509 54_2: IBI_5, D3, LC513046, LC513541
55	central Honshu	Okawa R.	Yodogawa R.	35°31'22.74", 136°09'37.1"	94	2017.6.3	2	55_1: OOK_3, C1, LC513015, LC513510 55_2: OOK_1, H12, LC513116, LC513611
56	central Honshu	Lake Biwa	Yodogawa R.	35°30'13.00", 136°10'51.90"	84	2017.8.1	2	56_1: IIU_1, F1, LC513059, LC513554 56_2: IIU_3, F2, LC513061, LC513556
57	central Honshu	Lake Biwa	Yodogawa R.	35°27'39.80", 136°07'28.30"	84	2017.8.1	3	57_1: SUG_1, F7, LC513066, LC513561 57_2: SUG_2, F8, LC513067, LC513562 57_3: SUG_3, F9, LC513068, LC513563
58	central Honshu	Lake Biwa	Yodogawa R.	35°27'36.00", 136°04'50.60"	84	2017.8.1	1	58_1: UMI_1, F10, LC513060, LC513555
59	central Honshu	Lake Biwa	Yodogawa R.	35°27'34.80", 136°11'51.10"	84	2018.8.28	3	59_1: KTY_1, F3, LC513062, LC513557 59_2: KTY_2, F4, LC513063, LC513558 59_3: KTY_3, F5, LC513064, LC513559
60	central	Lake Biwa	Yodogawa R.	35°11'24.90",	84	2017.8.3	1	60_1: MGH_1, F6, LC513065, LC513560

	Honshu			136°05'02.50"				
61	central Honshu	Ado R.	Yodogawa R.	35°21'49.30", 135°56'36.90"	136	2017.8.2	3	61_1: ADO3_1, H1, LC513113, LC513608 61_2: ADO3_2, H2, LC513123, LC513618 61_3: ADO3_3, H3, LC513124, LC513619
62	central Honshu	Inugami R.	Yodogawa R.	35°15'21.80", 136°13'43.30"	90	2017.8.3	1	62_1: INK_1, H6, LC513133, LC513628
63	central Honshu	Mano R.	Yodogawa R.	35°07'37.90", 135°54'43.20"	96	2017.8.4	3	63_1: MAN_2, D5, LC513048, LC513543 63_2: MAN_1, G19, LC513084, LC513579 63_3: MAN_3, G20, LC513089, LC513584
64	central Honshu	Echi R.	Yodogawa R.	35°04'38.10", 136°18'22.40"	189	2017.8.3	2	64_1: ETI_1, C1, LC513016, LC513511 64_2: ETI_2, C1, LC513017, LC513512
65	central Honshu	Meta R.	Yodogawa R.	35°03'46.00", 135°59'03.10"	96	2017.8.4	3	65_1: MET_2, C8, LC513036, LC513531 65_2: MET_1, H9, LC513136, LC513631 65_3: MET_3, H9, LC513137, LC513632
66	central Honshu	Santa R.	Yodogawa R.	34°58'05.90", 135°53'31.40"	118	2017.8.4	2	66_1: MIT_1, G1, LC513069, LC513564 66_2: MIT_3, G21, LC513090, LC513585
67	central Honshu	Daido R.	Yodogawa R.	34°57'01.94", 135°59'12.32"	133	2018.10.27	1	67_1: OOT_3, C10, LC513020, LC513515
68	central Honshu	Nagashiro R.	Yodogawa R.	35°04'11.15", 135°46'11.79"	105	2018.10.16	2	68_1: KAM1, G15, LC513080, LC513629 68_2: KAM1_3, H7, LC513134, LC513575
69	central Honshu	Oishi R. (junction of Seta R.)	Yodogawa R.	34°54'37.4", 135°54'35.7"	76	2019.6.14	2	69_1: OIS_2, C19, LC513029, LC513524 69_2: OIS_3, H18, LC513122, LC513617
70	central Honshu	Uji R.	Yodogawa R.	34°54'24.20" 135°47'33.80"	10	2019.2.5	2	70_1: UJI_1, H5, LC513126, LC513621 70_2: UJI_2, H5, LC513127, LC513622
71	central Honshu	Koizumi R.	Yodogawa R.	34°53'52.80", 135°41'54.45"	9	2018.10.16	1	71_1: KIZ_1, D4, LC513047, LC513542
72	central	Kizu R.	Yodogawa R.	34°44'40.26",	29	2017.6.4	1	72_1: KID_1, H8, LC513135, LC513630

	Honshu			135°49'22.42"				
73	central Honshu	Yoshinogawa R.	Yoshinogawa R.	34°23'10.91, 135°54'02.54	171	2017.6.4	2	73_1: YSN_3, C1, LC513019, LC513514 73_2: YSN_2, H5, LC513128, LC513623
74	western Honshu	Oya R.	Maruyama R.	35°21'47.49, 134°44'43.33"	70	2017.5.20	1	74_1: MRV_3, H10, LC513114, LC513609
75	western Honshu	Miyakawa R.	Yura R.	35°24'42.95", 135°09'13.68"	20	2017.5.20	2	75_1: YUR2_6, G34, LC513105, LC513600 75_2: YUR2_7, H17, LC513121, LC513616
76	western Honshu	Hatto R.	Sendai R.	35°22'35.29", 134°17'29.58"	75	2017.5.19	2	76_1: TIY2_3, G28, LC513098, LC513593 76_2: TIY2_4, G29, LC513099, LC513594
77	western Honshu	Sendai R.	Sendai R.	35°20'36.24", 134°12'10.96"	68	2017.5.19	1	77_1: TIY1_6, H14, LC513118, LC513613
78	western Honshu	Yoshii R.	Yoshii R.	34°48'11.29", 134°08'25.83"	18	2017.3.27	2	78_1: YSI1_1, G32, LC513103, LC513598 78_2: YSI1_2, G33, LC513104, LC513599
79	western Honshu	Hiromo R.	Asahi R.	34°49'19.67", 133°48'34.62"	215	2017.3.27	2	79_1: ASH3_4, G1, LC513070, LC513565 79_2: ASH3_3, H4, LC513125, LC513620
80	western Honshu	Takahashi R	Takahashi R	34°47'05.30", 133°36'32.20"	56	2017.3.28	2	80_1: TKH_1, H15, LC513119, LC513614 80_2: TKH_2, H16, LC513120, LC513615
81	western Honshu	Uto R.	Takahashi R	34°37'57.18", 133°26'04.90"	65	2017.3.28	2	81_1: ODK1_5, G23, LC513092, LC513587 81_2: ODK1_6, H11, LC513115, LC513610
82	western Honshu	Ashida R.	Ashida R.	34°35'05.68", 133°02'53.57"	336	2017.3.28	2	82_1: ASD_18, G1, LC513071, LC513566 82_2: ASD_20, G2, LC513086, LC513581
83	western Honshu	Gonokawa R.	Gonokawa R.	34°39'49.60", 132°42'46.40"	197	2017.3.28	2	83_1: GON_2, G6, LC513109, LC513604 83_2: GON_3, G7, LC513110, LC513605
84	western Honshu	Mukunashi R.	Numata R.	34°34'06.25", 132°48'17.85"	375	2017.3.28	3	84_1: NMT_4, G1, LC513072, LC513567 84_2: NMT_2, G19, LC513085, LC513580 84_3: NMT_3, G22, LC513091, LC513586
85	western Honshu	Ota R.	Ota R.	34°34'29.36", 132°13'56.16"	269	2017.3.29	2	85_1: OTA1_7, G24, LC513093, LC513588 85_2: OTA1_6, H5, LC513129, LC513624

86	western Honshu	Oze R.	Oze R.	34°12'26.66", 132°11'37.43"	9	2017.3.29	2	86_1: OZE_1, H5, LC513130, LC513625 86_2: OZE_2, H13, LC513117, LC513612
87	western Honshu	Saba R.	Saba R.	34°08'51.41", 131°37'17.20"	40	2017.3.29	2	87_1: SBA_2, G26, LC513095, LC513590 87_2: SBA_5, G26, LC513096, LC513591
88	western Honshu	Koto R.	Koto R.	34°03'31.20", 131°17'28.52"	9	2017.3.29	(1)	88_1: KTO_2, ‡, LC513141, LC513636
89	western Honshu	Shizuma R.	Shizuma R.	35°09'13.70", 132°30'51.16"	34	2017.5.19	2	89_1: SNB_4, G1, LC513073, LC513568 89_2: SNB_3, H5, LC513131, LC513626
90	western Honshu	Hamada R.	Hamada R.	34°53'43.97, 132°06'08.29"	9	2017.5.19	2	90_1: HMD_2, G1, LC513074, LC513569 90_2: HMD_3, H5, LC513132, LC513627
91	Shikoku	Doki R.	Doki R.	34°11'53.56", 133°50'26.62"	76	2017.3.24	2	91_1: DKK_1, D1, LC513038, LC513533 91_2: DKK_2, D2, LC513045, LC513540
92	Shikoku	Ishite R.	Shigenobu R.	33°52'27.30", 132°50'01.10"	133	2017.3.21	3	92_1: SGN2_5, D1, LC513039, LC513534 92_2: SGN2_2, D7, LC513050, LC513545 92_3: SGN2_4, D8, LC513051, LC513546
93	Shikoku	Kamiyakawa R.	Niyodo R.	33°37'37.31", 133°18'09.75"	62	2017.3.23	1	93_1: NYD3_8, D6, LC513049, LC513544
94	Shikoku	Yasuda R.	Yasuda R.	33°28'24.80" 133°59'44.10"	26	2016.05.21	1	94_1: YSD_3, D1, LC513040, LC513535
95	Shikoku	Mima R.	Shimanto R.	33°17'05.63", 132°35'47.46"	152	2017.3.22	2	95_1: SMT1_1, D9, LC513052, LC513547 95_2: SMT1_2, D10, LC513042, LC513537
96	Shikoku	Yusuhara R.	Shimanto R.	33°23'35.74", 132°55'31.65"	400	2017.3.22	2	96_1: SMT5_11, D1, LC513041, LC513536 96_2: SMT5_10, D11, LC513043, LC513538
97	Shikoku	Shimanto R.	Shimanto R.	33°12'27.94", 133°07'39.27"	200	2017.3.22	1	97_1: SMT7_1, D12, LC513044, LC513539
98	Kyushu	Hikosan R.	Onga R.	33°34'11.79", 130°51'05.38"	64	2017.5.13	2	98_1: HYM_2, G12, LC513077, LC513572 98_2: HYM_3, G13, LC513078, LC513573
99	Kyushu	Imi R.	Imi R.	33°38'30.04,	53	2017.5.14	2	99_1: IBK_3, G2, LC513087, LC513582

				131°35'23.67"				99_2: IBK_2, G14, LC513079, LC513574
100	Kyushu	Yamautsuri R.	Yamakuni R.	33°25'05.10", 131°09'20.49"	176	2017.5.14	2	100_1: YMK3_3, G30, LC513101, LC513596 100_2: YMK3_4, G31, LC513102, LC513597
101	Kyushu	Kase R.	Kase R.	33°20'19.19", 130°15'27.44"	19	2017.5.13	2	101_1: KSG_3, G2, LC513088, LC513583 101_2: KSG_4, G18, LC513083, LC513578
102	Kyushu	Hoshino R.	Yabe R.	33°13'22.94", 130°36'56.12"	51	2017.5.13	2	102_1: HSN_4, G10, LC513075, LC513570 102_2: HSN_5, G11, LC513076, LC513571
103	Kyushu	Banjo R.	Banjo R.	32°57'31.19", 131°48'11.14"	15	2017.5.14	1	103_1: BNS_4, G3, LC513100, LC513595
104	Kyushu	Mifune R.	Midorikawa R.	32°43'51.56", 130°56'58.47"	454	2017.5.16	2	104_1: HSE1_4, G8, LC513111, LC513606 104_2: HSE1_5, G9, LC513112, LC513607
105	Kyushu	Gokase R.	Gokase R.	32°33'32.21", 131°31'14.93"	19	2017.5.15	2	105_1: GKS_16, G4, LC513106, LC513601 105_2: GKS_18, G5, LC513108, LC513603
106	Kyushu	Sashiki R.	Sashiki R.	32°17'44.53", 130°30'58.88"	6	2017.5.15	2	106_1: SZK_2, G4, LC513107, LC513602 106_2: SZK_3, G27, LC513097, LC513592
107	Kyushu	Kuma R.	Kuma R.	32°12'41.46", 130°45'33.10"	99	2017.5.15	2	107_1: KMK_1, G16, LC513081, LC513576 107_2: KMK_2, G17, LC513082, LC513577
108	Kyushu	Oyodo R.	Oyodo R.	31°55'15.69", 131°14'09.28"	22	2017.5.15	1	108_1: OYD_1, G25, LC513094, LC513589
109	Fukuejima	Fukue R.	Fukue R.	32°42'47.70", 128°48'30.90"	89	2018.8.30	2	109_1: FKE_2, I1, LC513138, LC513633 109_2: FKE_3, I2, LC513139, LC513634
Overall							209	
<i>Ecdyonurus viridis</i>								
110	Hokkaido	Masunosawa R.	Ishikari R.	42°57'46.10" 141°13'37.40"	204	2017.8.27	1	110_1: TYH_19, †, LC513638, LC513640
<i>Ecdyonurus hyalinus</i>								
111	Taiwan	Jialan R.	Dabuanxi R.	23°39'44.5", 121°31'54.8"	165	2017.4.21	1	111_1: TWN3_1, †, LC377346, LC377572



---

*Ecdyonurus levis*

---

112	Korea	Gapyeong R.	Hung R.	37°56'07.70", 127°29'26.40"	213	2018.9.30	1	112_1:GAP1_5, †, LC513637, LC513639
-----	-------	-------------	---------	--------------------------------	-----	-----------	---	-------------------------------------

---

†, Specimen was excluded from population analyses.

Table 1-3 Genetic diversities and pairwise *Fst* of *Ecdyonurus hyalinus* in the Yaeyama Islands and the main island of Taiwan based on mitochondrial DNA analysis.

Sampling site code	Group name	Sample size	<i>S</i>	<i>h</i> ± SD	<i>π</i> ± SD	<i>π</i> ± SD in the group	Mean pairwise distance between the groups	<i>Fst</i> ( <i>p</i> ) between the groups	
1	Yaeyama Islands	10	4	0.53 ± 0.18	0.0031 ± 0.0045	0.0051 ± 0.0185	0.1196 ± 0.0146	0.96 (***)	
			4	0.53 ± 0.18	0.0012 ± 0.0023				
2		9	2	0.56 ± 0.09	0.0026 ± 0.0038				
			4	0.75 ± 0.11	0.0019 ± 0.0032				
3		10	4	0.73 ± 0.12	0.0042 ± 0.0059				
			3	0.69 ± 0.10	0.0016 ± 0.0030				
4		12	7	0.83 ± 0.10	0.0056 ± 0.0080				
			6	0.80 ± 0.10	0.0027 ± 0.0047				
5		8	7	0.96 ± 0.08	0.0050 ± 0.0062				0.0039 ± 0.0159
			4	0.75 ± 0.14	0.0028 ± 0.0041				
6	13	8	0.83 ± 0.09	0.0038 ± 0.0061	0.0380 ± 0.0119	0.91 (***)			
		7	0.85 ± 0.07	0.0032 ± 0.0056					
7	9	6	0.89 ± 0.09	0.0038 ± 0.0052					
		4	0.69 ± 0.15	0.0024 ± 0.0038					
8	5	5	1.00 ± 0.13	0.0031 ± 0.0034					
		2	0.60 ± 0.18	0.0012 ± 0.0018					
9	8	6	0.89 ± 0.11	0.0039 ± 0.0051					
		4	0.75 ± 0.14	0.0020 ± 0.0032					
10	Main island of Taiwan	8	1	0	0				
			2	0.25 ± 0.18	0.0005 ± 0.0013	0.0060 ± 0.0102			
12		3	3	1.00 ± 0.27	0.0031 ± 0.0029				
			2	0.67 ± 0.31	0.0013 ± 0.0016				
14		1	1	NA	NA				

		1		
15	2	2	1.00 ± 0.50	0.0110 ± 0.0120
		1	0	0
16	3	2	0.67 ± 0.31	0.0010 ± 0.0013
		2	0.67 ± 0.31	0.0013 ± 0.0016
Overall	101	34	NA	NA
		20		

In each cell, the upper figures indicate the value from *COI* sequences, and the lower figures indicate the value from *16Sr RNA* sequences.

*S*: number of haplotypes, *h*: haplotype diversity, *d*: nucleotide diversity, *SD*: standard deviation, \* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01, \*\*\* : p < 0.001, NA: not analyzed.

Table 2-1 Genetic diversities and demographic parameters of *Ecdyonurus yoshidae* in the Japanese archipelago based on the mitochondrial DNA analysis.

Haplogroup	Sample size	Genetic diversities					Neutrality test	Mismatch distribution	
		$H_r$	$H'$	$E$	$h \pm SD$	$H \pm SD$	Tajima's $D(p)$	mean pairwise differences SSD ( $p$ ) $Tau$ (95% CI), $T$ (95% CI) Ma	
A	61	0.83	2.72	0.77	0.83 ± 0.05	0.0016 ± 0.0372	-2.623 (***)	2.3 0.001 (0.926) 2.723 (0.965-4.457), 0.10 (0.04-0.17)	
B	17	0.93	2.23	0.93	0.93 ± 0.04	0.0046 ± 0.0141	-0.217 (0.45)	5.0 0.027 (0.302) 7.922 (2.468-11.643), 0.30 (0.09-0.44)	
C	27	0.90	2.56	0.87	0.90 ± 0.06	0.0017 ± 0.0079	-2.293 (**)	1.9 0.004 (0.499) 1.969 (1.232-2.750), 0.07 (0.05-0.10)	
D	15	0.94	2.34	0.94	0.94 ± 0.05	0.0029 ± 0.0064	-2.155 (**)	3.4 0.004 (0.844) 1.529 (0.420-5.652), 0.06 (0.02-0.21)	
E	6	0.70	1.01	0.92	0.73 ± 0.16	0.0008 ± 0.0021	0.311 (0.65)	0.9 0.031 (0.458) 1.186(0.000-2.580), 0.04 (0.00-0.10)	
F	10	1.00	2.30	1.00	1.00 ± 0.04	0.0026 ± 0.0046	-1.742 (*)	3.1 0.014 (0.454) 3.082 (1.633-4.684), 0.12 (0.06-0.18)	
G	44	0.98	3.34	0.95	0.98 ± 0.01	0.0037 ± 0.0024	-2.191 (**)	4.2 0.001 (0.542) 4.336 (3.412-5.148), 0.16 (0.13-0.19)	
H	25	0.93	2.62	0.91	0.93 ± 0.05	0.0022 ± 0.0075	-2.360 (***)	2.5 0.001 (0.857)	

								2.386 (1.356-3.240), 0.09 (0.05-0.12)
I	2	1.00	0.69	1.00	1.00 ± 0.50	0.0009 ± 0.0009	NA	NA
								11.6
Overall	207	NA	4.57	0.92	0.92 ± 0.01	0.0103 ± 0.2059	-1.79861 (**)	0.004 (0.425)
								8.374 (5.98-13.54), 0.32 (0.23-0.51)

Footnotes are the same as in Table 1-3, in addition, *Hr*: Haplotype richness, *H'*: Shannon diversity index, *E*: evenness, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , SSD: sum of squared deviation, *Tau*: date of growth or decline measured in units of mutational time, T: Time of population expansion calculated based on the sudden expansion model from the evolutionary rates of mitochondrial DNA *COI* and *16S rRNA*, CI: Confidence Interval, Ma: Mega annum.

Table 3-1 Specimens information of *Ecdyonurus yoshidae* in the Yodogawa River system for mitochondrial DNA analysis.

Sampling site code	River name	Latitude N, Longitude E	Altitude (m)	Sampling date	Sample size	Specimen code: Abbreviation, Concatenated haplotype, Accession number <i>COI</i> , <i>16S rRNA</i>
1	Anegawa R.	35°24'46.1", 136°16'57.4"	104	2022.4.8	10	1-1: ANE3_1, C27, LC759216, LC759404
						1-2: ANE3_2, H19, LC759217, LC759405
						1-3: ANE3_3, H10, LC759218, LC759406
						1-4: ANE3_4, C1, LC759219, LC759407
						1-5: ANE3_5, C20, LC759220, LC759408
						1-6: ANE3_6, H20, LC759221, LC759409
						1-7: ANE3_9, D3, LC759222, LC759410
						1-8: ANE3_10, D3, LC759223, LC759411
						1-9: ANE3_11, H21, LC759224, LC759412
						1-10: ANE3_12, D3, LC759225, LC759413
2	Yagura R.	35°17'27.4", 136°17'09.0"	102	2022.4.8	7	2-1: YGR_1, †, LC759226, LC759414
						2-2: YGR_2, H22, LC759227, LC759415

						2-3: YGR_3, C1, LC759228, LC759416
						2-4: YGR_4, H12, LC759229, LC759417
						2-5: YGR_5, †, LC759230, LC759418
						2-6: YGR_6, C22, LC759231, LC759419
						2-7: YGR_7, G35, LC759232, LC759420
						3-1: SRI_1, D15, LC759233, LC759421
						3-2: SRI_2, H24, LC759234, LC759422
						3-3: SRI_3, H5, LC759235, LC759423
						3-4: SRI_4, C21, LC759236, LC759424
3	Serigawa R.	35°15'01.1", 136°15'55.2"	104	2022.4.8	10	3-5: SRI_5, C1, LC759237, LC759425
						3-6: SRI_6, H24, LC759238, LC759426
						3-7: SRI_7, †, LC759239, LC759427
						3-8: SRI_8, G20, LC759240, LC759428
						3-9: SRI_9, H25, LC759241, LC759429

						3-10: SRI_10, H24, LC759242, LC759430
4	Inugami R.	35°15'21.8", 136°13'42.3"	89	2018.4.26	1	4-1: INK_1, H6, LC513133, LC513628
						5-1: ETI_1, C1, LC513016, LC513511 5-2: ETI_2, C1, LC513017, LC513512 5-3: ETI_4, D3, LC759243, LC759431 5-4: ETI_5, H15, LC759244, LC759432 5-5: ETI_6, H26, LC759245, LC759433
5	Echi R.	35°05'23.2", 136°16'12.9"	164	2017.8.3	10	5-6: ETI_7, G36, LC759246, LC759434 5-7: ETI_8, H24, LC759247, LC759435 5-8: ETI_9, G20, LC759248, LC759436 5-9: ETI_10, D14, LC759249, LC759437 5-10: ETI_12, H10, LC759250, LC759438
						6-1: SKR_2, H5, LC759251, LC759439 6-2: SKR_3, H10, LC759252, LC759440
6	Sakura R.	35°03'41.7", 136°10'54.3"	124	2022.4.5	10	



---

6-3: SKR\_4, H3,  
 LC759253, LC759441  
 6-4: SKR\_5, H24,  
 LC759254, LC759442  
 6-5: SKR\_6, H27,  
 LC759255, LC759443  
 6-6: SKR\_7, H9,  
 LC759256, LC759444  
 6-7: SKR\_8, D18,  
 LC759257, LC759445  
 6-8: SKR\_9, D17,  
 LC759258, LC759446  
 6-9: SKR\_10, H3,  
 LC759259, LC759447  
 6-10: SKR\_11, H28,  
 LC759260, LC759448

---

7-1: YSK\_1, C1,  
 LC759261, LC759449  
 7-2: YSK\_2, H6,  
 LC759262, LC759450  
 7-3: YSK\_3, C1,  
 LC759263, LC759451  
 7-4: YSK\_4, H5,  
 LC759264, LC759452  
 7-5: YSK\_5,  
 C1,LC759265, LC759453  
 7-6: YSK\_6,  
 H29, LC759266,LC759454

---

7	Yasu R.	35°03'27.8", 136°00'28.9"	100	2022.4.4	7
---	---------	---------------------------	-----	----------	---

						7-7: YSK_7, H5,LC759267, LC759455
						8-1: MET_1, H9, LC513136, LC513631 8-2: MET_2, C8, LC513036, LC513531 8-3: MET_3, H9, LC513137, LC513632 8-4: MET_4, H30, LC759268, LC759456 8-5: MET_5, D18, LC759269, LC759457 8-6: MET_6, H9, LC759270, LC759458 8-7: MET_7, C26, LC759271, LC759459 8-8: MET_8, H31, LC759272, LC759460 8-9: MET_9, H6, LC759273, LC759461 8-10: MET_10, H28, LC759274, LC759462
8	Meta R.	35°03'46.0", 135°59'03.8"	95	2017.8.4	10	
						9-1: OGT_1, H15, LC759275, LC759463 9-2: OGT_2, D13, LC759276, LC759464 9-3: OGT_3, G37, LC759277, LC759465
9	Ogoto R.	35°03'46.0", 135°59'03.8"	121	2022.4.5	10	

---

9-4: OGT\_4, H5,  
LC759278, LC759466  
9-5: OGT\_5, H3,  
LC759279, LC759467  
9-6: OGT\_6, H32,  
LC759280, LC759468  
9-7: OGT\_7, H33,  
LC759281, LC759469  
9-8: OGT\_8, H34,  
LC759282, LC759470  
9-9: OGT\_9, G1,  
LC759283, LC759471  
9-10: OGT\_10, D19,  
LC759284, LC759472

---

10-1: MAN\_1, G19,  
LC513084, LC513579  
10-2: MAN\_2, D5,  
LC513048, LC513543  
10-3: MAN\_3, G20,  
LC513089, LC513584  
10-4: MAN\_4, H35,  
LC759285, LC759473  
10-5: MAN\_5, †,  
LC759286, LC759474  
10-6: MAN\_6, G38,  
LC759287, LC759475  
10-7: MAN\_7, H36,  
LC759288, LC759476

---

10            Mano R.            35°07'37.9", 135°54'43.2"            94            2017.8.4            10

						10-8: MAN_8, H31, LC759289, LC759477 10-9: MAN_9, G39, LC759290, LC759478 10-10: MAN_10, G19, LC759291, LC759479
11	Waji R.	35°09'23.0", 135°55'52.8"	89	2022.4.5	2	11-1: WAJ_1, G40, LC759292, LC759480 11-2: WAJ_2, G19, LC759293, LC759481
						12-1: KMG_1, H31, LC759294, LC759482 12-2: KMG_2, H5, LC759295, LC759483 12-3: KMG_3, H38, LC759296, LC759484 12-4: KMG_4, G41, LC759297, LC759485 12-5: KMG_5, H5, LC759298, LC759486 12-6: KMG_6, D3, LC759299, LC759487 12-7: KMG_7, H37, LC759300, LC759488 12-8: KMG_8, G42, LC759301, LC759489 12-9: KMG_9, †, LC759302, LC759490
12	Kamogawa R.	35°19'07.4", 136°00'48.6"	92	2022.4.5	10	

						12-10: KMG_11, H5, LC759303, LC759491
						13-1: ADO3_1, H1, LC513113, LC513608 13-2: ADO3_2, H2, LC513123, LC513618 13-3: ADO3_3, H3, LC513124, LC513619 13-4: ADO3_8, D16, LC759304, LC759492 13-5: ADO3_9, H39, LC759305, LC759493
13	Ado R.	35°21'49.3", 135°56'36.9"	134	2017.8.2 2022.4.6	5	
						14-1: ADO4_2, H40, LC759306, LC759494 14-2: ADO4_3, H5, LC759307, LC759495 14-3: ADO4_4, D3, LC759308, LC759496 14-4: ADO4_5, G19, LC759309, LC759497 14-5: ADO4_6, H41, LC759310, LC759498 14-6: ADO4_7, G19, LC759311, LC759499 14-7: ADO4_8, H19, LC759312, LC759500 14-8: ADO4_9, H42, LC759313, LC759501
14	Ado R.	35°20'58.2", 136°00'21.1"	106	2022.4.6	8	

15	Ado R.	35°20'28.7", 136°02'00.6"	95	2022.4.6	4	15-1: ADO5_1, G19, LC759314, LC759502 15-2: ADO5_2, H43, LC759315, LC759503 15-3: ADO5_3, †, LC759316, LC759504 15-4: ADO5_4, H15, LC759317, LC759505
16	Ishida R.	35°24'52.9", 136°01'56.2"	92	2022.4.6	3	16-1: ISI_1, H3, LC759318, LC759506 16-2: ISI_2, G43, LC759319, LC759507 16-3: ISI_3, H44, LC759320, LC759508
17	Chinai R.	35°27'44.3", 136°03'05.9"	91	2022.4.6	3	17-1: TIN_1, G44, LC759321, LC759509 17-2: TIN_2, H45, LC759322, LC759510 17-3: TIN_5, H10, LC759323, LC759511
18	Okawagawa R.	35°31'23.3", 136°09'37.2"	90	2017.6.3 2022.4.7	10	18-1: OOK_1, H12, LC513116, LC513611 18-2: OOK_3, C1, LC513015, LC513510 18-3: OOK_4, D3, LC759324, LC759512 18-4: OOK_5, H10, LC759325, LC759513

						18-5: OOK_6, H10, LC759326, LC759514
						18-6: OOK_10, H21, LC759327, LC759515
						18-7: OOK_11, C1, LC759328, LC759516
						18-8: OOK_12, C23, LC759329, LC759517
						18-9: OOK_18, H12, LC759330, LC759518
						18-10: OOK_19, †, LC759331, LC759519
						19-1: OIS_1, C22, LC759332, LC759520
						19-2: OIS_2, C19, LC513029, LC513029
						19-3: OIS_3, H18, LC513122, LC513617
19	Seta R.	34°54'37.4", 135°54'35.7"	78	2019.6.14	10	19-4: OIS_4, C24, LC759333, LC759521
						19-5: OIS_5, H46, LC759334, LC759522
						19-6: OIS_6, C25, LC759335, LC759523
						19-7: OIS_7, G45, LC759336, LC759524
						19-8: OIS_8, H47, LC759337, LC759525

						19-9: OIS_9, H23, LC759338, LC759526 19-10: OIS_10, C1, LC759339, LC759527
20	Uji R.	34°54'24.2", 135°47'33.8"	12	2019.2.5	2	20-1: UJI_1, H5, LC513126, LC513621 20-2: UJI_2, H5, LC513127, LC513622
21	Mita R.	34°58'05.9", 135°53'31.4"	118	2017.8.4	2	21-1: MIT_1, G1, LC513069, LC513564 21-2: MIT_3, G21, LC513090, LC513585
22	Daido R.	34°57'01.94", 135°59'12.32"	134	2018.10.27	1	22-1: OOT_3, C10, LC513020, LC513515
23	Koizumi R.	34°53'52.80", 135°41'54.45"	9	2018.10.16	1	23-1: KIZ_1, D4, LC513047, LC513542
24	Kidu R.	34°44'40.26", 135°49'22.42"	30	2017.6.4	1	24-1: KID_1, H8, LC513135, LC513630
25	Nagashiro R.	35°04'42.06", 135°45'53.25"	122	2018.10.16	2	25-1: KAM1_1, H7, LC513134, LC513629 25-2: KAM2_3, G15, LC513080, LC513575
26	Lake Biwa (Katayama)	35°27'34.8", 136°11'51.1"	85	2018.8.28, 2022.4.8	10	26-1: KTY_1, F3, LC759340, LC759528 26-2: KTY_2, F4, LC759341, LC759529 26-3: KTY_3, F5, LC759342, LC759530



26-4: KTY2\_2, F11,  
 LC759343, LC759531  
 26-5: KTY2\_4, F10,  
 LC759344, LC759532  
 26-6: KTY2\_5, F12,  
 LC759345, LC759533  
 26-7: KTY2\_6, F13,  
 LC759346,  
 26-8: KTY2\_7, F14,  
 LC759347, LC759535  
 26-9: KTY2\_8, F4,  
 LC759348, LC759536  
 26-10: KTY2\_9, F15,  
 LC759349, LC759537

27-1: MGH\_1, F6,  
 LC513065, LC513560  
 27-2: MGH\_2, F6,  
 LC759350, LC759538  
 27-3: MGH\_4, F16,  
 LC759351, LC759539  
 27-4: MGH\_5, F17,  
 LC759352, LC759540  
 27-5: MGH\_6, F18,  
 LC759353, LC759541  
 27-6: MGH\_9, F19,  
 LC759354, LC759542  
 27-7: MGH\_10, F20,  
 LC759355, LC759543

27	Lake Biwa (Miyagahama- 1)	35°11'24.7", 136°05'01.2"	85	2017.8.3	9
----	---------------------------------	---------------------------	----	----------	---

						27-8: MGH_11, F21, LC759356, LC759544 27-9: MGH_13, F4, LC759357, LC759545
						28-1: MGH_16, F18, LC759358, LC759546 28-2: MGH_17, F22, LC759359, LC759547 28-3: MGH_18, F23, LC759360, LC759548 28-4: MGH_19, F24, LC759361, LC759549 28-5: MGH_20, F25, LC759362, LC759550 28-6: MGH_21, F19, LC759363, LC759551 28-7: MGH_22, F26, LC759364, LC759552 28-8: MGH_23, F27, LC759365, LC759553 28-9: MGH_24, F28, LC759366, LC759554 28-10: MGH_25, F4, LC759367, LC759555
28	Lake Biwa (Miyagahama- 2)	35°11'23.9", 136°04'41.8"	85	2022.4.4	10	
29	Lake Biwa (Kaizu)	35°27'50.4", 136°04'46.4"	85	2017.8.1 2022.4.6	10	29-1: UMI_1, F10, LC513060, LC513555 29-2: UMI_2, F49, LC760078, LC760079

---

29-3: UMI\_3, F30,  
LC760080, LC760081  
29-4: UMI2\_3, F4,  
LC759368, LC759556  
29-5: UMI2\_4, F7,  
LC759369, LC759557  
29-6: UMI2\_5, F29,  
LC759370, LC759558  
29-7: UMI2\_6, F29,  
LC759371, LC759559  
29-8: UMI2\_7, F4,  
LC759372, LC759560  
29-9: UMI2\_9, F4,  
LC759373, LC759561  
29-10: UMI2\_10, F4,  
LC759374, LC759562

---

30-1: OUR2\_2, F31,  
LC759375, LC759563  
30-2: OUR2\_4, F8,  
LC759376, LC759564  
30-3: OUR2\_5, F32,  
LC759377, LC759565  
30-4: OUR2\_6, F4,  
LC759378, LC759566  
30-5: OUR2\_7, F32,  
LC759379, LC759567  
30-6: OUR2\_8, F33,  
LC759380, LC759568

---

30	Lake Biwa (Oura)	35°29'15.57, 136°07'10.32"	84	2022.4.7 2015.6.27	10
----	---------------------	----------------------------	----	-----------------------	----

						30-7: OUR2_9, F34, LC759381, LC759569
						30-8: OUR3_1, F35, LC759382, LC759570
						30-9: OUR_3, F36, LC759383, LC759571
						30-10: OUR_4, F4 LC759384, LC759572
						31-1: SUG_1, F7, LC759385, LC759573
						31-2: SUG_2, F8, LC759386, LC759574
						31-3: SUG_3, F9, LC513068, LC513563
						31-4: SUG2_2, F37, LC759387, LC759575
31	Lake Biwa (Sugaura)	35°27'29.8", 136°08'24.2"	85	2015.6.27, 2022.4.7	10	31-5: SUG2_3, F38, LC759388, LC759576
						31-6: SUG2_5, F39, LC759389, LC759577
						31-7: SUG2_6, F40, LC759390, LC759578
						31-8: SUG2_8, F42, LC759391, LC759579
						31-9: SUG2_9, F43, LC759392, LC759580
						31-10: SUG2_10, F44, LC759393, LC759581

---

						32-1: IIU_1, F1, LC759394, LC759582
						32-2: IIU_2, F48, LC759395, LC759583
						32-3: IIU_3, F2, LC759396, LC759584
						32-4: IIU2_3, F45, LC759397, LC759585
						32-5: IIU2_4, F41, LC759398, LC759586
32	Lake Biwa (Han-noura)	35°30'13.0", 136°10'51.8"	85	2017.8.1, 2022.4.7	10	32-6: IIU2_5, F46, LC759399, LC759587
						32-7: IIU2_6, F47, LC759400, LC759588
						32-8: IIU2_7, F46, LC759401, LC759589
						32-9: IIU2_10, F4, LC759402, LC759590
						32-10: IIU2_11, F29, LC759403, LC759591

---

Overall 218

Footnotes are the same as in Tables 1-2.

Table 3-2 Genetic diversities and demographic parameters of *Ecdyonurus yoshidae* in the Yodogawa River system based on mitochondrial DNA analysis.

Haplogroup	Sample size	Genetic diversity						Neutrality test	Mismatch distribution
		<i>S</i>	<i>h</i> ± SD	<i>π</i> ± SD	<i>Hr</i>	<i>H'</i>	<i>E</i>	Tajima's <i>D</i> ( <i>p</i> )	Mean pairwise difference, T (95% CI) Ma
C	23	12	0.78 ± 0.09	0.0017 ± 0.0073	8.33	1.93	0.78	-1.989 (**)	1.9, 0.10 (0.00-0.18)
	27	19	0.90 ± 0.06	0.0017 ± 0.0079	0.90	2.56	0.87	-2.293 (**)	1.9, 0.07 (0.05-0.10)
D	17	10	0.84 ± 0.087	0.0024 ± 0.0072	9.00	1.95	0.85	-2.059 (**)	2.8, 0.11 (0.04-0.18)
	15	12	0.94 ± 0.05	0.0029 ± 0.0064	0.94	2.34	0.94	-2.155 (**)	3.4, 0.06 (0.02-0.21)
F	69	48	0.97 ± 0.013	0.0023 ± 0.0184	13.45	3.59	0.93	-2.494 (***)	2.7, 0.10 (0.08-0.12)
	10	10	1.00 ± 0.04	0.0026 ± 0.0046	1.00	2.3	1.00	-1.742 (*)	3.1, 0.12 (0.06-0.18)
G	24	16	0.93 ± 0.04	0.0031 ± 0.0128	11.12	2.54	0.91	-1.461 (*)	3.6, 0.16 (0.08-0.23)
	44	34	0.98 ± 0.01	0.0037 ± 0.0234	0.98	3.34	0.95	-2.191 (**)	4.2, 0.16 (0.13-0.19)
H	78	41	0.96 ± 0.01	0.0027 ± 0.0323	12.40	3.38	0.91	-2.359 (***)	3.1, 0.12 (0.05-0.12)
	25	18	0.93 ± 0.05	0.0022 ± 0.0075	0.93	2.62	0.91	-2.360 (***)	2.5, 0.12 (0.09-0.14)
Overall	211	127	0.99 ± 0.00	0.0100 ± 0.2441	NA	4.51	0.93	-1.464 (*)	11.4, 0.58 (0.39-0.72)
	121	93	0.99 ± 0.00	0.0095 ± 0.1271	NA	4.57	0.92	-1.587 (*)	11.6, 0.32 (0.23-0.51)

Footnotes are the same as in Tables 1-3 and 2-1. In addition, in each row, the upper figures indicate the Yodogawa River population, and the lower figures indicate the Japanese archipelago population.

Table 3-3 Specimens information of *Ecdyonurus yoshidae* in the Yodogawa River system for nuclear DNA analysis.

Sampling site code	River name	River system name	Latitude N, Longitude E	Altitude (m)	Sampling date	Sample size	Specimen code: Abbreviation, mt-DNA haplogroup, Accession number
Yodogara River system							
4	Inugami R.	Yodogawa R.	35°15'21.80", 136°13'43.30"	91	2017.8.3	1	4-1: INK_1, H6, LC759014
5	Echi R.	Yodogawa R.	35°04'38.10", 136°18'22.40"	189	2017.8.3	2	5-1: ETI_1, C1, LC759015 5-2: ETI_2, C1, LC759016
8	Meta R.	Yodogawa R.	35°03'46.00", 135°59'03.10"	96	2017.8.4	2	8-1: MET_1, H9, LC759017 8-2: MET_2, C8, LC759018
10	Mano R.	Yodogawa R.	35°07'37.90", 135°54'43.20"	96	2017.8.4	2	10-1: MAN_1, G19, LC759019 10-2: MAN_2, D5, LC759020
13	Ado R.	Yodogawa R.	35°21'49.30", 135°56'36.90"	136	2017.8.3	2	13-1: ADO3_2, H2, LC759021 13-2: ADO3_3, H3, LC759022

18	Okawa R.	Yodogawa R.	35°31'22.74", 136°09'37.1"	94	2017.6.3	1	18-1: OOK_1, H12, LC759023
19	Seta R.	Yodogawa R.	34°54'37.4", 135°54'35.7"	76	2019.6.14	1	19-1: OIS_2, C19, LC759024
20	Uji R.	Yodogawa R.	34°54'24.20" 135°47'33.80"	10	2019.2.5	2	20-1: UJI_1, H5, LC759025 20-2: UJI_2, H5, LC759026
21	Mita R.	Yodogawa R.	34°58'05.90", 135°53'31.40"	118	2017.8.4	1	21-1: MIT_3, G21, LC759027
22	Daido R.	Yodogawa R.	34°57'01.94", 135°59'12.32"	118	2017.6.6	1	22-1: OOT_3, C10, LC759028
23	Koizumi R.	Yodogawa R.	34°53'52.80", 135°41'54.45"	9	2018.10.16	1	23-1: KIZ_1, D4, LC759030
24	Kizu R.	Yodogawa R.	34°44'40.26", 135°49'22.42"	29	2017.6.4	1	24-1: KID_1, H8, LC759029
26	Lake Biwa (Katayama)	Yodogawa R.	35°27'34.80", 136°11'51.10"	84	2018.8.28	3	26-1: KTY_1, F3, LC759031 26-2: KTY_2, F4, LC759032 26-3: KTY_3, F5, LC759033
27	Lake Biwa (Miyagahama-1)	Yodogawa R.	35°11'24.90", 136°05'02.50"	84	2017.8.3	3	27-1: MGH_1, F6, LC759034



							27-2: MGH_2, F6, LC759035 27-10: MGH_3, NA, LC759036
29	Lake Biwa (Kaizu)	Yodogawa R.	35°27'36.00", 136°04'50.60"	84	2017.8.1	3	29-1: UMI_1, F10, LC759037 29-2: UMI_2, F4, LC759038 29-11: UMI_3, F30, LC759039
30	Lake Biwa (Oura)	Yodogawa R.	35°29'06.8", 136°06'58.9"	84	2015.6.27	2	30-1: OUR_3, F36, LC759040 30-2: OUR_4, F4, LC759041
31	Lake Biwa (Sugaura)	Yodogawa R.	35°27'39.80", 136°07'28.30"	84	2015.6.27	3	31-1: SUG_1, F7, LC759042 31-2: SUG_2, F8, LC759043 31-3: SUG_3, F9, LC759044
32	Lake Biwa (Han-noura)	Yodogawa R.	35°30'13.00", 136°10'51.90"	84	2017.8.1	3	32-1: IIU_1, F1, LC759045 32-11: IIU_2, F48, LC759046 32-3: IIU_3, F2 LC759047

Other river systems except the Yodogawa River system

1	Asahi R.	Omono R.	39°46'02.01", 140°10'26.23"	35	2017.6.19	1	1-1: OMN3_4, B1, LC759048
13	Shiroishi R.	Abukuma R.	38°00'38.88", 140°37'06.88"	48	2018.6.7	1	13-1: ABU3_2, A1, LC759049
20	Lake Yunoko	Tone R.	36°47'54.40", 139°25'42.50"	1488	2019.05.18	1	20-1: YNK_1, B10, LC759051
21	Lake Chuzenji	Tone R.	36°44'27.10", 139°29'13.8"	1271	2019.05.06	1	21-1: TYK_6, B10, LC759050
25	Edo R.	Tone R.	35°56'25.0", 139°50'52.0"	5	2017.4.16	1	25-2: TON10_3, A3, LC759052
34	Hayakawa R.	Hayakawa R.	35°14'00.30", 139°06'31.90"	81	2018.5.15	1	34-1: HYK_15, A1, LC759053
35	Lake Ashinoko	Hayakawa R.	35°12'09.91", 139° 01'32.23"	727	2019.6.13	1	10-1: ASK_1, A1, LC759054
47	Yahagi R.	Yahagi R.	35°04'56.49", 137°09'57.21"	39	2017.6.3	1	47-1: YHG_5, C1, LC759055
49	Hakkagawa R.	Hakkagawa R.	37°15'10.33", 136°49'17.00"	150	2017.5.21	1	49-1: HKE_6, E6, LC759056
51	Iburi R.	Shinbori R.	36°18'49.58", 136°23'18.34"	5	2017.5.21	1	51-1: IBU_6, E2, LC759057

54	Makita R.	Ibi R.	35°19'59.35", 136°31'22.03	32	2017.6.3	1	54-1: IBL_7, C1, LC759058
73	Yoshino R.	Yoshino R.	34°23'10.91, 135°54'02.54	171	2017.6.4	1	73-1: YSN_3, C1, LC759059
91	Doki R.	Doki R.	34°11'53.56", 133°50'26.62"	76	2017.3.24	1	91-1: DKK_1, D1, LC759060
109	Fukue R.	Fukue R.	32°42'47.70", 128°48'30.90"	89	2018.8.30	1	109-1: FKE_3 I1, LC759061
Overall						55	
<i>Outgroup Ephoron shigae</i>							
	Nabari R.	Yodogawa R.	34°39'09.5", 136°04'23.4"	166	2019.9.7	1	NAB_5 LC759062
<i>Congener Ecdyonurus viridis</i>							
	Masunosawa R.	Toyohira R.	42°57'46.10" 141°13'37.40"	204	2017.8.27	1	TYH_14 LC759063
<i>Congener Ecdyonurus levis</i>							
	Gapyeong R.	Hung R.	37°56'07.70", 127°29'26.40"	213	2018.9.30	1	GAP1-5 LC759064
<i>Congener Ecdyonurus hyalinus</i>							
	Jialan R.		23°39'44.5", 121°31'54.8"	178	2017.3.21	1	TWN3-1 LC759065

<i>Congener Ecdyonurus tigris</i>						
Nakatsu R.	Sagami R.	35°29'10.87", 139°12'08.46"	494	2016.10.6	1	NKT8_6 LC759066
<i>Congener Ecdyonurus tobiironis</i>						
Nakatsu R.	Sagami R.	35°31'01.7", 139°19'28.1"	65	2017.3.16	1	NKT9_1 LC759067

Sampling site codes, specimen codes, and abbreviations of other river systems except the Yodogawa River system are the same as in Table 1-2.

Table 4-1 Specimens information of *Ecdyonurus yoshidae* in the Sagami River system for mitochondrial DNA analysis.

Sampling site code	River name	Latitude N, Longitude E	Altitude (m)	$h \pm SD^*$	Sampling date	Sample size	Specimen code: Abbreviation, Haplotype: Accession number
1	Sagami R.	35°25'6.77", 139°22'10.70"	7	0.53 ± 0.18	2016.6.1 2020.5.2	10	1-1: SGM1_1, A1: LC603425
							1-2: SGM1_6, A1: LC603426
							1-3: SGM1_7, A1: LC603427
							1-4: SGM1_8, A1: LC603428
							1-5: SGM1_10, A1: LC603429
							1-6: SGM1_11, A16: LC603430
							1-7: SGM1_20, A11: LC603431
							1-8: SGM1_21, A1: LC603432
							1-9: SGM1_22, A2: LC603433
							1-10: SGM1_23, A1: LC603434
2	Sagami R.	35°26'30.6", 139°22'19.9"	12	0.88 ± 0.05	2016.1.16 2016.3.1 2016.4.15	20	2-1: SGM2_1, A7: LC603435
							2-1: SGM2_2, A1: LC603436
							2-3: SGM2_3, A7: LC603437
							2-4: SGM2_4, A17: LC730080
							2-5: SGM2_5, A1: LC603438
							2-6: SGM2_7, A18: LC603439
							2-7: SGM2_8, C1: LC603440
							2-8: SGM2_9, A34: LC603441
							2-9: SGM2_15, A6: LC603442
							2-10: SGM2_16, A2: LC603443
							2-11: SGM2_17, A2: LC603444
							2-12: SGM2_18, A1: LC730081
							2-13: SGM2_19, A1: LC730082
							2-14: SGM2_20, A1: LC730083

							2-15: SGM2_21, A6: LC730084
							2-16: SGM2_22, A9: LC730085
							2-17: SGM2_24, A6: LC730086
							2-18: SGM2_25, A6: LC730087
							2-19: SGM2_26, A19: LC730088
							2-10: SGM2_27, A1: LC730089
							3-1: SGM4_1, A20: LC512972 (LC603445)*
							3-2: SGM4_2, A21: LC512973
							3-3: SGM4_3, A2: LC603447
							3-4: SGM4_4, A1: LC603448
							3-5: SGM4_5, A2: LC603449
3	Sagami R.	35°27'51.41", 139°22'46.78"	16	0.93 ± 0.07	2016.3.21	11	3-6: SGM4_11, A1: LC603450
							3-7: SGM4_7, C1: LC603451
							3-8: SGM4_8, A12: LC603452
							3-9: SGM4_9, A8: LC603453
							3-10: SGM4_10, A2: LC603454
							3-11: SGM4_6, A7: LC512974 (LC603446) *
							4-1: SGM7_1, A1: LC603455
							4-2: SGM7_3, A1: LC603456
							4-3: SGM7_4, A1: LC603457
							4-4: SGM7_5, A1: LC603458
4	Sagami R.	35°29'13.05", 139°22'22.10"	16	0.71 ± 0.14	2018.5.11	11	4-5: SGM7_6, A7: LC603459
							4-6: SGM7_7, A8: LC603460
							4-7: SGM7_8, A7: LC603461
							4-8: SGM7_9, C4: LC603462
							4-9: SGM7_10, A1: LC603463

							4-11: SGM7_11, A22: LC603464 4-12: SGM7_12, A1: LC730090
5	Sagami R.	35°31'50.30", 139°21'05.50"	41	0.38 ± 0.18	2018.5.17	10	5-1: SGM10_1, A1: LC603465 5-2: SGM10_2, A1: LC603466 5-3: SGM10_3, A1: LC603467 5-4: SGM10_4, A1: LC603468 5-5: SGM10_5, A1: LC603469 5-6: SGM10_6, C5: LC603470 5-7: SGM10_7, C1: LC603471 5-8: SGM10_8, A1: LC603472 5-9: SGM10_9, A1: LC603473 5-10: SGM10_10, A1: LC603474
6	Sagami R.	35°32'32.30", 139°19'41.70"	47	0.72 ± 0.16	2016.5.19	9	6-1: SGM5_1, A1: LC603475 6-2: SGM5_2, A1: LC603476 6-3: SGM5_3, A2: LC603477 6-4: SGM5_4, A1: LC603478 6-5: SGM5_5, A8: LC603479 6-6: SGM5_6, C5: LC603480 6-7: SGM5_7, A1: LC603481 6-8: SGM5_8, C1: LC603482 6-9: SGM5_11, A1: LC603483
7	Sagami R.	35°34'00.26", 139°18'57.32"	60	0.71 ± 0.14	2016.3.21	11	7-1: SGM6_1, A3: LC603484 7-2: SGM6_2, C2: LC603485 7-3: SGM6_3, A1: LC603486 7-4: SGM6_4, A2: LC603487 7-5: SGM6_5, A2: LC603488 7-6: SGM6_6, A1: LC603489 7-7: SGM6_7, C1: LC603490

							7-8: SGM6_8, A1: LC603491 7-9: SGM6_9, A1: LC603492 7-10: SGM6_10, A1: LC603493 7-11: SGM6_11, A1: LC730091
8	Sagami R. (Katsuragawa R.)	35°34'25.20", 138°54'59.17"	440	0.49 ± 0.18	2016.7.11 2020.5.3	10	8-1: KTR1_2, A1: LC603494 8-2: KTR1_12, A1: LC603495 8-3: KTR1_13, A1: LC603496 8-4: KTR1_22, A1: LC603497 8-5: KTR1_24, A1: LC603498 8-6: KTR1_25, A12: LC603499 8-7: KTR1_26, A1: LC603500 8-8: KTR1_27, A2: LC603501 8-9: KTR1_28, A1: LC603502 8-10: KTR1_5, A1: LC730092
9	Tamagawa R.	35°25'56.00", 139°19'23.50"	34	0.69 ± 0.15	2018.5.22 2020.5.2	9	9-1: STM1_1, A13: LC603503 9-2: STM1_2, A10: LC603504 9-3: STM1_3, A1: LC603505 9-4: STM1_4, A1: LC603506 9-5: STM1_5, C2: LC603507 9-6: STM1_7, A1: LC603508 9-7: STM1_8, A10: LC603509 9-8: STM1_9, A1: LC603510 9-9: STM1_10, A1: LC603511
10	Tamagawa R.	35°26'16.70", 139°15'09.60"	399	NA	2018.5.22	1	10-1: STM4_2, A4: LC603512
11	Koayu R.	35°27'08.70", 139°21'25.00"	24	0.64 ± 0.18	2018.5.21 2020.5.3	8	11-1: KOA1_1, A1: LC603513 11-2: KOA1_4, A1: LC603514 11-3: KOA1_5, A5: LC603515



							11-4: KOA1_6, A1: LC603516 11-5: KOA1_7, A1: LC603517 11-6: KOA1_8, A1: LC603518 11-7: KOA1_9, A23: LC603519 11-8: KOA2_2, C6: LC603520
12	Koayu R.	35°28'02.30", 139°19'26.3"	45	0.79 ± 0.15	2018.5.21 2018.6.7 2018.7.13 2020.5.3	8	12-1: KOA3_1, A1: LC603521 12-2: KOA3_2, †, J: LC730093 12-3: KOA3_6, A1: LC603522 12-4: KOA3_7, A1: LC603523 12-5: KOA3_8, A21: LC603524 12-6: KOA3_9, A1: LC603525 12-7: KOA9_3 (i)*, A1: LC603526 12-8 : KOA9_9 (i), C1: LC603527
13	Koayu R.	35°28'30.3", 139°17'08.0"	113	0.52 ± 0.21	2018.5.21 2018.7.2 2018.7.13 2018.8.3	7	13-1: KOA6_2, A25: LC603528 13-2: KOA6_3, †, L: LC603529 13-3: KOA10_13 (i), A1: LC603530 13-4 : KOA10_14 (i) A1: LC603531 13-5 : KOA10_20 (i), A1: LC603532 13-6: KOA10_24 (i), A1: LC603533 13-7: KOA10_25 (i), A1: LC603534
14	Nakatsu R.	35°28'09.9", 139°21'51.7"	27	0.76 ± 0.13	2015.5.28	10	14-1: NKT1-1, A1: LC603535 14-2: NKT1-2, A1: LC603536 14-3: NKT1-3, A1: LC603537 14-4: NKT1-4, A14: LC603538 14-5: NKT1-5, A1: LC603539 14-6: NKT1-6, †, K: LC603540 14-7: NKT1-7, A1: LC603541 14-8: NKT1-8, C1: LC603542

							14-9: NKT1-9, A5: LC603543
							14-10: NKT1-10, A5: LC603544
							15-1: NKT2-3, A1: LC603545
							15-2: NKT2-4, A1: LC603546
							15-3: NKT2-7, A1: LC603547
							15-4: NKT2-8, A1: LC603548
							15-5: NKT2-10, A1: LC603549
							15-6: NKT2-11, A1: LC603550
							15-7: NKT2-12, A10: LC603551
							15-8: NKT2-13, A5: LC603552
					2015.8.25		15-9: NKT2-14, A4: LC603553
15	Nakatsu R.	35°29'01.7", 139°21'25.8"	36	0.71 ± 0.11	2016.3.21	20	15-10: NKT2-15, A1: LC603554
					2016.5.19		15-11: NKT2-16, A2: LC730094
					2020.4.30		15-12: NKT2-17, A13: LC730095
							15-13: NKT2-18, A9: LC730096
							15-14: NKT2-19, A26: LC730097
							15-15: NKT2-20, A1: LC730098
							15-16: NKT2-21, A1: LC730099
							15-17: NKT2-22, A11: LC730100
							15-18: NKT2-23, A27: LC730101
							15-19: NKT2-24, A1: LC730102
							15-20: NKT2-25, A1: LC730103
							16-1: NKT3-1, A1: LC603555
							16-2: NKT3-2, A4: LC603556
16	Nakatsu R.	35°30'24.40", 139°19'48.90"	55	0.75 ± 0.10	2015.05.01	20	16-3: NKT3-3, A1: LC603557
					2015.5.28		16-4: NKT3-4, A3: LC603558
							16-5: NKT3-5, A2: LC603559
							16-6: NKT3-6, A28: LC603560

							16-7: NKT3-7, A15: LC603561 16-8: NKT3-8, A1: LC603562 16-9: NKT3-9, A29: LC603563 16-10: NKT3-10, A30: LC603564 16-11: NKT3-11, A1: LC730104 16-12: NKT3-12, A31: LC730105 16-13: NKT3-13, A1: LC730106 16-14: NKT3-14, A1: LC730107 16-15: NKT3-15, A32: LC730108 16-16: NKT3-16, A3: LC730109 16-17: NKT3-17, A1: LC730110 16-18: NKT3-18, A1: LC730111 16-19: NKT3-19, A1: LC730112 16-20: NKT3-20, A1: LC730113
17	Nakatsu R.	35°31'27.4", 139°17'07.3"	89	0.52 ± 0.18	2015.8.18	10	17-1: NKT5-1, A1: LC603565 17-2: NKT5-2, A1: LC603566 17-3: NKT5-3, A1: LC603567 17-4: NKT5-4 (i), A1: LC603568 17-5: NKT5-5 (i), A1: LC603569 17-6: NKT5- 6 (i), C7: LC603570 17-7: NKT5-7 (i), A3: LC603571 17-8: NKT5- 8 (i), A1: LC603572 17-9: NKT5-9 (i), A15: LC603573 17-10: NKT5-10 (i), A1: LC603574
18	Nakatsu R.	35°32'41.1", 139°16'11.9"	121	0.80 ± 0.09	2016.5.25 2016.5.25	12	12-1: NKT7-6, A1: LC603575 12-2: NKT7-7, C1: LC603576 12-3: NKT7-8, A1: LC603577 12-4: NKT7-9, A3: LC603578

							12-5: NKT7-11, A1: LC603579 12-6: NKT7-12, A2: LC603580 12-7: NKT7-13, A1: LC603581 12-8: NKT7-14, C3: LC603582 12-9: NKT7-15, A2: LC603583 12-10: NKT7-16, A1: LC730114 12-11: NKT7-17, C1: LC730115 12-12: NKT7-18, A3: LC730116
19	Mizusawa R.	35°31'51.5", 139°11'51.2"	342	NA	2018.5.31	1	19-1: MZS_20, A4: LC603584
20	Kushikawa R.	35°34'59.20", 139°17'51.02"	76	0.22 ± 0.17	2015.6.4	9	20-1: KSK1_A1: LC603585 20-2: KSK1_A1: LC603586 20-3: KSK1_1, A1: LC603587 20-4: KSK1_2, A1: LC603588 20-5: KSK1_3, A1: LC603589 20-6: KSK1_4, A1: LC603590 20-7: KSK1_5, A1: LC603591 20-8: KSK1_6, A9: LC603592 20-9: KSK1_7, A1: LC603593
21	Kushikawa R.	35°32'30.53", 139°13'5.82"	284	0.93 ± 0.07	2015.6.4 2018.5.31 2018.6.27 2020.5.27	11	21-1: KSK2_1, A1: LC603594 21-2: KSK2_2, A4: LC603595 21-3: KSK2_3, C1: LC603596 21-4: KSK2_4, A9: LC603597 21-5: KSK2_6, C3: LC603598 21-6: KSK2_7, A10: LC603599 21-7: KSK2_40 (si*), A2: LC603600 21-8: KSK2_45, C1: LC603601 21-9: KSK2_46, A1: LC603602

							21-10: KSK2_47 (i), A1: LC603603 21-11: KSK2_53, A33: LC730117
22	Akiyama R.	35°35'05.50", 139°07'49.90"	225	NA	2016.5.13	1	22-1: AKY1_7, A1: LC603604
23	Sasago R.	35°35'52.67", 138°53'19.61"	433	0.33 ± 0.22	2019.5.27	6	23-1: SSK_1, A1: LC603605 23-2: SSK_2, A1: LC603606 23-3: SSK_3, A1: LC603607 23-4: SSK_6, A5: LC603608 23-5: SSK_9, A1: LC603609 23-6: SSK_12, A1: LC603610
24	Sugeno R.	35°32'08.4", 138°54'34.5"	530	NA	2019.5.27	1	24-1: SGE_2, A1: LC603611
Overall						226	

Footnotes are the same as in Table 1-2. In addition, (i): imago, (si): subimago, other samples are nymphs; LC603445 and LC603446 are secondary accession numbers.

Table 4-2 Genetic diversities and Tajima's  $D$  for each river population of *Ecdyonurus yoshidae* in the Sagami River system based on mitochondrial DNA analysis.

	Sagami R.	Tamagawa R.	Koayu R.	Nakatsu R.	Kushikawa R.	Sasago R.
$n$	92	10	23	72	20	6
$h \pm SD$	$0.71 \pm 0.05$	$0.76 \pm 0.13$	$0.64 \pm 0.12$	$0.72 \pm 0.06$	$0.70 \pm 0.11$	$0.33 \pm 0.22$
$\pi \pm SD$	$0.0048 \pm 0.010$	$0.0057 \pm 0.0042$	$0.0052 \pm 0.0063$	$0.0047 \pm 0.0083$	$0.0065 \pm 0.0065$	$0.0005 \pm 0.0012$
$H'$	1.95	1.36	1.64	1.98	1.58	0.45
Tajima's $D(p)$	-1.2531 (0.073)	-1.8127 *	-1.4038 (0.051)	-1.6744 *	-0.9689 (0.137)	-0.9330 (0.224)

Footnotes are the same as in Tables 1-3 and 2-1.

Table 4-3 Genetic diversities and demographic parameters for haplogroups A and C of *Ecdyonurus yoshidae* in the Sagami River system based on mitochondrial DNA analysis.

Haplogroup	Sample size	Genetic diversity					$\pi \pm$ SD between haplogroups	Mismatch distribution	Neutrality test
		$H_r$	$H'$	$E$	$h \pm$ SD	$\pi \pm$ SD		Mean pairwise differences SSD ( $p$ ) $\tau$ (95% CI) time (95% CI) Ma	Tajima's $D(p)$
A	203	6.6	1.89	0.54	$0.63 \pm 0.04$	$0.0019 \pm 0.0250$	0.0196 $\pm$ 0.0757	1.2 0.0027 (0.236) 0.968 (0.53–1.42) 0.04 (0.03–0.07)	-2.3884 (***)
C	20	6.0	1.47	0.75	$0.69 \pm 0.11$	$0.0025 \pm 0.0123$		1.6 0.0183 (0.489) 2.82 (0.36–5.31) 0.14 (0.02–0.26)	-1.2271 (0.078)
Overall	223	NA	2.16	0.58	$0.70 \pm 0.03$	$0.0048 \pm 0.0150$	3.1 0.0175 (0.218) 1.48 (0.00–2.90) 0.07 (0.00–0.14)	-1.6519 (*)	

Footnotes are the same as in Tables 1-2 and 2-1.

Table 4-4 Analysis of molecular variance among six rivers of *Ecdyonurus yoshidae* in the Sagami River system based on mitochondrial DNA.

Source of variation	differentiation	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Fixation Indices ( $p$ )
Among groups	5	6.122	-0.03684 Va	-2.00	-0.02004 (0.90)
Among populations within groups	15	36.475	0.05748 Vb	3.13	0.03066 (0.15)
Within population	199	361.647	1.81732 Vc	98.88	0.01123 (0.21)
Total	219	404.245	1.83797	NA	NA



Table 4-5 Pairwise *Fst* values between sampling sites in the Sagami River system based on mitochondrial DNA.

Site	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1		-0.002	0.016	0.014	0.075	0.114	0.066	-0.018	0.027	0.538	0.042	0.110	-0.010	0.066	-0.041	-0.002	0.002	0.147	0.538	-0.005	0.128	-1.000	-0.019	-1.000	
2			-0.002	-0.018	0.025	0.054	0.029	-0.020	0.002	-0.117	0.001	0.037	-0.025	0.015	<b>0.029</b>	0.027	-0.019	<b>0.107</b>	-0.117	-0.005	0.090	-0.887	-0.030	-0.887	
3				-0.030	-0.042	-0.045	-0.044	-0.057	-0.036	-0.338	-0.033	-0.015	-0.032	-0.015	<b>0.051</b>	0.044	-0.051	0.017	-0.338	0.045	0.008	-0.861	0.001	-0.861	
4					-0.020	0.003	-0.008	-0.023	-0.023	-0.141	-0.034	0.001	-0.010	-0.017	<b>0.046</b>	0.033	-0.040	0.056	-0.141	0.016	0.036	-0.925	-0.023	-0.925	
5						-0.108	-0.092	-0.038	-0.053	-0.276	-0.069	-0.092	0.008	-0.082	0.122	0.090	-0.074	-0.059	-0.276	0.089	-0.075	-0.787	0.038	-0.787	
6							-0.099	-0.012	-0.038	-0.292	-0.057	-0.082	0.035	-0.063	<b>0.165</b>	0.129	-0.055	-0.081	-0.292	0.134	-0.086	-0.722	0.076	-0.722	
7								-0.028	-0.062	-0.330	-0.075	-0.073	-0.001	-0.062	<b>0.112</b>	0.069	-0.073	-0.074	-0.330	0.079	-0.069	-0.788	0.030	-0.788	
8									-0.044	-0.050	-0.040	-0.023	-0.056	-0.030	0.014	0.016	-0.072	0.049	-0.050	0.010	0.028	-0.938	-0.027	-0.938	
9										-0.278	-0.049	-0.038	-0.025	-0.044	0.045	0.047	-0.060	-0.001	-0.278	0.039	-0.031	-0.917	-0.009	-0.917	
10											-0.286	-0.300	0.167	-0.240	0.132	0.096	-0.226	-0.291	0.000	0.800	-0.393	1.000	0.714	1.000	
11												-0.067	-0.029	-0.077	0.067	0.003	-0.093	-0.035	-0.286	0.049	-0.023	-0.929	-0.021	-0.929	
12													0.012	-0.081	<b>0.150</b>	<b>0.115</b>	-0.056	-0.045	-0.300	<b>0.115</b>	-0.064	-0.796	0.055	-0.796	
13														-0.007	-0.016	-0.021	-0.052	0.072	0.167	0.027	0.059	-1.000	-0.016	-1.000	
14															<b>0.094</b>	0.073	-0.065	-0.018	-0.240	0.068	-0.038	-0.831	-0.006	-0.831	
15																0.008	0.033	<b>0.203</b>	0.132	-0.043	<b>0.184</b>	-0.985	-0.069	-0.985	
16																	-0.013	<b>0.150</b>	0.096	-0.009	<b>0.157</b>	-0.921	-0.033	-0.921	
17																		-0.016	-0.226	0.014	-0.016	-0.948	-0.028	-0.948	
18																			-0.291	0.154	-0.069	-0.607	0.103	-0.607	
19																				0.800	-0.393	1.000	0.714	1.000	
20																						0.130	-1.000	0.012	-1.000
21																							-0.671	0.081	-0.671
22																								-1.000	0.000
23																									-1.000
24																									

Bold figures indicate significant *Fst* values, but after the Bonferroni correction, all values are insignificant.



Fig. 1-1 Habitat at Lake Biwa



Fig. 1-2 Habitat at the Sagami River



Fig. 1-3 Nymph of *Ecdyonurus yoshidae*

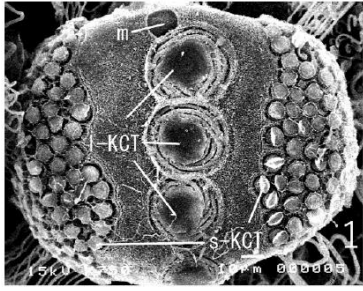


Fig. 1-4 Male subimago of *Ecdyonurus yoshidae*



Fig. 1-5 Female imago of *Ecdyonurus yoshidae*

A



B

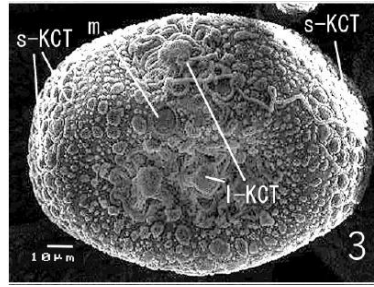


Fig. 1-6 Eggs of *Ecdyonurus yoshidae*. A: the Sagami River, B: Lake Biwa.  
Cited from Ishiwata & Fujitani (2018).

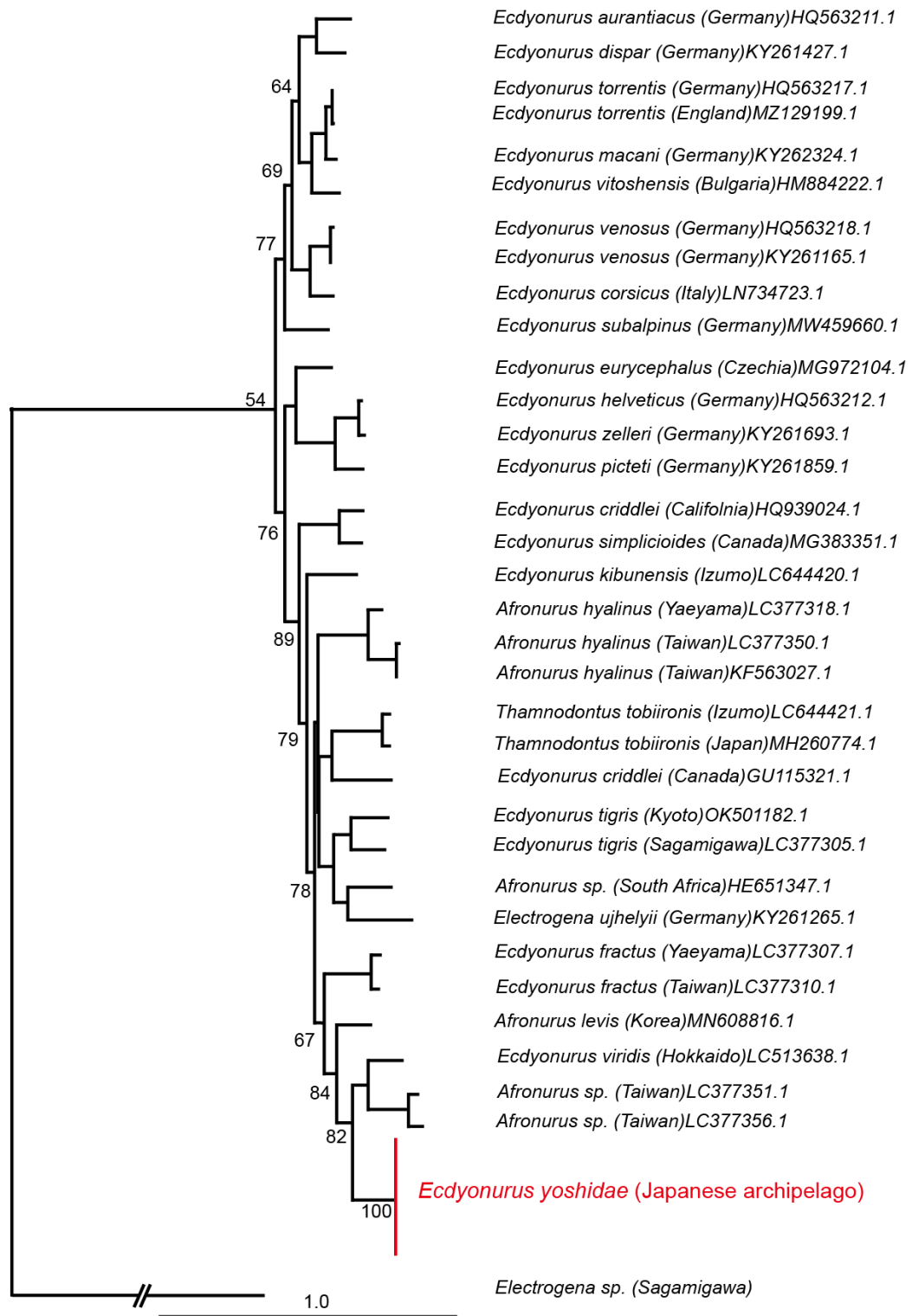


Fig. 1-7 Maximum likelihood phylogenetic tree based on the *COI* for the genera *Ecdyonurus*, *Afronurus*, *Thamnodontus*, and *Electrogena*.

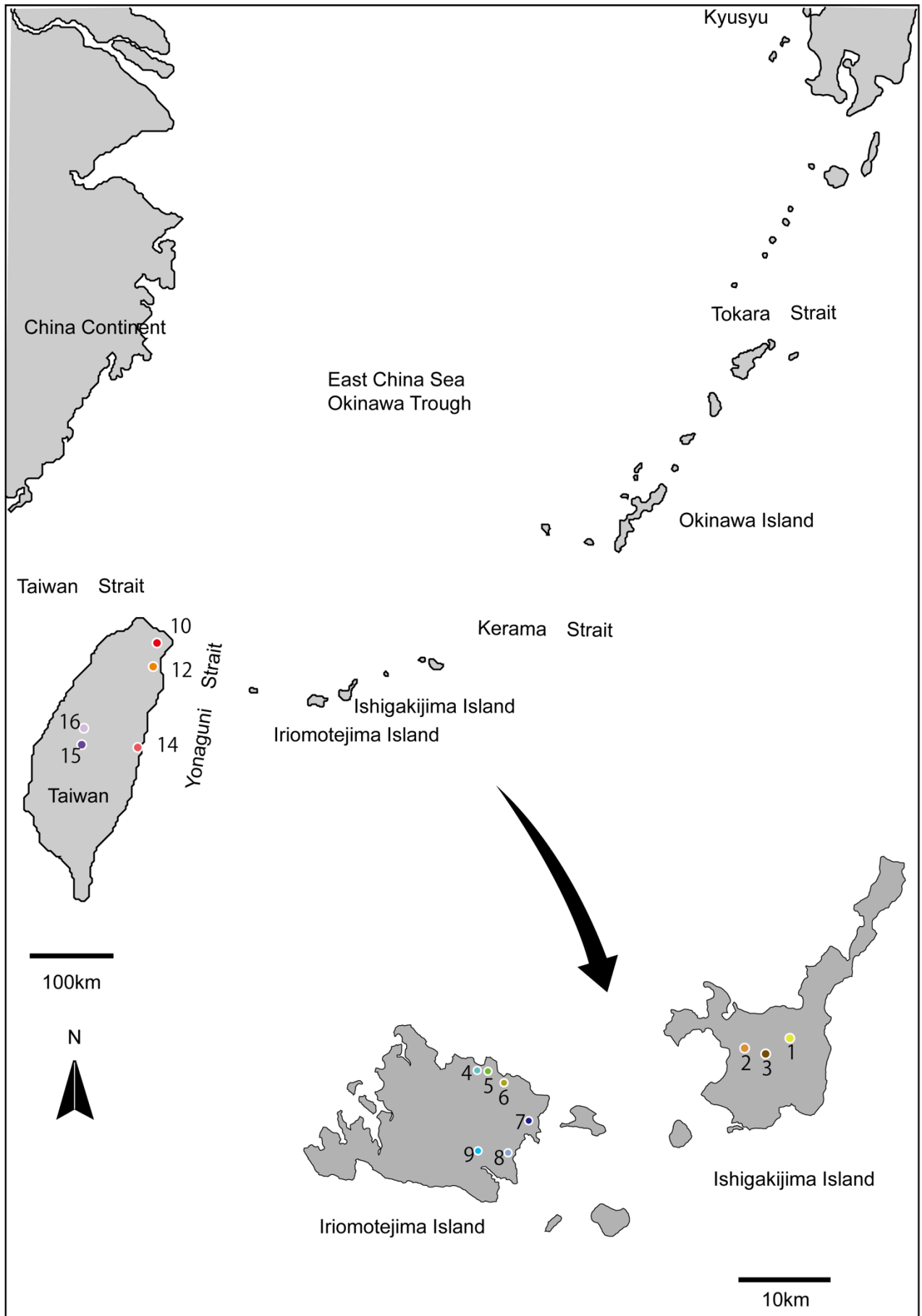


Fig. 2-1 Map of *Ecdyonurus hyalinus* sampling sites in the Yeyama Islands and Taiwan. Dots and numbers indicate sampling site locations and codes, respectively.

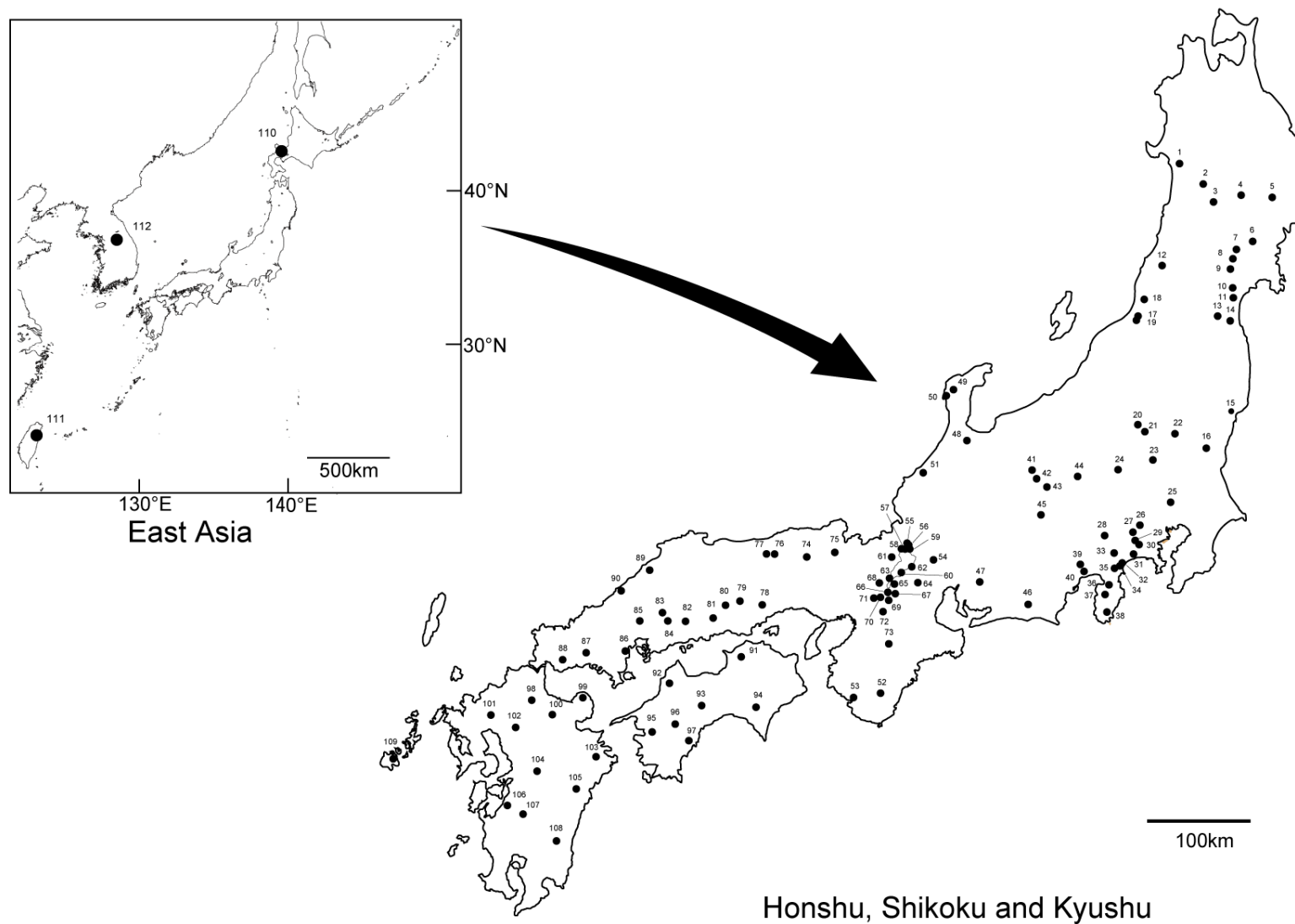


Fig. 2-2 Map of the genera *Ecdyonurus* sampling sites. Dots and numbers indicate sampling site locations and codes, respectively. *Ecdyonurus yoshidae*, *Ecdyonurus viridis*, *Ecdyonurus hyalinus*, and *Ecdyonurus levis* specimens were collected from sites 1-109, 110, 111, and 112, respectively.



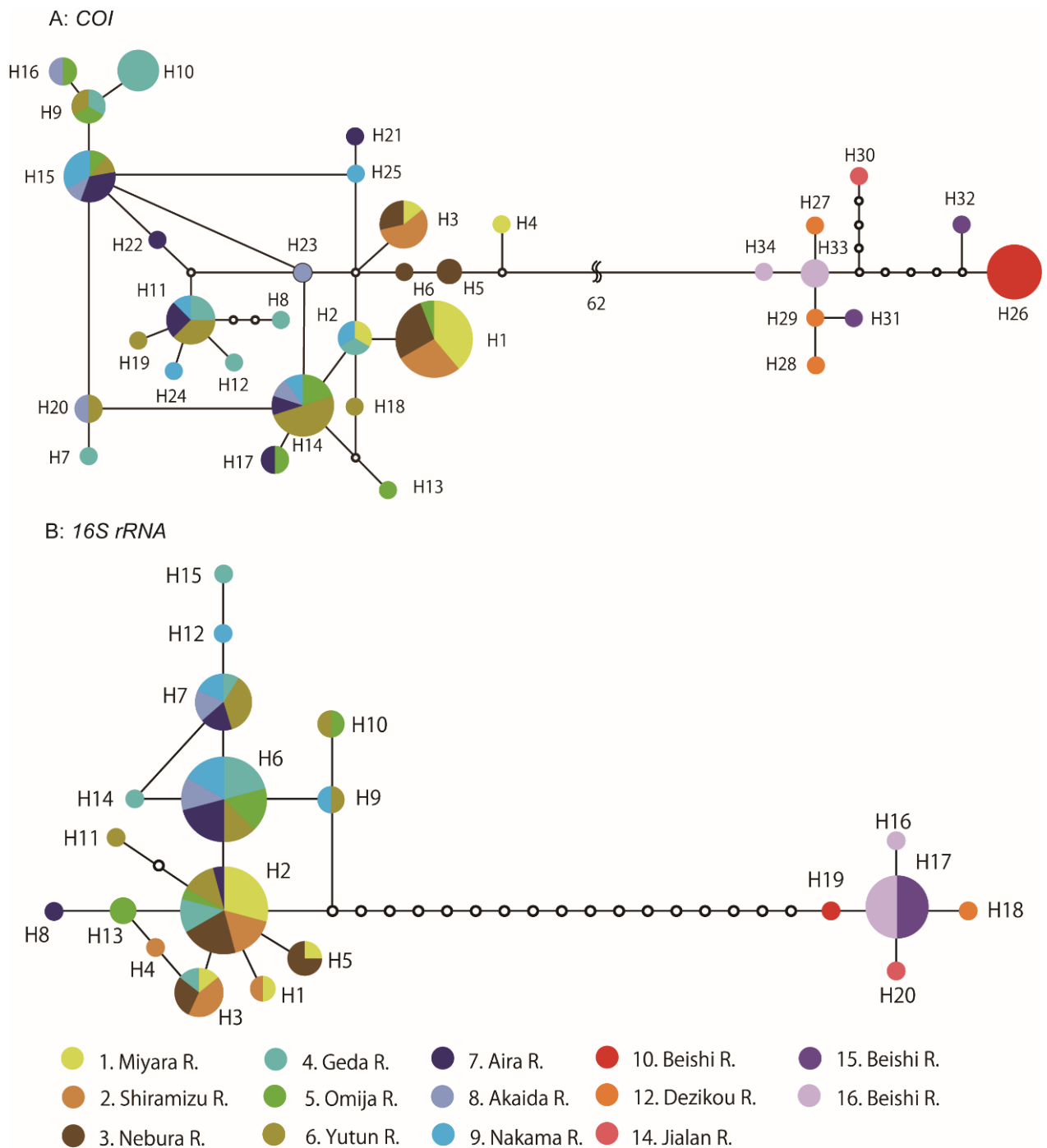


Fig. 2-3 Haplotype network diagram from *Ecdyonurus hyalinus*. Circle diameter is proportional to sample size, lines represent one base substitution, and open circles represent missing (extinct or unobserved) haplotypes. Colors and numbers are according to Fig. 2-1. The sample size and detected sampling site of each haplotype are shown in Table 1-1.

A: *COI* sequences, B: *16S rRNA* sequences.

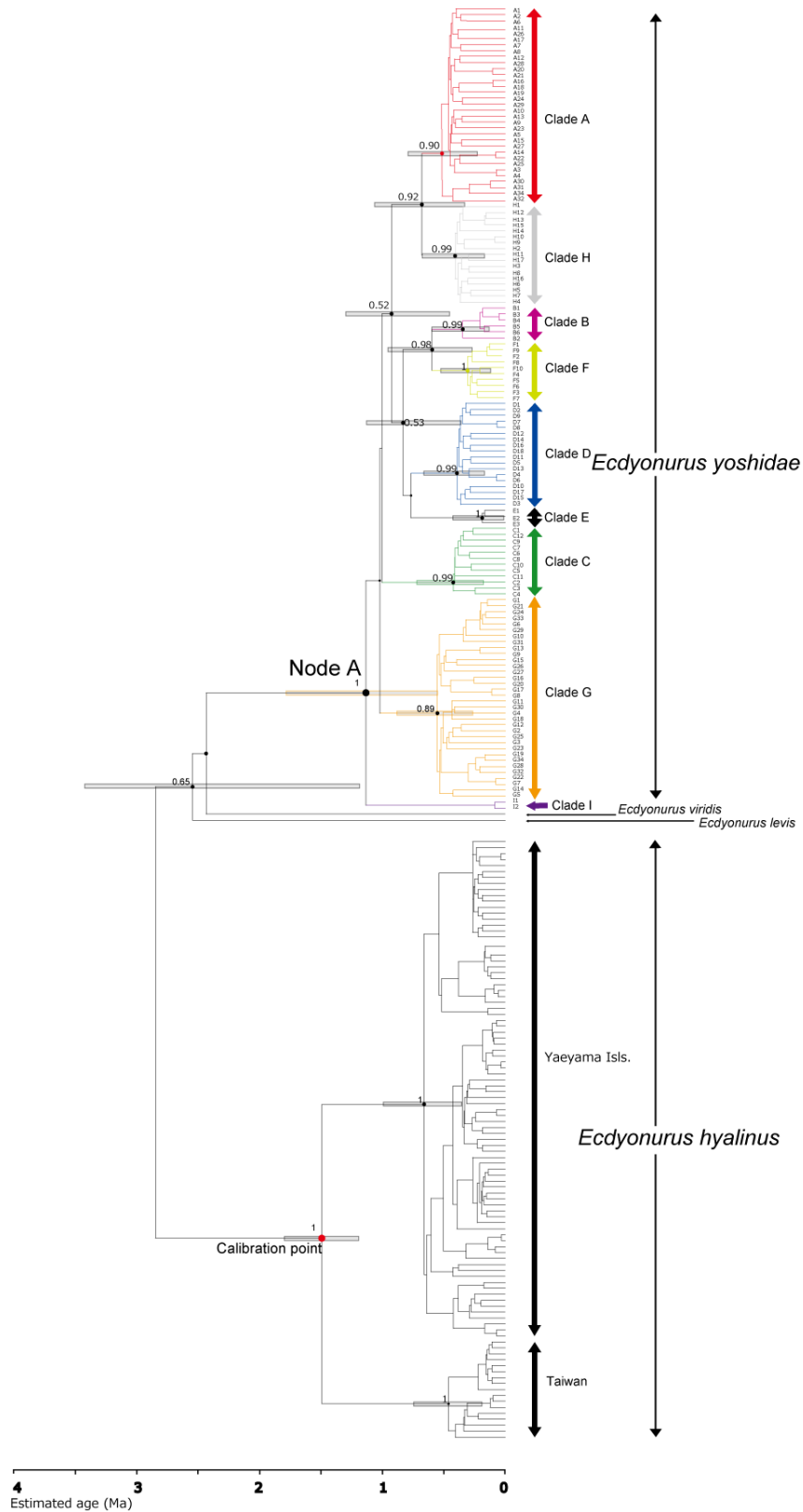


Fig. 2-4 Bayesian phylogenetic tree of concatenated *COI* and *16S rRNA* sequences from closely related congeners *Ecdyonurus yoshidae*, *Ecdyonurus hyalinus*, *Ecdyonurus viridis*, *Ecdyonurus levis*. The red dot indicates the calibration point. Node A indicates the divergence point between Clade I and the other clades. Only posterior probabilities of >50 and main nodes are shown. Node bars indicate 95% highest posterior density interval (HPDI) of the node age.



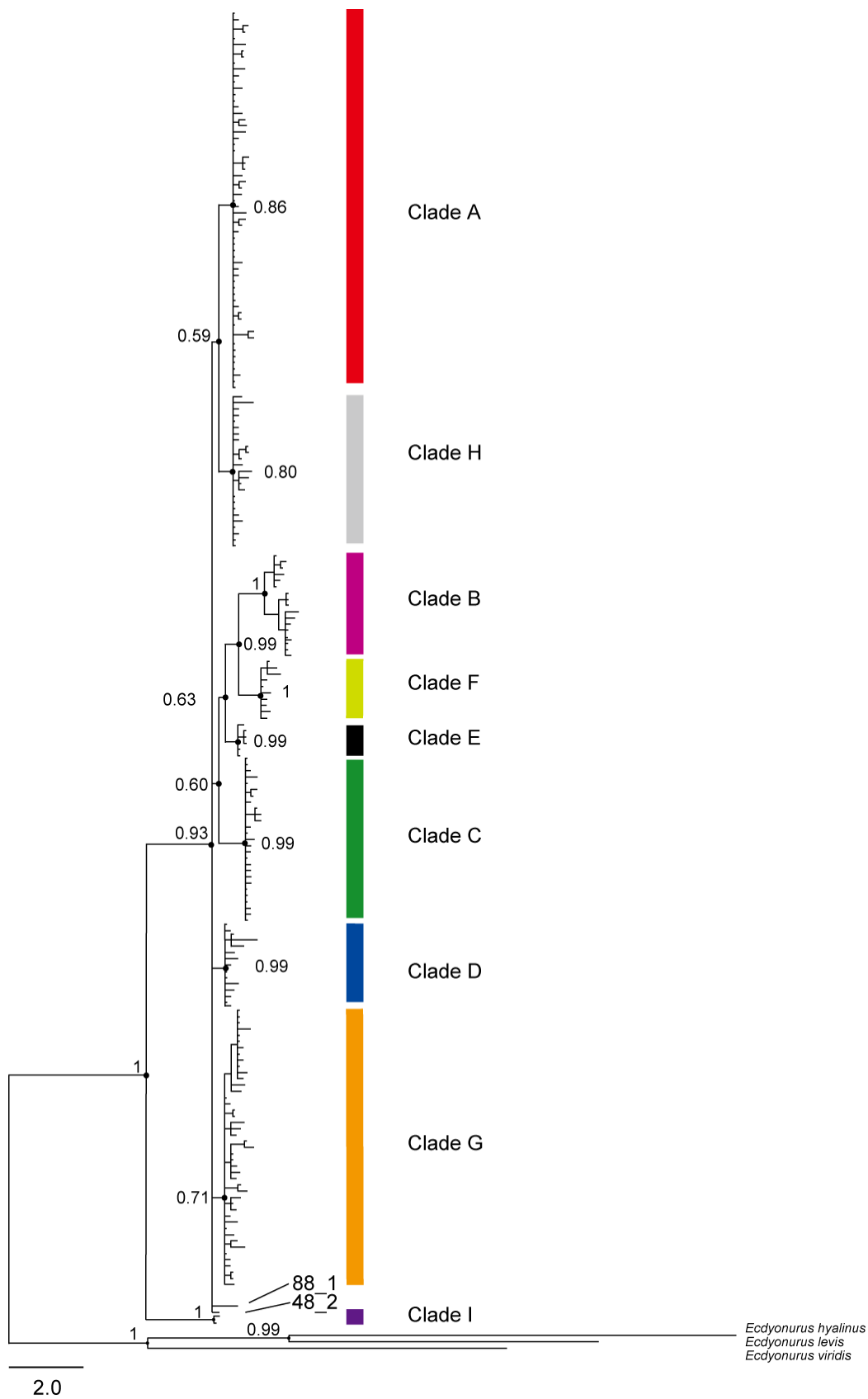


Fig. 3-1 Bayesian phylogenetic tree of concatenated *COI* and *16S rRNA* sequences from *Ecdyonurus yoshidae* collected in the Japanese archipelago. Three closely related congeners *Ecdyonurus hyalinus*, *Ecdyonurus viridis*, *Ecdyonurus levis* were included as outgroup taxa, and the specimens included in each clade are listed in Table 1-2. Node values indicate posterior probabilities.

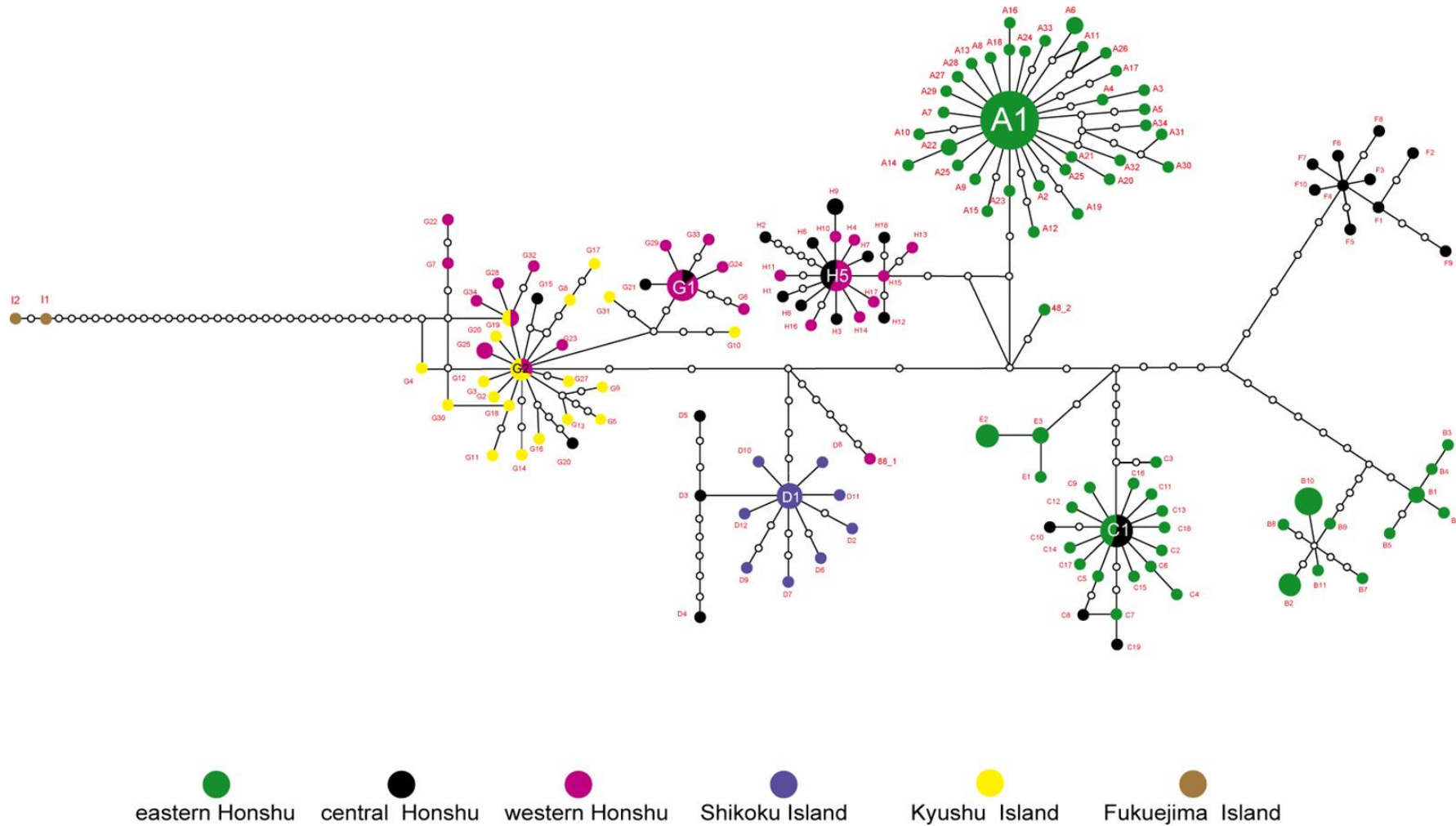


Fig. 3-2 Haplotype network diagram of concatenated *COI* and *16S rRNA* sequences from *Ecdyonurus yoshidae*. Circle diameter is proportional to sample size, lines represent one base substitution, and open circles represent missing haplotypes. The first letter of each haplogroup label indicates the clade to which it belongs. The sample size and detected sampling site of each haplotype are shown in Table 1-2.

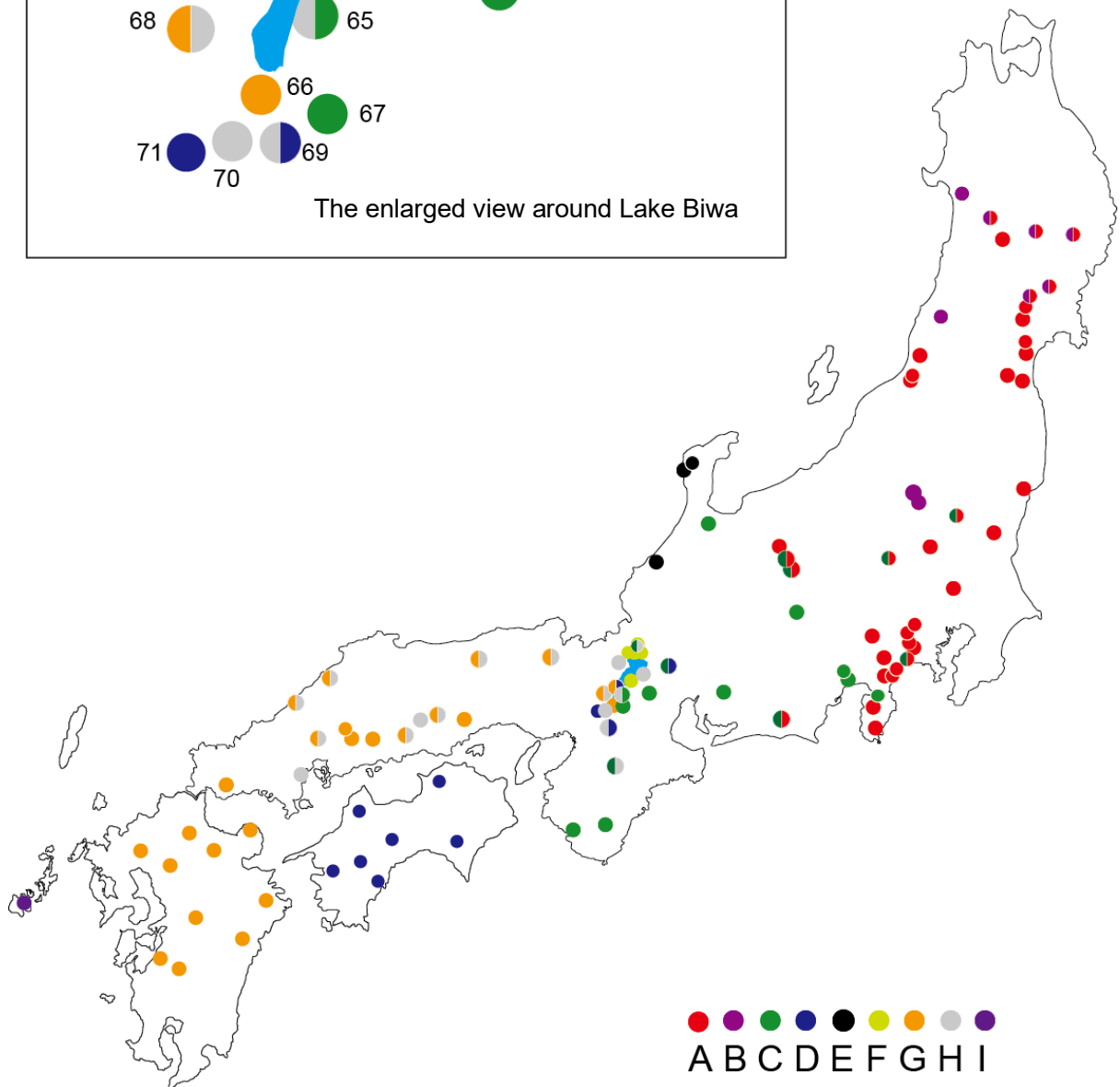
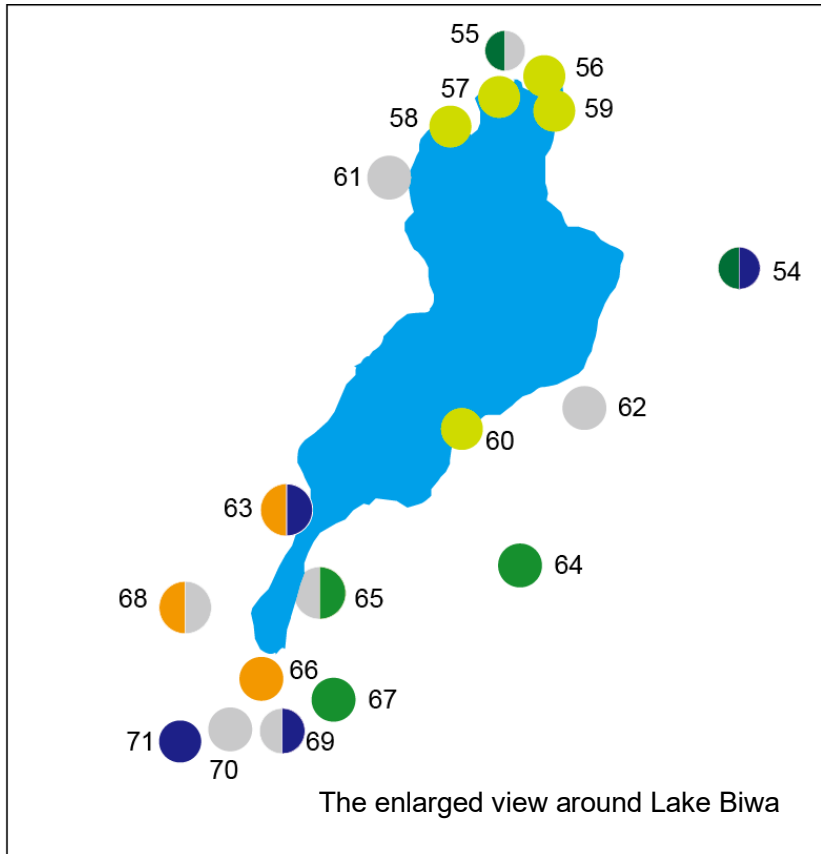


Fig. 3-3 Distribution of haplogroups from *Ecdyonurus yoshidae* specimens collected in the Japanese archipelago. Dots of two colors represent sampling sites that yielded specimens from different haplogroups.

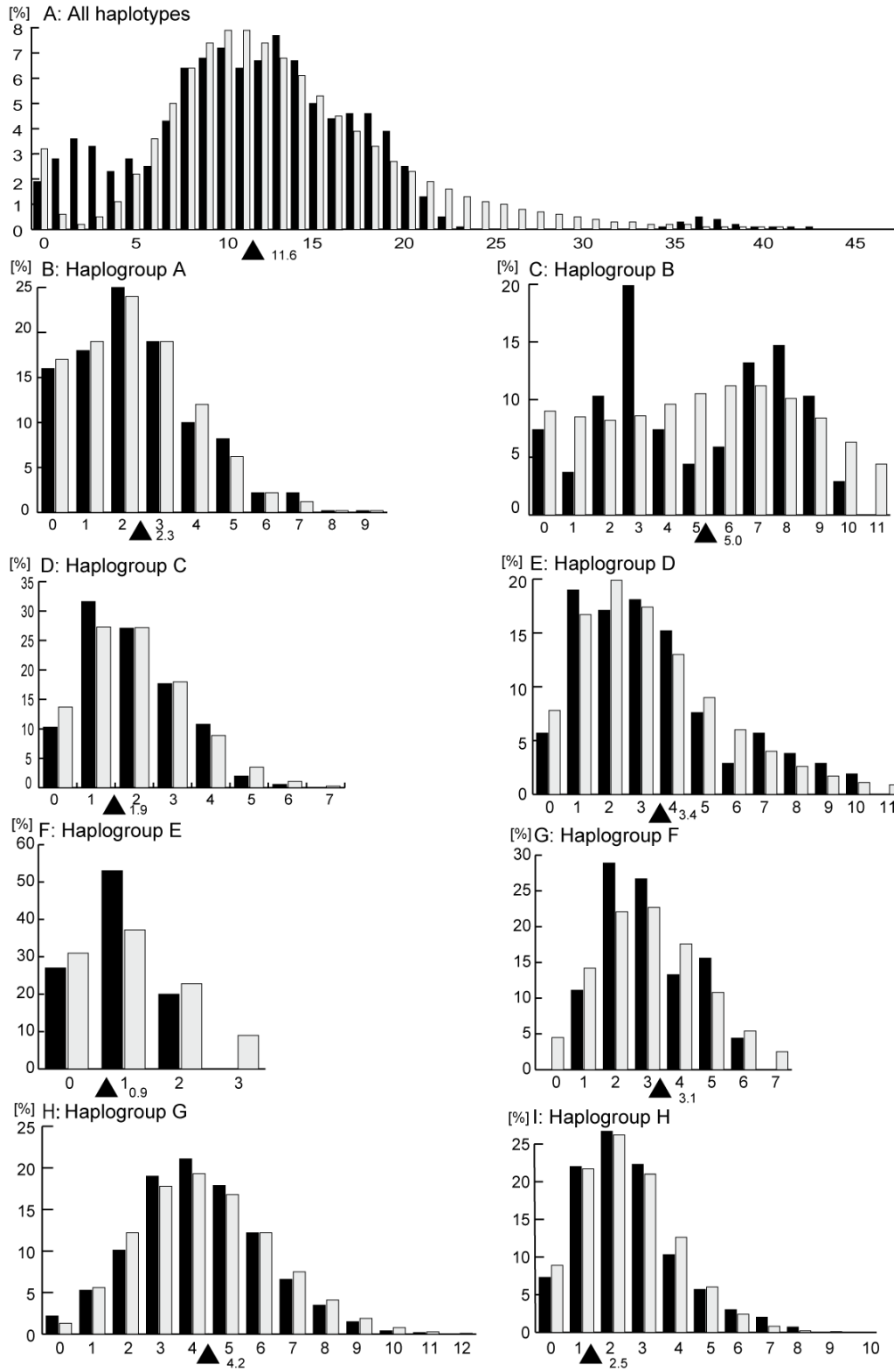


Fig. 3-4 Mismatch distribution of pairwise nucleotide differences of concatenated *COI* and *16S rRNA* sequences from *Ecdyonurus yoshidae* collected in the Japanese archipelago. The *x*- and *y*-axes indicate pairwise differences and the corresponding relative frequencies (%) of pairwise differences between compared haplotypes. The black bars indicate the observed, and the gray bars indicate the expected frequency distribution under the sudden expansion model. Triangles and values indicate mean pairwise differences. A: All haplotypes, B: Haplogroup A, C: Haplogroup B, D: Haplogroup C, E: Haplogroup D, F: Haplogroup E, G: Haplogroup F, H: Haplogroup G, I: Haplogroup H.

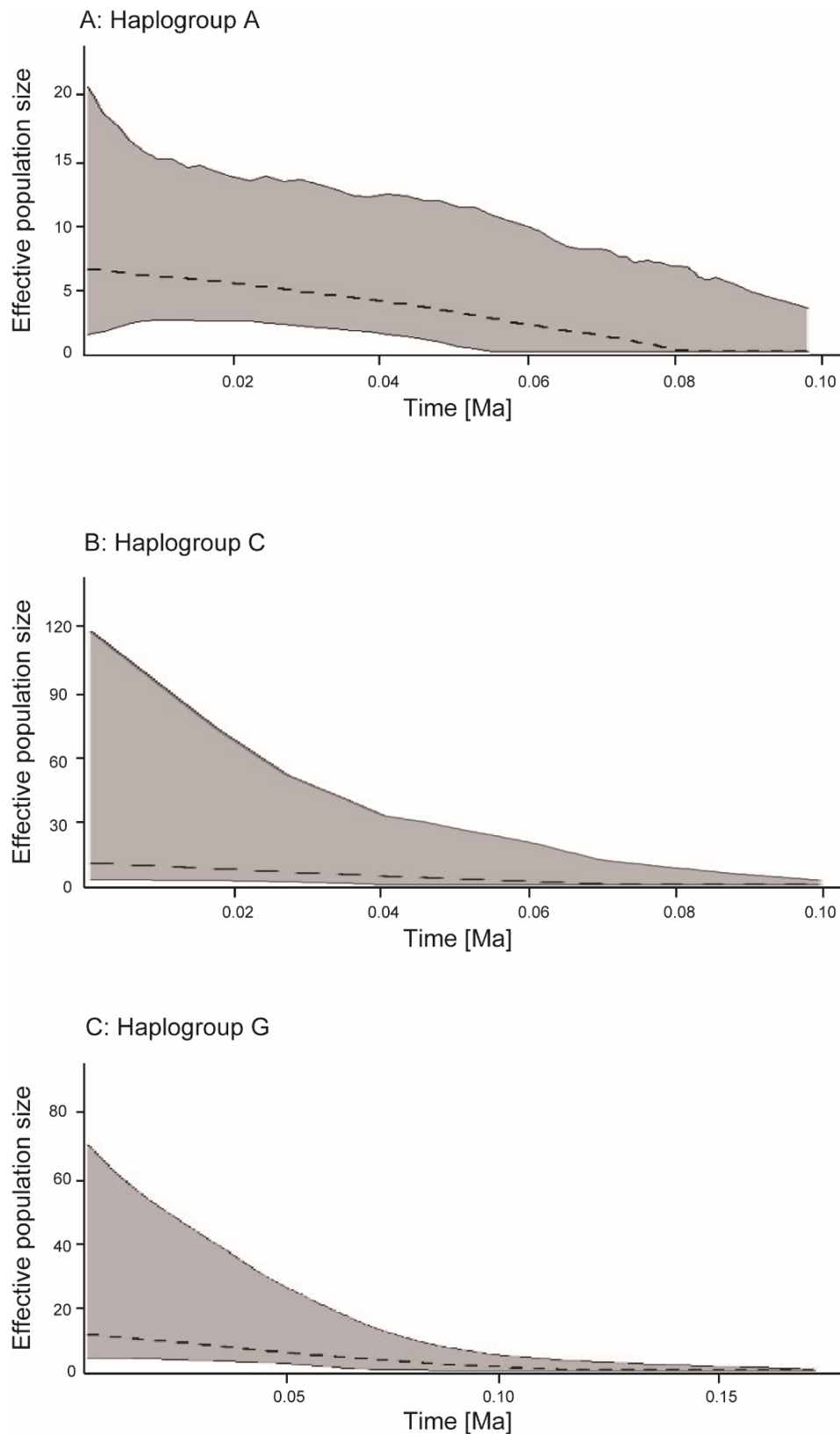


Fig. 3-5 Extended Bayesian Skyline Plots of concatenated *COI* and *16S rRNA* sequences from *Ecdyonurus yoshidae* collected in the Japanese archipelago. The x and y axes indicate the time (Ma: million years) and the effective population size. The middle-dotted lines are median estimates; upper and lower limits (95% highest posterior density interval) are also given.

A: All haplotypes, B: Haplogroup C, C: Haplogroup G.

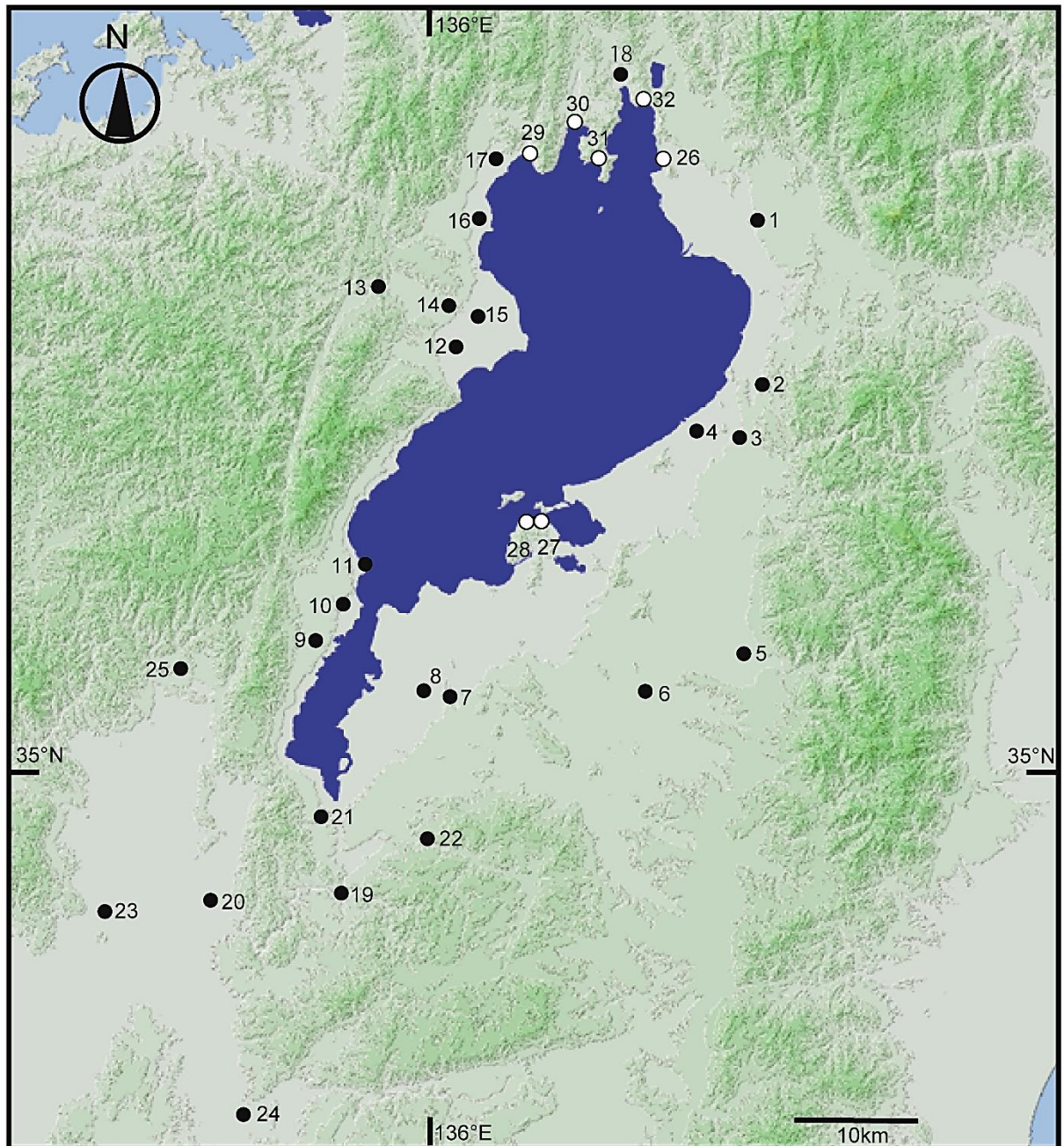


Fig. 4-1 Map of *Ecdyonurus yoshidae* sampling sites in the Yodogawa River system. Black and white dots indicate the sampling sites in the rivers and Lake Biwa. Numbers indicate the sampling site codes.

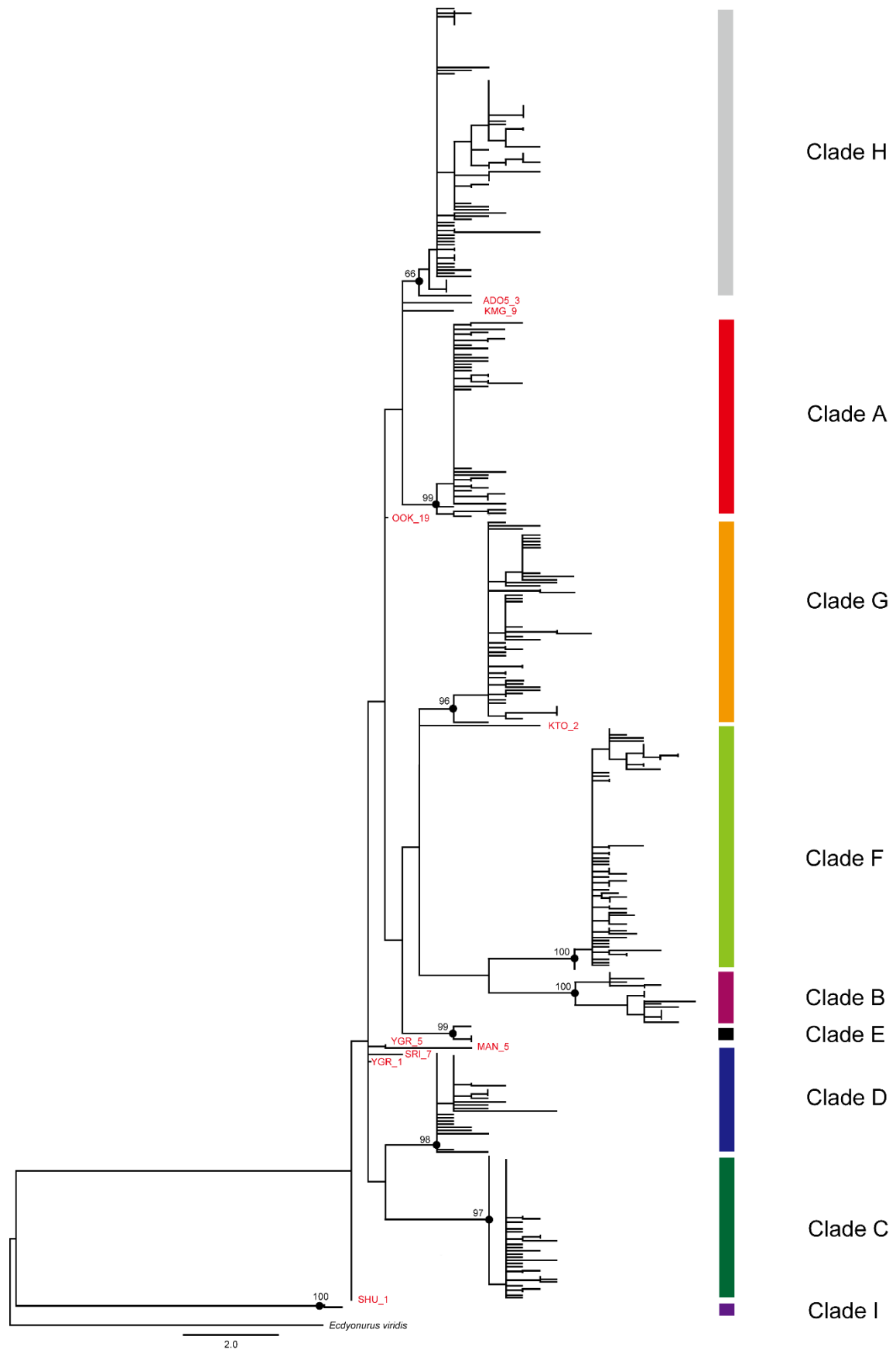


Fig. 4-2 Maximum likelihood phylogenetic tree of concatenated *COI* and *16S rRNA* sequences from 218 *Ecdyonurus yoshidae* specimens in the Yodogawa River system and 175 specimens from other river systems. A closely related congener, *Ecdyonurus viridis* was included as an outgroup. The specimens are listed in Tables 1-2 and 3-1. The values indicate the probabilities of the nodes.



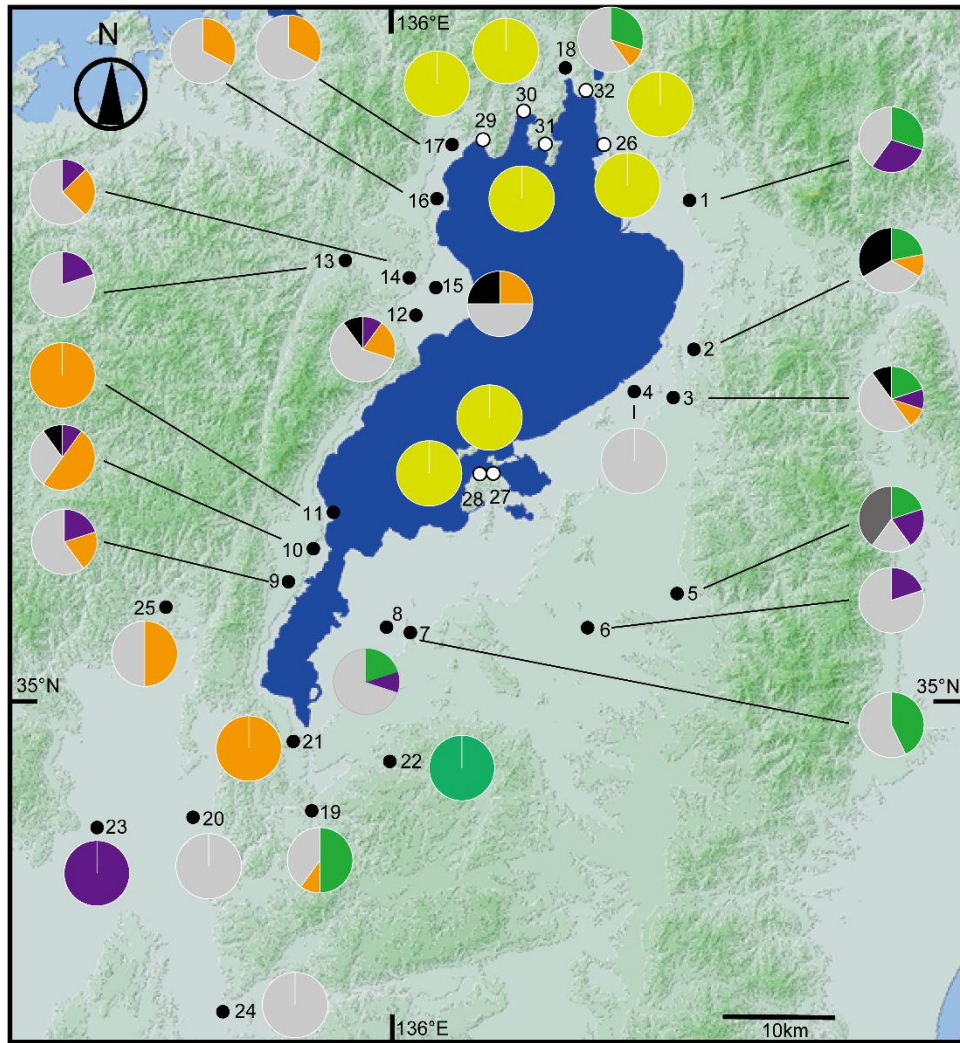


Fig. 4-3 Map of *Ecdyonurus yoshidae* sampling sites in the Yodogawa River system. White and black dots indicate sampling site locations of Lake Biwa and rivers. Numbers indicate sampling site codes. Colors are according to Fig. 3-3.



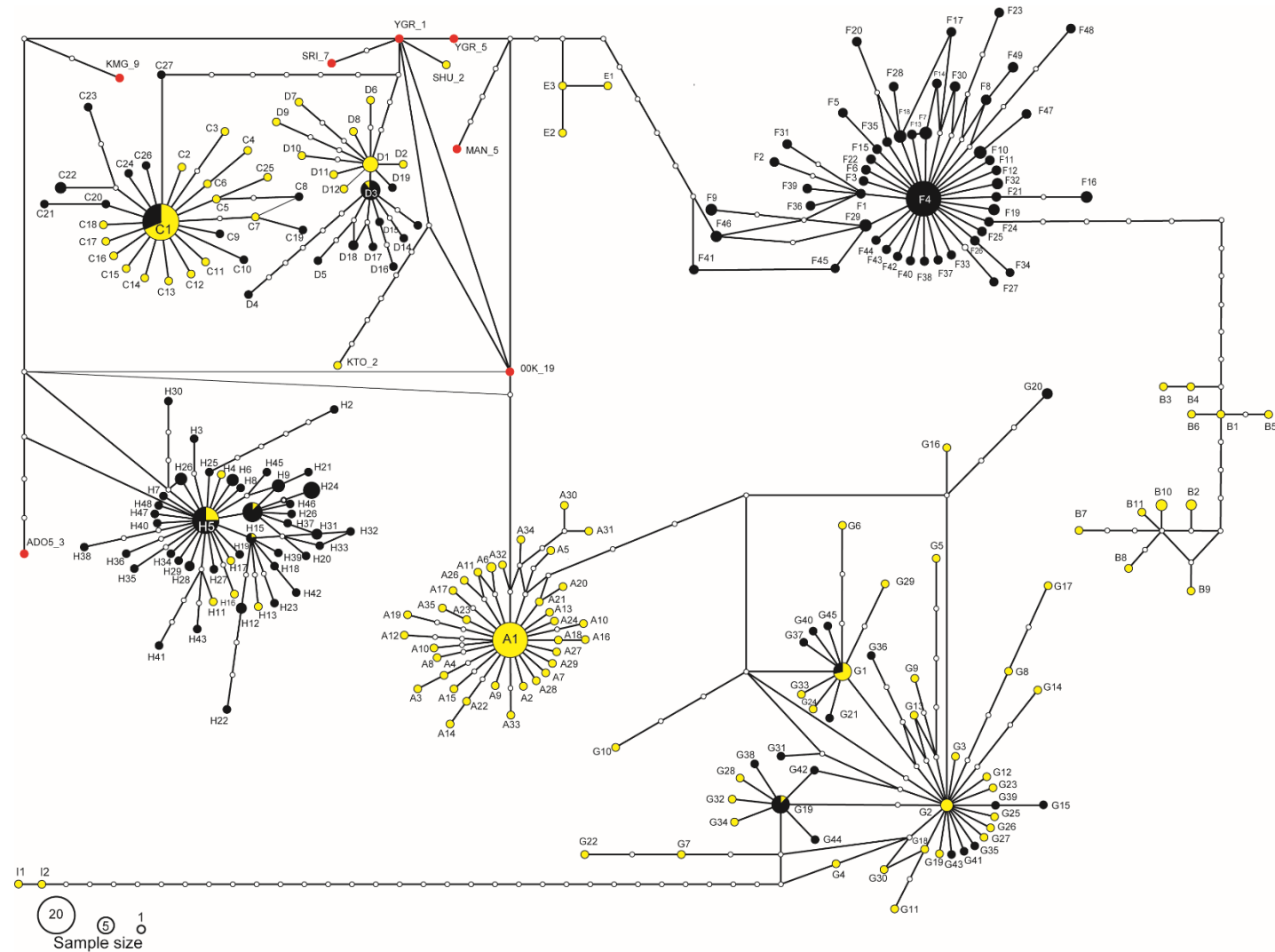


Fig. 4-4 Haplotype network diagram of concatenated *COI* and *16S rRNA* sequences in 393 samples from *Ecdyonurus yoshidae* in the Japanese archipelago. Black and yellow circles indicate the haplotypes of the Yodogawa River and other river systems. Circle diameter is proportional to sample size, lines represent one base substitution, and open circles represent missing haplotypes. The first letter of each haplotype label indicates the clade to which it belongs. The sample size and detected sampling site of each haplotype are shown in Tables 1-2 and 3-1.

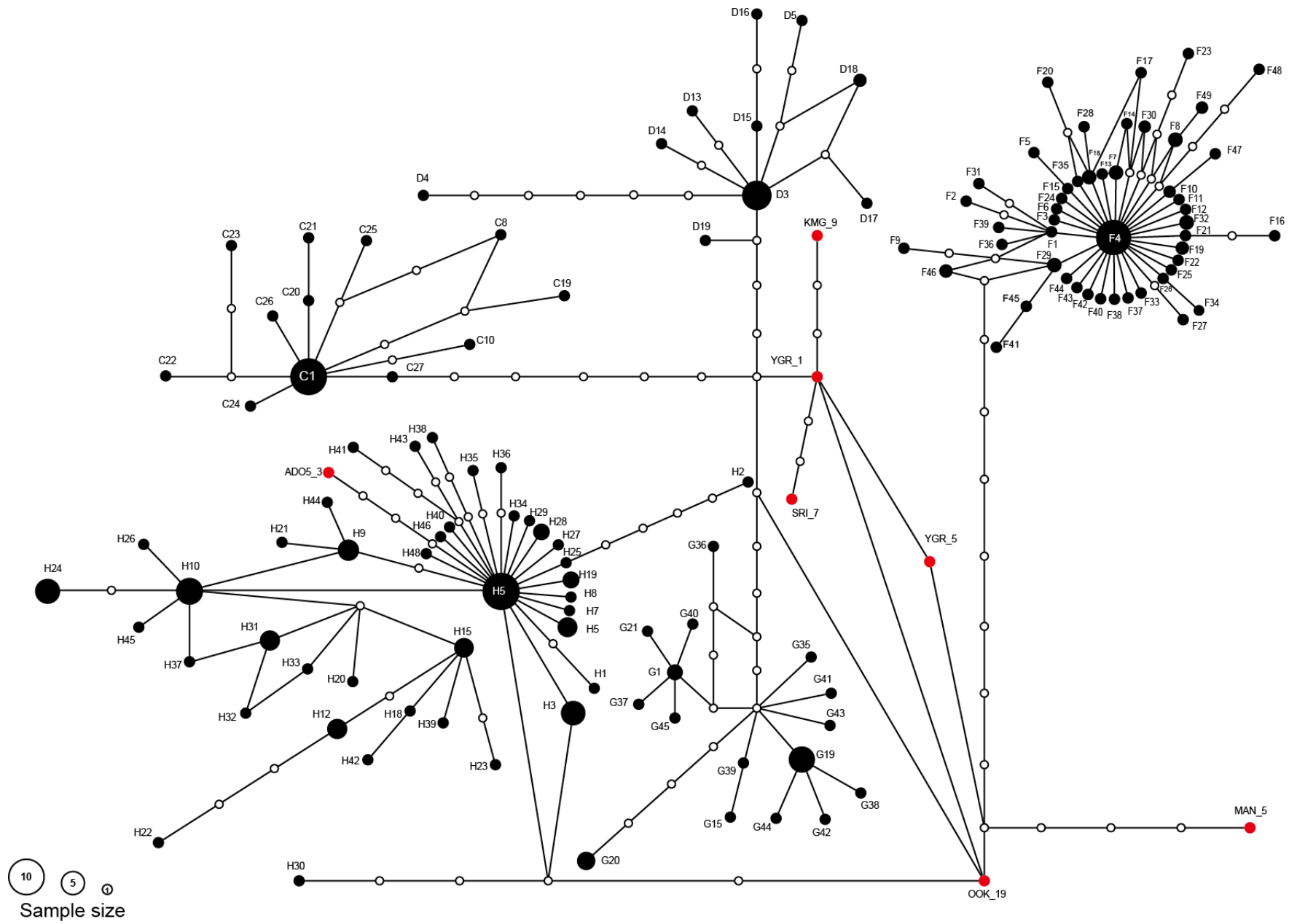


Fig. 4-5 Haplotype network diagram of concatenated *COI* and *16S rRNA* sequences in 218 samples from *Ecdyonurus yoshidae* in the Yodogawa River system. Other figure legends are the same as Fig. 4-4.

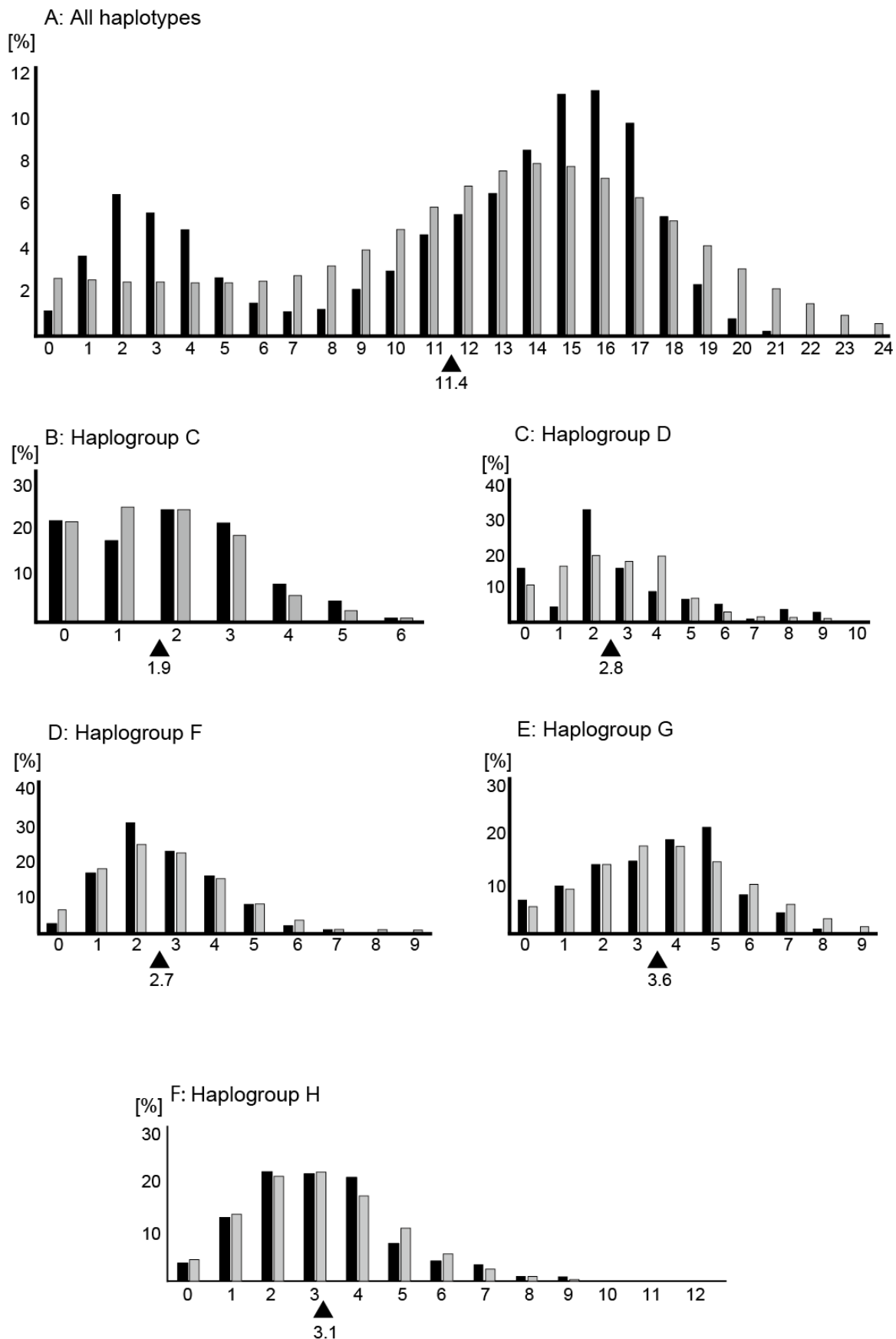


Fig. 4-6 Mismatch distribution of pairwise nucleotide differences of concatenated *COI* and *16S rRNA* sequences from *Ecdyonurus yoshidae* collected in the Yodogawa River system. Figure legends are the same as Fig. 3-4. A: All haplotypes, B: Haplogroup C, C: Haplogroup D, D: Haplogroup F, E: Haplogroup G, F: Haplogroup H.

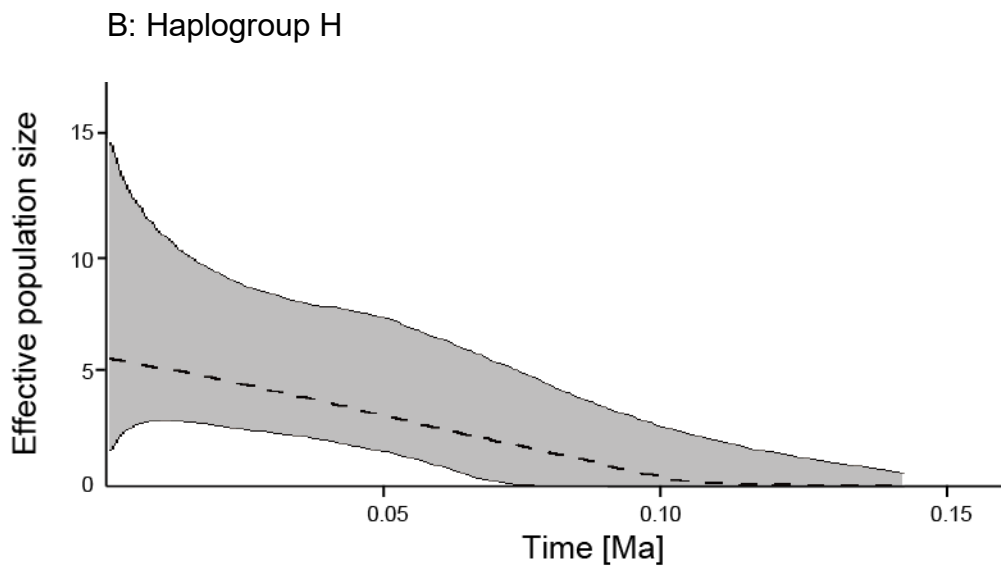
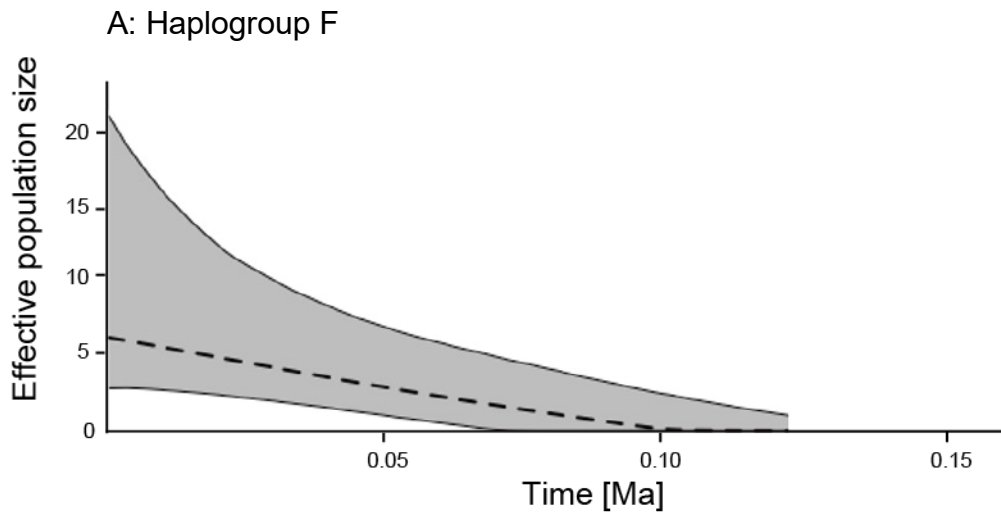


Fig. 4-7 Extended Bayesian Skyline Plots of *Ecdyonurus yoshidae* collected in the Yodogawa River system. Figure legends are the same as Fig. 3-5.

A: Haplogroup F, B: Haplogroup H.

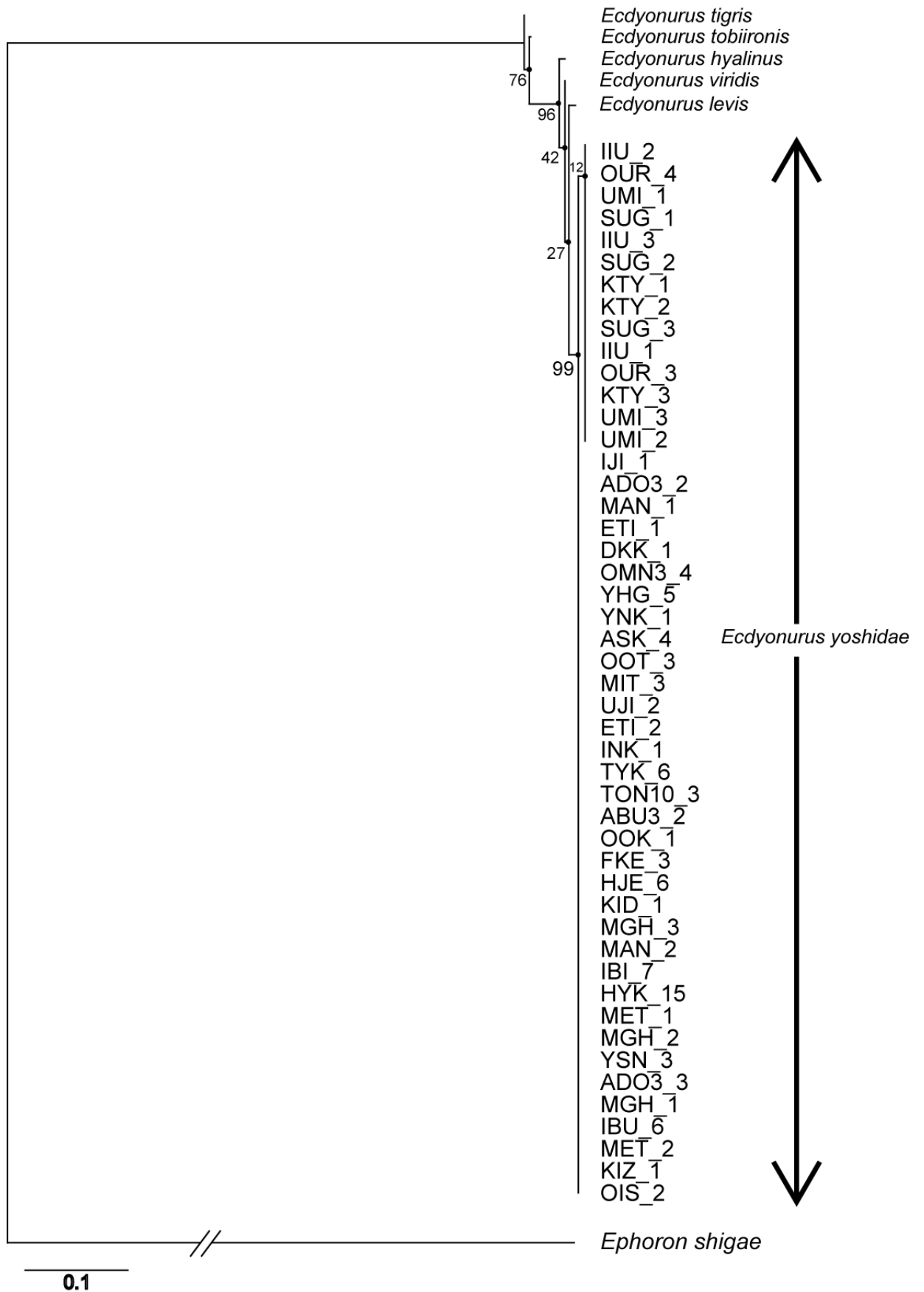


Fig. 4-8 Maximum likelihood phylogenetic tree based on *28S rRNA* sequences of congeners *Ecdyonurus tigris*, *Ecdyonurus tobiironis*, *Ecdyonurus hyalinus*, *Ecdyonurus viridis*, *Ecdyonurus levis*, *Ecdyonurus yoshidae*. The specimens are listed in Table 3-3. Node values indicate posterior probabilities.

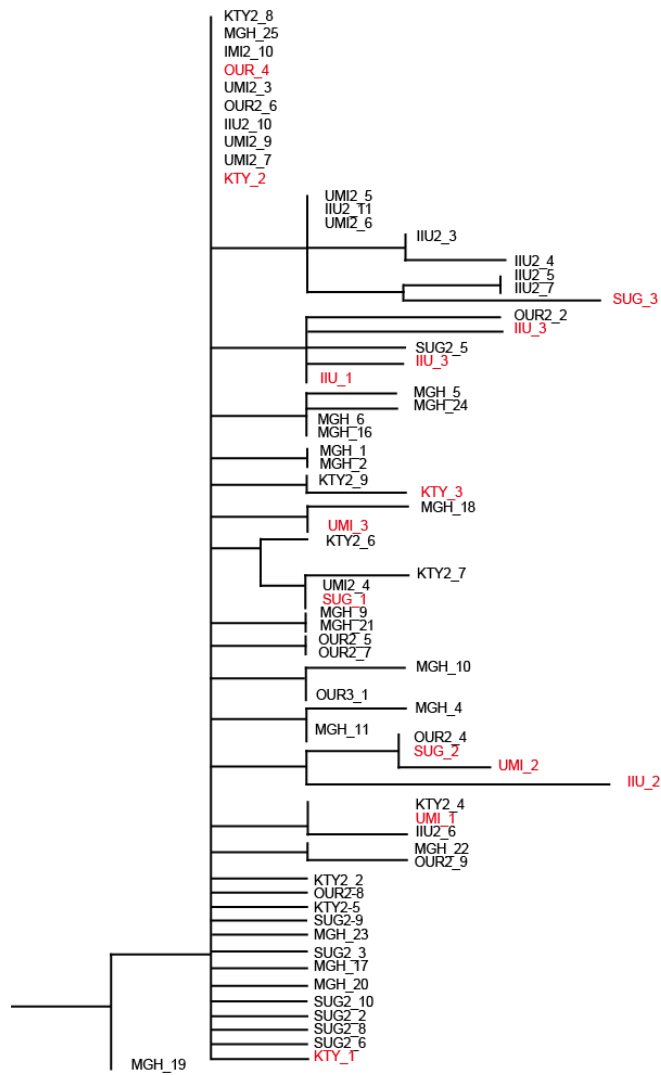


Fig. 4-9 Enlarged view of the parts of clade F in Fig. 4-2. Abbreviations colored in red show the mitochondrial genes with thymine at 85th on the 28S rRNA nuclear gene sequences.

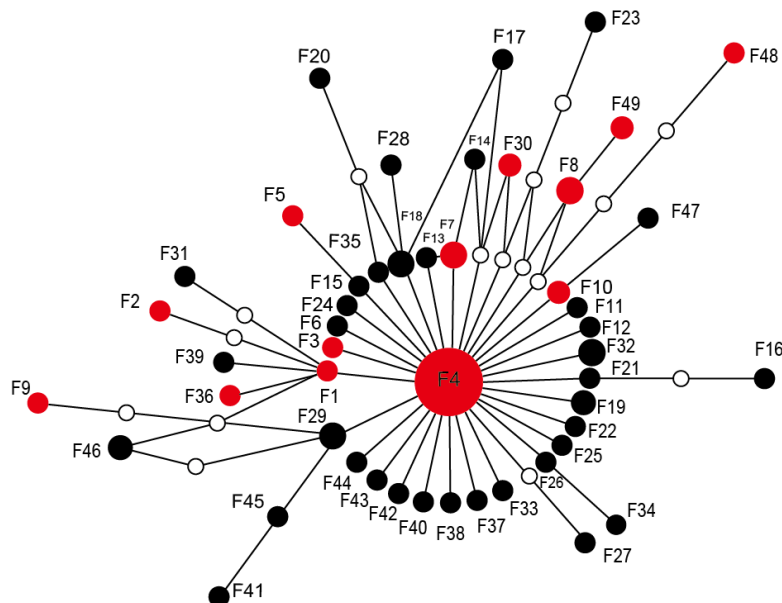


Fig. 4-10 Enlarged view of parts of haplogroup F in Fig. 4-4. Circles colored in red show the haplotypes with thymine at 85th on the 28S rRNA nuclear gene sequences.

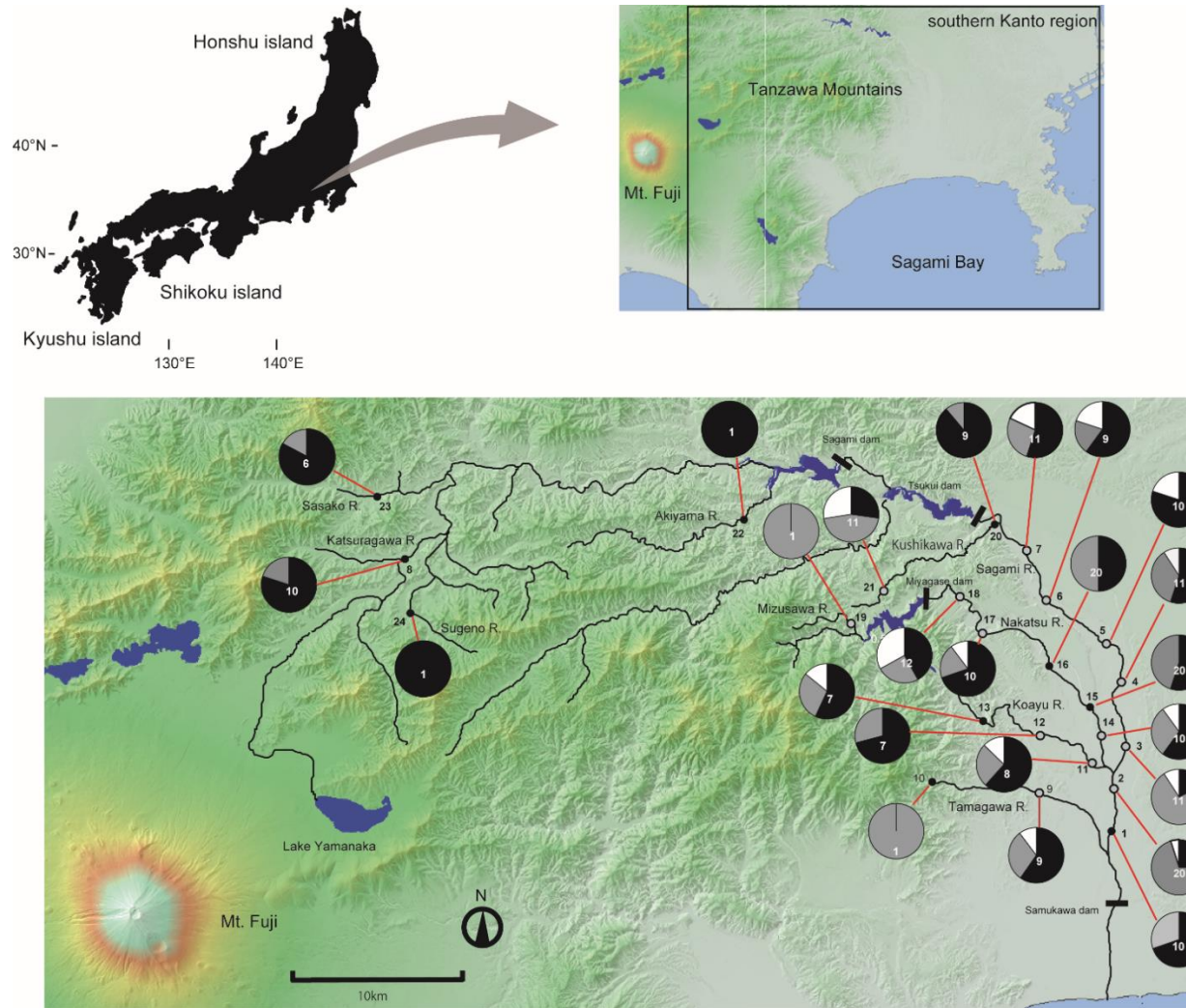


Fig. 5-1 Map of Japan, with enlargements showing the location of the southern Kanto Region, and sampling sites and genetic structures of *Ecdyonurus yoshidae* in the Sagami River system. Dominant haplotype A1 is colored in black, the others in haplogroup A are in gray, and haplogroup C is colored in white in the pie charts. The numbers in the pie chart are the sample size. Black and white dots indicate sampling sites detected haplogroup A, and haplogroups A and C.

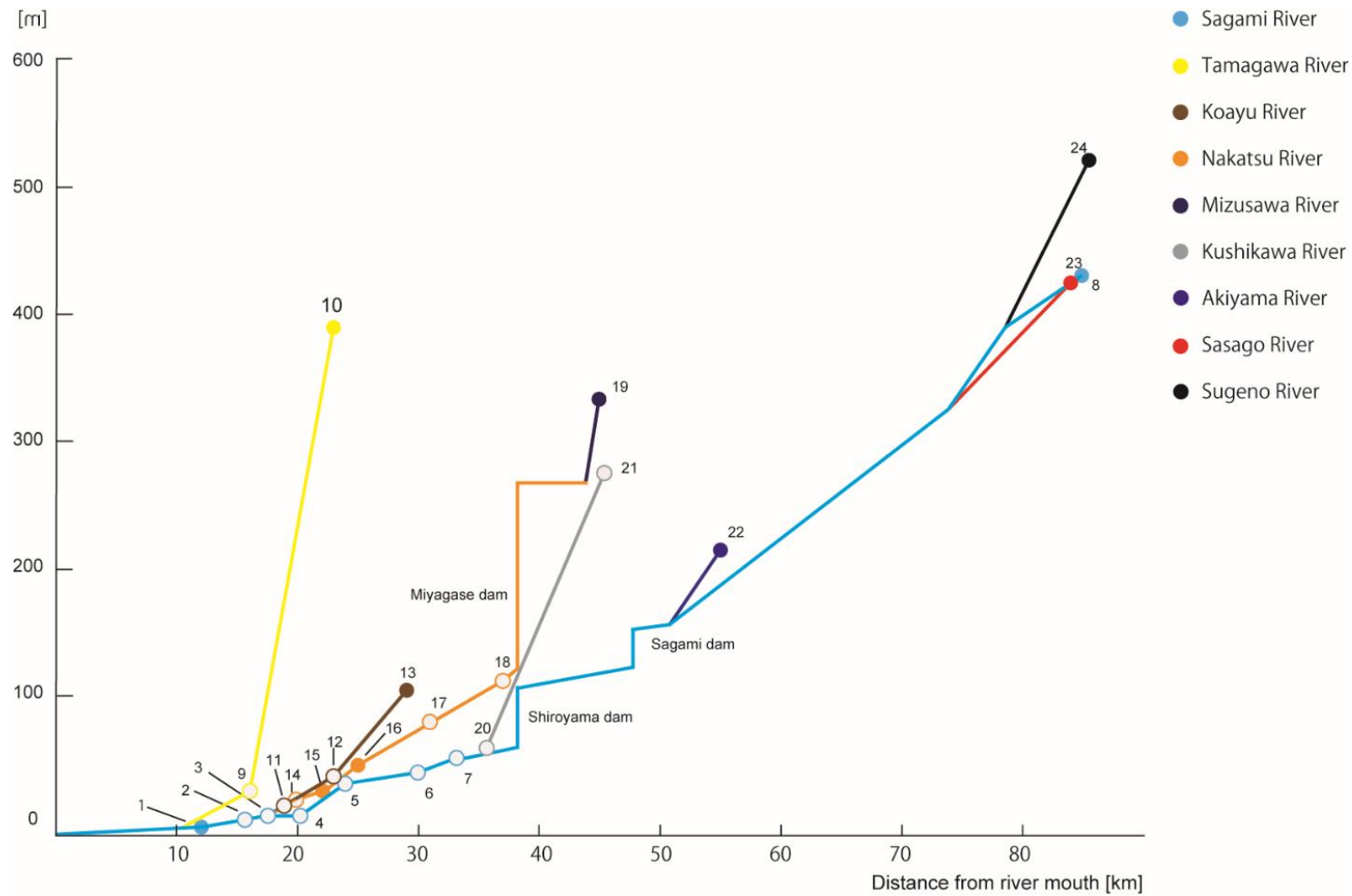


Fig. 5-2 Plots of altitude and distance of each sampling site from the mouth of the Sagami River for each tributary in the Sagami River system. The numbers indicate the sampling site code, and the  $x$ - and  $y$ -axes show the distance (km) from the river mouth and altitude (m), respectively. White circles indicate sampling sites where both haplogroups A and C were collected, and the solid circles indicate sampling sites where only haplogroup A of *Ecdyonurus yoshidae* was collected.



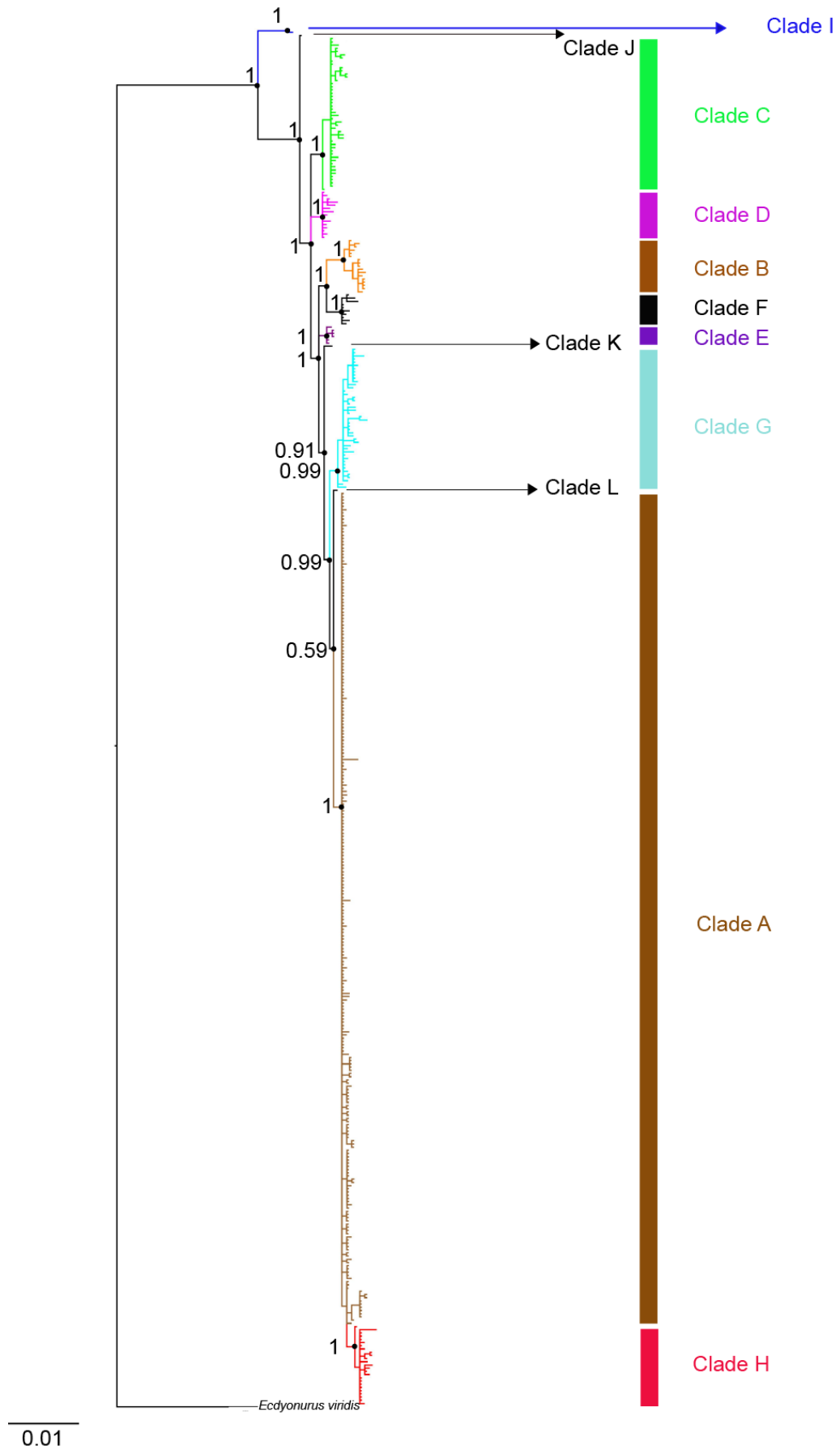


Fig. 5-3 Bayesian phylogenetical tree based on *COI* sequences of *Ecdyonurus yoshidae* from 226 specimens in the Sagami River and 207 other river systems. Closely related congener *Ecdyonurus viridis* was included as an outgroup taxon. Node values indicate posterior probabilities. The specimens are listed in Tables 1-2 and 4-1.

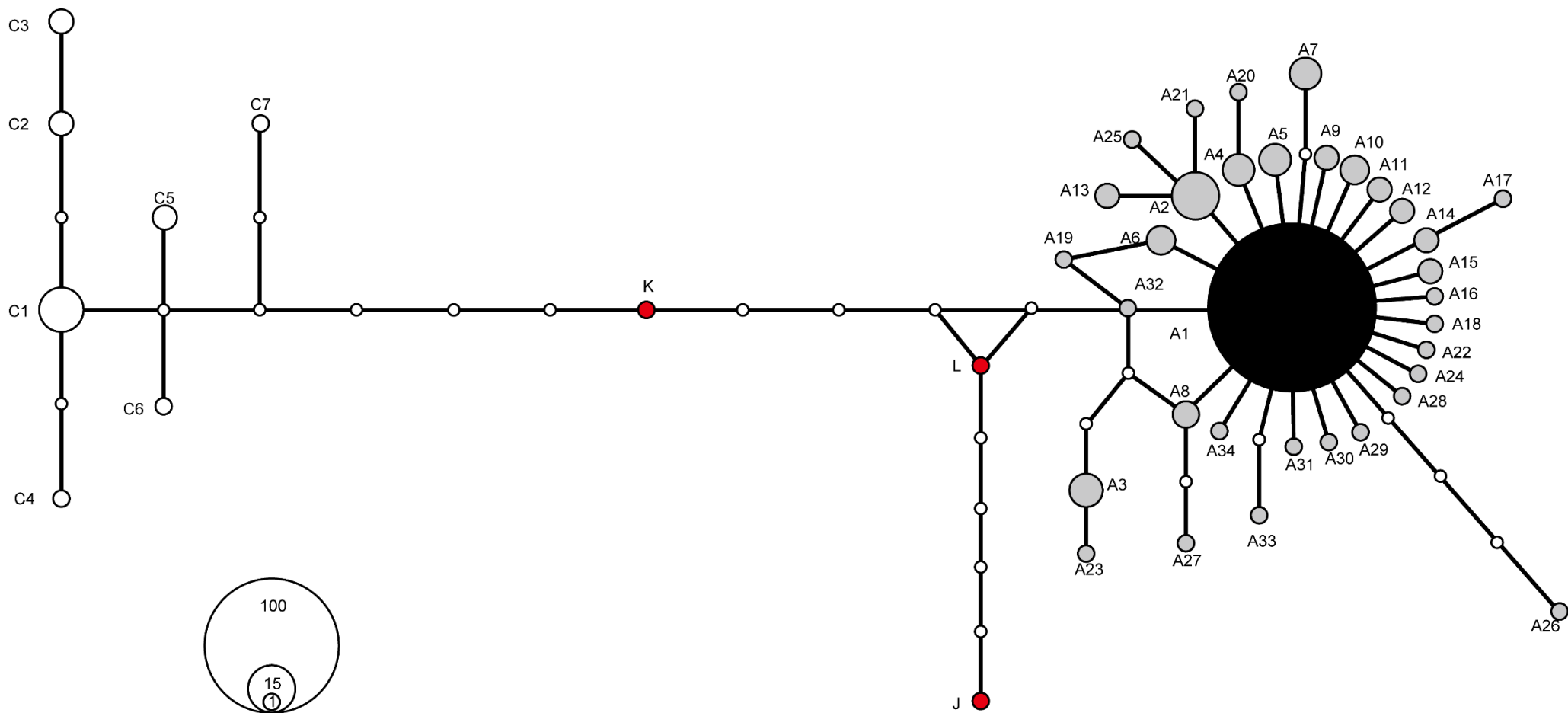


Fig. 5-4 Haplotype network diagram of the *COI* sequences from *Ecdyonurus yoshidae* in the Sagami River system. Circle diameters are proportional to sample size, and small white circles represent a missing haplotype. The sample size and detected sampling site of each haplotype are shown in Table 4-1. The large black circle represents haplotype A1, gray and white circles represent haplogroup A and haplogroup C. Red circles represent the monophyletic clades of J, K, and L in Fig. 5-3.

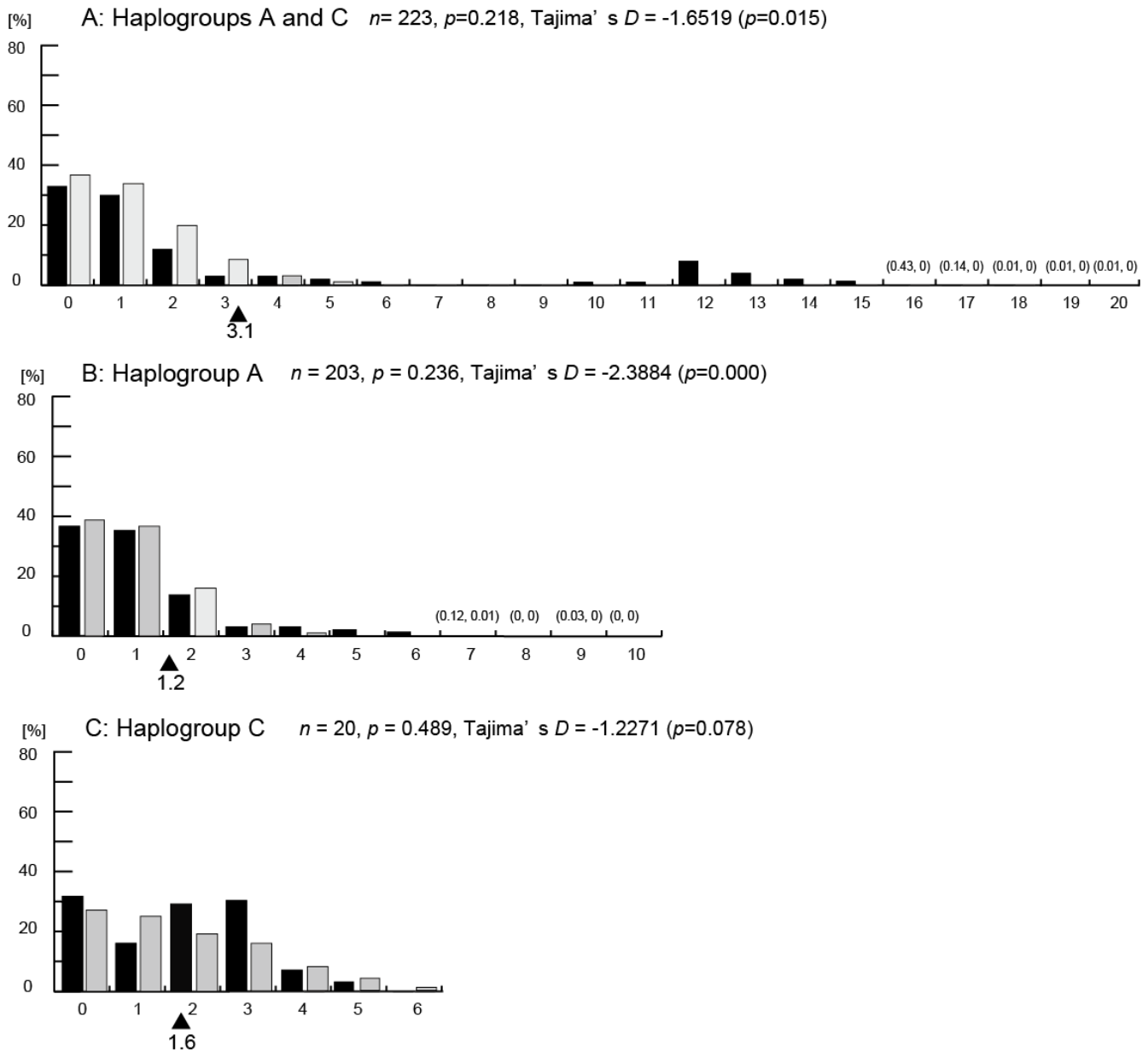


Fig. 5-5 Mismatch distribution of pairwise nucleotide differences based on *COI* sequences from *Ecdyonurus yoshidae* in the Sagami River system. The figure legends are the same as Fig. 3-4. In addition,  $n$  represents a sample size, and  $p$  is the statistically significant value between the observed and expected values using SSD under the sudden expansion model. Tajima's  $D$  and  $p$ -value are also shown. Figures in parentheses indicate values that cannot be represented in the bar. A: Haplogroups A and C, B: Haplogroup A, and C: Haplogroup C.

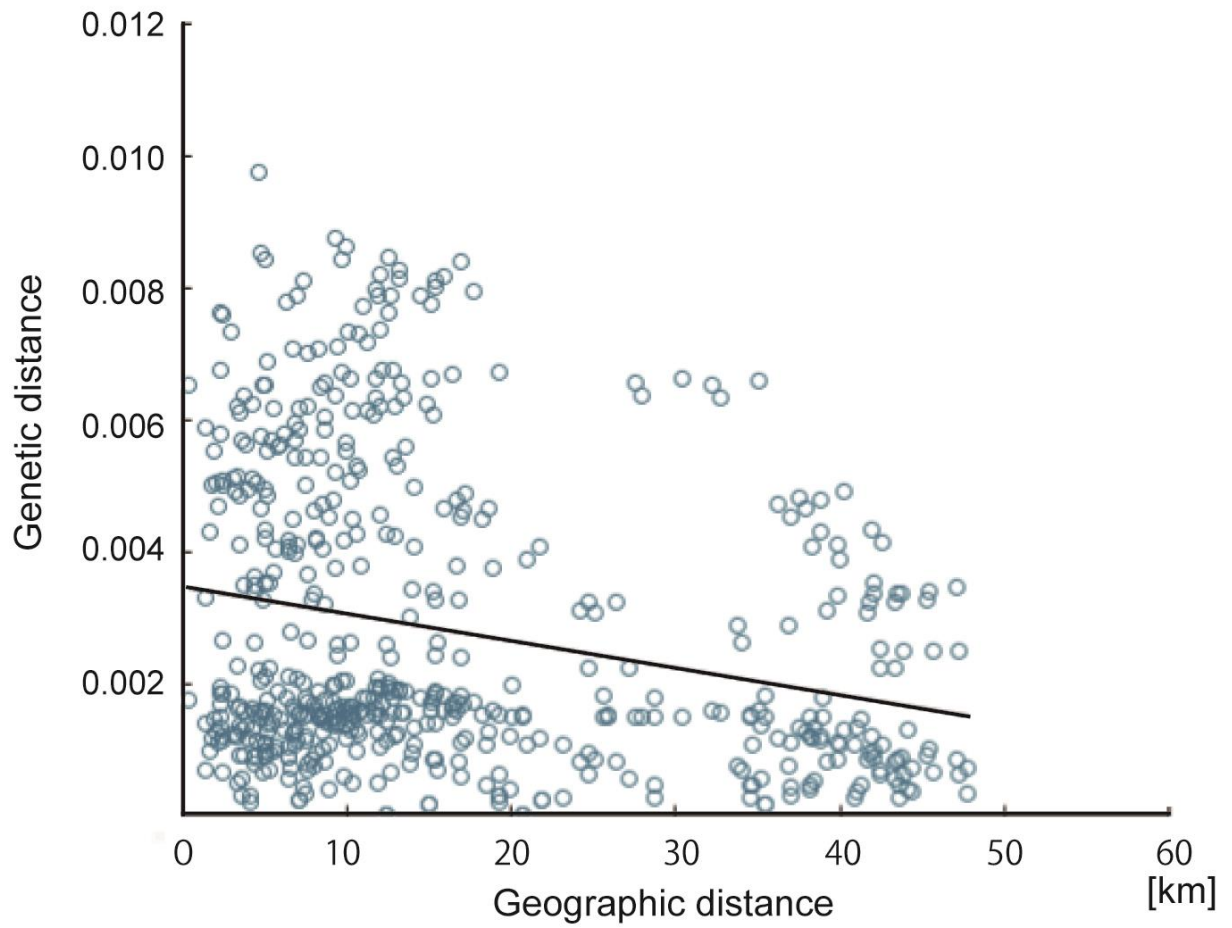


Fig. 5-6 Scatter plot of Nei's genetic distance vs. geographical distance (straight-line distance between the sites) and the regression line ( $r = -0.235$ ,  $p < 0.0001$ ) for *Ecdyonurus yoshidae* populations . The  $x$ - and  $y$ -axes indicate geographic [km] and genetic distances.

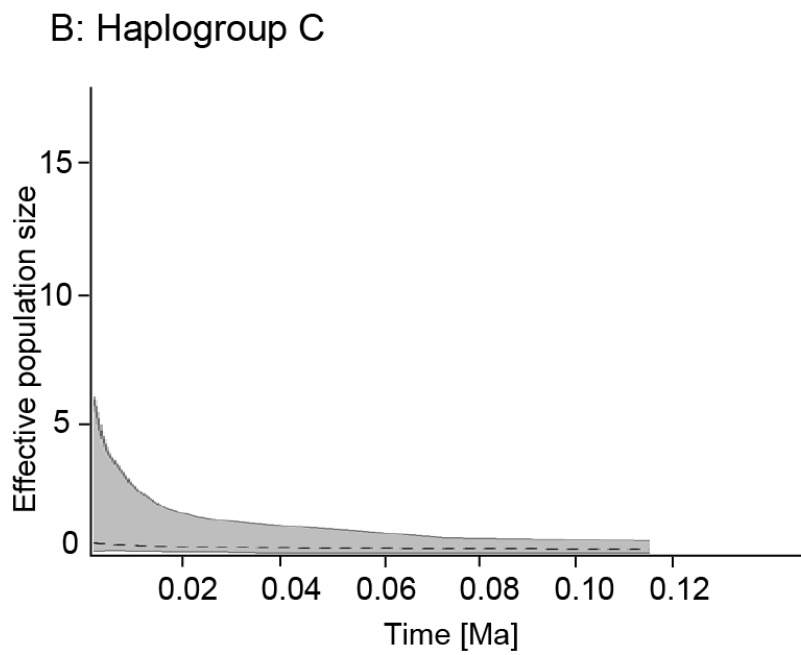
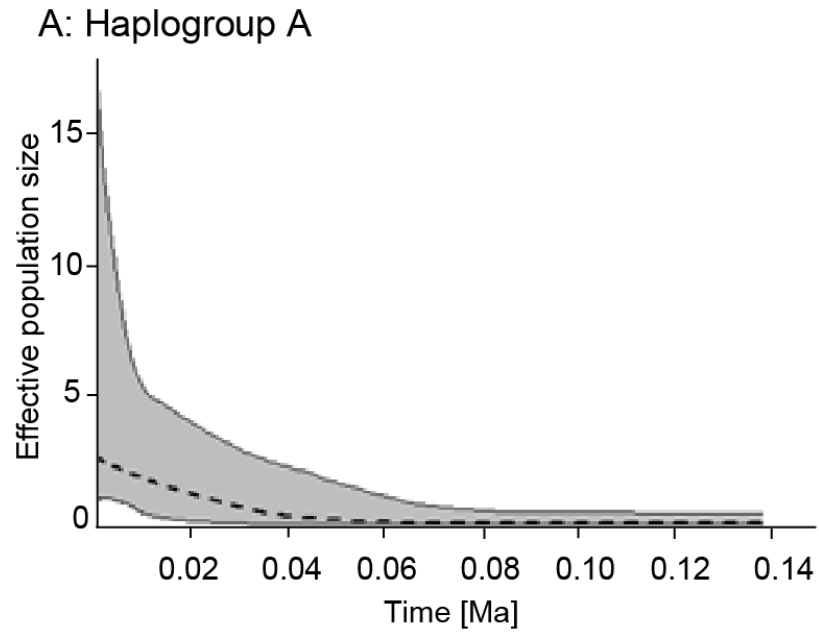


Fig. 5-7 Extended Bayesian Skyline Plots of *COI* sequences from *Ecdyonurus yoshidae* in the Sagami River system. The figure legends are the same as Fig. 3-5.

A: Haplogroup A, B: Haplogroup C.



Figs. 6-1 Gravel riverbed. (A) The Kumano River, (B) The Shimanto River, (C) The Kizu River, (D) The Eai River.





Figs. 6-2 Organisms of the gravel riverbed. (A) *Eusphingonotus japonicus* Saussure, (B) *Sterna albifrons* Pallas

Cited from Hiratsuka City Museum. HP

(C) *Aster kantoensis* Kitam

Cited from Katsuragawa and Sagami River Watershed Council. HP



Figs. 6-3 The old environments of the Sagami River. (A) The Sagami River behind Atsugi Shrine during late Meiji era, (B) The Sagami River during Taisho era, (C) The Sagami River during early Showa era. Cited from Hiratsuka City Museum (2009)



Fig. 6-4 The current state of erosion control and conservation facilities in the Tanzawa Mountains. Cited from Uchiyama & Suzuki (2007)



Figs. 6-5 Sediment movement countermeasures. (A) Deposited sand downstream of the Nagayasu Dam. Cited from Ministry of Land, Infrastructure and Transport. HP  
 (B) Slit check dam. Cited from Ministry of Land, Infrastructure and Transport. Yuzawa sabo office. HP