



琵琶湖につながる水田水路におけるフナ属魚類の卵の分布の傾向と範囲： 河口からの直線距離と標高から見た概要

馬淵浩司¹・西田一也¹・吉田 誠^{1,2}

Author & Article Info

¹ 国立環境研究所 琵琶湖分室（大津市）
KM: mabuchi.koji@nies.go.jp (corresponding author)
² 東京大学大気海洋研究所（柏市）

Received 27 February 2024
Revised 13 March 2024
Accepted 16 March 2024
Published 18 March 2024
DOI 10.34583/ichthy.42.0_15

Kohji Mabuchi, Kazuya Nishida and Makoto A. Yoshida. 2024. Distribution trends and range of *Carassius* eggs in rice-field drainage channels connected to Lake Biwa, Japan: an overview based on direct distance from the river mouth and altitude. Ichthy, Natural History of Fishes of Japan, 42: 15–30.

Abstract

The distribution trends and range of *Carassius* eggs were investigated in three rice-field drainage systems connected to Lake Biwa, Japan through field collection of eggs and DNA identification. In total, 1,208 eggs (38 egg populations) were collected from 54 points in the Harie drainage system between April and July, 2020; 607 eggs (30 egg populations) from 114 points in the Chounogi River drainage system in June and July 2020; and 344 eggs (19 egg populations) from 48 points in the Eguchi River drainage system in June 2022. DNA genus identification of 696 randomly selected eggs, with 8 eggs per egg population, identified 525 *Carassius*, 48 *Cyprinus*, and 18 *Gnathopogon* eggs, with analysis failing for the remaining 105 eggs. Subsequent DNA species/subspecies identification of the 525 *Carassius* eggs identified 220 eggs as Nigoro-buna (*Carassius buergeri grandoculis*), and 57 eggs as Gin-buna (*Carassius* sp.), with analysis failing for the remaining 248 eggs. Among the 277 *Carassius* eggs for which the species/subspecies was determined, 79% were Nigoro-buna and 21% were Gin-buna. Species/subspecies compositions of pooled egg populations in surveyed 2-m elevation intervals and those in 500-m direct-distance intervals from the river mouth indicated that higher altitude and longer distance from the river mouth were associated with higher appearance ratios of Nigoro-buna to Gin-buna and Nigoro-buna eggs (hereinafter, Nigoro-buna egg ratio). Scatter plots of the Nigoro-buna egg ratio for each egg population against the altitude of the collection point and its direct distance from the river mouth revealed similar trends. Survey data collected in the Harie drainage system over four months showed that this trend remained constant regardless of the survey month. Almost all *Carassius* eggs were collected at points within 2.5 km from the river mouth and

up to 88 m above sea level (4-m height relative to the standard water surface of Lake Biwa).

琵琶湖には、3種類のフナ属魚類：ニゴロブナ *Carassius buergeri grandoculis* Temminck and Schlegel, 1846, ギンブナ *Carassius* sp., ゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri* Temminck and Schlegel, 1846 が生息している [滋賀県立琵琶湖文化館, 1980：学名は細谷 (2013)]。琵琶湖のフナ属魚類は古くから食用に供されており、縄文時代の貝塚から骨が見つかるほか（瀬口, 2016）、水田稲作の伝来とともに伝わったとされるナレズシ（フナズシ）の材料として現在でも有名であり、滋賀県内では刺身としても賞味されてきた（大沼, 2017）。しかし、その漁獲量は1980年代後半から1990年代前半にかけて激減し、現在はそれ以前の5–10分の1にまで落ち込んでいる（藤岡, 2013）。ニゴロブナとゲンゴロウブナは琵琶湖淀川水系の固有の亜種・種であることから、このような個体群の減少を反映して環境省のレッドリスト（環境省, 2020）では絶滅危惧IB類（EN）にランクされている。

琵琶湖のフナ属魚類が減少した最も大きな要因は、繁殖場所の減少と外来魚の蔓延であると考えられている（藤岡, 2013）。本湖のフナ属魚類は、春から夏にかけて、湖岸のヨシ帯や内湖（琵琶湖につながる湖沼）さらには水田地帯にまで進入して産卵するが（藤岡, 2013）、湖岸堤の建設や圃場整備により好適な産卵場（および初期発育の場）が失われた上に、オオクチバス *Micropterus nigricans* (Cuvier, 1828) やブルーギル *Lepomis macrochirus macrochirus* Rafinesque, 1819 による食害がこれに追い打ちをかけたと考えられている（藤岡, 2013）。個体群の回復には、これら外来魚の駆除と、産卵場の回復が必要と考えられるが、水田地帯における産卵場に関して有効かつ効率的な対策を立てるためには、まず、現在の水田地帯におけるフナ属魚類の3種・亜種の産卵場所の違いを把握しておくことが必要である。なお現在の圃場整備後の水田では、琵琶湖につながる排水路と水田面との高低差が大きくなり、水路を遡上して

きた魚が水田まで上がれない状態になっているので、調査は水田水路における産卵場所の違いを調べることになる。

フナ属魚類の3種・亜種の産卵場所の違いに関しては、これまで定性的な指摘がされてきた。細谷（2005）は、琵琶湖に生息する淡水魚の回遊様式を8つのタイプに分類し、ニゴロブナは「琵琶湖・内湖・水田回遊型」に、ゲンゴロウブナは「琵琶湖・内湖回遊型」に分類した。ギンブナについては明白にタイプ分けしていないが、水田で繁殖する魚種として記述している。これらから細谷（2005）は琵琶湖周辺の水田地帯で繁殖するのはニゴロブナとギンブナであると認識していることがわかる。また、前畑（2001）は琵琶湖から水田へ遡上・産卵するフナ属魚類としてニゴロブナとギンブナを紹介し、大塚（2012）は琵琶湖周辺の水田に産卵遡上するのは「ニゴロブナとギンブナがほとんど」と記述している。さらに亀甲（2019）は「ニゴロブナは湛水した水田や水路に入り込んで産卵する性質が強い」とし、ギンブナも水田地帯で産卵するとする一方で、ゲンゴロウブナは内湖やヨシ帯内で産卵するとしている。このように、フナ属魚類のうち水田地帯を利用するのはニゴロブナとギンブナで、ゲンゴロウブナは利用しないと考えられているが、このような産卵場所の違いを水田地帯の地図を用いて定量化・可視化した例はない。

琵琶湖とその周辺におけるフナ属魚類の魚種を区別した産卵場所の調査には、産着卵の採集とDNA種判別を組み合わせた手法が有効であることが示されている（西田・馬淵, 2020）。水田地帯における応用例としては、中小河川や幹線排水路における調査報告（馬淵ほか, 2019；西田ほか, 2022）があるが、水田につながる末端の排水路まで含めた調査への応用例はまだない。そこで本論文では、琵琶湖周辺の3ヶ所の水田地帯において、末端部を含めた排水路系で産着卵を採集し、そのDNA種判別を通して、フナ属魚類3種・亜種の産卵場所の違いを水田地帯の地図を用いて可視化した。また、琵琶湖岸からの直線距離や標高という側面から、フナ属魚類の産卵場所となる範囲のまかな数値的目安も把握した。

材料と方法

調査場所と調査日 琵琶湖周辺に位置する次の3つの水田排水路系（Fig.1）で産着卵の探索を行った。A）高島市新旭町針江の1排水路系（以降、「針江水路系」、河口部の水路幅は約7 m）：全長約1.5 kmの最上流部までを探索。B）長浜市の丁野木川につながる排水路系（「丁野木川水路系」、河口部の川幅は約16 m）：全長5 kmのうち河口から3 kmまでを探索。なお、下流部周辺の旧早崎内湖の干拓地は、排水路系が異なるため今回の探索地域からは除外した。また、この水路系には河口から約2 km（標高88.0 m）と約2.5 km（標高86.5 m）に水路の形状と横断構造物

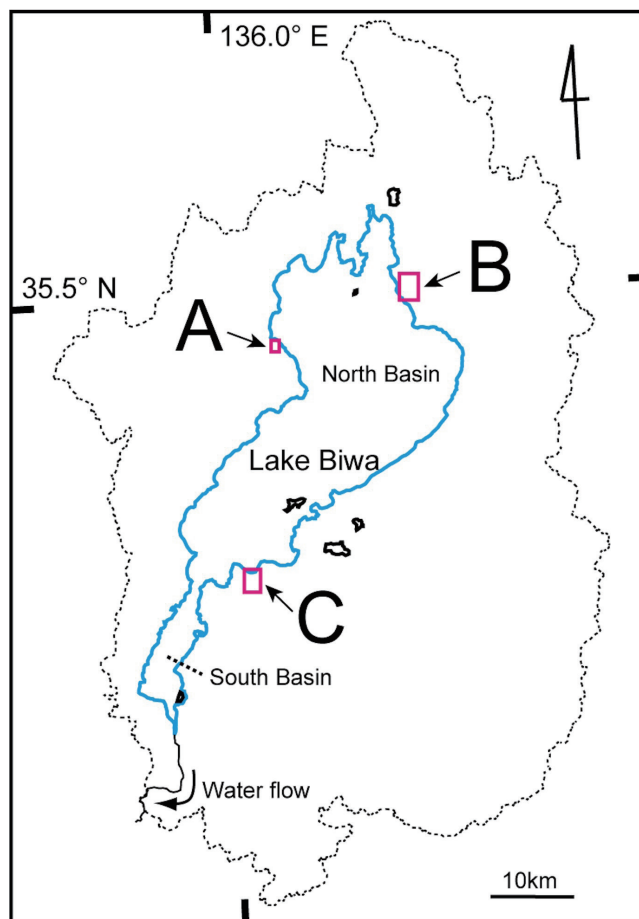


Fig. 1. Locations of three study areas (squares) adjacent to Lake Biwa, including three rice-field drainage systems where *Carassius* egg distribution surveys were conducted: A) Harie, B) Chounogi River, and C) Eguchi River.

による大きな落差（Fig. 3BのD1およびD2）が存在した。C）野洲市の江口川（江川）の排水路系（「江口川水路系」、河口部の水路幅は約17 m）：全長約2.5 kmの最上流部までを探索。各水路系の調査日は次のとおり：針江水路系，2020年の4月から7月の7日間（4月14, 21日, 5月7, 21, 22日, 6月16日, 7月1日）；丁野木川水路系，2020年の6月の6日間と7月の1日（6月8, 15, 16, 20, 21, 23日, 7月18日）；江口川水路系，2022年の6月の3日間（7, 8, 10日）。

産着卵の採集とDNA抽出 排水路脇の畦道を徒歩で移動しながら、水路内の植物体に付着している卵を目視で探索した。卵を発見した場所ではGPS端末GPSMAP64s（Garmin）で緯度経度の情報（通常条件下で誤差は3 m以内）を記録するとともに、その採集地点から手の届く範囲で10個以上の卵を採集し、水を入れた15 mlのプラスチックチューブに入れて実験室に持ち帰った（白くなっている卵は死卵と判断し採集しなかった）。このように1箇所から得た一群の卵を「卵群」と呼び、チューブごとにGを冠した固有の番号を割り振った。また、卵の発見されなかった地点についても緯度経度の情報を記録した。持ち帰った卵は、その日のうちに99.5%エタノールで固定した後すぐに-30°Cで保管し、後日、カネカ簡易DNA抽出キット

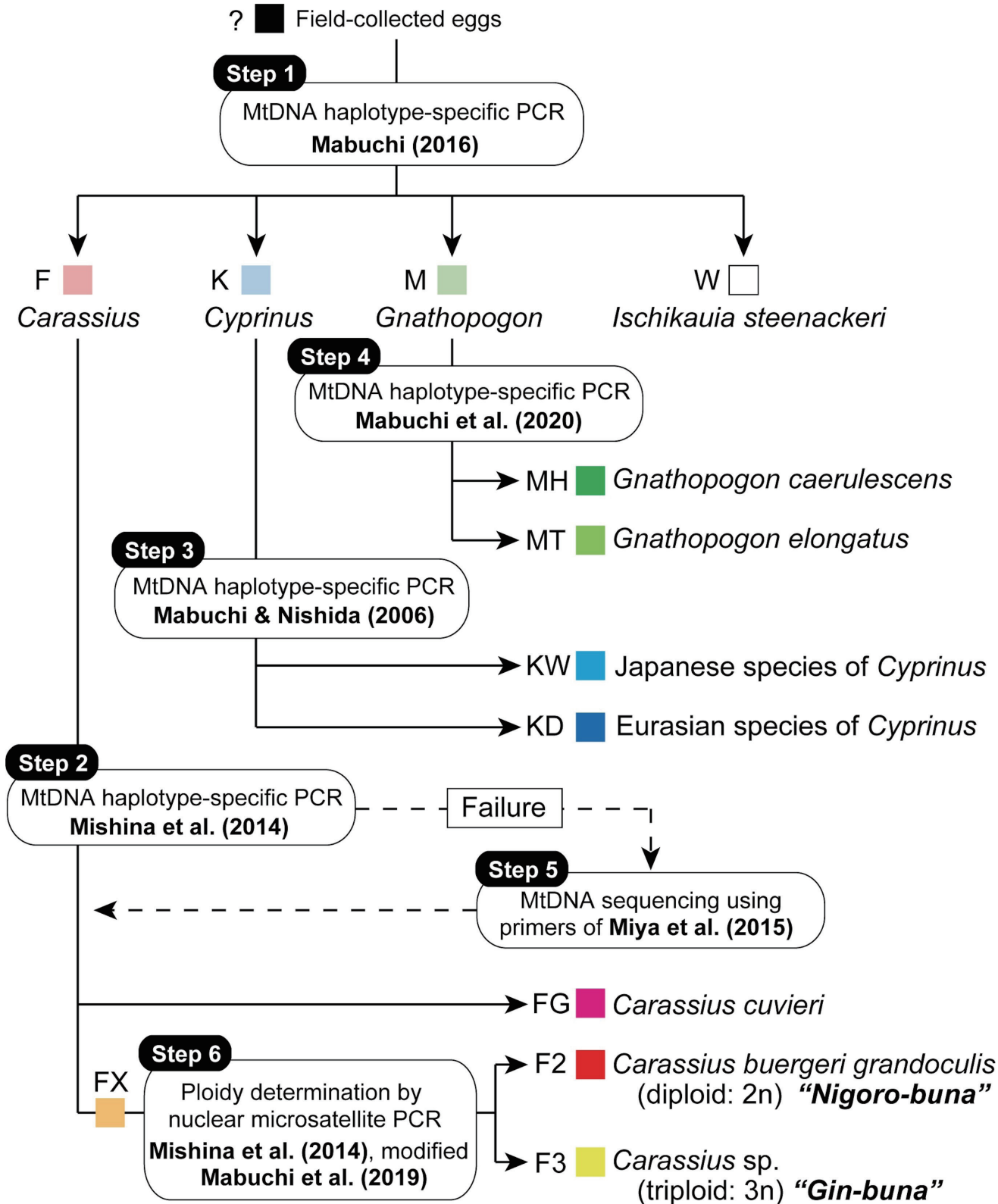


Fig. 2. Flow chart of the DNA identification process for field-collected eggs. Colors correspond to those used in the pie charts in Figs. 4 and 6; adjacent species/subspecies codes are as used in Figs. 4, 6 and Table 1.

Ver.2 (カネカ) を用いて 1 卵ずつから DNA を抽出した。抽出の対象とした卵は各卵群サンプルからランダムに 8 個を選んだ。なお、抽出作業の最初のステップでは Protease K (Promega) を添加してタンパク質の消化力を増強し、抽出後はエタノール沈殿 (中山・西方, 1995) で更に精製した。

PCR による卵の魚種判別 上述のようにして採集した卵の中には、フナ属魚類の 3 種・亜種のほかに、コイ属

の日本在来系統と大陸導入系統 [前者は日本の固有亜種あるいは種であるとの考えが提出されており、後者も含めて学名は確定していない。詳しくは Atsumi et al. (2016) や馬淵・松崎 (2017) を参照], タモロコ属のタモロコ *Gnathopogon elongatus* (Temminck and Schlegel, 1846) とホンモロコ *Gnathopogon caerulescens* (Sauvage, 1883), さらにワタカ属のワタカ *Ischikauia steenackeri* (Sauvage, 1883) の卵



Fig. 3. Egg search points (flags) on a Google aerial view (April 15, 2021) of the drainage systems for A) Harie, B) Chounogi River, and C) Eguchi River. Egg population codes (Gxxxx) are provided for points where eggs were found; X indicates that no eggs were found. Further information, including Global Positioning System data, search dates, egg population names, and numbers of eggs collected, is provided in Table 1. Blue lines indicate main waterways; direct distances from the exit to Lake Biwa (river mouth) are indicated by solid (1, 2, 3 km) or dashed (0.5, 1.5, 2.5 km) white arcs. In B, two yellow bars (D1 and D2) indicate significant drops in the main waterway; red and orange stars indicate the survey areas of Mabuchi et al. (2019) and (2021), respectively; and dashed orange line delineates the reclaimed Hayasaki Lagoon area, which was excluded from the current search due to its drainage system being separate from that of the Chounogi River.

も含まれている可能性がある。本研究では、多数のこのような卵について効率よく魚種判別するため、ミトコンドリア DNA をターゲットとした塩基サイト特異的プライマーによる PCR 種 (属) 判別 (増幅断片の長さの違いで判別) を段階的に用いた。詳細は Fig. 2 に示した通りだが、ニゴロブナとギンブナはミトコンドリア DNA では区別できないため、この 2 魚種の判別 (Fig. 2 中の Step 6) についてのみは、マイクロサテライト多型解析によるゲノム倍数性判定 (ニゴロブナは 2 倍体、ギンブナは 3 倍体) に基づいて判別した (Mishina et al., 2014)。以上一連のステップは、西田・馬淵 (2020) の図 11 で紹介されているものと全く同じである。各ステップの PCR 増幅には LifeECO (BioER) または Thermal Cycler Dice Touch (TaKaRa) を用い、ミトコンドリア DNA の増幅断片長の電気泳動解析は 3% アガロースゲル上で 100V, 15 分の条件で行い、サイズマーカーには 100 bp DNA Ladder RTU (GeneDireX) を使用した。また、フナ属魚類のマイクロサテライト多型解析には、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い、サイズマーカーには GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

DNA シーケンスによる卵の魚種判別 フナ属魚類の卵の判別では、ゲンゴロウブナかそれ以外のフナ属魚類かを判別する PCR (Fig. 2 中の Step 2) が成功しない例が多数あったので、このような卵については、ミトコンドリア DNA の塩基配列を決定することによりゲンゴロウブナか

否かの判別を行った (Step 5)。PCR プライマーは、魚類の環境 DNA 解析で用いられる MiFish-U-F と MiFish-U-R (Miya et al., 2015) を用い、12 rRNA 遺伝子領域の中のいわゆる MiFish 領域を解析した。実験条件は馬淵・西田 (2023) と同じ。得られた塩基配列は DDBJ に登録し (アクセッション番号: LC795716–8)、各配列の魚種判別は NCBI (National Center for Biotechnology Information) サイトの [BLAST 検索](#) により行った。

産着卵の分布傾向の解析 産着卵の地理的な出現状況を可視化するため、卵の探索地点を、Google Earth Pro (ver. 7.3.6.9750, Google) を用いて緯度経度データを基に地図 (衛星画像, 2021 年 4 月 15 日撮影) 上にマッピングした。地図中では、卵を採集した地点には卵群の G 番号を、卵が検出されなかった地点には x 印を付した。また、卵の出現状況を琵琶湖からの距離と標高という側面から把握するため、横軸に河口 (排水路系の琵琶湖への出口) からの直線距離 (以下「河口距離」)、縦軸に標高をとった平面グラフ上に、各探索地点をプロットした。河口距離と標高の値は、緯度経度情報を基に国土地理院の地理院地図 ([電子国土 Web](#)) 上で取得した。標高はほぼすべて航空レーザー測量の測定値 (標高点格子の間隔は約 5 m 四方) を元にした標高タイル (DEM5A) に基づく値を用いた [ただし、丁野木川本流のごく一部の地点についてはこのような標高タイルがなかったため、写真測量によって図化された 1/25,000 地形図の等高線 (10 m 間隔) から作成された標高タイル

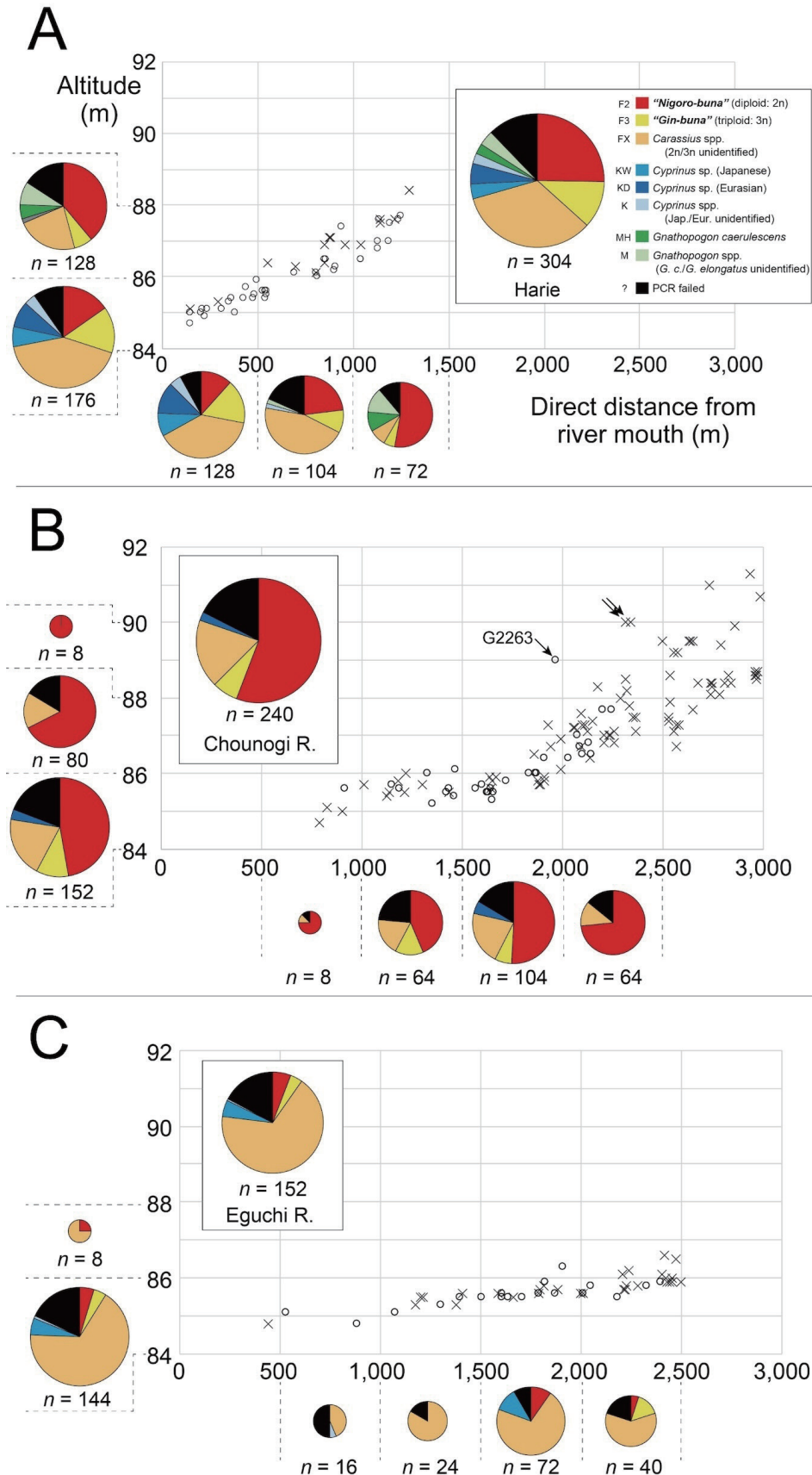


Fig. 4. Scatter plots relating the altitudes of egg search points to their direct distance from the river mouth in the drainage systems of A) Harie, B) Chounogi River, and C) Eguchi River. Pie charts to the left of each scatter plot depict the species/subspecies compositions of pooled egg populations in 2-m elevation intervals, and pie charts below each scatter plot depict those in 500-m intervals of direct distance from the river mouth. In each scatter plot, circles indicate egg collection and crosses indicate no eggs found. Pie charts within each scatter plot correspond to the pooled egg population of the drainage system. Pie chart size reflects the number of eggs analyzed. Further information, including altitude, direct distance from the river mouth, and species/subspecies composition, is provided in Table 1. Altitude and distance data were derived from maps of the Geospatial Information Authority of Japan ([URL](#)), primarily with reference to a digital elevation model (DEM) based on aerial laser surveys (DEM5A). In B, altitudes for the three points indicated by arrows were obtained from a photogrammetry-based DEM (DEM10B) of lower accuracy than DEM5A.

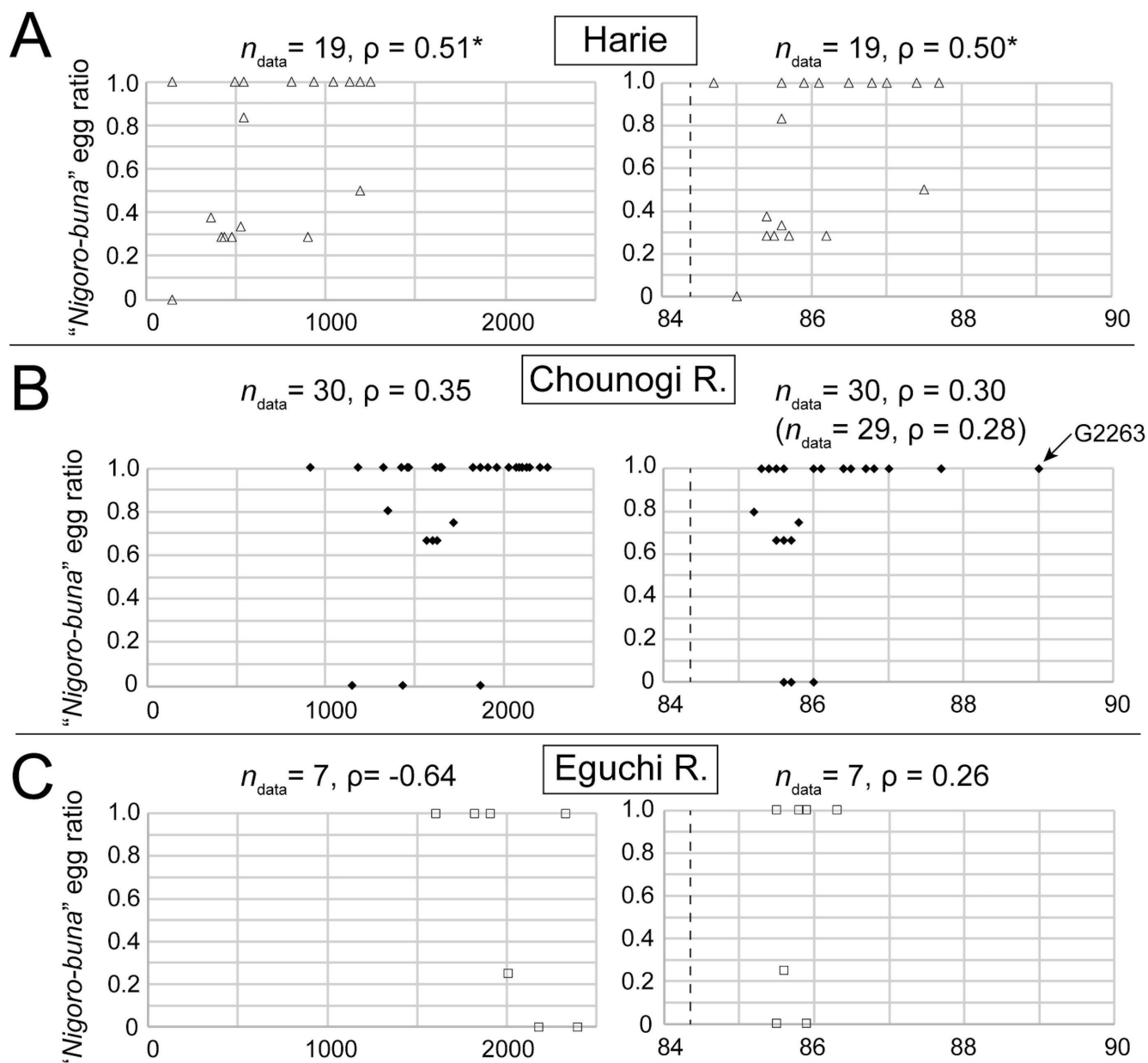


Fig. 5. Scatter plots for Nigoro-buna egg ratios (the number of Nigoro-buna eggs divided by total number of Gin-buna and Nigoro-buna eggs) for each egg population against the direct distance from the river mouth (left) and the altitude of the collection point (right) for A) Harie, B) Chounogi River, and C) Eguchi River. The number of data points (n_{data}) and Spearman's rank correlation coefficient (ρ) are presented above each plot, with those in parenthesis shown above the right scatter plots in B being the values when excluding the egg population G2263 due to the lower accuracy of its altitude measurement (89 m) from DEM10B (see Fig. 4). Asterisks indicate significance level ($*P < 0.05$). Further information, including numbers of Nigoro-buna and Gin-buna eggs for each population, altitude, direct distance from the river mouth, is provided in Table 1. Triangles, diamonds, and squares indicate egg populations collected from Harie, Chounogi River, and Eguchi River, respectively.

(DEM10B) に基づく値（精度は劣る）を用いた]. このようにして得た標高の値は、水路の水面や水底の標高ではなく、水路を取り巻く地表面の標高についての値であるが、公開データから容易に取得しやすいものであるためこの値を用いた。

この散布図に加えて、河口距離や標高から見た卵の出現状況の、魚種間での違いを把握するため、採集された卵の魚種組成を、河口からの距離 500 m ごと、標高 84 m (琵琶湖の標準水面の標高は 84.371 m) から 2 m ごとの区間別に集計し、円グラフを作成した（なお、区間の境目に当

たるデータは下の区間に含めた：例 標高 86.0 m のデータは 84–86 m 区間に含めた）。魚種組成の円グラフは、各水路系の全体についても作成した。

上記の区間の中で卵の魚種組成を比較したところ、ニゴロブナ卵のギンブナ卵に対する割合は河口距離や標高と関連している可能性が認識できたため、河口距離あるいは標高と、各卵群内におけるニゴロブナ卵の割合 [ニゴロブナ卵率 = ニゴロブナ卵数 / (ニゴロブナ卵数 + ギンブナ卵数)] に関して、それぞれ水路系ごとの散布図を作成し、Spearman の順位相関係数を統計ソフト R (R Development

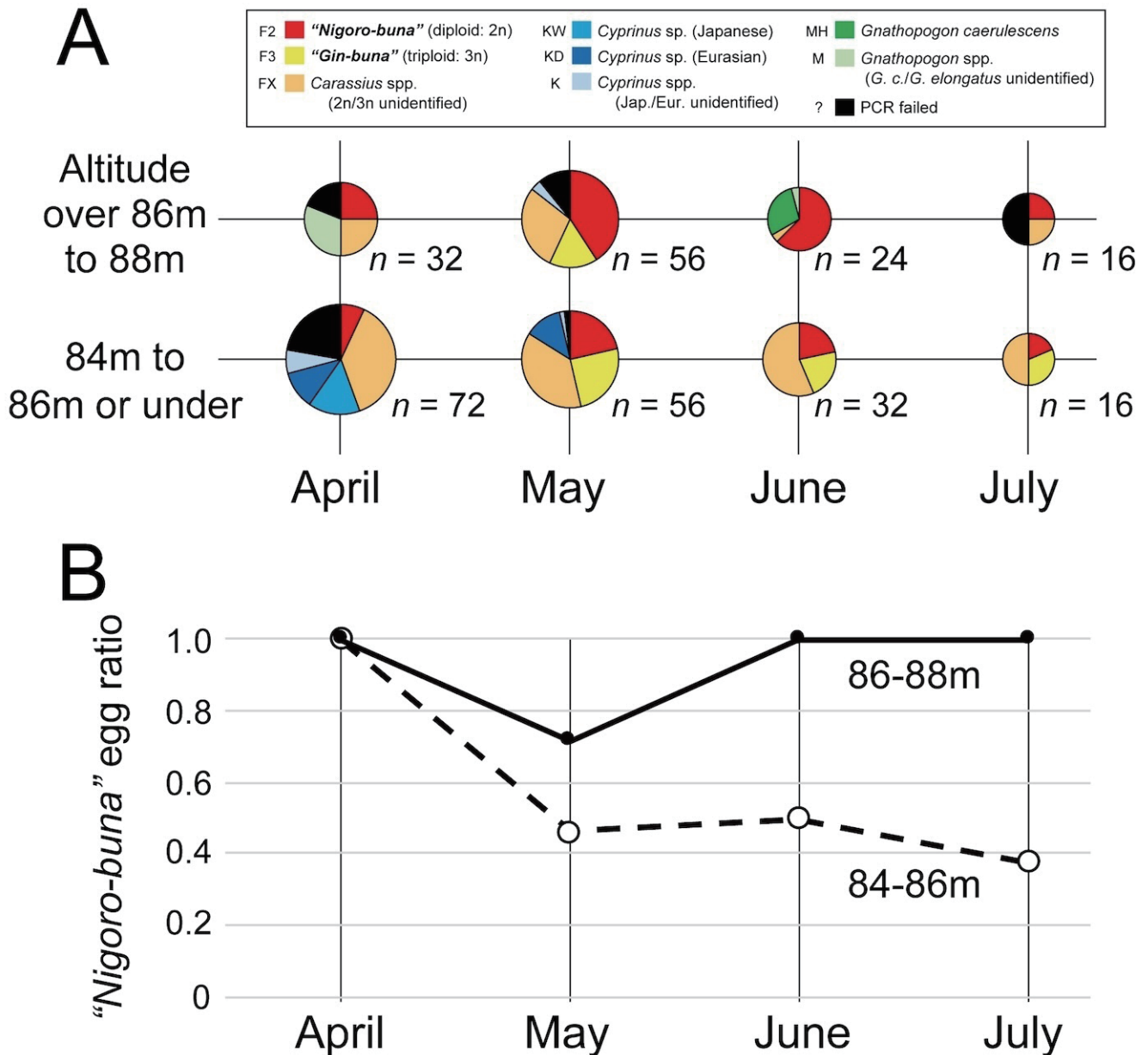


Fig. 6. (A) Species/subspecies composition and (B) Nigoro-buna egg ratio of egg populations collected in Harie from April to July in 2-m altitude intervals, starting from 84 m. Pie-chart size reflects the number of eggs analyzed, and the number is shown at the bottom right of the corresponding pie chart. Further information, including species/subspecies composition for each egg population, altitude, and collection date, is provided in Table 1.

Core Team, 2019) を用いて算出した。帰無仮説の検定は、市原 (1990) に基づき、データ数が 31 組以上のデータセットについては p 値により、30 組以下のデータセットについては Spearman の検定表を用いて行った。なお、丁野木川水路系のデータでは、ニゴロブナ卵率が取得できた卵群のうち最も標高が高い地点で採集された卵群 G2263 の標高値 (89.0 m) が、写真測量のデータに基づいた精度の低いものだったため、この点を除いたデータセットでも順位相関係数を計算した。

結果の項で説明するように、卵群内におけるニゴロブナ卵の割合は標高と比較的良好な相関が見られたが、両者の関係が調査を行った月によって異なるかを確認するため、採集月 (4 月, 5 月, 6 月, 7 月) と標高区間別 (84–86

m, 86–88 m) に採集卵の魚種組成を集計し、円グラフを作成した。さらに、この魚種組成に基づいて各月の標高区間ごとのニゴロブナ卵率を計算し、月変動の様子を折れ線グラフで可視化した。これらの解析は 4 ヶ月に渡って調査を行った針江水路系のデータについてのみ行った。

結 果

産着卵の探索地点と卵検出の有無 各地点の緯度、経度、標高 (およびその元となる標高タイルの種類)、河口距離、卵の探索年月日および卵の検出の有無などは Table 1 のとおり。針江水路系では 54 地点、丁野木川水路系では 114 地点、江口川水路系では 48 地点において産着卵の探索が行われ、それぞれ 38 地点、30 地点、19 地点で産着

卵が検出された。なお、丁野木川水路系の 114 地点のうち 3 地点（うち 1 地点で卵群 G2263 を検出）の標高は、写真測量に基づくやや精度の低い値となった。卵の探索時期としては、丁野木川水路系と江口川水路系では、ほぼ 6 月のみに探索が行われたが（前者では 1 地点のみ 7 月に探索し、卵検出はなし）、針江水路系のみは 4 月から 7 月の 4 ヶ月に渡って探索が行なわれ、各月の探索地点数（および産着卵検出地点数）は、4 月が 13 地点（13 地点）、5 月が 18 地点（14 地点）、6 月が 9 地点（7 地点）、7 月が 14 地点（4 地点）だった。

各地点の地理的な分布は Fig. 3A–C の地図のとおり。各地点の河口距離および標高という側面から、卵が発見された、またはされなかった地点の分布を図示すると Fig. 4A–C の散布図になった。針江水路系（Fig. 4A）では、水路の上限である河口から約 1.5 km、標高約 88 m までで卵が採集された。丁野木川水路系（Fig. 4B）では、河口から約 3 km の領域まで産着卵が探索されたが、卵が採集されたのは約 2.5 km までで、標高は約 88 m までにほぼ限られていた（標高 89.0 m の 1 地点で上述の G2263 が採集された）。江口川水路系（Fig. 4C）では、水路の上限である河口から約 2.5 km、標高では 86 m までで卵が採集された（標高 86.3 m の 1 地点で例外的な採集：G2915）。

採集卵の魚種組成 針江水路系では 38 卵群（卵 1,208 個）、丁野木川水路系では 30 卵群（卵 607 個）、江口川水路系では 19 卵群（卵 344 個）が採集された。各卵群あたり 8 個をランダムに選び、合計 696 個の卵について DNA 種同定に供した結果、属以上の判別に成功した 591 個の卵のうち、フナ属魚類の卵が 525 個（89%）、コイ属魚類の卵が 48 個（8%）、タモロコ属魚類の卵が 18 個（3%）だった。フナ属魚類と判別された 525 個の卵の内訳は、ニゴロブナ卵が 220 個、ギンブナ卵が 57 個、この 2 魚種のいずれかであると判別された卵が 248 個で、魚種（亜種）まで判別できたフナ属魚類の卵 277 個のうち 220 個、すなわち 79% がニゴロブナであった。

なお、最初の PCR 判別でフナ属魚類と判定されたものの、次の PCR 判別でゲンゴロウブナかそれ以外のフナ属魚類かが判定できなかった卵は 106 個あった（Table 1）。これらについてミトコンドリア DNA の塩基配列を決定したところ 3 つのハプロタイプ（FX1–3）が認識されたが、BLAST 検索の結果、これらはすべてニゴロブナ/ギンブナ（両者はミトコンドリア DNA では区別できない）のシーケンスだった。以上の結果から、今回採集・解析されたフナ属魚類の卵 525 個の中から、ゲンゴロウブナの卵は一つも検出されなかった。

上述の魚種組成を、水路系ごと、標高・河口距離ごとに集計した結果は Fig. 4A–C に示した円グラフのとおり。針江水路系（Fig. 4A）では 304 個の卵が解析され、属以上

の判別結果が得られた 267 個のうち 215 個（81%）がフナ属魚類の卵、34 個（13%）がコイ属魚類、18 個（7%）がタモロコ属魚類と判定された。フナ属魚類の卵のうち 77 個はニゴロブナ、35 個がギンブナ、103 個はこの 2 魚種のどちらかでゲンゴロウブナではないと判定された。丁野木川水路系（Fig. 4B）では 240 個の卵が解析され、属以上の判別結果が得られた 198 個のうち 193 個（97%）がフナ属魚類の卵で、残り（5 個、3%）はすべてコイ属魚類と判定された。フナ属魚類の卵のうち 134 個はニゴロブナ、16 個がギンブナ、43 個はこの 2 魚種のどちらかでゲンゴロウブナではないと判定された。江口川水路系（Fig. 4C）では 152 個の卵が解析され、属以上の判別結果が得られた 126 個のうち 117 個（93%）がフナ属魚類の卵で、残りの 9 個（7%）はすべてコイ属魚類と判定された。フナ属魚類の卵のうち 9 個はニゴロブナ、6 個はギンブナ、102 個はこの 2 魚種のどちらかでゲンゴロウブナではないと判定された。

ニゴロブナ卵率 3 つの水路系のいずれでも、属以上の魚種判別ができた卵の 80% 以上はフナ属魚類の卵であり、これらはニゴロブナまたはギンブナの卵であると判定された。どちらの魚種であるか判定できなかった卵も多かったが、判別に成功した卵の 60% 以上（針江で 69%、丁野木川で 89%、江口川で 60%）はニゴロブナのものだった。江口川水路系ではフナ属魚類の卵の 12%（15 個）しか魚種判別できなかったが、100 個を超える半分以上の卵で判別に成功した針江水路系と丁野木川水路系について、2 m ごとの標高および 500 m ごとの河口距離の区間別に両魚種の卵の比率を見ると、標高が高い、あるいは河口から遠い区間ほど、ニゴロブナの卵の比率が高い傾向があった（Fig. 4A, B の縦横軸の外の円グラフ）。

ニゴロブナとギンブナの区別ができた卵を含む卵群は、針江で 19（採集したのは 38 卵群）、丁野木川で 30（30）、江口川で 7（19）だったが、これらの各卵群におけるニゴロブナ卵率について、その採集地点の標高あるいは河口距離との関係を水系ごとに散布図にすると Fig. 5A–C になった。上述の区間ごとの集計結果と同様に、標高が高い、あるいは河口から遠いほどニゴロブナ卵の比率が高い卵群が多くなる傾向が見て取れ、Spearman の順位相関係数はほぼすべて 0.2 以上の正の値だった〔江口川の河口距離（Fig. 5C 左）のみ負の値〕。ただし、統計的に有意な値と判定されたのは針江の河口距離と標高（Fig. 5A の右と左）のみだった。

魚種組成とニゴロブナ卵率の月変動 4 ヶ月に渡って調査を行った針江水路系のデータについて、採集した卵の魚種組成を月別・標高区間別に集計した結果は Fig. 6A のとおり。どの月の標高区間も、魚種判別に成功した卵の半分近くかそれ以上はフナ属魚類の卵で、必ずニゴロブナ卵が

含まれていたが、ギンブナ卵は 5–7 月の低い方の標高区間（84–86 m）と 5 月の高い方の標高区間（86–88 m）でのみ検出された。ニゴロブナ卵率の月変動は Fig. 6B のとおりで、4 月はどちらの標高区間でもギンブナ卵の検出がなかったため値は 1 で同じだったが、それ以降の月では、どの月も高い方の標高区間の方が高率であった。

考 察

卵の DNA 種判別の成功率 本研究では、卵の DNA 魚種判別を、属、種、亜種という段階的な篩分け (Fig. 2) によって進め、大部分のステップにおいて高率で判別結果が得られた。ミトコンドリア DNA を対象とする塩基サイト特異的プライマーによる PCR 判別での成功率は、属判別 (Step 1) で 85% (591/696)、フナ属魚類の種判別 (Step 2) で 79% (416/525)、コイ属魚類の種判別 (Step 3) で 81% (39/48)、タモロコ属魚類の種判別 (Step 4) で 39% (7/18) であり、最後のタモロコ属魚類の判別以外は約 80% かそれ以上の高率で成功した。一方、核ゲノムのマイクロサテライト多型解析によるゲノム倍数性判定 (Step 6) では、525 個のうち半分近く (47%) の 248 個は、ニゴロブナ・ギンブナのどちらか判別できなかった。核ゲノムの倍数性判定の成功率がミトコンドリアゲノムを対象とする上述の方法と比べて低いという結果は、先行研究 (馬淵ほか, 2019, 2021) でも見られているが、おそらく対象とする DNA 領域の細胞あたりのコピー数が核ゲノムではミトコンドリアゲノムに比べて格段に少ないことが影響していると考えられる。

フナ属魚類による水田地帯とその周辺の産卵場所利用 今回解析に成功した卵 591 個の約 90% はフナ属魚類のものであった。また、そのうち種・亜種まで判別できた卵 277 個の約 80% はニゴロブナ、残りの約 20% はギンブナの卵で、ゲンゴロウブナの卵は一つも検出されなかった。この結果から、琵琶湖周辺の水田地帯の排水路系は、ニゴロブナとギンブナに産卵場所として利用されている一方、ゲンゴロウブナには利用されていない状況が示された。このような各魚種の産着卵の分布状況は、本論文の導入部で紹介した細谷 (2005) などが定性的に示したフナ属魚類 3 種・亜種の琵琶湖からの遡上傾向と非常によく一致している。このことから、今回の論文で示した分布データは、魚種間の産卵場所の違いを具体的に示す実証データとして非常に貴重だといえる。

今回調査を行った丁野木川水路系 (Fig. 3B) に関しては、その本流である丁野木川の 1 支流、益田川 (Fig. 3B の赤星印) と、本流の河口外にある湖岸の造成ヨシ帯 (Fig. 3B の橙星印) で今回の調査と同じ手法による先行研究がある (馬淵ほか, 2019, 2021)。それらの報告によると、湖岸の造成ヨシ帯のとくに開放水面ではゲンゴロウブナの卵が優占している一方で、上流の益田川 (河口から 2 km 地点)

ではゲンゴロウブナの卵は全く検出されずにニゴロブナとギンブナの卵が検出されており、上述の細谷 (2005) のタイプ分けなどと整合したデータとなっている。

ニゴロブナ卵率と標高の関係 標高あるいは河口距離の区分ごとに産着卵の魚種組成を集計すると、標高が高いほど、また、河口から遠い区間ほど、ニゴロブナ卵のギンブナ卵に対する出現比率 (ニゴロブナ卵率) が高くなる傾向がみられた (Fig. 4A, B の円グラフ)。また、各卵群のニゴロブナ卵率と、その採集地点の標高あるいは河口距離との関係を解析した結果 (Fig. 5A–C) でも、Spearman の順位相関係数はどの水路系でも概ね 0.2 以上の正の値となり、上述の傾向と整合的だった。

Spearman の順位相関係数は、河口距離と標高のどちらでも、針江水路系、丁野木川水路系、江口川水路系の順番で小さい値になった。針江水路系 (Fig. 5A) では河口距離 $\rho=0.51$ 、標高 $\rho=0.50$ で、 $P<0.05$ の検定表からどちらも有意な値だったが、丁野木川水路系 (Fig. 5B) では、河口距離 $\rho=0.35$ 、標高 $\rho=0.30$ (標高が最も高いが標高値の精度が低い G2263 のデータを除くと $\rho=0.28$) で、どちらも有意ではなく、江口川水路系 (Fig. 5C) では、河口距離については負の値 $\rho=-0.64$ となり、標高については $\rho=0.26$ で、どちらも有意でなかった。卵群の探索・採集地点の河口距離・標高平面上の散布図 (Fig. 4A–C) を見ると、針江水路系、丁野木川水路系、江口川水路系はこの順番で水路系の勾配が緩くなっていることから、水路系の勾配が緩くなるほど卵群のニゴロブナ卵率の上述の傾向 (標高が上がるほど、河口から遠いほど高率の卵群が多くなる) は不明瞭になるといえるかもしれない。

ニゴロブナ卵率と水路系勾配とのこのような関係は、琵琶湖のギンブナがニゴロブナほど大きな季節的移動を行わず、「産卵期をも含めて終始岸近くのヨシなどが茂っているあたりに棲んでいる」 (滋賀県立琵琶湖文化館, 1980) という点を考慮すると納得しやすい。勾配が非常に緩やかな水路系の場合は、湖岸のヨシ帯内部と同じような緩やかな水流の環境が内陸奥深くまで続き、河口からある程度遠くてもギンブナの産卵範囲に入るだろう。今回調査を行った江口川水路系は、2 km 上流でもギンブナの卵が検出されており (Figs. 4C, 5C 左)、このケースに当てはまると推察される。この水路系の河口距離のプロットで相関係数が負の値 ($\rho=-0.64$) となった (Fig. 5C 左) 理由の一つも緩い勾配があると考えられる [データ数 (卵群数) が 7 と少なく、かつニゴロブナ/ギンブナの判別ができた卵も 15 個と少なかったことからくるデータの不確実性もあるだろう]。

なお、本調査で明らかになった「標高が高いほど、河口から遠い区間ほど、ニゴロブナ卵率が高くなる」という傾向は、針江水路系の月別・標高区間別の集計結果 (Fig.

6A, B) から判断して、どの月でも基本的に同じと考えて良さそうである。

ニゴロブナの産卵場所の範囲 今回の調査から、フナ属魚類 3 種・亜種の卵の中で最も上流まで分布するのはニゴロブナの卵だということが判明したが、この魚種の産着卵は標高で 88 m まで、河口距離で約 2.5 km までの範囲で検出された (Fig. 5A–C)。針江水路系と江口川水路系の調査では、上流の末端部（前者で標高約 88 m、河口距離約 1.3 km、後者で標高約 87 m、河口距離約 2.5 km）までニゴロブナの卵が検出されており、それ以上の標高・距離での産着卵の有無については検証できなかった。一方、丁野木川水路系は河口から約 2 km（標高 88.0 m）と約 2.5 km（標高 86.5 m）に水路の形状と横断構造物による大きな落差 (Fig. 3B の D1, D2) が存在するが、それを超える標高約 92 m、河口距離約 3 km までの調査を行った上で、大部分の卵の検出上限が標高 88 m、河口距離約 2.5 km という結果であった。なお、落差の上流でも少数ながら卵群が採集され、落差 D1 のすぐ上流で G2261–3 が採集されたが、これらの河口距離は約 2.0–2.2 km、標高は 87.7–89.0 m だった（ただし標高 89.0 m の標高値は低精度である）。以上から、今回得られたニゴロブナの産卵範囲「標高で 88 m まで、河口距離で約 2.5 km まで」は、遡上を阻害する条件がなければより広くなる可能性を残しているものの、長さや標高、勾配が異なる実際の水路系で確認された最低限の数値的な目安といえるだろう。なお、標高 88 m までという産卵範囲の上限は、琵琶湖の標準水面の標高が 84 m 強なので、湖面からの比高でいうと 4 m 弱になる。

琵琶湖周辺の水田地帯の末端排水路におけるニゴロブナの遡上範囲が地理的な位置情報とともにわかる先行研究としては、遡上親魚のモンドリ捕獲によって水路選択に関わる環境要因を調べた水野ほか (2010) の研究がある。この論文の Fig. 1 の地図に示されているモンドリの位置に基づいて本研究と同様の方法で各地点の標高と河口距離を推定すると、調査が行われた南湖東岸にある草津市の 1 水路では、親魚の遡上は標高 86 m、河口距離 1.6 km までで確認されていることになる。この調査では、これより上流での調査がないために遡上の上限は不明だが、確認された遡上範囲は本研究で明らかにした産卵範囲に収まっているので、少なくとも潜在的にはもう少し上流まで産着卵の分布はありそうである。

ニゴロブナの水田放流の影響 今回明らかになったフナ属魚類 3 種・亜種の産着卵の分布傾向は、細谷 (2005) などが定性的に提示した琵琶湖からの遡上傾向とよく一致しており、基本的には各種の産卵遡上の程度の違いで理解できると考えられる。しかし、ニゴロブナに関しては滋賀県によって水田への種苗放流が行われており (滋賀県水産振興協会, 2024)、最上流部の産着卵に関しては、これに

由来する河川残留個体 (その存在が標本やデータで示されているわけではないが) の卵である可能性も否定できない。今回調査を行った丁野木川水路系では、馬淵ほか (2019) の Fig.1 に示されているように、河口から約 2.2 km 上流の水田域にまで放流が行われており、この辺りまで産着卵が検出されている。このうち最上流部で確認された 3 つの卵群 (G2261–3) は、丁野木川本流にある大きな落差 (D1) より上流で採集されている。これらの親は、顕著な増水時に琵琶湖から遡上したものであると考えられるが、そうではなく生まれた時から上流部に残留している個体である可能性も現段階では否定できない。また、針江水路系でも過去にニゴロブナの種苗放流が行われており、その範囲は今回確認された最上流部の卵群 (G1651, 1897, 1889 など) の検出地点の約 100 m 下流 (河口から約 1.1 km) にまで及んでいる (中新井隆氏, 私信)。これらの卵も残留個体のものが含まれる可能性は否定できないが、周辺の水田を耕作する農家の方の話によると、フナを排水路で目にするのは産卵期のみであることから、多くは琵琶湖から遡上したものと推察される。

一般に、水田地帯の末端の排水路は、フナ属魚類の非繁殖期 (秋・冬期) には、(稲作の都合で) 水田に水が供給されないため、水深が非常に浅くなり、干上がることも多く、とくに成魚の生息は非常に難しい。例えば、琵琶湖から約 0.6–1.2 km の 3 地点で 3 年 (2015–2017 年) にわたって行われた末端排水路の調査 (藤岡, 2020) では、1.2 km より上流では 6 月にはすでに水深が 0 cm になり (0.9 km 地点の 6 月の水深は 10–20 cm 程)、0.6 km 地点も含めてニゴロブナ成魚の捕獲数は 6 月には 0 となった (4 月と 5 月には捕獲あり)。著者らの野外調査の経験では、幹線排水路や中小河川の上流部でも同様の状況である。このような時期には幹線排水路や中小河川の下流部に移動するしかないが、ここまでくると下流に向かう水の流れて琵琶湖に降るのは容易と推察される (大雨などの出水時には河川に止まる方が難しいと推察される)。一方、水田に放流されたニゴロブナ稚魚は、琵琶湖で捕獲される 0 歳魚の約 20% にも上る年があるほど多くの個体が琵琶湖まで流下している [耳石の ALC 標識放流調査による確認: 根本 (2009) など]。また、著者らによる親個体のテレメトリ調査では、河口から 1 km 以上離れた幹線排水路への琵琶湖からの (翌年の) 遡上回帰が確認されている (未発表)。これらの知見や上述の末端排水路の状況を考え合わせると、今回検出されたニゴロブナの産着卵の多くは、琵琶湖から遡上したのではないかと推察される。採集された卵のそれぞれが、河川残留個体、天然の遡上個体、放流種苗の回帰個体などいずれのものなのかを区別するのは現時点では不可能だが、今後はまず河川残留個体の存在そのものや、もし存在するとすれば、その出現頻度や産卵についての調査が必要である。

Table 1. Geographic data and search/collection date for egg search points (coded as X when no eggs were found) and collected egg populations (coded as Gnnnn when eggs were collected) with numbers of collected and DNA-analyzed eggs and species/subspecies composition.

Code	Search area	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Data source	Direct distance (m)	Date	Collected eggs	DNA-analyzed eggs	Species/subspecies composition										Sequenced eggs			Haplotype frequency				
										F2	F3	FX	FG	F	KW	KD	K	MH	MT	M	W	?	FX1	FX2	FX3		
G1468	A	35°22'14.167"	136°02'49.657"	84.7	DEM5A	142.24	14-Apr-20	14	8	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	
G1892	A	35°22'15.967"	136°02'46.122"	84.9	DEM5A	217.916	21-Apr-20	27	8	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
G1854	A	35°22'11.698"	136°02'53.041"	85	DEM5A	143.776	21-May-20	69	8	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	
G1885	A	35°22'11.636"	136°02'52.922"	85	DEM5A	146.468	16-Jun-20	24	8	0	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0	2	
G1469	A	35°22'11.618"	136°02'48.872"	85	DEM5A	203.769	14-Apr-20	9	8	0	0	0	0	0	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1471	A	35°22'05.700"	136°02'46.795"	85	DEM5A	379.465	14-Apr-20	15	8	0	0	0	0	0	5	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	X	35°22'11.723"	136°02'52.908"	85.1	DEM5A	144.211	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1891	A	35°22'16.698"	136°02'46.475"	85.1	DEM5A	209.696	21-Apr-20	60	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	0	0	
G2018	A	35°22'14.909"	136°02'45.618"	85.1	DEM5A	233.614	7-May-20	17	8	0	0	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1470	A	35°22'08.011"	136°02'47.573"	85.1	DEM5A	309.488	14-Apr-20	21	8	0	0	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	X	35°22'08.620"	136°02'47.746"	85.3	DEM5A	291.681	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1893	A	35°22'15.474"	136°02'40.945"	85.3	DEM5A	348.981	21-Apr-20	26	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	
G2019	A	35°22'14.333"	136°02'40.600"	85.4	DEM5A	361.564	7-May-20	23	8	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1883	A	35°22'10.546"	136°02'39.530"	85.4	DEM5A	421.182	16-Jun-20	46	8	2	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1894	A	35°22'08.173"	136°02'38.724"	85.4	DEM5A	473.522	21-Apr-20	21	8	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	3	0	0	
G1884	A	35°22'00.559"	136°02'45.244"	85.4	DEM5A	537.1	16-Jun-20	28	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7	
G2020	A	35°22'07.925"	136°02'38.641"	85.5	DEM5A	479.281	7-May-20	24	8	2	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
G1857	A	35°22'00.199"	136°02'45.236"	85.5	DEM5A	547.048	21-May-20	33	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	
G1858	A	35°22'05.916"	136°02'38.069"	85.6	DEM5A	526.011	21-May-20	49	8	2	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1859	A	35°22'08.731"	136°02'35.369"	85.6	DEM5A	540.019	21-May-20	38	8	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	0	
G1887	A	35°22'10.283"	136°02'34.469"	85.6	DEM5A	542.953	16-Jun-20	13	8	5	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	
G1654	A	35°22'10.081"	136°02'39.196"	85.7	DEM5A	434.827	1-Jul-20	29	8	2	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
G1653	A	35°22'13.681"	136°02'35.516"	85.9	DEM5A	491.353	1-Jul-20	50	8	1	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	
G1895	A	35°21'52.002"	136°02'42.367"	86	DEM5A	807.223	21-Apr-20	14	8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	1	0	1	0	
G1860	A	35°21'59.764"	136°02'35.959"	86.1	DEM5A	692.914	21-May-20	33	8	0	0	6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	4	0	0	0	
X	X	35°21'52.042"	136°02'42.292"	86.1	DEM5A	806.871	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1888	A	35°21'52.042"	136°02'42.256"	86.1	DEM5A	807.167	16-Jun-20	27	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
G1865	A	35°21'49.007"	136°02'41.482"	86.2	DEM5A	901.007	21-May-20	129	8	2	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	X	35°22'00.624"	136°02'34.678"	86.3	DEM5A	696.959	21-May-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1896	A	35°21'48.852"	136°02'41.449"	86.3	DEM5A	905.867	21-Apr-20	32	8	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	
X	X	35°21'53.406"	136°02'35.671"	86.4	DEM5A	850.372	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1898	A	35°21'53.338"	136°02'35.916"	86.5	DEM5A	848.6	21-Apr-20	21	8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	5	1	1	0	0
G1861	A	35°21'53.276"	136°02'35.812"	86.5	DEM5A	851.688	21-May-20	31	8	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	
G1866	A	35°21'44.568"	136°02'40.297"	86.5	DEM5A	1039.369	22-May-20	27	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1655	A	35°21'44.539"	136°02'40.218"	86.5	DEM5A	1040.944	1-Jul-20	44	8	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	
G1867	A	35°21'41.702"	136°02'39.530"	86.8	DEM5A	1129.088	22-May-20	38	8	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
X	X	35°21'53.435"	136°02'35.621"	86.9	DEM5A	850.58	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	X	35°21'53.363"	136°02'28.946"	86.9	DEM5A	957.854	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	X	35°21'47.610"	136°02'32.694"	86.9	DEM5A	1041.035	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1656	A	35°21'41.807"	136°02'39.433"	87	DEM5A	1126.764	1-Jul-20	10	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	
G1889	A	35°21'39.910"	136°02'38.890"	87	DEM5A	1186.464	21-Apr-20	23	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	X	35°21'54.601"	136°02'32.136"	87.1	DEM5A	875.702	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	X	35°21'54.511"	136°02'32.150"	87.1	DEM5A	877.643	21-May-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1862	A	35°21'54.076"	136°02'29.267"	87.4	DEM5A	936.135	21-May-20	18	8	2	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
X	X	35°21'46.663"	136°02'27.557"	87.5	DEM5A	1138.913	22-May-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1864	A	35°21'42.685"	136°02'31.031"	87.5	DEM5A	1192.44	21-May-20	25	8	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1652	A	35°21'46.822"	136°02'27.553"	87.6	DEM5A	1135.134	16-Jun-20	50	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	0	0	0	
X	X	35°21'46.566"	136°02'27.434"	87.6	DEM5A	1143.104	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	X	35°21'41.915"	136°02'30.984"	87.6	DEM5A	1213.912	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G1897	A	35°21'41.274"	136°02'30.689"	87.6	DEM5A	1234.681	21-Apr-20	24	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	

Table 1. Continued.

Code	Search area	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Data source	Direct distance (m)	Date	Collected eggs	DNA-analyzed eggs	Species/subspecies composition										Sequenced eggs	Haplotype frequency				
										F2	F3	FX	FG	F	KW	KD	K	MH	MT		M	W	?	FX1	FX2
G1651	A	35°21'40.918"	136°02'30.570"	87.7	DEM5A	1245.566	16-Jun-20	26	8	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
X	A	35°21'41.458"	136°02'26.077"	88.4	DEM5A	1291.044	22-May-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	A	35°21'41.404"	136°02'25.980"	88.4	DEM5A	1293.991	1-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'11.298"	136°12'30.960"	84.7	DEM5A	790.13	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'06.222"	136°12'34.909"	85	DEM5A	903.62	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'12.018"	136°12'32.465"	85.1	DEM5A	828.24	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2280	B	35°25'08.717"	136°12'53.208"	85.2	DEM5A	1353.84	21-Jun-20	20	8	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	
G2249	B	35°25'35.238"	136°12'58.252"	85.3	DEM5A	1651.98	15-Jun-20	29	8	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
X	B	35°25'15.229"	136°12'43.996"	85.4	DEM5A	1125.53	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2282	B	35°25'13.508"	136°12'57.575"	85.4	DEM5A	1462.98	21-Jun-20	27	8	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
X	B	35°25'14.027"	136°12'44.597"	85.5	DEM5A	1137.28	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'19.596"	136°12'46.703"	85.5	DEM5A	1214.25	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2273	B	35°25'34.781"	136°12'48.402"	85.5	DEM5A	1426.65	20-Jun-20	32	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'17.605"	136°12'56.124"	85.5	DEM5A	1437.93	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2248	B	35°25'34.460"	136°12'57.463"	85.5	DEM5A	1623.48	15-Jun-20	33	8	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	
G2274	B	35°25'36.538"	136°12'56.466"	85.5	DEM5A	1630.62	20-Jun-20	14	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	
G2283	B	35°25'18.174"	136°13'04.742"	85.5	DEM5A	1655.77	21-Jun-20	15	8	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	
G2276	B	35°25'19.481"	136°12'34.736"	85.6	DEM5A	920.41	20-Jun-20	12	8	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
G2277	B	35°25'22.123"	136°12'44.788"	85.6	DEM5A	1186.56	20-Jun-20	17	8	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
G2281	B	35°25'16.838"	136°12'56.174"	85.6	DEM5A	1436.18	21-Jun-20	15	8	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
G2250	B	35°25'41.520"	136°12'49.720"	85.6	DEM5A	1568.98	15-Jun-20	35	8	2	1	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2251	B	35°25'41.434"	136°12'53.615"	85.6	DEM5A	1647.46	15-Jun-20	25	8	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'20.222"	136°13'04.051"	85.6	DEM5A	1647.82	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°24'59.080"	136°12'36.943"	85.7	DEM5A	1013.92	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2278	B	35°25'14.088"	136°12'45.043"	85.7	DEM5A	1148.48	21-Jun-20	13	8	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0	2	
X	B	35°25'21.904"	136°12'49.716"	85.7	DEM5A	1304.7	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2247	B	35°25'34.043"	136°12'56.653"	85.7	DEM5A	1599.44	15-Jun-20	24	8	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	
X	B	35°25'17.378"	136°13'13.984"	85.7	DEM5A	1884.65	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'16.450"	136°13'14.372"	85.7	DEM5A	1891.84	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'07.090"	136°12'46.343"	85.8	DEM5A	1185.36	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'35.173"	136°12'58.295"	85.8	DEM5A	1651.93	8-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2252	B	35°25'41.999"	136°12'56.642"	85.8	DEM5A	1720.75	15-Jun-20	24	8	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'18.268"	136°13'13.703"	85.8	DEM5A	1880.54	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'13.753"	136°13'15.247"	85.8	DEM5A	1908.91	18-Jul-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'34.756"	136°12'57.856"	85.9	DEM5A	1636.6	8-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'35.652"	136°12'58.835"	85.9	DEM5A	1670.72	8-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'13.901"	136°13'15.262"	85.9	DEM5A	1909.35	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'03.734"	136°12'47.066"	86	DEM5A	1219.27	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2279	B	35°25'15.856"	136°12'51.930"	86	DEM5A	1326.51	21-Jun-20	9	8	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	1	0	
G2253	B	35°25'44.533"	136°12'59.893"	86	DEM5A	1832.2	15-Jun-20	25	8	3	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
G2284	B	35°25'20.744"	136°13'12.832"	86	DEM5A	1869.02	21-Jun-20	15	8	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	4	2	2	0	0	
G2264	B	35°25'44.897"	136°13'01.618"	86	DEM5A	1874.83	16-Jun-20	9	8	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2275	B	35°25'30.529"	136°12'52.956"	86.1	DEM5A	1469.49	20-Jun-20	22	8	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	1	
X	B	35°25'14.624"	136°13'18.502"	86.1	DEM5A	1992.02	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2254	B	35°25'51.136"	136°13'18.766"	86.4	DEM5A	1911.96	15-Jun-20	20	8	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	
G2257	B	35°25'46.290"	136°13'07.817"	86.4	DEM5A	2029.53	15-Jun-20	30	8	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
X	B	35°25'44.382"	136°13'14.164"	86.4	DEM5A	2138.07	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X	B	35°25'33.265"	136°13'08.425"	86.5	DEM5A	1862.42	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2265	B	35°25'37.733"	136°13'16.475"	86.5	DEM5A	2102	16-Jun-20	11	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2258	B	35°25'47.244"	136°13'12.446"	86.5	DEM5A	2144.37	15-Jun-20	23	8	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	
X	B	35°25'57.234"	136°12'52.294"	86.7	DEM5A	1940.36	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2272	B	35°25'34.777"	136°13'17.299"	86.7	DEM5A	2088.15	20-Jun-20	19	8	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	1	0	
X	B	35°25'36.458"	136°13'16.658"	86.7	DEM5A	2091.62	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1. Continued.

Code	Search area	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Data source	Direct distance (m)	Date	Collected eggs	DNA-analyzed eggs	Species/subspecies composition										Sequenced eggs			Haplotype frequency		
										F2	F3	FX	FG	F	KW	KD	K	MH	MT	M	W	?	FX1	FX2	FX3
X	B	35°25'48.367"	136°13'31.001"	86.7	DEM5A	2571.87	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2256	B	35°25'53.389"	136°13'06.740"	86.8	DEM5A	2131.98	15-Jun-20	8	8	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
X	B	35°25'52.043"	136°13'11.557"	86.8	DEM5A	2205.81	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'47.014"	136°13'18.005"	86.8	DEM5A	2261.99	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'58.091"	136°12'54.068"	86.9	DEM5A	1990.47	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2255	B	35°25'52.918"	136°13'04.253"	87	DEM5A	2073.47	15-Jun-20	21	8	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
X	B	35°25'38.374"	136°13'20.762"	87	DEM5A	2209.55	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'54.354"	136°13'10.780"	87	DEM5A	2231.21	15-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'44.245"	136°13'18.876"	87	DEM5A	2241.66	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'53.342"	136°13'06.456"	87.1	DEM5A	2125.44	15-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'56.406"	136°13'10.207"	87.1	DEM5A	2258.15	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'47.370"	136°13'22.508"	87.1	DEM5A	2367.24	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'46.855"	136°13'31.231"	87.1	DEM5A	2556.8	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'03.242"	136°12'50.778"	87.2	DEM5A	2055.13	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'04.376"	136°12'49.532"	87.2	DEM5A	2063.22	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'56.244"	136°12'53.064"	87.3	DEM5A	1931.73	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'04.556"	136°12'51.487"	87.3	DEM5A	2098.07	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'53.249"	136°13'06.064"	87.3	DEM5A	2115.75	15-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'47.287"	136°13'31.426"	87.3	DEM5A	2567.05	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'50.318"	136°13'30.320"	87.3	DEM5A	2583.9	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'05.226"	136°12'53.816"	87.4	DEM5A	2151.11	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'41.477"	136°13'32.999"	87.4	DEM5A	2531.81	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'45.228"	136°13'23.246"	87.5	DEM5A	2353.74	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'00.366"	136°13'11.971"	87.5	DEM5A	2369.23	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'40.346"	136°13'33.420"	87.5	DEM5A	2529.14	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'04.783"	136°12'51.091"	87.6	DEM5A	2097.12	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2261	B	35°26'00.283"	136°13'03.374"	87.7	DEM5A	2204.61	16-Jun-20	25	8	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
G2262	B	35°26'00.582"	136°13'05.448"	87.7	DEM5A	2249.38	16-Jun-20	16	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'45.138"	136°13'36.286"	87.7	DEM5A	2651.44	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'01.486"	136°13'09.134"	87.8	DEM5A	2337.19	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'47.928"	136°13'29.762"	87.9	DEM5A	2537.82	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'01.036"	136°13'07.014"	88	DEM5A	2288.05	16-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'39.126"	136°13'42.812"	88.1	DEM5A	2740.01	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'49.397"	136°13'39.641"	88.1	DEM5A	2782.1	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'10.680"	136°12'56.398"	88.2	DEM5A	2322.85	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'09.913"	136°12'47.876"	88.3	DEM5A	2177.19	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'39.540"	136°13'42.856"	88.3	DEM5A	2745.18	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'38.633"	136°13'40.271"	88.4	DEM5A	2674.33	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'35.684"	136°13'44.137"	88.4	DEM5A	2740.91	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'37.049"	136°13'43.756"	88.4	DEM5A	2743.59	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'59.257"	136°13'34.338"	88.4	DEM5A	2808.67	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'57.940"	136°13'36.890"	88.4	DEM5A	2842.82	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'06.850"	136°13'01.488"	88.5	DEM5A	2315.58	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'40.991"	136°13'51.676"	88.5	DEM5A	2970.5	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'14.284"	136°13'04.552"	88.6	DEM5A	2538.65	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'59.387"	136°13'35.303"	88.6	DEM5A	2831.39	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'39.385"	136°13'51.884"	88.6	DEM5A	2960.53	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'42.643"	136°13'50.812"	88.6	DEM5A	2965.77	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'38.384"	136°13'52.194"	88.7	DEM5A	2959.1	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°25'45.314"	136°13'49.944"	88.7	DEM5A	2972.99	21-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2263	B	35°25'57.868"	136°12'52.909"	89	DEM10B	1965.45	16-Jun-20	19	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'27.992"	136°12'38.326"	89.2	DEM5A	2556.22	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'27.416"	136°12'42.127"	89.2	DEM5A	2578.34	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1. Continued.

Code	Search area	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Data source	Direct distance (m)	Date	Collected eggs	DNA-analyzed eggs	Species/subspecies composition										Sequenced eggs			Haplotype frequency		
										F2	F3	FX	FG	F	KW	KD	K	MH	MT	M	W	?	FX1	FX2	FX3
X	B	35°26'20.303"	136°13'11.302"	89.4	DEM5A	2790.26	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'19.396"	136°12'53.496"	89.5	DEM5A	2499.36	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'29.656"	136°12'41.360"	89.5	DEM5A	2633.46	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'28.136"	136°12'45.598"	89.5	DEM5A	2635.84	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'20.339"	136°13'02.190"	89.5	DEM5A	2648.17	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'24.086"	136°13'09.984"	89.9	DEM5A	2859.45	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'10.028"	136°12'56.761"	90	DEM10B	2312.75	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'10.594"	136°12'57.776"	90	DEM10B	2342.3	20-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'30.361"	136°13'08.036"	90.7	DEM5A	2984.81	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'29.807"	136°12'50.260"	91	DEM5A	2735.02	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X	B	35°26'33.896"	136°12'57.834"	91.3	DEM5A	2937.69	23-Jun-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2907	C	35°07'38.795"	136°00'19.912"	84.8	DEM5A	890.206	7-Jun-22	20	8	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0
x	C	35°07'52.720"	136°00'28.130"	84.8	DEM5A	441.869	8-Jun-22	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2908	C	35°07'33.204"	136°00'16.949"	85.1	DEM5A	1074.973	7-Jun-22	20	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2920	C	35°07'49.778"	136°00'28.048"	85.1	DEM5A	532.296	8-Jun-22	16	8	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	1	0	0
G2909	C	35°07'26.533"	136°00'12.085"	85.3	DEM5A	1306.085	7-Jun-22	20	8	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
x	C	35°07'25.169"	136°00'07.981"	85.3	DEM5A	1379.481	8-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'30.767"	136°00'12.640"	85.3	DEM5A	1177.363	8-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2910	C	35°07'23.909"	136°00'09.979"	85.5	DEM5A	1399.228	7-Jun-22	20	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2911	C	35°07'20.852"	136°00'07.477"	85.5	DEM5A	1508.898	7-Jun-22	20	8	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
G2913	C	35°07'15.161"	136°00'03.074"	85.5	DEM5A	1712.01	7-Jun-22	15	8	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2917	C	35°07'01.909"	135°59'53.318"	85.5	DEM5A	2183.258	7-Jun-22	18	8	0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
G2921	C	35°07'17.728"	136°00'06.696"	85.5	DEM5A	1606.211	8-Jun-22	25	8	1	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
G2922	C	35°07'15.604"	136°00'10.580"	85.5	DEM5A	1640.473	8-Jun-22	23	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
x	C	35°07'14.408"	136°00'12.683"	85.5	DEM5A	1663.344	8-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'28.387"	136°00'16.938"	85.5	DEM5A	1219.362	8-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'29.064"	136°00'15.710"	85.5	DEM5A	1206.362	8-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2912	C	35°07'18.077"	136°00'05.310"	85.6	DEM5A	1607.827	7-Jun-22	22	8	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
G2914	C	35°07'12.911"	135°59'56.199"	85.6	DEM5A	1793.801	7-Jun-22	20	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
G2925	C	35°07'06.776"	135°59'56.695"	85.6	DEM5A	2011.704	10-Jun-22	15	8	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
G2928	C	35°07'08.040"	136°00'08.737"	85.6	DEM5A	1877.656	10-Jun-22	18	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'06.935"	135°59'56.375"	85.6	DEM5A	2010.671	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'08.252"	135°59'53.876"	85.6	DEM5A	1999.073	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'14.174"	135°59'58.016"	85.6	DEM5A	1789.515	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'19.063"	136°00'04.201"	85.6	DEM5A	1589.62	8-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'22.933"	136°00'12.110"	85.6	DEM5A	1412.369	8-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'00.905"	135°59'52.364"	85.7	DEM5A	2221.46	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'01.790"	135°59'50.687"	85.7	DEM5A	2213.666	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'07.370"	136°00'10.678"	85.7	DEM5A	1886.128	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'12.997"	136°00'00.198"	85.7	DEM5A	1800.698	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2916	C	35°07'05.506"	135°59'56.184"	85.8	DEM5A	2052.898	7-Jun-22	12	8	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0
G2918	C	35°06'57.780"	135°59'50.053"	85.8	DEM5A	2332.992	7-Jun-22	8	8	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
x	C	35°06'55.742"	136°00'02.030"	85.8	DEM5A	2288.188	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'00.473"	135°59'53.106"	85.8	DEM5A	2226.184	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'11.748"	136°00'02.254"	85.8	DEM5A	1817.665	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2919	C	35°06'56.052"	135°59'48.523"	85.9	DEM5A	2397.449	7-Jun-22	20	8	0	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
G2927	C	35°07'11.150"	136°00'03.460"	85.9	DEM5A	1824.669	10-Jun-22	12	8	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
x	C	35°06'53.183"	135°59'46.424"	85.9	DEM5A	2499.938	7-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°06'53.680"	135°59'50.359"	85.9	DEM5A	2446.115	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°06'54.418"	135°59'47.368"	85.9	DEM5A	2455.205	7-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°06'55.098"	135°59'47.821"	85.9	DEM5A	2431.418	7-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°06'52.466"	135°59'52.710"	86	DEM5A	2458.834	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°06'56.077"	135°59'45.881"	86	DEM5A	2424.722	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1. Continued.

Code	Search area	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Data source	Direct distance (m)	Date	Collected eggs	DNA-analyzed eggs	Species/subspecies composition										Sequenced eggs			Haplotype frequency		
										F2	F3	FX	FG	F	KW	KD	K	MH	MT	M	W	?	FX1	FX2	FX3
x	C	35°06'58.345"	135°59'41.899"	86.1	DEM5A	2408.207	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°07'02.802"	135°59'48.692"	86.1	DEM5A	2207.355	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°06'59.090"	135°59'55.554"	86.2	DEM5A	2242.591	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2915	C	35°07'09.545"	135°59'58.823"	86.3	DEM5A	1912.621	7-Jun-22	20	8	2	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
x	C	35°06'51.322"	135°59'54.845"	86.5	DEM5A	2473.579	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
x	C	35°06'57.031"	135°59'43.940"	86.6	DEM5A	2420.206	10-Jun-22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total								2159	696	220	57	248	0	0	19	20	9	7	0	11	0	105	85	8	13

Search area codes correspond to those in figure 1. Data source for altitude is digital elevation model based on aerial laser surveys (DEM5A) or that based on photogrammetry (DEM10B). In the results of DNA analyses, species/subspecies are indicated by codes shown in figures 2 and 4. About 40% of the eggs identified as FX (*Carassius* spp., 2n/3n unidentified) were identified by mtDNA sequencing. Number of the sequenced eggs and frequency of the obtained haplotypes are shown on the right side of the table. Three haplotypes (FX1, 2, 3) were detected from 106 *Carassius* eggs, which are deposited in DDBJ as accession nos. LC795716–8.

謝 辞

「水土里ネットしんあさひ」の上原和男氏、「せせらぎの郷」の堀 彰男氏には野外調査における便宜を図っていただいた。滋賀県水産振興協会の中井隆氏には、水田地帯への種苗放流の情報を提供していただいた。滋賀県琵琶湖環境科学研究センターにはシーケンサーを使用させていただいた。本研究の一部は、滋賀県委託研究費「湖沼の生態系の評価と管理・再生に関する調査研究 (OS2020RR2)」および「在来魚の生息状況に関する調査研究業務 (OS2021RR2, OS2022RR2, OS2023RR2)」の援助を受けた。卵の採集は滋賀県特別採捕許可 (特第 31-87, 3-87) を得て行った。

引用文献

- Atsumi, K., H.-Y. Song, H. Senou, K. Inoue and K. Mabuchi. 2016. Morphological features of an endangered Japanese strain of *Cyprinus carpio*: reconstruction based on seven SNP markers. *Journal of Fish Biology*, 90: 936–953.
- 藤岡康弘. 2013. 琵琶湖固有 (亜) 種ホンモロコおよびニゴロブナ・ゲンゴロウブナ激減の現状と回復への課題. *魚類学雑誌*, 60: 57–63. [URL](#)
- 藤岡康弘・片岡佳孝・大植伸之・米田一紀・根本守仁・亀甲武志. 2020. 琵琶湖周辺水田の小水路におけるニゴロブナの産卵繁殖. *滋賀県水産試験場研報*, 56: 1–10. [URL](#)
- 細谷和海. 2005. 琵琶湖の淡水魚の回遊様式と内湖の役割, pp. 118–125. 西野麻知子・浜端悦治 (編) 内湖からのメッセージ 琵琶湖周辺の湿地再生と生物多様性保全. サンライズ出版, 彦根.
- 細谷和海. 2013. コイ科, pp. 308–327, 1813–1819. 中坊徹次 (編) 日本産魚類検索 全種の同定 第3版. 東海大学出版会, 秦野.
- 市原清志. 1990. バイオサイエンスの統計学 正しく活用するための実践理論. 南江堂, 東京. 378 pp.
- 環境省. 2020. 環境省レッドリスト 2020. [URL](#) (22 Jan. 2024)
- 亀甲武志. 2019. フナ類, pp. 1–3. 水田地域における生態系保全のための技術指針 Ver.1.0. (2019.9.30) (前半). [URL](#) (3 Mar. 2024)
- Mabuchi, K. 2016. A method for PCR-based identification of fish eggs attached to vegetation in Lake Biwa, Japan. *Conservation Genetics Resources*, 8: 215–217.
- 馬淵浩司・松崎慎一郎. 2017. 日本の自然水域のコイ：在来コイの現状と導入コイの脅威. *魚類学雑誌*, 64: 213–218. [URL](#)
- 馬淵浩司・西田一也. 2023. 琵琶湖・北湖の北岸の礫浜で検出されたカマツカの産着卵. *魚類学雑誌*, doi.org/10.11369/jji.23-001 (May 2023), 70: 199–204 (Nov. 2023).
- 馬淵浩司・西田一也・吉田 誠. 2019. 琵琶湖流入河川・丁野木川の人工護岸支流におけるホンモロコ・ニゴロブナ・在来コイの産卵：産着卵のDNA 種判別にもとづく知見. *魚類学雑誌*, doi: 10.11369/jji.19-012 (Aug. 2019), 66: 237–243 (Nov. 2019).
- 馬淵浩司・西田一也・吉田 誠. 2020. マルチプレックス PCR 法を用いた琵琶湖水系産タモロコ属 2 種のミトコンドリア DNA の簡易識別法：手法開発と南湖の産着卵への適用. *魚類学雑誌*, doi: 10.11369/jji.19-033 (Mar. 2020), 67: 51–65 (Apr. 2020).
- 馬淵浩司・西田一也・吉田 誠. 2021. 琵琶湖・早崎内湖干拓地外の造成ヨシ帯におけるゲンゴロウブナ (コイ科フナ属) の産卵：産着卵のDNA 種判別にもとづく確認. 伊豆沼・内沼研究報告, 15: 31–45. [URL](#)
- 馬淵浩司・西田 睦. 2006. PCR 法を用いた琵琶湖産野生型コイのミトコンドリア DNA の簡易識別法. *水産育種*, 35: 19–23.
- 前畑政善. 2001. 魚類, pp. 116–128. 滋賀自然環境研究会 (編) 滋賀の田園の生き物. サンライズ出版, 彦根.
- Mishina, T., M. Takada, H. Takeshima, M. Nakano, R. Tabata, M. Nishida and K. Watanabe. 2014. Molecular identification of species and ploidy of *Carassius* fishes in Lake Biwa, using mtDNA and microsatellite multiplex PCRs. *Ichthyological Research*, doi: 10.1007/s10228-014-0388-9 (Jan. 2014), 61: 169–175 (Apr. 2014).

- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2: 150088. [URL](#)
- 水野敏明・大塚泰介・金尾滋史・小川雅広・舟尾俊範・前畑政善. 2010. 水田地帯へ遡上するニゴロブナの水路選択に関わる環境要因. *魚類学雑誌*, 52: 135–142. [URL](#)
- 中山広樹・西方敬人. 1995. 細胞工学別冊 目で見る実験ノートシリーズ バイオ実験イラストレイテッド 1 分子生物学実験の基礎. 秀潤社, 東京. 184 pp.
- 根本守仁. 2009. 水田を利用したニゴロブナ種苗生産. 豊田市矢作川研究所月報 *Rio*, 2009.8 No.133. [URL](#)
- 西田一也・馬淵浩司. 2020. 湖魚の産卵場としての琵琶湖沿岸の水田地帯：その現状とモニタリング手法の開発. *地球環境*, 25: 53–64.
- 西田一也・馬淵浩司・吉田 誠. 2022. 琵琶湖北東部に流入する改修済み幹線排水路・中小河川におけるコイ科魚類の産着卵の出現状況. *農業農村工学会論文集*, 314: IV_9–IV_12. [URL](#)
- 大沼芳幸. 2017. 琵琶湖八珍 湖魚の宴 絶品メニュー. 海青社, 大津. 196 pp.
- 大塚泰介. 2012. ニゴローの大冒険：フナから見た田んぼの生きものにぎわい：琵琶湖博物館第 20 回企画展示. 滋賀県立琵琶湖博物館, 草津. 77 pp.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. [URL](#) (22 Jan. 2024)
- 瀬口眞司. 2016. 琵琶湖に眠る縄文文化 粟津湖底遺跡. 新泉社, 東京. 93 pp.
- 滋賀県立琵琶湖文化館. 1980. 湖国びわ湖の魚たち. 第一法規出版, 東京. 177 pp.
- 滋賀県水産振興協会. 2024. ニゴロブナ. [URL](#) (3 Mar. 2024)