

希少淡水魚における外来集団による遺伝的攪乱を
簡便に検出する環境 DNA 検出系の開発：持続的な生息域内保全に向けて

伊藤 玄

三重県

1. はじめに

日本列島の淡水魚類は、山地の隆起や海峡により交流が妨げられており、各地域による遺伝的分化が大きいことが知られている（Watanabe et al., 2017）。各地域で遺伝的に分化した地域系統は、進化的に重要な単位として、保全する意義が大きいことが指摘されている（渡辺・高橋, 2010）。一方で、淡水魚類はアユなどの放流種苗への随伴や、釣魚目的などの意図的な理由により、様々な魚種が日本中に移植されている（河村, 2015）。その結果、各地域の同種・近縁種を遺伝的に攪乱したため、地域固有の生物多様性が失われつつある（日本魚理学会自然保護委員会, 2013）。特に種内地域系統は外見による識別が困難であることから、その侵入確認には相当な個体数の DNA 分析を行うことにより、明らかにされてきた（Kitazima et al., 2015; Tominaga et al., 2020）。しかし、確認時点では既に定着しているなど、外見による識別が困難な他地域集団の侵入確認は、得てして遅れがちである。

環境 DNA 分析は、生息地の水に含まれる DNA を分析することで低密度の生物でも存在を強力に検出できる手法である（土居・近藤, 2021）。環境 DNA 分析は、河川内の魚類相を把握できるメタバーコーディング解析（Yamamoto et al., 2017）や、対象種を絞った種特異的解析による存在研究（Sakata et al., 2017）などが発展しており、これらの手法を用いることで、外来種の侵入のいち早い確認が期待されている（土居・近藤, 2021）。一方で、上記の環境 DNA 分析技術は、種～属レベルの解像度であることがほとんどである。種内地域系統レベルの環境 DNA による分析技術は発展途上であり、コイの外来・在来系統の検出系が知られているのみである（Uchii et al., 2016）。様々な魚種による外来・在来系統の識別を可能にする検出系を開発することができれば、外来系統の侵入確認にかかる費用や労働力の軽減、および侵入初期の検出が期待できる。

イチモンジタナゴ *Acheilognathus cyanostigma* は、コイ科タナゴ亜科魚類に属する純淡水魚類であり、日本列島の東海地方から近畿、山陽、四国地方にかけて自然分布する日本固有種である（北村・内山, 2020）。環境省のレッドリストには絶滅危惧 IA 類として掲載されており（環境省, 2020）、保全が必要な種類である。イチモンジタナゴは、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析により、琵琶湖・淀川水系周辺 (Clade 1)、加古川・由良川水系 (Clade 2)、東海地方 (Clade 3) の 3 つの地域に遺伝的に分化していると考えられている（Kitazima et al., 2015）。一方で、イチモンジタナゴは、東海、九州、北陸、山陽地方などに移植されており、地域によっては国内外来種としても認識

されている (Kitazima et al., 2015 ; 北村・内山, 2020) 。東海地方は、イチモンジタナゴ Clade 3 の自然分布域であるが、Clade 3 の mtDNA ハプロタイプが確認された地域は三重県橿田川水系の 1 地点のみであり、岐阜県や愛知県の本曾川水系、長良川水系、矢作川水系からは、Clade1 または 2 のハプロタイプのみが確認されている (Kitazima et al., 2015 ; 北村, 2016) 。これらのことから、東海地方のイチモンジタナゴは、近畿産の移植により攪乱または置換がすすんでいると考えられており、東海地方在来集団 (Clade 3) は絶滅の危機が非常に高いと考えられている (北村, 2016) 。

橿田川水系の在来イチモンジタナゴ集団は、当初 1 つのため池から確認されていたが、タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* などの外来種の侵入により個体数が激減した。そこで、近隣のため池に緊急避難させ、いくつかのため池では再生産に成功している (北村, 2016) 。近年では、ため池に近い橿田川水系支流において、イチモンジタナゴが採集された情報もあるが (藤本, 私信)、支流に生息するイチモンジタナゴがため池から流下した個体であるか、ため池とは別の集団であるか、そもそも在来・外来系統のいずれであるかも不明である。支流の集団が在来集団であれば、新たに保全が必要であるが、もし外来集団であれば直ちに 駆除や隔離などの措置が必要である。まずは、橿田川水系における在・外来集団の正確な分布範囲の把握が必要であるが、橿田川水系内におけるイチモンジタナゴの生息密度は相当に低いことが予想される。

そこで、本研究では、絶滅危惧 IA 類の淡水魚イチモンジタナゴの東海・近畿系統を識別できる新たな環境 DNA 分析系を開発し、この検出系を用いて橿田川水系内における本種の在来・外来系統それぞれの正確な分布範囲を明らかにする。なお、本研究では、Clade1, 2 を合わせて近畿系統 (または外来系統)、Clade3 を東海系統 (または在来系統) として呼称する。

23-25)、ミナミアカヒレタビラ *Acheilognathus tabira jordani* (No. 26-28)、ゼニタナゴ *Acheilognathus typus* (No. 29, 30)、カゼトゲタナゴ *Rhodeus atremius atremius* (No. 31) を使用した。上記の DNA サンプルを、Qubit を用いて 0.1ng/ul になるように希釈した。PCR については、反応液量を 12 ul とし、2 x TaqPath qPCR Master Mix を 6 ul、最終濃度が 900 nM のプライマー対、テンプレート DNA 2 ul を混合した。各サンプルおよび超純水を用いた PCR ネガコンは 3 反復で行った。PCR 増幅にはリアルタイム PCR 装置 (StepOne-Plus) を用い、50°C2 分、95°C10 分の後、95°C15 秒、60°C60 秒を 55 サイクルの温度条件で行った。PCR 後、各繰り返しサンプルを 1 つに集約し、電気泳動を行った。

電気泳動の結果、イチモンジタナゴについては、東海・近畿両系統ともに増幅領域にバンドが確認された。近縁種については、ヤリタナゴ (No. 10)、カネヒラ (No. 16)、タイリクバラタナゴ (No. 24, 25)、ミナミアカヒレタビラ (No. 26) の約 200bp 付近においてバンドが薄く確認された (Fig. 2-1)。

2.4 プライマーおよびプローブの種特異性確認

2.3 で行った電気泳動の結果では、近縁種における増幅産物が、対象領域か偶然増幅長が一致した他の領域であるかが不明である。そこで、プローブも添加したリアルタイム PCR 分析をすることにより、増幅産物の確認を行った。使用した DNA サンプルは、2.3 で 0.1ng/ul に希釈した 31 サンプルとした。PCR については、反応液量を 12 ul とし、2 x TaqPath qPCR Master Mix を 6 ul、最終濃度が 900 nM のプライマー対、125 nM の TaqMan MGB プローブ 2 種類、テンプレート DNA 2 ul を混合した。各サンプルおよび超純水を用いた PCR ネガコンは 3 反復で行った。PCR 増幅にはリアルタイム PCR 装置 (StepOne-Plus) を用い、50°C2 分、95°C10 分の後、95°C15 秒、60°C60 秒を 55 サイクルの温度条件で行った。

リアルタイム PCR の結果、東海系統用プローブ (AcydT) は、イチモンジタナゴ東海系統の 3 サンプル (A1-A9) のみを増幅した。近畿系統用プローブ (AcydK) は、イチモンジタナゴ近畿系統の 4 サンプル (A10-B9) と、1 個体のタイリクバラタナゴ (G1, G3) を増幅した (Table2-1. Fig. 2-2)。これらのことから、東海系統用および近畿系統用いずれも、イチモンジタナゴの対象系統のみを増幅していた。しかし、近畿系統用プローブでは、タイリクバラタナゴを 1 個体のみ増幅していた。電気泳動では、ヤリタナゴやカネヒラなどの増幅が疑われていたが、プローブを添加したリアルタイム PCR により、本プライマーとプローブセットは近縁種のほとんどを増幅させないことが確認できた。

2.5 タイリクバラタナゴサンプルの増幅配列確認

2.4 の実験により、タイリクバラタナゴの 1 個体が近畿系統用のプローブで増幅された。本サンプルは、2.3 の電気泳動で増幅が確認された No. 25 と同じサンプルである。リアルタイム PCR では、増幅したタイリクバラタナゴサンプルが、イチモンジタナゴサンプルによる汚染 (コンタミネーション) か、タイリクバラタナゴ DNA の増幅かを

判断することができない。そこで、2.4 で増幅したタイリクバラタナゴサンプルの塩基配列解読を行った。塩基配列の解読を行ったのは、タイリクバラタナゴ (No. 25) のリアルタイム PCR 産物である G1, G3 に加え、タイリクバラタナゴ (No. 23-25) の原液、タイリクバラタナゴ (No. 25) の 0.1ng/ul 希釈液、イチモンジタナゴ近畿系統 2 個体 (No. 5-6) とした。リアルタイム PCR 産物である G1, G3 以外の 6 サンプルについて、PCR を行った。1 サンプルあたりミリ Q3.75ul、10uM 各プライマー0.25ul、Ex Premier DNA Polymerase Dye plus6.25ul として混合した。最後に、テンプレート DNA を 2ul ずつ分注し、Simpliamp を用いて PCR を行った。PCR 条件は、94°C1 分の後、94°C30 秒、60°C30 秒、72°C1 分を 30 サイクルとした。次に、上記 PCR を行った 3 サンプルと、タイリクバラタナゴ (No. 25) のリアルタイム PCR 産物である G1, G3 を加えた 8 サンプルについて、PCR 産物の精製を行った。ミリ Q1.125ul、ExoSAP IT Express0.125ul となるように混合し、各サンプルに 1.25ul ずつ分注した。温度条件は、37°C8 分、80°C2 分とした。精製後、タカラバイオ株式会社のプレミックスシーケンスの protocol に従って調整を行い、プレミックスシーケンスを依頼した。シーケンスの結果、タイリクバラタナゴ (No. 25) のリアルタイム PCR 産物である G1, G3 は、シーケンスしたイチモンジタナゴ近畿系統 (No. 5-6) の配列と一致した。また、タイリクバラタナゴ (No. 23-25) の原液およびタイリクバラタナゴ (No. 25) の 0.1ng/ul 希釈液からは、タイリクバラタナゴの DNA が増幅された。これらのことから、リアルタイム PCR により増幅したタイリクバラタナゴ (No. 25) のサンプルは、イチモンジタナゴ近畿系統のコンタミネーションであると結論付けられた。

2.6 結論

イチモンジタナゴの種特異的プライマーおよび、イチモンジタナゴ東海・近畿系統に特異的に反応する各プローブを用いてリアルタイム PCR を行ったところ、東海・近畿系統用プローブはイチモンジタナゴの各対象系統を誤検出なく識別できた。近縁種においては、近畿系統用プローブにタイリクバラタナゴの 1 個体が増幅されていたが、イチモンジタナゴ近畿系統のコンタミネーションであることが判明した。これらのことから、本研究で開発したイチモンジタナゴプライマーは問題なくイチモンジタナゴのみを増幅し、イチモンジタナゴ東海・近畿用の各プローブは、問題なく対象系統のみに反応すると考えられる。

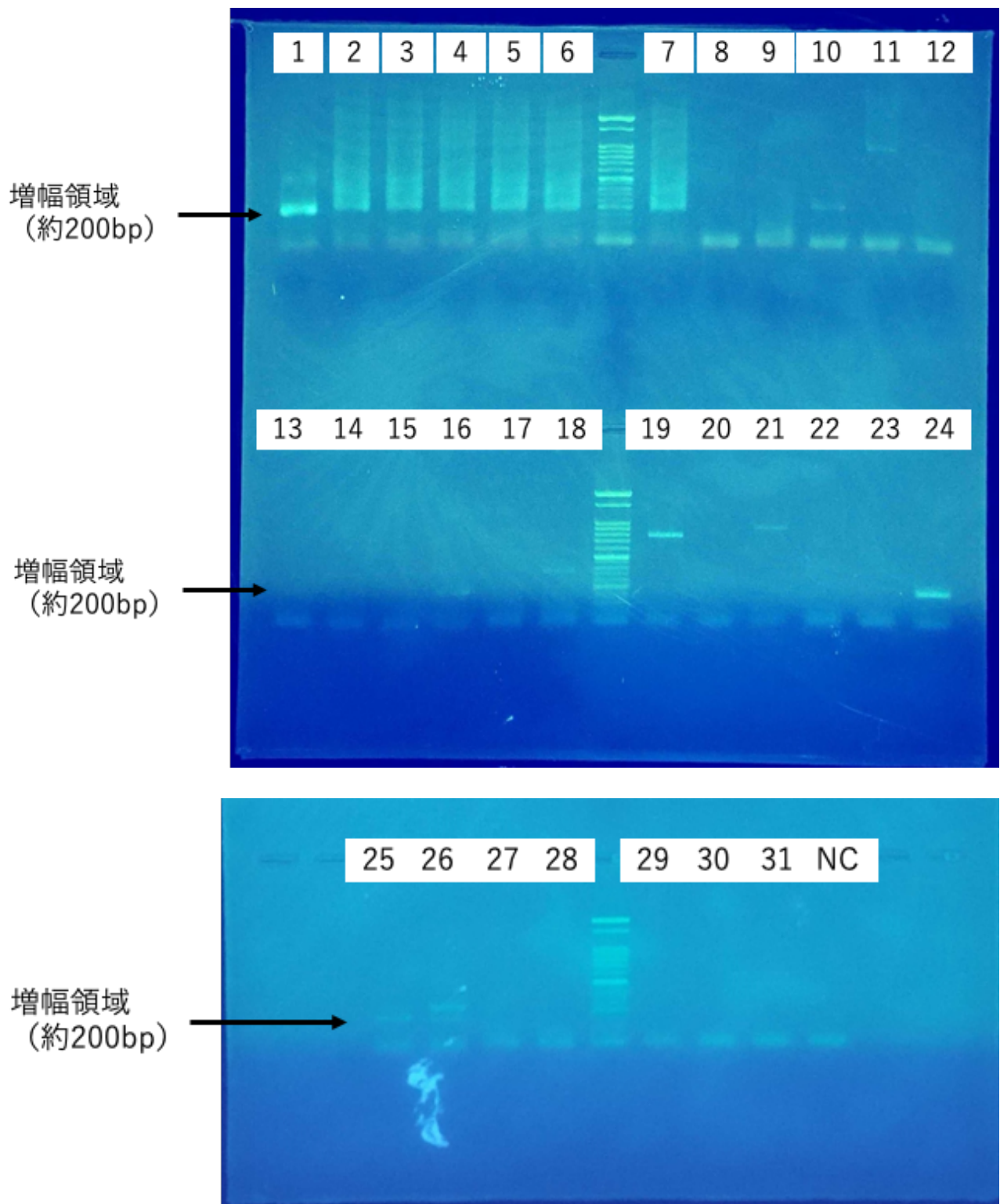


Fig. 2-1 本研究で開発したイチモンジタナゴ種特異プライマーを用いた PCR による像副産物の電気泳動像。増幅領域である約 200bp 付近において、No. 1-7 (イチモンジタナゴ)、No. 10 (ヤリタナゴ)、No. 16 (カネヒラ)、No. 34, 35 (タイリクバラタナゴ)、No. 26 (ミナミアカヒレタビラ) の増幅が確認できる。

No.	個体名	陽性反応数	
		東海系統	近畿系統
1	イチモンジタナゴ東海系統1	3/3	
2	イチモンジタナゴ東海系統2	3/3	
3	イチモンジタナゴ東海系統3	3/3	
4	イチモンジタナゴ近畿系統1		3/3
5	イチモンジタナゴ近畿系統2		3/3
6	イチモンジタナゴ近畿系統3		3/3
7	イチモンジタナゴ近畿系統4		3/3
8	ヤリタナゴ1		
9	ヤリタナゴ2		
10	ヤリタナゴ3		
11	アブラボテ1		
12	アブラボテ2		
13	アブラボテ3		
14	カネヒラ1		
15	カネヒラ2		
16	カネヒラ3		
17	シロヒレタビラ1		
18	シロヒレタビラ2		
19	シロヒレタビラ3		
20	タナゴ1		
21	タナゴ2		
22	タナゴ3		
23	タイリクバラタナゴ1		
24	タイリクバラタナゴ2		
25	タイリクバラタナゴ3		2/3
26	ミナミアカヒレタビラ1		
27	ミナミアカヒレタビラ2		
28	ミナミアカヒレタビラ3		
29	ゼニタナゴ1		
30	ゼニタナゴ2		
31	カゼトゲタナゴ1		

Table 1-1 本研究で開発したイチモンジタナゴ種特異プライマーおよび東海・近畿系統用プローブセットを用いて行ったリアルタイム PCR の結果。3 繰り返しで行い、陽性反応の数を示す。

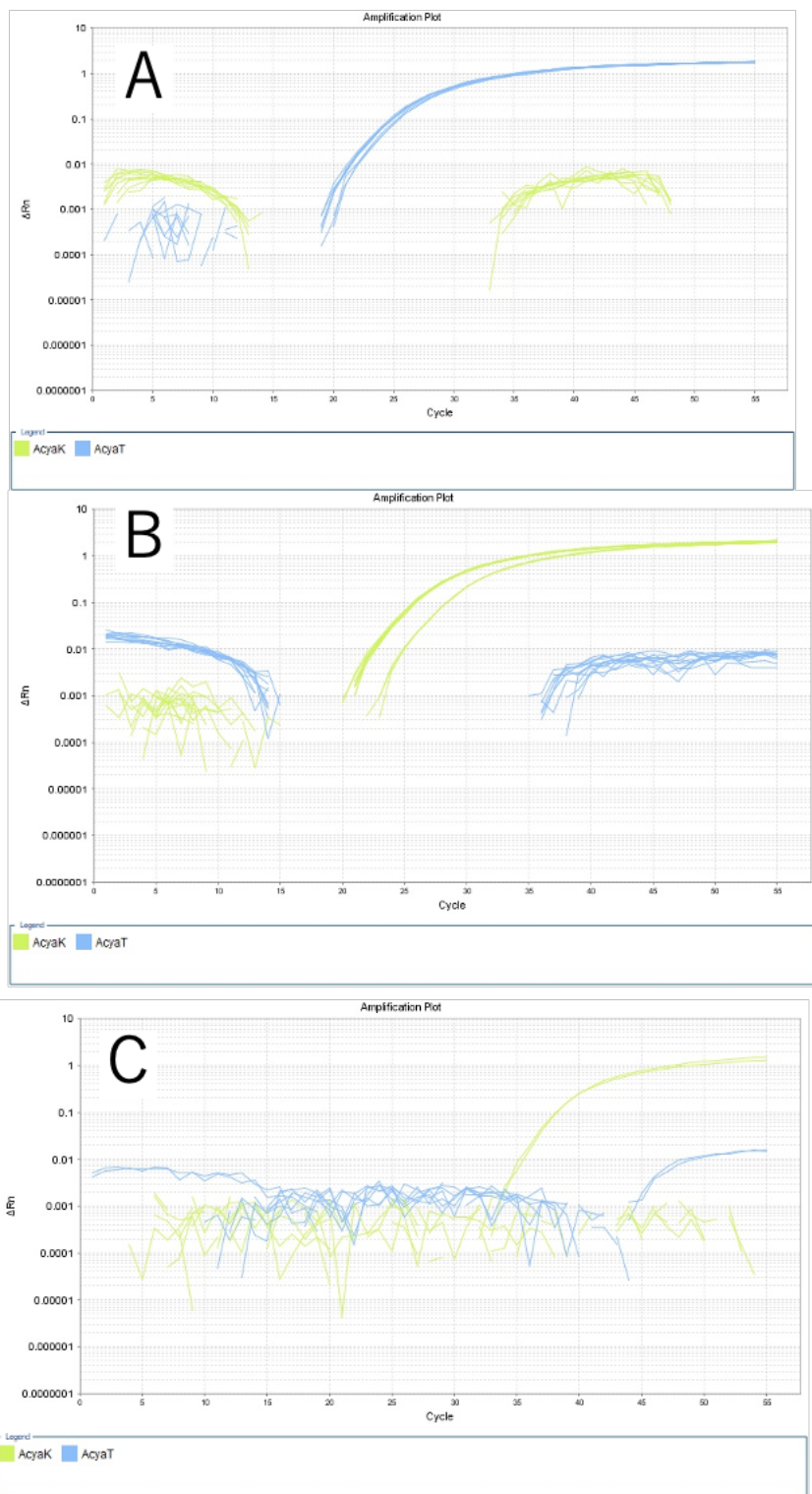


Fig. 2-2 本研究で開発したイチモンジタナゴ種特異プライマーおよび東海・近畿系統用プローブセットを用いて行ったリアルタイム PCR の結果。(A) 東海系統用プローブにより増幅したイチモンジタナゴサンプルを示す。(B) 近畿系統用プローブにより増幅したイチモンジタナゴサンプルを示す。(C) 近畿系統用プローブにより増幅したタイリクバラタナゴサンプルを示す。

3. 櫛田川水系におけるイチモンジタナゴ在来・外来系統判別調査

3.1 材料と方法

2021年11月13日に、櫛田川水系支流A（過去にイチモンジタナゴの採集情報がある流域）から10地点（A1-A10）、櫛田川水系支流B（イチモンジタナゴの保護池がある流域）から4地点（B1-B4）、イチモンジタナゴの保護池を含めたため池6地点（P1-P6）から採水を行った。支流AおよびBは、櫛田川本流から約1km間隔の採水地点として設定した。各採水地点の詳細について、表3-1に示したが、詳細な位置に関しては保護の観点から公表しない。基本的な採水手法は、環境DNA調査・実験マニュアル Ver. 2.2（Minamoto et al., 2021）に従い、若干の変更を施した。採水時には使い捨てのプラスチックカップを使用し、1地点あたり表層水を1000ml採水した。コンタミネーションを防ぐため、プラスチックカップは1地点の採水に用いた後、廃棄した。採水後、DNAの分解抑制のために直ちに10%塩化ベンザルコニウムを1000μl添加し（Yamanaka et al., 2017）、冷蔵状態で研究室に持ち帰った。ネガティブコントロールには、支流Aの10地点後の採水後（NC1）、および支流Bとため池の合計10地点の採水後（NC2）に、1000mlの超純水を用いた。

研究室に持ち帰り、その日のうちに濾過を行った。濾過は、直径47mm、0.7μmポアサイズのGF/Fフィルターを用いて行い、濾過後直ちに-20℃で保管した。DNA抽出は、基本的にはMiya et al. (2016)を、若干の変更部分をHirohara et al. (2021)に従い、DNeasy Blood and Tissue Kitを用いて行った。

mtDNAのCyt b領域の一部を、本報告書2で開発したプライマー対を用いてPCRにより増幅した。PCRについては、反応液量を12ulとし、2x TaqPath qPCR Master Mixを6ul、最終濃度が900nMのプライマー対、125nMのTaqMan MGBプローブ2種類、テンプレートDNA2ulを混合した。各サンプルおよび超純水を用いたPCRネガコンは3反復で行った。PCR増幅にはリアルタイムPCR装置（StepOne-Plus）を用い、50℃2分、95℃10分の後、95℃15秒、60℃60秒を55サイクルの温度条件で行った。

3.2 結果

イチモンジタナゴの種特異プライマー・系統特異プローブセットを用いてリアルタイムPCRを行った結果、近畿系統プローブによる陽性反応は得られず、東海系統プローブによる反応が6地点で得られた（Table 3-1, Fig. 3-1, 3-2）。東海系統については、陽性反応数3/3の地点がP3およびP6、陽性反応数2/3の地点がB1およびB2、陽性反応数1/3の地点がA2およびP5であった。残りの地点は陰性だった（Table 3-1, Fig. 3-2）。

3.3 考察

イチモンジタナゴ近畿系統のプローブは反応しなかったことから、本研究で検出されたイチモンジタナゴは、全て東海系統である可能性が高いと判断された。

支流AからはA2からのみ陽性反応があった。支流Aでは、櫛田川本流との合流点付近から過去のイチモンジタナゴの採集情報がある（藤本，私信）。陽性反応のあったA2は、支流Aの下流側にあたり、過去の採集情報のエリアと一致する。過去に支流

A で確認されたイチモンジタナゴは、支流 A の上流と下流のいずれから移動してきた個体群であるかについては不明であった。しかし本研究では、陽性反応があったのは支流 A2 のみであり、上流側からは陽性反応は得られなかった。また、後述するが、支流 A に近い支流 B からもイチモンジタナゴの陽性反応が得られていることから、支流 A のイチモンジタナゴは、上流からの移動個体ではなく、支流 B からの移動個体である可能性が高い。

支流 B からは、B1 および B2 から陽性反応が得られた。支流 B は、保護池として利用しているため池（P6）の位置する流域である。また、B1 と B2 はいずれも保護池 P6 の下流側であることから、P6 から流出した環境水に含まれた環境 DNA または、P6 から支流 B に流出したイチモンジタナゴが存在し、その個体由来の環境 DNA を検出した可能性が考えられる。

ため池からは、P3、P5、P6 から陽性反応が得られた。この 3 箇所のため池は、保護池として活用しており、現在も生息が確認されているため池である。陽性反応が得られなかったため池 P1、P2、P4 は、イチモンジタナゴがかつて確認されていたが、現在は確認されていないため池である（北村，私信）。これらのことから、本環境 DNA 調査は、今までの採集調査による結果とよく対応している。

採水地点	水域	環境	陽性反応数	
			東海系統	近畿系統
A1	支流A	河川		
A2	支流A	ワンド	1/3	
A3	支流A	たまり		
A4	支流A	ワンド		
A5	支流A	河川		
A6	支流A	河川		
A7	支流A	河川		
A8	支流A	河川		
A9	支流A	河川		
A10	支流A	河川		
B1	支流B	保護池より下流	2/3	
B2	支流B	保護池より下流	2/3	
B3	支流B	保護池より上流		
B4	支流B	保護池より上流		
P1	ため池	イチモンジタナゴが元々生息していたため池		
P2	ため池	かつて保護池として活用していたが現在の生息状況は不明		
P3	ため池	保護池として活用しており現在も生息している	3/3	
P4	ため池	かつて保護池として活用していたが現在の生息状況は不明		
P5	ため池	保護池として活用しており現在も生息している	1/3	
P6	ため池	保護池として活用しており現在も生息している	3/3	

Table 3-1 櫛田川水系の採水サンプルで行ったイチモンジタナゴのリアルタイム PCR の結果。3 繰り返しで行い、陽性反応の数を示す。

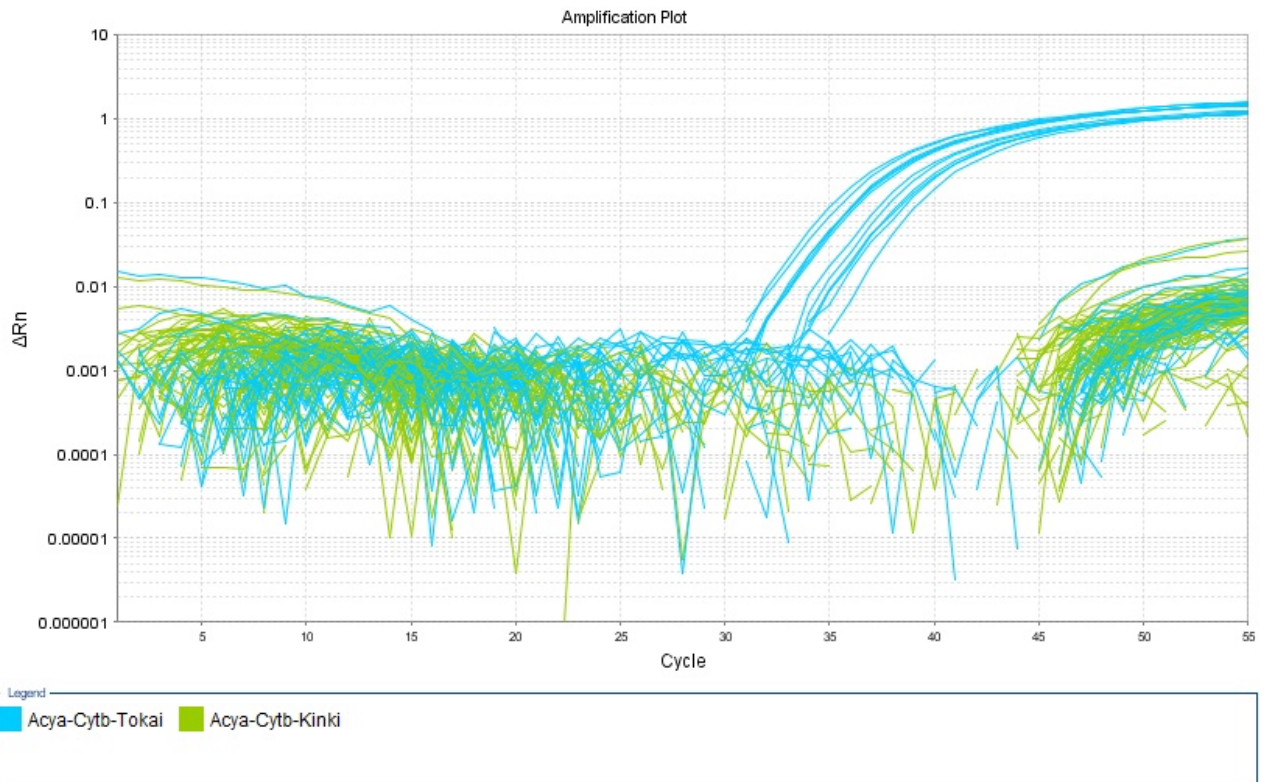
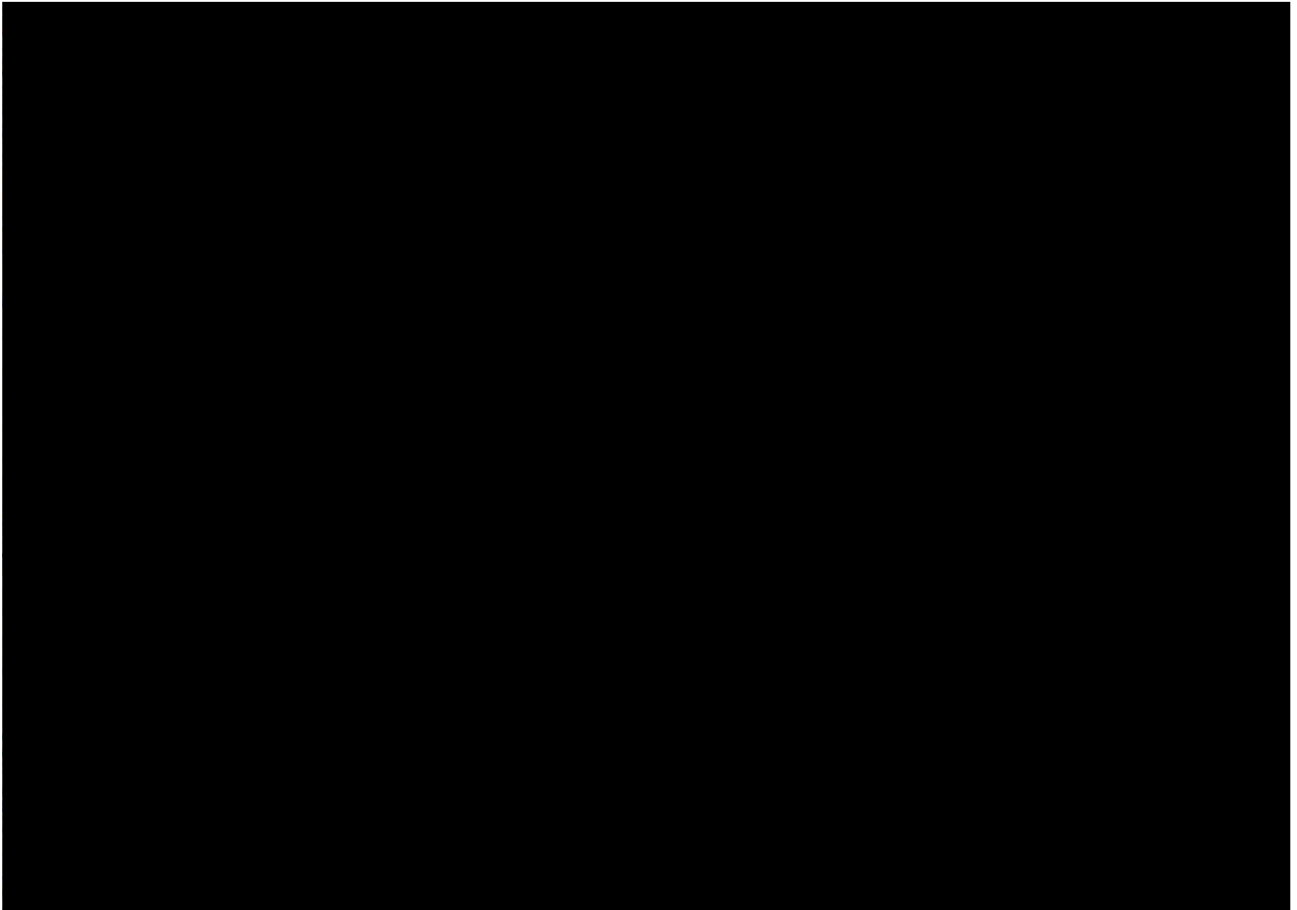


Fig. 3-1 櫛田川水系の採水サンプルで行ったイチモンジタナゴのリアルタイム PCR の結果。ピンク色は東海系統用プローブを、緑色は近畿系統用プローブによる増幅曲線を表す。



Fog. 3-2 櫛田川水系における採水地点。採水地点ナンバーは、Table 3-1 に対応している。赤色で示した部分が、イチモンジタナゴ東海系統の陽性反応が得られたエリアを示す。

4. 総合考察

本研究により、イチモンジタナゴの種特異的プライマーおよび、東海・近畿系統を識別可能なプローブが開発された。本検出系は、櫛田川水系のみならず、全国の本種の保全活動においても活用できる。本検出系は簡便に外来集団の侵入状況の把握が可能であることから、各地域における保全にかかる費用や労働力を軽減でき、持続的な保全活動を行う上で有用である。また、本研究で開発した検出系は、過去にイチモンジタナゴの分布が知られていた三重県五十鈴川水系および員弁川水系などの調査においても応用可能である。本種の保全に重要な残存在来集団の発見において、本検出系が高い効果を発揮することが期待される。今後、本検出系の検出限界および定量限界を求めることで、検出系の信頼性を高める必要がある。

櫛田川水系の調査により、櫛田川水系におけるイチモンジタナゴの詳細な分布範囲が明らかになった。櫛田川水系におけるイチモンジタナゴは、東海系統のみの検出であり、現時点で近畿系統の侵入の可能性は低いことが示された。支流 A で確認されていたイチモンジタナゴは、保護池から支流 B に流下し、支流 B から櫛田川本流を介して分散した個体である可能性が高い。支流 A でイチモンジタナゴを検出した地点は、ワンドであった。イチモンジタナゴは、河川内ではワンドなどの止水環境に近い生息環境を好むことが知られている（北村・内山，2020）。そのため、櫛田川水系にワンド環境を維持することで、イチモンジタナゴの繁殖に適した場が創出される可能性がある。櫛田川水系内でイチモンジタナゴが自然に増える環境を整えることが期待される。

櫛田川水系におけるイチモンジタナゴ東海系統の分布範囲は、局所的であることが示された。本研究で得られた櫛田川水系におけるイチモンジタナゴの分布情報は、櫛田川水系における環境アセスメントや学校教育活動、博物館における展示活動にも役立てることが可能である。今後、これらの活動に役立てられるよう、関係機関に情報提供を行っていく。

5. 謝辞

三重県在住の藤本侑介氏には、櫛田川水系におけるイチモンジタナゴの生息状況についての情報のご提供、および現地採水調査にご協力頂いた。三重県総合博物館の北村淳一博士には、イチモンジタナゴ保護池での採水許可をいただき、現地調査にもご協力頂いた。龍谷大学先端理工学部の中村裕樹准教授には、環境 DNA 検出系開発にあたり技術的なアドバイスを頂いた。龍谷大学生物多様性科学研究センターの朝見麻希博士、後藤祐子氏には、PCR 実験などの技術的サポートを頂いた。ここに記し、厚くお礼申し上げます。

6. 引用文献

土居秀幸・近藤倫生（編）（2021）環境 DNA—生態系の真の姿を読み解く—。共立出版，東京。

Hirohara, T., Tsuru, K., Miyagawa, K., Paine, R.T.R., Yamanaka, H. (2021) The application of PMA (propidium monoazide) to different target sequence lengths of Zebrafish eDNA: a

new approach aimed toward improving environmental DNA ecology and biological surveillance. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 9, 632973. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.632973>.

河村 功一 (2015) 交雑がもたらす遺伝子汚染の実態. *生物の科学遺伝*, 69:116-122.

北村 淳一 (2016) イチモンジタナゴ: 地域とともに将来につなぐ. (日本魚類学会自然保護委員会 編). *淡水魚保全の挑戦: 水辺のにぎわいを取り戻す理念と実践*, 147-160. 東海大学出版部, 平塚.

北村 淳一, 内山 りゅう (2020) 日本のタナゴ 生態・保全・文化と図鑑. 山と溪谷社, 東京.

Kitazima J, Matsuda M, Mori S, Kokita T, Watanabe K (2015) Population structure and cryptic replacement of local populations in the endangered bitterling *Acheilognathus cyanostigma*. *Ichthyological Research*, 62:122-130. <https://doi.org/10.1007/s10228-014-0412-0>.

Minamoto, Miya, Sado, Seino, Doi, Kondoh, Nakamura, Takahara, Yamamoto, Yamanaka, Araki, Iwasaki, Kasai, Masuda & Uchii (2021) An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA* 3: 8-13, <https://doi.org/10.1002/edn3.121>.

Miya, M., Minamoto, T., Yamanaka, H., Oka, S., Sato, K., Yamamoto, S., Sado, T., Doi, H. (2016) Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *Journal of Visualized Experiments*. 117, e54741. <https://doi.org/10.3791/54741>.

日本魚類学会自然保護委員会 (編) 見えない脅威”国内外来魚”. 東海大学出版会, 秦野. Sakata, M.K., Maki, N., Sugiyama, H., Minamoto T. (2017) Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, *Acheilognathus typus*, in a natural river in Japan. *Science Nature*. 104, 100. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1521-1>.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.

Tominaga K, Nagata N, Kitamura J, Watanabe K, Sota T (2020) Phylogeography of the bitterling *Tanakia lanceolate* (Teleostei: Cyprinidae) in Japan inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Ichthyological Research*, 67:105-116.

Uchii, K., Doi, H., Minamoto, T. (2016) A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources*. 16, 415–422. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12460>.

渡辺勝俊・高橋 洋 (編著) (2010) 淡水魚類地理の自然史-多様性と分化をめぐって -. 北海道出版会, 札幌.

Watanabe, K., Tominaga, K., Nakajima, J., Kakioka, R., Tabata, R. (2017) Japanese freshwater fishes: Biogeography and cryptic diversity. In M. Motokawa & H. Kajihara (Eds.), *Species diversity of animals in Japan*. Springer, Tokyo, Japan. pp. 183–227.

- Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., Minamoto, T., Miya, M. (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports*. 7, 40368. <https://doi.org/10.1038/srep40368>.
- Yamanaka, H., Minamoto, T., Matsuura, J., Sakurai, S., Tsuji, S., Motozawa, H., Hongo, M., Sogo, Y., Kakimi, N., Teramura, I., Sugita, M., Baba, M., Kondo, A. (2017) A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*. 18, 233–241. <https://doi.org/10.1007/s10201-016-0508-5>.