

博士論文

日本産土壌性 *Mundochthonius* 属の分類学的研究

(カニムシ目：ツチカニムシ科)

Taxonomic Study of Japanese Soil-Dwelling *Mundochthonius*

(Pseudoscorpiones: Chthoniidae)

平成 30 年 3 月

大平 創

福島大学大学院共生システム理工学研究科

指導教員 塘 忠顕

福島大学共生システム理工学類

目 次

要旨 Abstract	1
第 1 章 序論	
Introduction	6
第 2 章 小型カニムシ類の付属肢を用いた迅速・安価な DNA 抽出法	
A rapid and low-cost protocol for DNA extraction from small-sized pseudoscorpion appendages	20
第 3 章 分子系統解析および形態解析によって明らかになった日本産 <i>Mundochthonius</i> 属カニムシ（カニムシ目：ツチカニムシ科）の想定外の 種多様性	
Unexpected species diversity within Japanese <i>Mundochthonius</i> pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) and the necessity for improved species diagnosis revealed by molecular and morphological examination	41
第 4 章 日本産 <i>Mundochthonius</i> 属カニムシ種の形態形質の多変量解析	
A multivariate analysis of morphological characteristics among Japanese <i>Mundochthonius</i> pseudoscorpion species	88
第 5 章 日本産 <i>Mundochthonius</i> 属の新 3 種	
Three new species of the genus <i>Mundochthonius</i> form Japan	113
第 6 章 総合考察	
General Discussion	135
謝辞 Acknowledgement	156

第1章 序論

土壌の多様な生態系機能やサービスは、各土壌動物群と関連付けられる。土壌の生物多様性、特に分類学的な多様性は十分に解明されておらず、多くの隠蔽種や未記載種が存在する。種の分類は自然史研究の基本的な目標のひとつであると共に、生物多様性の保全、生態系サービスや資源の持続可能な利用のために不可欠である。

カニムシ類（鋏角亜門：クモガタ綱：カニムシ目）は、中型土壌動物群を代表する分類群のひとつである。カニムシ類は、病害虫のコントロールや生物指標として注目されつつある。近年の分子系統解析を用いた研究は、多くの隠蔽種あるいは未記載種の存在を示唆している。一方で、必ずしも信頼できない伝統的な診断形質によって種を識別している現在の種分類は、多くのカニムシ類の種における分類学的位置付けに疑問を与えている。

カニムシ類の種分類における伝統的な研究手法は、分子データを活用した現代的な動物分類学研究の手法を取り入れ、再構築されなくてはならない。本研究はカニムシ類の種分類の再構築を目指し、特定のカニムシ種群において、(1) 遺伝的グループを認識した上で、(2) 遺伝的グループに基づいた形態形質の解析や診断形質の評価を行い、(3) 種の形態的特徴や多様性を記載する、という研究プロセスを実践した。また、低コストでカニムシ類の DNA 抽出と形態情報の取得を両立した方法の確立も行った。研究材料には日本産土壌性 *Mundochthonius* 属カニムシ類を採用した（図 1）。このグループは、最も小型なカニムシ類のひとつであり、カニムシ類の種分類の典型的な問題を抱えている分類群である。また、未記載種の存在も示唆されており、潜在的な種多様性はこれまで考えられていたより高い可能性がある。そのため、モデル研究の対象

として好適である。

第 2 章 小型カニムシ類の付属肢を用いた迅速・安価な DNA 抽出法

カニムシ類の DNA 抽出と、プレパラート標本を作成し、証拠標本の保持と形態形質情報の取得を両立する方法を考案した。本方法は、異なる系統に属する小型カニムシ類 2 種、*Mundochthonius japonicus* (ツチカニムシ亜目：ツチカニムシ科) と *Microbisium pygmaeum* (カニムシ亜目：コケカニムシ科) を材料に考案され、両種とも標的遺伝子座の PCR 増幅、塩基配列の決定に成功した。このことから、本方法は広いカニムシ分類群に応用可能であると考えられる。また、既存の方法より低コストかつ短時間で DNA 抽出することを可能にするため、多数のサンプルを解析する場合に特に有用である。

第 3 章 分子系統解析および形態解析によって明らかになった日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ (カニムシ目：ツチカニムシ科) の想定外の種多様性

必ずしも信頼できない伝統的な診断形質によって識別されている日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ類の分子系統解析および形態解析を行った。日本産 3 種、*M. japonicus*, *M. kiyoshii*, *M. itohi* の基準産地を含む日本の広範囲から採集した標本を用い、ミトコンドリア DNA *COI* および核 DNA *18S rRNA* 遺伝子の部分配列に基づく分子系統解析を行った結果、7 つの主要な遺伝的クレードが存在することが明らかとなった (図 2)。また、塩基配列の差異や種の区切り解析の結果を踏まえると、7 つのクレードはそれぞれ別種に相当すると考えられた。そのうち 3 クレードは既知種に対応し、残りの 4 クレードはそれぞれ隠蔽種あるいは未記載種であると考えられた。しかしながら、これらを伝統的な診断形質によって識別することは困難であり、遺伝的グループに基づいて形態形質を精

査する必要性が示唆された。

第4章 日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ種の形態形質の多変量解析

遺伝的グループが認識可能な分類群において、多変量解析は種の有用な診断形質を探索する際に有効である。そこで日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ類の種に相当する7つの遺伝的クレードについて83の量的形態形質に基づいた判別分析を行った。その結果、量的形態形質による遺伝的クレードの判別率は低かった。また、一部の量的形態形質は特定のクレード間で有意に異なっていたが、種間で範囲が重複しており、種を明確に識別するためには十分な診断形質とは言えなかった。これらの結果は、量的形態形質によってカニムシ種を識別することの困難さを示唆する一方で、診断形質として質的形態形質の重要性を強調した。

第5章 日本産 *Mundochthonius* 属の新3種

日本産 *Mundochthonius* 属標本の形態形質の精査を行い、3種 *M. longisetosus* sp. nov., *M. aizuensis* sp. nov., *M. sakayorii* sp. nov. を記載した。これらの種は、腹部背板の刺毛の長さ、瘤状紡角の有無、頭胸部腹面前縁の歯の形状および缺角固定指内歯のタイプ等の質的な診断形質によって相互に識別され、また同属既知種からも識別される。さらに、これらの形質に基づいた日本産 *Mundochthonius* 属種および亜種の検索表を示した。

第6章 総合考察

現代的な動物分類学研究の手法を取り入れたカニムシ類の種分類について、量的形態形質と質的形態形質の関係を踏まえたうえで、カニムシ類の「亜種」

の分類学的取扱い，および種概念におけるカニムシ類の「種」について総合的に議論した．現代的なカニムシ類の種分類による他分野への貢献が期待される．

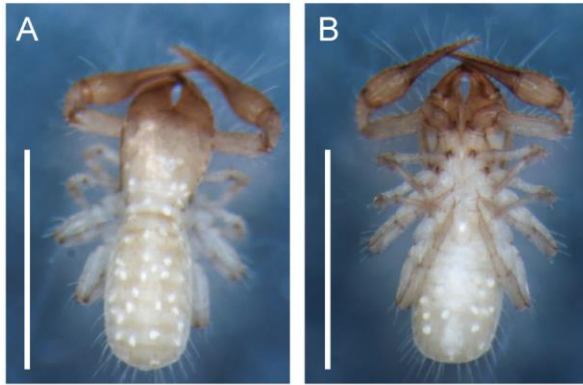


図 1. *Mundochthonius japonicus*

A, 背面 ; B, 腹面. スケールは 1 mm.

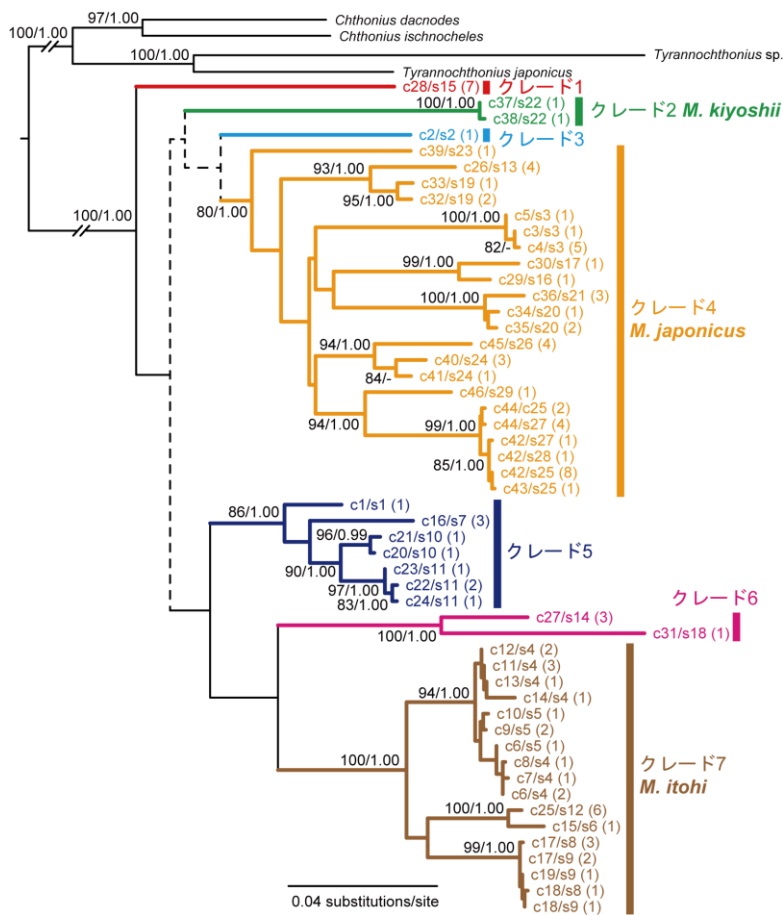


図 2. ミトコンドリア DNA COI と核 DNA 18S rRNA 遺伝子の部分配列に基づいた日本産 *Mundochthonius* 属の分子系統樹

第 1 章

序論

Introduction

土壌は多様な生態系機能をもち、我々は多くの生態系サービスや資源を土壌から享受している (Brussaard 2012; Orgiazzi *et al.* 2016). 土壌の多様な生態系機能は特定の土壌動物群 (大型-, 中型-, 小型土壌動物群, バクテリア類, 菌類, 古細菌等) と関連付けられる (Brussaard 2012; Orgiazzi *et al.* 2016). 従って, 土壌の生態系機能およびサービスは, 土壌の生物多様性に依存している (Lavelle 1996; Brussaard 1997, 2012; Wolters 2001; Lavelle *et al.* 2006; Brussaard *et al.* 2007; Orgiazzi *et al.* 2016). しかしながら, 土壌の生物多様性, 特に土壌生物の種多様性は十分に解明されておらず, 多くの隠蔽種や未記載種の存在が示唆されている (Dance 2008; Rougerie *et al.* 2009; Decaëns 2010). 種の分類は自然史研究の基本的な目標のひとつであると共に, 生物多様性の保全, 生態系サービスや資源の持続可能な利用のために不可欠であるとされる (Bickford *et al.* 2006; Decaëns *et al.* 2008; Decaëns 2010; Wagg *et al.* 2014).

カニムシ類 (鋏角亜門: クモガタ綱: カニムシ目) は, 中型土壌動物群を代表する分類群のひとつであり, 重要な生態系機能を担うだけでなく, 生物資源として潜在的な有用性も持っている. カニムシ類は肉食で, 主に他の小型節足動物類を餌とする捕食者である (Weygoldt 1969). そのため, カツオブシムシ類の幼虫, アリ類, ダニ類, チャタテムシ類等の病害虫の防除に寄与するとされる (Orgiazzi *et al.* 2016). 一部のカニムシ種は, ミツバチ類の病害虫 (ミツバチヘギイタダニ *Varroa destructor* とこれを媒介者とする病原ウイルス) をコントロールするための生物農薬として有望視されている (e.g. Rosenkranz *et al.* 2010; Fagan *et al.* 2012; Read *et al.* 2012, 2014; van Toor *et al.* 2015). さらに, 土壌性カニムシ類は森林環境の指標生物としての有用性も示唆されている (e.g. Yamamoto *et al.* 2001; Lencinas *et al.* 2015).

カニムシ類は, 生態系における機能的役割や生物資源としての有用性が示さ

れているにも関わらず、その種多様性が十分に理解されていない。これまでに 3,500 種以上のカニムシ種が記載されているが (Harvey 2013a, 2013b), カニムシ類の記載分類は欧米諸国を中心に進められてきたため、全くあるいはほとんど記録がない国や地域も多い (Harvey 2007)。しかしながら、カニムシ類のファウナ調査が行われていない、あるいは調査が不十分な国や地域における種の豊富さは、欧米諸国のそれに匹敵する可能性がある (Harvey 2007)。また、DNA マーカーを使用した先行研究は、カニムシ類には多数の隠蔽種あるいは未記載種が存在する可能性が高いことを明らかにしている (Wilcox *et al.* 1997; Zeh *et al.* 2003; Heerden *et al.* 2013; Harrison *et al.* 2014; Cosgrove *et al.* 2016)。カニムシ類の多数の隠蔽種あるいは未記載種の存在は、ファウナ調査が不十分であるという問題に加えて、現在の種分類にも問題があることを示唆している (Wilcox *et al.* 1997; Zeh *et al.* 2003; Heerden *et al.* 2013)。

カニムシ類の種分類における最も重大な問題は、独立種としての分類学的位置付けを担保する形態形質が、必ずしも信頼できないことである。カニムシ類は体サイズが小さいため (多く種が 1-5 mm 程度)、伝統的にプレパラート標本の形態的特徴に基づいて分類されてきた (Weygoldt 1969)。カニムシ類の上位分類群は、基節間結節片 (intercoxal tubercle) の有無、吐糸管を備える紡角 (または兜状体 galea) の有無、鋏角や触肢鋏部上の長感覚毛の配置 (trichobothrial pattern) 等、またはそれらの組み合わせといった顕著な質的形態形質によって分類されているが、一方でほとんどの種は、体長、特定の部位の長さとの比率、刺毛数、鋏部の歯数等、またはそれらの組み合わせといった量的形態形質によって分類されている (e.g. Chamberlin 1929a; Beier 1932a, 1932b; Morikawa 1960; Harvey 1992)。しかしながら、それらの伝統的に用いられてきた量的形態形質は、個体変異の範囲が種間で大きく重複するだけでなく、標本の状態やプレパラート

標本作製の過程（保存方法や脱水）によっても影響を受ける可能性がある

(Harvey 2014; 坂寄 2014). 従って, このような信頼性の低い量的形態形質に基づいて分類されている種の分類学的位置付けは疑わしく, 再検討が必要であると考えられる.

診断形質の信頼性や独立種としての分類学的位置付けは, 多数の形態計測データに基づいた多変量解析によって検討することができる. 特に遺伝的グループに基づいて解析が可能である場合, 種間で異なる形態形質の探索にも役立つ (Marhold 2011). 例えば, ダニ (Heethoff *et al.* 2011), サソリ (Luna-Ramirez *et al.* 2017), クモ (Wong *et al.* 2017) では, 分子系統解析と形態形質の多変量解析から, 種間の差異や関係を議論している. カニムシ類でも, 形態形質の多変量解析によって種間の形態的な差異や種の診断形質の探索を行っている研究はあるが (Muster *et al.* 2004; Christophoryová *et al.* 2016), 分子系統解析に基づいた検討に行われていない. 分子データに基づいた分類学的な検討は, 現代的な分類学において重要な研究プロセスのひとつである (reviewed in Dayrat 2005; Jörger and Schrödl 2013). カニムシ類においても, この現代的な分類学の研究手法を踏襲し, 遺伝的グループと形態形質の対応を検討すべきである.

カニムシ類の遺伝的グループの認識と形態形質を対応付けるためには, 同一のサンプルについて DNA 抽出と形態的特徴の観察を行う必要がある. カニムシの形態的特徴の観察はプレパラート標本に基づいて行われてきた. そのため, 野外から採集されたサンプルはプレパラート標本を作成する前に DNA を抽出しなければならない. 従来, カニムシ類のような小型節足動物類は全身を破碎して DNA が抽出されていたが, 最近では非破壊的な方法も開発されている (e.g. Porco *et al.* 2010; Aoyama *et al.* 2015). カニムシ類の研究では非破壊的な方法は使用されていないものの, 全身ではなく一部の付属肢を使用して DNA を抽出して

いる (Murienne *et al.* 2008; Ovchinnikov and Masta 2012; Harrison *et al.* 2014; Harvey *et al.* 2016). しかしながら, それらの方法では市販のキット (例えば DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) が使用されており, 1 サンプルあたり 400–500 円の金銭的コストがかかる. 多変量解析や個体変異の範囲を把握するためには相当数のサンプルを扱わなければならないが, DNA 抽出あるいは DNA 解析にかかるコストによってサンプル数が限定される恐れがある. 従って, カニムシ類の種分類における問題を解決するためには, 形態情報の取得が可能である低コストな DNA 抽出方法の確立も要求され得る.

伝統的な研究手法による現在のカニムシ類の種分類は, 分子データを活用した現代的な動物分類学研究の手法を取り入れ, 再構築されなくてはならない. 本研究はカニムシ類の種分類の再構築を目指し, 特定のカニムシ種群において, (1) 遺伝的グループを認識した上で, (2) 遺伝的グループに基づいた形態形質の解析や診断形質の評価を行い, (3) 種の形態的特徴や多様性を記載する, という研究プロセスを実践した. また, 低コストでカニムシ類の DNA 抽出と形態情報の取得を両立した方法の確立も行った.

本研究の研究対象には, 日本産土壌性 *Mundochthonius* 属カニムシ類を採用した. *Mundochthonius* 属は, カニムシ類のなかでも特に小型である (体長約 1 mm). 小型カニムシ類において DNA 抽出と形態情報の取得を両立した方法を確立することができれば, 他の分類群にも応用が容易である. 本属の日本産種は *M. japonicus* Chamberlin, 1929, *M. kiyoshii* Sakayori, 2002, *M. itohi* Sakayori, 2009 の 3 種が記載されており, さらに *M. japonicus* には基亜種の他に *M. j. scolytidis* Morikawa, 1954, *M. j. imadatei* Morikawa, 1956, *M. j. tripartitus* Morikawa, 1956 の 3 亜種が記載されている (Chamberlin 1929b; Morikawa 1954, 1956, 1960; Sakayori 2002, 2009, 2010). これらの日本産種および亜種のうち, *M. j. imadatei* と *M. j.*

tripartitus は洞穴性であり，その他は土壌性である．洞穴性亜種は採集が困難であるため，本研究では研究対象に含めなかった．日本産土壌性 *Mundochthonius* 属種および亜種は，体長，毛序式（刺毛数やその配列），触肢腿節の長さとの比率等の信頼性の低いとされる量的形態形質によって分類されており

（Chamberlin 1929b, Morikawa 1954, 1960; Sakayori 2002, 2009），カニムシ類の種分類における典型的な問題を抱えた分類群であると考えられる．一方で，未記載種の存在も示唆されており（前原ら 2003; 坂寄 2010），潜在的な多様性は高いことが予想される．従って，日本産土壌性 *Mundochthonius* 属は本研究の研究モデルとして好適な材料である．

本研究では，日本産の土壌性全既知種および亜種の基準産地を含む日本の各地から採集した *Mundochthonius* 属標本を使用して，以下のような研究を実施した．第 2 章では *Mundochthonius* 属を含む小型カニムシ種を用いて低コストの DNA 抽出と形態情報の取得を両立した方法の開発を行い，作業上のポイントや利点について解説および考察した．第 3 章では，採集した *Mundochthonius* 属標本について分子系統解析を行い，7 つの主要な遺伝的グループが存在し，それらが種に相当することを明らかにした．また，現在の種分類に従って，それらの遺伝的グループの形態形質を比較し，既知 3 種の他に隠蔽種あるいは未記載種 4 種が含まれていることを明らかにした．第 4 章では，日本産 *Mundochthonius* 属標本の量的形態形質を測定し，多変量解析によって各遺伝的グループが識別可能かどうかを検討した．その結果，量的形態形質を用いてそれらの遺伝的グループを識別することは困難であったが，一方で，遺伝的グループの識別に有用と思われるいくつかの質的形態形質を発見することができた．第 5 章では，第 3 章および第 4 章の結果を受けて，新たに 3 種の日本産 *Mundochthonius* 属種を記載した．また，日本産 *Mundochthonius* 属種または亜種への検索表を示した．そ

して第6章では、現代的な動物分類学研究の手法を取り入れたカニムシ類の種分類について、量的形態形質と質的形態形質の関係を踏まえたうえで、カニムシ類の「亜種」の分類学的取扱い、および種概念におけるカニムシ類の「種」について総合的に議論した。

引用文献

- Aoyama, H., Saitoh, S., Fujii, S., Nagahama, H., Shinzato, N., Kaneko, N., and Nakamori, T. (2015). A rapid method of non-destructive DNA extraction from individual springtails (Collembola). *Applied Entomology and Zoology* **50**, 419–425.
- Beier, M. (1932a). Pseudoscorpionidea I. Subord. Chthoniinea et Neobisiinea. *Tierreich* **57**, i–xx, 1–258.
- Beier, M. (1932b). Pseudoscorpionidea II. Subord. C. Cheliferinea. *Tierreich* **58**, i–xxi, 1–294.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., and Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 148–155.
- Brussaard, L. (1997). Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *Ambio* **26**, 563–570.
- Brussaard, L. (2012). Ecosystem services provided by the soil biota. In 'Soil and Ecology and Ecosystems Services'. (Eds D. H. Wall, R. D. Bardgett, V. Behan-Pelletier, J. E. Herrick, T. H. Jones, K. Ritz, J. Six, D. R. Strong and W. H. van der Putten.) pp.45–48. (Oxford University Press, Oxford, UK.)
- Brussaard, L., De Ruiter, P. C., and Brown, G. G. (2007). Soil biodiversity for

agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **121**, 233–244.

- Chamberlin, J. C. (1929a). A synoptic classification of the false scorpions or chela-spinners, with a report on a cosmopolitan collection of the same. Part I. The Heterosphyronida (Chthoniidae) (Arachnida-Chelonethida). *Annals and Magazine of Natural History* **4**, 50-80.
- Chamberlin, J. C. (1929b). On some false scorpions of the suborder Heterosphyronida (Arachnida-Chelonethida). *Canadian Entomologist* **61**, 152–155.
- Christophoryová, J., Krajčovičová, K., Henderickx, H., and Španiel, S. (2016). A multivariate study of differentiating characters between three European species of the genus *Lasiochernes* Beier, 1932 (Pseudoscorpiones, Chernetidae). *ZooKeys* **629**, 51–81.
- Cosgrove, J. G., Agnarsson, I., Harvey, M. S., and Binford, G. J. (2016). Pseudoscorpion diversity and distribution in the West Indies: sequence data confirm single island endemism for some clades, but not others. *Journal of Arachnology* **44**, 257–271.
- Dance, A. (2008). Soil ecology: what lies beneath. *Nature* **455**, 724–725.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**, 407-415.
- Decaëns, T. (2010). Macroecological patterns in soil communities. *Global Ecology and Biogeography* **19**, 287–302.
- Decaëns, T., Lavelle, P., Jimenez, J. J. (2008). Priorities for conservation of soil animals. *CAB Reviews* **3**, 1–18.
- Fagan, L. L., Nelson, W. R., Meenken, E. D., Howlett, B. G., Walker, M. K., and

- Donovan, B. J. (2012). Varroa management in small bites. *Journal of Applied Entomology* **136**, 473–475.
- Harrison, S. E., Guzik, M. T., Harvey, M. S., and Austin, A. D. (2014). Molecular phylogenetic analysis of Western Australian troglobitic chthoniid pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) points to multiple independent subterranean clades. *Invertebrate Systematics* **28**, 386–400.
- Harvey, M. S. (1992). The phylogeny and classification of the Pseudoscorpionida (Chelicerata: Arachnida). *Invertebrate Systematics* **6**, 1373–1435.
- Harvey, M. S. (2007). The smaller arachnid orders: diversity, descriptions and distributions from Linnaeus to the present (1758–2007). *Zootaxa* **1668**, 363–380.
- Harvey, M. S. (2013a). Order Pseudoscorpiones. *Zootaxa* **3703**, 34–35.
- Harvey, M. S. (2013b). 'Pseudoscorpions of the World, Version 3.0.' Western Australian Museum, Perth. Available at <http://www.museum.wa.gov.au/catalogues/pseudoscorpions> [Date accessed: 3 August 2017.]
- Harvey, M. S. (2014). A review and redescription of the cosmopolitan pseudoscorpion *Chelifer cancroides* (Pseudoscorpiones: Cheliferidae). *Journal of Arachnology* **42**, 86–104.
- Harvey, M. S., Huey, J. A., Hillyer, M. J., McIntyre, E., and Giribet, G. (2016). The first troglobitic species of Gymnobisiidae (Pseudoscorpiones: Neobisioidea), from Table Mountain (Western Cape Province, South Africa) and its phylogenetic position. *Invertebrate Systematics* **30**, 75–85.
- Heerden, J. V., Taylor, P. J., and Heerden, C. V. (2013). Genetic differentiation in *Horus* Chamberlin (Arachnida: Pseudoscorpiones: Olpiidae) as indicated by

mitochondrial DNA analysis. *African Zoology* **48**, 351–358.

Heethoff, M., Laumann, M., Weigmann, G., and Raspotnig, G. (2011). Integrative taxonomy: combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic *Trhypochthonius tectorum* complex (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). *Frontiers in Zoology* **8**, 2.

Jörger, K. M., and Schrödl, M. (2013). How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers in Zoology* **10**, 59.

Lavelle, P. (1996). Diversity of soil fauna and ecosystem function. *Biology International* **33**, 3–16.

Lavelle, P., Decaens, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P., and Rossi, J. (2006). Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology* **42**, S3–S15.

Lencinas, M. V., Kreps, G., Soler, R., Peri, P. L., Porta, A., Ramírez, M., and Pastur, G. M. (2015). *Neochelanops michaelsoni* (Pseudoscorpiones: Chernetidae) as a potential bioindicator in managed and unmanaged Nothofagus forests of Tierra del Fuego. *Journal of Arachnology* **43**, 406–412.

Luna-Ramirez, K., Miller, A. D., and Rašić, G. (2017). Genetic and morphological analyses indicate that the Australian endemic scorpion *Urodacus yaschenkoi* (Scorpiones: Urodacidae) is a species complex. *PeerJ* **5**, e2759.

前原 忠, 萩原康夫, 石井 清, 伊藤良作, 黒住耐二, 坂寄 廣, 菅波洋平, 田村浩志, 茅根重夫, 中村修美, 直海俊一朗, 布村 昇, 萩野康則, 宮田俊晴, 石橋整司. (2003). 利尻島の土壤動物. *利尻研究* **22**, 55–72.

Marhold, K. (2011). Multivariate morphometrics and its application to monography at specific and infraspecific levels. In 'Monographic Plant Systematics:

- Fundamental Assessment of Plant Biodiversity, Regnum Vegetabile, Vol. 153'.
(Eds T. F. Stuessy and H. W. Lack.) pp. 73–99. (Koeltz Scientific Books:
Königstein, Germany.)
- Morikawa, K. (1954). Two new species of Chthoniinea from Japan. *Japanese Journal of Zoology* **11**, 329–331.
- Morikawa, K. (1956). Cave pseudoscorpions of Japan (I). *Memoirs of the Ehime University (2B)* **2**, 271–282.
- Morikawa, K. (1960). Systematic studies of Japanese pseudoscorpion. *Memoirs of the Ehime University (2B)* **4**, 85–172.
- Murienne, J., Harvey, M. S., and Giribet, G. (2008). First molecular phylogeny of the major clades of Pseudoscorpiones (Arthropoda: Chelicerata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**, 170–184.
- Muster, C., Schmarda, T., and Blick, T. (2004). Vicariance in a cryptic species pair of European pseudoscorpions (Arachnida, Pseudoscorpiones, Chthoniidae). *Zoologischer Anzeiger—A Journal of Comparative Zoology* **242**, 299–311.
- Orgiazzi, A., Bardgett, R. D., Barrios, E., Behan-Pelletier, V., Briones, M. J. I., Chotte, J-L., De Deyn, G. B., Eggleton, P., Fierer, N., Fraser, T., Hedlund, K., Jeffery, S., Johnson, N. C., Jones, A., Kandeler, E., Kaneko, N., Lavelle, P., Lemanceau, P., Miko, L., Montanarella, L., Moreira, F. M. S., Ramirez, K. S., Scheu, S., Singh, B. K., Six, J., van der Putten, W. H., and Wall, D. H. (Eds.) (2016). 'Global Soil Biodiversity Atlas.' (European Commission, Publications Office of the European Union: Luxembourg, Luxembourg.)
- Ovchinnikov, S., and Masta, S. E. (2012). Pseudoscorpion mitochondria show rearranged genes and genome-wide reductions of RNA gene sizes and inferred

- structures, yet typical nucleotide composition bias. *BMC Evolutionary Biology* **12**, 31.
- Porco, D., Rougerie, R., Deharveng, L., and Hebert, P. (2010). Coupling non-destructive DNA extraction and voucher retrieval for small soft-bodied arthropods in a high-throughput context: the example of Collembola. *Molecular Ecology Resources* **10**, 942–945.
- Read, S., Howlett, B. G., Donovan, B. J., Nelson, W. R., van Toor, R. F., and Leung, G. (2012). Chelifers may control varroa. *New Zealand beekeeper* **20**, 12–13.
- Read, S., Howlett, B. G., Donovan, B. J., Nelson, W. R., and Toor, R. F. (2014). Culturing chelifers (Pseudoscorpions) that consume Varroa mites. *Journal of Applied Entomology* **138**, 260–266.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., and Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S96–S119.
- Rougerie, R., Decaëns, T., Deharveng, L., Porco, D., James, S. W., Chang, C. H., Richard, B., Potapov, M., Suhardjono, Y., Hebert, P. D. (2009). DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **44**, 789–802.
- Sakayori, H. (2002). Two new species of the family Chthoniidae from Kyushu, in western Japan (Arachnida: Pseudoscorpionida). *Edaphologia* **69**, 1–8.
- Sakayori, H. (2009). A new species of the genus *Mundochthonius* from Ibaraki Prefecture, central Japan (Arachnida: Pseudoscorpionida: Chthoniidae). *Bulletin of Ibaraki Nature Museum* **12**, 1–4.
- 坂寄 廣. (2010). 日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ分類の現状. In '茨城県自然博物館総合調査報告書 -2009年 茨城県の昆虫類およびその他の無脊椎動物の動向-' (茨城県自然博物館編.) pp. 51–52. (茨城県自然博物館: 坂東.)

- 坂寄 廣. (2014). 岡山産オウギツチカニムシ *Allochthonius (Allochthonius) opticus* の再記載 (カニムシ目, ツチカニムシ科). *茨城県自然博物館研究報告* **17**, 1–6.
- Van Toor, R. F., Thompson, S. E., Gibson, D. M., and Smith, G. R. (2015). Ingestion of *Varroa destructor* by pseudoscorpions in honey bee hives confirmed by PCR analysis. *Journal of Apicultural Research* **54**, 555–562.
- Wagg, C., Bender, S. F., Widmer, F., and van der Heijden, M. G. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 5266–5270.
- Weygoldt, P. (1969). 'The Biology of Pseudoscorpions.' (Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, US.)
- Wilcox, T. P., Hugg, L., Zeh, J. A., and Zeh, D. W. (1997). Mitochondrial DNA sequencing reveals extreme genetic differentiation in a cryptic species complex of neotropical pseudoscorpions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7**, 208–216.
- Wolters, V. (2001). Biodiversity of soil animals and its function. *European Journal of Soil Biology* **37**, 221–227.
- Wong, M. K., Woodman, J. D., and Rowell, D. M. (2017). Short-range phenotypic divergence among genetically distinct parapatric populations of an Australian funnel-web spider. *Ecology and Evolution* **7**, 5094–5102.
- Yamamoto, T., Nakagoshi, N., and Touyama, Y. (2001). Ecological study of pseudoscorpion fauna in the soil organic layer in managed and abandoned secondary forests. *Ecological Research* **16**, 593–601.
- Zeh, J. A., Zeh, D. W., and Bonilla, M. M. (2003). Phylogeography of the harlequin

beetle-riding pseudoscorpion and the rise of the Isthmus of Panamá. *Molecular Ecology* **12**, 2759–2769.

第 2 章

小型カニムシ類の付属肢を用いた迅速・安価な DNA 抽出法

A rapid and low-cost protocol for DNA extraction from small-sized pseudoscorpion
appendages

Acta Arachnologica 65(2) 掲載の論文を博士論文として改訂

要旨 — カニムシ類の付属肢 1 本から DNA を抽出し，証拠標本を保持しつつ，安価・迅速にカニムシ類の DNA 解析を実施する方法を考案した．本方法は，費用や作業時間を大幅に短縮することができ，一般的な DNA 解析用の試薬や機器のみを使用するため，導入も容易である．亜目の異なる *Mundochthonius japonicus* と *Microbisium pygmaeum* の2種の片方の触肢から本プロトコルに従って DNA を抽出し，ミトコンドリア DNA の *COI* 領域を対象に PCR 増幅，塩基配列の決定を行った結果，解析した全ての個体から有効な塩基配列を取得できた．

キーワード — *Microbisium pygmaeum*，ミトコンドリア DNA *COI* 領域，*Mundochthonius japonicus*，カニムシ，簡易 DNA 抽出

はじめに

カニムシ類（クモガタ綱：カニムシ目）は陸上の様々な環境に生息する体長 1–8 mm ほどの小型の節足動物である（Weygoldt 1969; Harvey 1990）。カニムシ類はこれまでに 2 亜目 24 科 3,500 種以上が記録されており（Harvey 2013）、種の記載・分類は実体顕微鏡や生物顕微鏡を使用した外部形態の観察に基づいてなされてきた。ところが、近年のカニムシ類に関する分子系統解析は、形態形質に基づく現在の分類体系は見直しが必要であることを明らかにしつつある

（Murienne *et al.* 2008; Harrison *et al.* 2014）。また、分子系統解析の結果に基づき、分類群間の診断形質の妥当性についても評価が行われ始めている（Ohira *et al.* 2016）。しかしながら、データ・バンクに登録されているカニムシ類の塩基配列情報は依然として少なく、GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) のデータ・ベースに登録されている塩基配列は 1,081 件に留まる（2017 年 10 月 23 日最終確認）。それらのうち日本産カニムシ類は、イソカニムシ *Garypus japonicus* Beier 1952, イソカニムシ属の一種 *Garypus* sp., ニホンカブトツチカニムシ *Mundochthonius japonicus scolytidis* Morikawa, 1954, イトウカブトツチカニムシ *Mundochthonius itohi* Sakayori, 2009, *Mundochthonius* 属の一種 *Mundochthonius* sp. のミトコンドリア DNA COI 領域の部分配列について、計 5 種 73 件が登録されているのみである（Niikura, unpublished; Ohira *et al.* 2016; 本研究）。カニムシ目の DNA 解析に関する研究は始まったばかりであり、カニムシ目の分類体系の見直しや多様性の解明のために、より多くの種や個体に基づいた網羅的な解析が必要である。

現代的な分類学的研究においては、DNA 解析、形態情報の取得、証拠標本の保持は極めて重要である（Pleijel *et al.* 2008）。かつては少量の体組織からの DNA 抽出は困難であったため、小型節足動物においては虫体の大部分が DNA 抽出に

使用され、形態情報の損失や証拠標本自体が失われる場合が多かった。近年では体内組織の溶出によって DNA を抽出し、外骨格は残す非破壊的な DNA 抽出方法が考案され（例えば、Porco *et al.* 2010; Aoyama *et al.* 2015）、この問題は解決されつつある。しかしながら、カニムシ類においては、外部形態だけではなく、生殖器の内部構造の情報も分類学的に重要であることが指摘され始めており（例えば、Dashdamirov 2012）、上述したような体内組織の溶出による方法は避けるべきである。また既存の分類体系の見直しや診断形質の評価においては、過去のプレパラート標本との形態形質の比較が必要となるため、新規のプレパラート標本も従来の方法に則って同質のものを作製すべきである。これらのことから、近年のカニムシ類の分子系統解析では、触肢や歩脚等の付属肢を 1-2 本用いて DNA 抽出を行い、過去の標本との比較にほとんど影響を与えない方法が採用されている（Murienne *et al.* 2008; Ovchinnikov and Masta 2012; Harrison *et al.* 2014; Harvey *et al.* 2016; Ohira *et al.* 2016）。

カニムシ類から DNA 抽出を行っている研究の多くは、Qiagen 社の DNA 解析用キット（DNeasy Blood & Tissue Kit や Genra Puregene DNA Purification Kit, Qiagen）や Life Technologies 社の DNA 解析用キット（ChargeSwitch gDNA Micro Tissue Kit, Life Technologies）を使用している（Wilcox *et al.* 1997; Zeh *et al.* 2003, 2012; Moulds *et al.* 2007; Murienne *et al.* 2008; Pfeiler *et al.* 2009; Ovchinnikov and Masta 2012; Harrison *et al.* 2014; Harvey *et al.* 2016, 表 1）。これらのキット類を用いた DNA 抽出は、コストや作業量、作業過程における DNA の量的な損失等の点で、十分に最適化されているとは言い難い。例えば、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) は多くの研究で使用されている定評のある DNA 抽出キットではあるものの、1 サンプルあたり約 430 円の費用がかかり（2017 年 10 月 23 日現在）、多数のサンプルから DNA を抽出する際には不向きである。さらに、サンプルの

破碎やその他の作業にかかる時間を除いた溶出のプロセスだけでも少なくとも1-3時間程度かかり、サンプルの質によってはオーバーナイトでの溶解が求められる（例えば Murienne *et al.* 2008; Harvey *et al.* 2016）.

カニムシ類の分類体系の見直しや診断形質の評価においては、DNA解析を伴うより多くの知見が必要であることから、網羅的な解析の過程で膨大なサンプルの処理が要求され得る。これに際して、上述のように体内組織の溶出による方法が適さないカニムシ類において、付属肢等の少量の組織片を使用した安価で迅速なDNA抽出方法は有用性が高い。そこで、カニムシ類のDNA抽出プロセスにおいて、1) 付属肢1本のみを使用すること、2) 安価であること、3) 迅速であること、を満たす方法を新たに開発した。ここでは、異なる亜目に属する小型種を対象に、動物の標準的なDNAバーコーディング対象領域であるミトコンドリアDNAのCOI領域のDNA解析を実施し、作業上のポイントや本方法の利点について解説および考察した。

材料・方法

解析に使用したカニムシ類

カニムシ類は大きく2亜目に分類される（Harvey 1992, 2013）。本研究ではそれぞれ異なる亜目に属する *Mundochthonius japonicus* Chamberlin, 1929（ツチカニムシ亜目：ツチカニムシ科）および *Microbisium pygmaeum* (Ellingsen, 1907)（カニムシ亜目：コケカニムシ科）の成体を解析に用いた。前者は体長0.8-1.2 mm、後者は体長1.2-1.5 mmの小型種である（Chamberlin 1929; Ellingsen 1907; 佐藤・坂寄 2015）。*Mundochthonius japonicus* は2012年5月23日に福島県西白河郡西郷村で採集した3個体、*Microbisium pygmaeum* は2012年7月1日に福島県耶麻郡北塩原村で採集した5個体を解析に使用した。土壌性カニムシ類である両種は、

森林土壌中から「ふるい」を用いたシフティング法とツルグレン装置を用いた抽出法を併用して採集し、純エタノールで固定したのち、4°Cで保存した。

DNA解析は、各個体の触肢の一方をサンプルとして使用した。実体顕微鏡下で微針を用いて、触肢を腿節と転節の間で切断した(図1)。微針は、タングステン・ニードル(作製方法は、日本土壌動物学会(編)(2007)に詳しい)、もしくは医療用の鍼(径=0.20 mm, 長さ=39 mm, NEO ディスポ鍼, 山正)を使用した。切断した触肢はDNA解析用の試料として純エタノールに入れて4°Cで保存した。触肢以外の部位は触肢と同様の方法で保存、または必要に応じてプレパラート標本作製し、種の同定に使用した。なお、本研究で使用した全ての標本は、福島大学の Insect Diversity and Morphology Laboratory で保管している。

DNA 抽出

本方法は、少量のサンプルによるDNA解析を可能とするために、Montero-Pau *et al.* (2008) および Suyama (2011) の方法を応用した。これらの方法は、動物プランクトンの卵や花粉一粒からのDNA解析を可能としたものである。これらの方法の特徴は、DNAの抽出溶液をそのままPCR増幅の鋳型DNA溶液として使用するため、DNAの損失を全くなくすることができる点にある。DNA吸着カラムやエタノール沈殿等を用いるDNA抽出方法では、吸着や沈殿の過程でDNAの損失が生じるため、これを完全に回収することができない。そのため、DNA吸着カラムやエタノール沈殿等を用いるDNA抽出方法は、DNA分子の数が限られる花粉一粒やごく微量なサンプルからのDNA抽出には適さない。しかしながら、Suyama (2011) の方法であれば、細胞数がごく少ないサンプル(1個以上あれば良い)から抽出したDNAでもPCR増幅が可能であり、マルチプレックスPCRを行えば、マイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型決定も可能である。

(例えば, Matsuki *et al.* 2008). したがって, カニムシ類の触肢のように多数の細胞から構成されている部位であれば, DNA 抽出溶液を希釈し, 分注しても PCR 増幅に必要な DNA 量を得ることが期待できる.

抽出溶液は Suyama (2011) を参考にし, 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.01 M EDTA (pH 8.0), 0.01% SDS (ニッポンジーン), 0.1 g/l Proteinase K (TaKaRa) に調整した. また触肢の破碎には, Montero-Pau *et al.* (2008) の方法を応用し, マイクロピペットチップを使用した. Montero-Pau *et al.* (2008) はチップをそのまま使用しているが, 本研究の破碎用チップは, アイビスピペットチップ I-503Y (図 2A) を加工したものをを用いた. まず 0.2 ml チューブに滅菌済みのチップを差し込み, チューブ底部でチップ先端を押し曲げた. その後, チップ先端をチューブ底部に押し付けながら回転させることで, チップ先端を丸く変形させた (図 2C).

切断した触肢を, マイクロピペットを用いて純エタノールの保存溶液と共に吸い込み, 滅菌済みの PCR チューブに移した. 触肢を PCR チューブに移した後, マイクロピペットを用いて余分なエタノールを取り除いた. その後, PCR チューブのふたを開け, サーマルサイ클ラーを用いてエタノールを完全に乾燥させた (55°C 10 分). 触肢が入っているチューブに抽出溶液を 1.0 μ l 添加した後, 触肢を抽出溶液と混合させながらチューブ底面へ移動させ, 破碎用チップとチューブ底面との間で触肢を潰すようにして, いくつかの破片になるまで破碎した. 抽出溶液を 2.0 μ l 追加し, 56°C 60 分で反応させた後, 95°C 10 分で Proteinase K を失活させた. 抽出溶液のうち 1.0 μ l を TE バッファーで 10 倍に希釈し, PCR 反応に使用した. 抽出溶液ならびに希釈した抽出溶液の残りは -30°C で保存した.

PCR による DNA 増幅と塩基配列の決定

上記の方法で得られた抽出物を鋳型とし、動物の標準的なDNAバーコーディング領域であるミトコンドリアDNAのCOI領域を増幅する、Folmer *et al.* (1994)のユニバーサル・プライマー (LC01490; 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', HC02198; 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') を用いてPCR反応を行った。TaqポリメラーゼはQiagen Multiplex PCR kit (Qiagen) を用いた。反応液8 µl中に、鋳型DNAを0.8 µl, 各プライマーを0.2 µM, Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) を4.0 µl含むように調整した。温度条件は、初期熱変性95°C 15分の後、熱変性94°C 30秒, アニーリング51°C 1分30秒, 伸長反応72°C 1分を35サイクル行った後、最終伸長を60°C 30分とした。反応終了後、PCR産物のうち1.0 µlを1.5%アガロースゲル (Agarose L03, TaKaRa) を用いて電気泳動し、増幅を確認した。増幅に成功したPCR産物については、illustra ExoStar (GE Healthcare UK) を用いて酵素処理を行い、ダイレクトシーケンス用の鋳型として精製産物を調整した。精製産物はABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems) でシーケンス反応を行った後、ABI PRISUM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。

得られた波形データはFinch TV (<http://www.geospiza.com/finchtv/>) を用いてアセンブルを行い、GenBankからBLAST検索 (NCBI; Altschul *et al.* 1997) を利用して、近縁種の検索と塩基配列の類似度の確認を行った。

結 果

抽出方法の工夫

触肢の切断において使用したタングステン・ニードルや医療用の鉏は、DNA抽出に使用したい付属肢のみを切断することができ、虫体を破損するようなこ

ともなかった。一方、触肢の切断にはピンセットの使用も試みたが、本研究で用いた小型のカニムシ種の場合、特定の付属肢のみを切断することは困難であり、虫体の一部を破損することがあった。

DNA 抽出のために付属肢を破砕するチップは、アイビス・ピペットチップ I-503Y が最も適していた (図 2A, A')。先端部のみを丸く加工できる点がアイビス・ピペットチップ I-503Y の優れた点である。アイビス・ピペットチップ I-503Y 以外の各種ピペットチップ (図 2B, B') の使用も試みたが、それらは加工時に折れ曲がることもあり、破砕に適した形状に先端部を加工することが困難であった (図 2D)。また、一般的なクリスタルチップ (より小容量用のチップ、例えば QSP 114 など) の方が先端部は細いが、それらも基部が折れやすく先端部のみを変形させることは難しかった。

塩基配列の決定

Mundochthonius japonicus 3 個体および *Microbisium pygmaeum* 5 個体の全個体において、ミトコンドリア DNA の *COI* 領域における PCR 増幅が認められ (図 3)、塩基配列の決定も成功した (表 2)。ニホンカブトツチカニムシについては 616 bp の塩基配列が得られ、3 個体の塩基配列は同一であった。チビコケカニムシについては 563 bp の塩基配列が得られ、5 個体から 3 種類のハプロタイプを決定した。それらのハプロタイプにおいては、4-15 か所において塩基置換が認められた。

BLAST 検索を実施した当時 (2016 年 4 月 18 日) の結果では、*Mundochthonius japonicus* は、同じツチカニムシ科に属する *Tyrannochthonius* sp. の *COI* 領域における塩基配列と一致率が最も高く、*Microbisium pygmaeum* は、3 種類の塩基配列とも同属の *Microbisium* sp. の *COI* 領域における塩基配列と一致率が最も高かつ

た(表2)。以上のことから、本方法によってカニムシ類のDNAを確実に抽出できていることが示された。

考 察

触肢切断に使用した微針や、DNA抽出のための触肢破碎に使用したマイクロピペットチップは、いずれも特別なものではない。タングステン・ニードルは、プレパラート標本作製時において、虫体のハンドリングに使用され(日本土壤動物学会(編)2007)、微小な節足動物類を扱う研究者であれば必携の道具である。また、タングステン・ニードルを常備しない場合であっても医療用の鍼で代用できる。タングステン・ニードル、医療の鍼のどちらも、様々な径や長さのものを用意することができるので、分類群の体サイズに応じて適切なものを選んで使用することが可能である。破碎用のマイクロピペットチップは、テーパ型になっているものが、破碎用チップの加工に最も適することが分かった(図2A)。また、チップの先端を加工しなかった場合は、うまく破碎することができないばかりではなく、切断した触肢がピペット内に入り込んでしまうことがある。そのため、カニムシ類においてはMontero-Pau *et al.* (2008)のように未加工のチップでの破碎は必ずしも最適ではない。

異なる亜目に属する *Mundochthonius japonicus* と *Microbisium pygmaeum* の両種において、本研究が新たに開発した方法を用いて良好なPCR増幅および塩基配列の取得に成功した(図3, 表2)。両種はカニムシ類のなかでも小型であり、付属肢の切断作業や、DNA抽出プロセスにおいて、体サイズが小さいことが作業や結果に悪影響を及ぼすことはないと言える。これらのことから、本方法はカニムシ類一般に広く適用できる可能性が高い。また、より体サイズの小さい *Mundochthonius japonicus* の若虫(1 mm未満)であっても、本方法によってDNA

解析が可能であることを確認している。一般にカニムシ類の種分類に用いられている形態形質は、同種であっても成虫と若虫の間で異なることが多い。さらに、若虫における形態的特徴の記載は乏しいため、形態的特徴に基づいて若虫の種を同定することは困難である (Morikawa 1960; 佐藤・坂寄 2015)。しかし、カニムシ類の塩基配列情報が蓄積されれば、若虫であっても DNA バーコーディングによる種の同定が容易となる。既存の方法よりも安価で迅速な DNA 解析を可能とする本研究の方法は、こうした問題の解決の糸口となることが期待される。

本方法は、先行研究におけるカニムシ類の DNA 抽出に用いられてきた一般的な抽出キットと比較した場合、使用した試薬については格段に安価である。DNA 解析を行う一般的な実験室には常備されている Tris-HCl (pH 8.0) と EDTA (pH 8.0) を除けば、今回使用した試薬は SDS (ニッポンジーン, 定価 5,000 円/100 ml) と Proteinase K (TaKaRa, 定価 20,000 円/5 ml) のみである。これらの試薬も使用量はごく僅かであり、1 サンプルあたりに要する試薬の総費用は約 2 円である (2017 年 10 月 23 日現在)。前述した DNeasy Blood & Tissue Kit (1 サンプルあたり約 430 円) と比べると、約 1/200 の費用となり、比較的安価な Gentra Puregene Tissue Kit (1 サンプルあたり約 120 円) と比べても、約 1/60 の費用で DNA 抽出が可能となる。一方で、虫体の一部を使用して安価に DNA 抽出を行う方法は、本方法以外にも考案されている。Casquet *et al.* (2012) は、小型のクモ類のイソウロウグモ属 *Argyrodes* の歩脚を用いた安価な DNA 抽出方法を考案している。本方法とは使用する試薬やサンプル片を破碎しないこと、溶解プロセスにかかる時間が長い等の点が異なっている。本方法のサンプル溶解に要する時間は 1 時間であり、数時間以上あるいはオーバーナイトの溶解時間が推奨されている DNA 抽出キットや Casquet *et al.* (2012) の方法に比べて短い。ま

た、サンプルをサーマルサイクラーにセットするだけで良いため、DNA 吸着カラムやエタノール沈殿を用いた DNA 抽出に必要な遠心等の作業を省略でき、全体としての作業量・作業時間はさらに少なくなる。使用した機器類も、サーマルサイクラー、PCR チューブ、マイクロピペットチップ等であり、特別なものではない。加えて、DNA 抽出には使い捨ての消耗品を使用するため、微量サンプルの DNA 解析で問題になりやすいコンタミネーションのリスクも最小限に抑えることができる。技術的な面から見ても、特殊な操作や訓練を必要としない。以上のことから、常時 DNA 解析を行っている実験室であれば、本方法の導入は容易であると考えられる。

カニムシ類の研究を進めている Western Australian Museum (オーストラリア) では、遺伝情報を含むカニムシ類標本の様々なデータを提供している (<http://museum.wa.gov.au/online-collections/>)。博物館が所蔵する質と密度の高い標本コレクションを用いた DNA 解析は、分類学のみならず、進化学や生態学においても重要な知見を提供する (Cooper 1994)。例えば、容易に DNA バーコーディングが可能となることで、若虫の形態の記載や、より詳細なファウナの解明に繋がる。また本方法は、理論上細胞が 1 個以上あれば DNA の解析が可能であり、標本の損傷を最小限にとどめることができる。本研究における安価、迅速、低リスク、そして軟組織などの内部形態を将来的に検討可能な状態で残すことができるという利点は、博物館のカニムシを含めた小型節足動物類の膨大なコレクションを利用した網羅的な DNA 解析を加速させる一助となることが期待される。

引用文献

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and

- Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Aoyama, H., Saitoh, S., Fujii, S., Nagahama, H., Shinzato, N., Kaneko, N., and Nakamori, T. (2015). A rapid method of non-destructive DNA extraction from individual springtails (Collembola). *Applied Entomology and Zoology* **50**, 419–425.
- Casquet, J., Thebaud, C., and Gillespie, R. G. (2012). Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. *Molecular Ecology Resources* **12**, 136–141.
- Chamberlin, J. (1929). On some false scorpions of the suborder Heterosphyronida (Arachnida–Chelonethida). *Canadian Entomologist* **61**, 152–155.
- Cooper, A. (1994). DNA from museum specimens. In 'Ancient DNA'. (Eds B. Herrmann and S. Hummel). pp. 149–165 (Springer: New York, US.)
- Dashdamirov, S. (2012). A new genus and species of false scorpion from Northern Vietnam (Arachnida, Chelonethi, Neobisiidae). *Tropical Natural History* **12**, 97–115.
- Ellingsen, E. (1907). On some pseudoscorpions from Japan collected by Hans Sauter. *Nytt Magasin for Naturvidenskapene* **45**, 1–17.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and 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.
- Harrison, S. E., Guzik, M. T., Harvey, M. S., and Austin, A. D. (2014). Molecular phylogenetic analysis of Western Australian troglobitic chthoniid pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) points to multiple independent subterranean

- clades. *Invertebrate Systematics* **28**, 386–400.
- Harvey, M. S. (1990). 'Catalogue of the Pseudoscorpionida.' (Manchester University Press: Manchester, UK.)
- Harvey, M. S. (1992). The phylogeny and classification of the Pseudoscorpionida (Chelicerata: Arachnida). *Invertebrate Systematics* **6**, 1373–1435.
- Harvey, M. S. (2013). Order Pseudoscorpiones. In 'Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (addenda 2013) (Ed Z.-Q. Zhang.) pp. 34–35. (*Zootaxa* **3703**, 1–82.)
- Harvey, M. S., Huey, J. A., Hillyer, M. J., McIntyre, E., and Giribet, G. (2016). The first troglobitic species of Gymnobisiidae (Pseudoscorpiones: Neobisioidea), from Table Mountain (Western Cape Province, South Africa) and its phylogenetic position. *Invertebrate Systematics* **30**, 75–85.
- Matsuki, Y., Tateno, R., Shibata, M., and Isagi, Y. (2008). Pollination efficiencies of flower-visiting insects as determined by direct genetic analysis of pollen origin. *American Journal of Botany* **95**, 925–930.
- Montero-Pau, J., Gómez, A., and Muñoz, J. (2008). Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography, Methods* **6**, 218–222.
- Morikawa, K. (1960). Systematic studies of Japanese pseudoscorpion. *Memoirs of the Ehime University (2B)* **4**, 85–172.
- Moulds, T. A., Murphy, N., Adams, M., Reardon, T., Harvey, M. S., Jennings, J., and Austin, A. D. (2007). Phylogeography of cave pseudoscorpions in southern Australia. *Journal of Biogeography* **34**, 951–962.

- Murienne, J., Harvey, M. S., and Giribet, G. (2008). First molecular phylogeny of the major clades of Pseudoscorpiones (Arthropoda: Chelicerata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**, 170–184.
- 日本土壤動物学会 (編). (2007). '土壤動物学への招待 -採集からデータ解析まで -.' (東海大学出版会: 秦野.)
- Ohira, H., Kaneko, S., and Tsutsumi, T. (2016). Is abdominal tergal chaetotaxy reliable for species diagnosis of Japanese soil-dwelling *Mundochthonius* pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae)?. *Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan* **50**, 11–13.
- Ovchinnikov, S., and Masta, S. E. (2012). Pseudoscorpion mitochondria show rearranged genes and genome-wide reductions of RNA gene sizes and inferred structures, yet typical nucleotide composition bias. *BMC Evolutionary Biology* **12**, 31.
- Pfeiler, E., Bitler, B. G., Castrezana, S., Matzkin, L. M., and Markow, T. A. (2009). Genetic diversification and demographic history of the cactophilic pseudoscorpion *Dinocheirus arizonensis* from the Sonoran Desert. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**, 133–141.
- Pleijel, F., Jondelius, U., Norlinder, E., Nygren, A., Oxelman, B., Schander, C., Sundberg, P., and Thollesson, M. (2008). Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**, 369–371.
- Porco, D., Rougerie, R., Deharveng, L., and Hebert, P. (2010). Coupling non-destructive DNA extraction and voucher retrieval for small soft-bodied arthropods in a high-throughput context: the example of Collembola. *Molecular Ecology*

Resources **10**, 942–945.

佐藤英文, 坂寄 廣. (2015). クモガタ綱Arachnida・カニムシ目Pseudoscorpiones. In '日本産土壌動物 分類のための図解検索. 第二版'. (青木淳一編著.) pp. 105–118. (東海大学出版会: 東京.)

Suyama, Y. (2011) Procedure for single-pollen genotyping. In 'Single-Pollen Genotyping'. (Eds Y. Isagi and Y. Suyama.) pp. 7–15. (Springer: Tokyo, Japan.)

Weygoldt, P. (1969). 'The Biology of Pseudoscorpions.' (Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, US.)

Wilcox, T. P., Hugg, L., Zeh, J. A., and Zeh, D. W. (1997). Mitochondrial DNA sequencing reveals extreme genetic differentiation in a cryptic species complex of neotropical pseudoscorpions. *Molecular Ecology Resources* **7**, 208–216.

Zeh, J. A., Zeh, D. W., and Bonilla, M. M. (2003). Phylogeography of the harlequin beetle-riding pseudoscorpion and the rise of the Isthmus of Panamá. *Molecular Ecology* **12**, 2759–2769.

Zeh, J. A., Bonilla, M. M., Su, E. J., Padua, M. V., Anderson, R. V., Kaur, D., Yang, D., and Zeh, D. W. (2012). Degrees of disruption: projected temperature increase has catastrophic consequences for reproduction in a tropical ectotherm. *Global Change Biology* **18**, 1833–1842.



図 1. *Mundochthonius japonicus* Chamberlin, 左上は虫体から分離した触肢.
スケールは 1 mm.

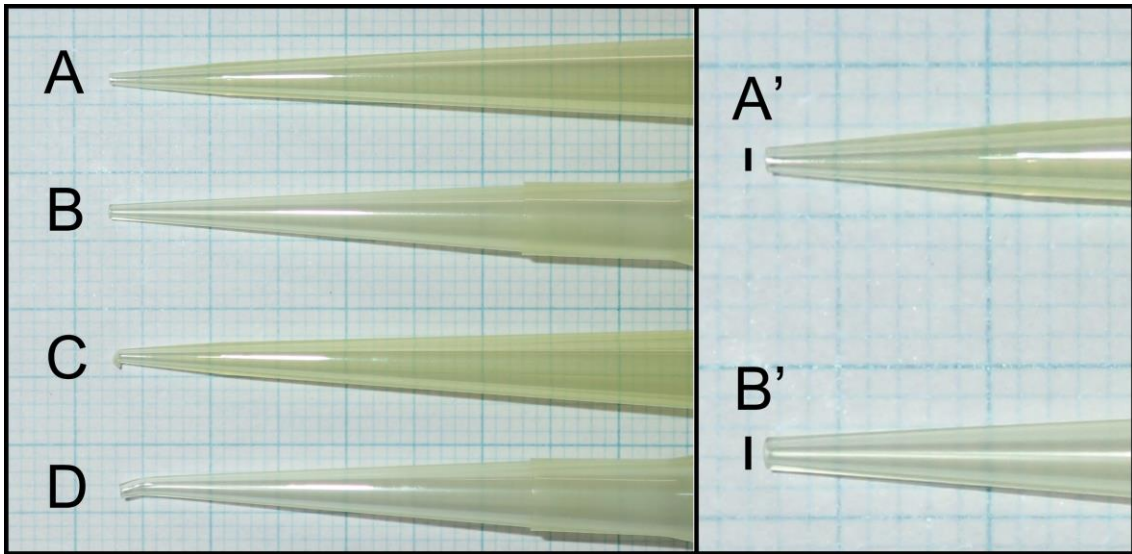


図 2. (A-D, A', B') 破碎用マイクロピペットチップ, 背景は 1 mm 方眼紙.

(A) 加工前のアイビス・ピペットチップ I-503Y; (A') A 先端部の拡大図; (B) 加工前の他のピペットチップ; (B') B 先端部の拡大図; (C) 加工後のアイビス・ピペットチップ I-503Y, 先端が破碎に適した丸い形状に加工できた; (D) 加工後の他のピペットチップ, 先が折れ曲がった破碎に不適な形状になりやすい. A' と B' における縦の黒色バーは各マイクロピペットチップの外径を示す. アイビス・ピペットチップ I-503Y はテーパ型となっており, 外径は B よりも狭い.

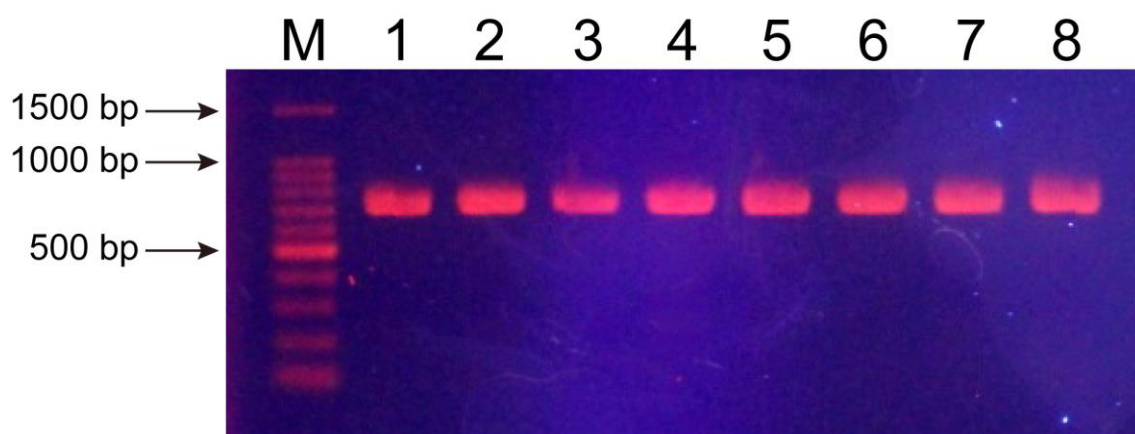


図 3. 片方の触肢から抽出した DNA を鋳型とした PCR 産物の電気泳動像.

PCR はプライマーセット LCO1490-HCO2198 (Folmer *et al.* 1994) を用いて行われた. M, サイズマーカー (100 bp ラダー); 1-3, *Mundochthonius japonicus* Chamberlin; 4-8, *Microbisium pygmaeum* (Ellingsen).

表 1. 先行研究における DNA 抽出方法および使用部位

文献	使用部位	抽出方法または使用したキット
Wilcox <i>et al.</i> (1997)	不明	2x CTAB
Zeh <i>et al.</i> (2003)	不明	2x CTAB
Moulds <i>et al.</i> (2007)	不明	Puregene DNA Purification Kit (Qiagen)
Murienne <i>et al.</i> (2008)	全体/付属肢1本	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)
Pfeiler <i>et al.</i> (2009)	不明	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)
Ovchinnikov and Masta (2012)	歩脚1本	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)
Zeh <i>et al.</i> (2012)	不明	gDNA Micro Tissue Kit (Life Technologies)
Harrison <i>et al.</i> (2014)	歩脚2本	Puregene DNA Purification Kit (Qiagen)
Harvey <i>et al.</i> (2016)	触肢1本	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

表 2. PCR 増幅結果および BLAST 検索結果

種	PCR増幅 成功数 /解析数	標本ID	アクセッション 番号	最も一致率の高かった配列 (BLAST検索)		
				分類群	アクセッション 番号	一致率 (%)
<i>Mundochthonius japonicus</i> Chamberlin [ツチカニムシ亜目]	3/3	100	AB855647	<i>Tyranno- chthonius</i> sp.	JN018174	80
		101				
		102				
<i>Microbisium pygmaeum</i> (Ellingsen) [カニムシ亜目]	5/5	125	AB855648	<i>Microbisium</i> sp.	KM835843	89
		129				
		126	AB855649	<i>Microbisium</i> sp.	KM835843	90
		128				
		127	LC147076	<i>Microbisium</i> sp.	KM835843	89

第3章

分子系統解析および形態解析によって明らかになった日本産 *Mundochthonius* 属

カニムシ（カニムシ目：ツチカニムシ科）の想定外の種多様性

Unexpected species diversity within Japanese *Mundochthonius* pseudoscorpions

(Pseudoscorpiones: Chthoniidae) and the necessity for improved species diagnosis

revealed by molecular and morphological examination

Invertebrate Systematics 印刷中の論文を博士論文として和訳・改訂

要旨 — 隠蔽種の同定を含む無脊椎動物の多様性の理解を深める上で、形態学と分子分類学の相補的アプローチを用いることは不可欠である。広く知られているクモガタ類の種分類は、長い間伝統的な診断形質に基づいてきたが、最近の分類学的研究では種の識別に信頼性がないことが示唆されている。従って、分子分類学的アプローチの適用は、このグループにおいて特に有用であり得る。ここでは、ミトコンドリア DNA シトクロム *c* オキシダーゼ I および核 DNA 18S *rRNA* 遺伝子の部分配列に基づいて、分子系統解析および種の区切り解析 (species delimitation analysis) を行い、日本産土壌性 *Mundochthonius* 属種 (ツチカニムシ科) の種分類および種識別のための形態学的特徴の信頼性を評価した。本研究の解析結果は、既知種 3 種および隠蔽種 4 種に対応する 7 つの主要な遺伝子クレードの存在を明らかにした。分子系統解析において、*M. kiyoshii* と *M. itohi* は単一のクレードを形成したが、*M. japonicus* は複数のクレードから構成され、系統関係と従来の形態的な診断形質を用いた現在の種の分類との不一致が強調された。本研究は、カニムシの種分類および種多様性のさらなる調査、研究の必要性を示している。特に、形態形質の精査は、隠蔽種間の差異を決定するのに役立つと期待される。

キーワード — 18S, クモガタ綱, 分類, 隠蔽種, シトクロム *c* オキシダーゼ I, 土壌

はじめに

種の分類は自然史研究の基本的な目標の1つであり、生物多様性の保全、病虫害の管理、生態系サービスの持続可能な提供に不可欠である (Bickford *et al.* 2006). 種の分類は伝統的に種間の異なる形態学的特徴を同定することに依存してきた. しかし、分子生物学的な技術、特に DNA シーケンシングやバーコーディングは、多くの無脊椎動物で知られているように (reviewed in Pfenninger and Schwenk 2007), 形態学的特徴によって認識されるよりも多様性が高いことを示している. 即ち、隠蔽種の存在である (Beheregaray and Caccone 2007). 従って、分類学は分子と形態を組み合わせるアプローチが必要であると主張されている (e.g. Hillis 1987; Dayrat 2005; Schlick-Steiner *et al.* 2007; Jörger and Schrödl 2013).

カニムシ目は 2 亜目 26 科 454 属に属する 3,500 種以上からなる分類群であり (Harvey 1990, 2013a; 2013b), 全ての種はプレパラート標本の様々な形態的特徴に基づいて記載されている (Weygoldt 1969). 基節棘や刺毛の形状、長感覚毛の数や配列パターンなどのいくつかの形質は、科や属間で明確に異なる (e.g. Chamberlin 1929a; Beier 1932a, 1932b; Morikawa 1960; Harvey 1992). 種同定においては、体長、毛序式 (頭胸部や腹部背板の刺毛の数)、特定の部位の形状、鋏部の歯の数、第一歩脚基節先端の形状等が診断形質として使用されている (Chamberlin 1929a; Beier 1932a, b; Morikawa 1960; Edward and Harvey 2008; Zaragoza 2008; Christophoryová *et al.* 2011).

しかしながら、最近の研究は前述した種分類における形態形質が必ずしも信頼できないことを示している (e.g. Harvey 2014; 坂寄 2014; Ohira *et al.* 2016a). Harvey (2014) は、*Chelifer cancroides* (Linnaeus, 1758) の体長が標本の状態と保存方法によって変化することを示した. 坂寄 (2014) は、*Allochthonius* 属の触肢

腿節の長さとの比率がプレパラート標本作製時の作製過程や脱水による影響を受けることを指摘している。Ohira *et al.* (2016a) は、サンプル数は少ないものの、*Mundochthonius* 属種の腹部背板毛序式と塩基配列パターン間の不一致を示した。これらの研究は、信頼性の低い形態的診断形質に基づいたカニムシの種分類の問題性を強調している。

日本産 *Mundochthonius* 属種は形態的特徴のみを使用して分類されている (図 1)。日本固有の 3 種 *M. japonicus* Chamberlin, 1929, *M. kiyoshii* Sakayori, 2002, *M. itohi* Sakayori, 2009 は体長、頭胸部および腹部背板の毛序式、触肢腿節の長さとの比率によって識別されている (Chamberlin 1929b; Morikawa 1954, 1960; Sakayori 2002, 2009; 表 1)。しかしながら、日本産 *Mundochthonius* 属種の腹部背板毛序式はそれぞれの種に固有でなく (Ohira *et al.* 2016a)、体長と触肢腿節の長さとの比率は種間で重複しているため、その種分類は再検討する必要がある。実際に上記の形質によって識別される *M. japonicus* の亜種、*M. j. japonicus* Chamberlin, 1929 と *M. j. scolytidis* Morikawa, 1954 の分類学的位置付けは、再評価される必要がある (Zaragoza and Harvey 2006; 坂寄 2010; 鶴崎 2012)。さらに、体長や腹部の毛序式が異なるが *M. japonicus scolytidis* と形態的に類似するとされる未記載種の存在も報告されている (前原ら 2003; 坂寄 2010)。

本研究では、日本産 *Mundochthonius* 属 3 種の標本をそれらの基準産地を含む分布域から採集し、分子系統解析と形態解析を実施した。分子系統解析はカニムシ類には高い遺伝的多様性があり、形態的な診断形質によって識別されない多くの隠蔽種が存在することを示している (Zeh *et al.* 2003; Moulds *et al.* 2007; Heerden *et al.* 2013; Harrison *et al.* 2014; Cosgrove *et al.* 2016)。本研究は種を分類するために用いられている伝統的な診断形質の信頼性を評価するために、日本産 *Mundochthonius* 属種の形態分類が分子系統解析によって支持されるかどうかを

検証した。*Mundochthonius* 属の種分類は、伝統的に重要と考えられてきた形態的な診断形質に基づいていることから、この属の種分類には問題があるため、種分類における分子データと形態データの両方を使用することの重要性を検討し、議論する好例と成り得る。

材料と方法

研究対象

Mundochthonius 属はツチカニムシ科 (Chthoniidae) に属し、全北区に分布している (Harvey 2013b)。ほとんどの *Mundochthonius* 属種は森林土壌に生息し、いくつかの種が洞穴から知られる。本研究では3種の日本産種 (*M. japonicus*, *M. kiyoshii*, *M. itohi*) と *M. japonicus* の2亜種 (*M. j. japonicus* と *M. j. scolytidis*) を対象とした。他に洞穴性の *M. japonicus* の2亜種 (*M. j. imadatei* Morikawa, 1956 と *M. j. tripartitus* Morikawa, 1956) が知られるが、洞穴性種の採集は困難であるため対象には含めなかった。本研究で使用した土壌性の4分類群は、体長、頭胸部の毛序式、腹部背板毛序式、触肢腿節の長さとの比率によってそれぞれ互いに識別されている (Chamberlin 1929b; Morikawa 1954, 1960; Sakayori 2002, 2009; 表 1)。*Mundochthonius japonicus* は日本から記載された本属最初の種であり (Chamberlin 1929b), *M. scolytidis* は Morikawa (1954, 1960) により *M. japonicus* の亜種 (*M. j. scolytidis*) として再分類された。これら2亜種は頭胸部と腹部背板の毛序式によって識別される (Morikawa 1960)。*Mundochthonius kiyoshii* は *M. japonicus* よりも体長が小さく、腹部背板毛序式が異なる (Sakayori 2002)。*Mundochthonius itohi* は *M. kiyoshii* と同じ腹部背板毛序式を持つが、体長と触肢腿節の長さとの比率が異なる (Sakayori 2009)。

Mundochthonius 属種は北海道から屋久島までの日本列島に広く分布する (図

2A). *Mundochthonius japonicus* は北海道, 本州, 四国, 九州, 屋久島を含む日本広域に分布する ; *M. j. japonicus* は本州南部, 四国, 九州に分布し, 対して *M. j. scolytidis* は北海道, 本州, 四国, 九州に分布する (Chamberlin 1929b; Morikawa 1954, 1955, 1960, 1962, 1971, 1972; 森川ら 1972; 佐藤 1978, 1979a, 1979b, 1979c, 1980, 1982a, 1982b, 1983, 1985, 1988, 2011, 2012; 小針 1984; 今立ら 1985; 坂寄 1990, 1995, 1998a, 1998b, 2000, 2001a, 2001b, 2004; 山本・頭山 1995; 佐藤・山内 2001; Yamamoto *et al.* 2001; 加藤・塘 2002; 前原ら 2003; 山内ら 2009; 塘ら 2011; 川野・佐藤 2015). *Mundochthonius kiyoshii* は九州西端の長崎県からのみ記録されている (Sakayori 2002). *Mundochthonius itohi* は本州の北東部にある茨城県と福島県から記録されている (加藤・塘 2002; 坂寄 2004, 2007, 2009; 塘ら 2011; 塘 2012).

採集地および採集方法

Mundochthonius 属の標本は, 日本産 *Mundochthonius* 属種および亜種の基準産地を含む 32 地点から採集した (図 2B; 付録 1). 各分類群の基準産地は霧島 (地点番号 28 ; *M. j. japonicus*), 松山 (番号 22 ; *M. j. scolytidis*), 長崎 (番号 23 ; *M. kiyoshii*), 常陸太田 (番号 15 ; *M. itohi*) である (Chamberlin 1929b; Morikawa 1954; Sakayori 2002, 2009). 加えて, 地点番号 19 から採集された *Tyrannochthonius japonicus* (Ellingsen, 1907) の一標本は, 系統解析の外群として使用した.

標本は園芸用ふるいを用いたシフティング法, またはツルグレン・ファネルを用いた抽出法によって, 落枝および腐植土から採集した. 採集されたすべての標本は純エタノールで固定した. 片方の触肢は実態顕微鏡下で先の尖ったタングステン・ニードルを用いて虫体から外し, 外された各触肢は DNA 抽出のために個別の 0.2 mL PCR チューブに移した. 触肢を外した虫体はプレパラート標

本作製まで 1.5 mL PCR チューブに純エタノールと共に保存した。

DNA 抽出, 増幅, 配列決定

全 genomic DNA は, 第 2 章で示した方法 (大平ら 2016b) を使用して, 片方の触肢から抽出した. 乾燥させた触肢と抽出バッファー 3 μL (0.1 g/L^{-1} of proteinase K, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.01 M EDTA, pH 8.0, 0.01% SDS に調製) は 0.2 mL PCR チューブに入れ, ホモジナイズした. サンプルは 56°C 60 分でインキュベートした後, 95°C 10 分で proteinase K を失活させた. 抽出した DNA は 1 M Tris-EDTA バッファーで 10 倍に希釈した後, DNA 増幅のための鋳型として直接使用した.

本研究では, Murienne *et al.* (2008), Harrison *et al.* (2014), Ohira *et al.* (2016a, 2016b) に従い, 2 つの遺伝子座, ミトコンドリア DNA (mtDNA) のシトクロム *c* オキシダーゼ I (*COI*) と核 DNA (nDNA) の *18S rRNA*, を系統学的再構築のために選択した. PCR 増幅は, *COI* 遺伝子は LCO1491–HCO2198 (Folmer *et al.* 1994), *18S rRNA* 遺伝子は 1F–5R, 3F–18Sbi, 18Sa2.0–9R (Giribet *et al.* 1996; Whiting *et al.* 1997) のユニバーサル・プライマーのペアをそれぞれ使用して行った. 全 8.0 μL の PCR 混合液中に, 鋳型として抽出 DNA 0.8 μL , 10 μM プライマー 0.16 μL , Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) 4.0 μL を含めた. *COI* と *18S rRNA* の両方の PCR 増幅は, 次の温度条件下で行った: 初期熱変性 95°C 15 分の後, 熱変性 94°C 30 秒, アニーリング 48°C 90 秒, 伸長反応 72°C 60 秒を 35 サイクル行い, 最終伸長 60°C 30 分とした. PCR 産物は Illustra™ ExoStar kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて精製した. 精製産物は ABI BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) を使用し, ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems) でダイレクト・シーケンスにより配列を決定した。フォワードおよびリバース・シーケンスは Finch TV ver. 1.4.0 (Geospiza, Seattle, WA, US) でアセンブルした。本研究で得られた *Mundochthonius* と *T. japonicus* の塩基配列の GenBank/ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) アクセッション番号を付録 3 に示した。

系統解析

ツチカニムシ科 (Chthoniidae) に属する 3 種の配列 : *Chthonius dacnodes* Navás, 1918 (*COI/18S rRNA* アクセッション番号 JN018171/NJ018288), *C. ischnocheles* (Hermann, 1804) (JN018172/JN018289, *Tyannochthonius* sp. JM-2008 (EU55906/EU559393) は GenBank/DDBJ から取得し, *T. japonicus* (LC200850/LC200880) と共に系統解析の外群として使用した。 *Mundochthonius* 属の配列, および外群の配列は, MAFFT ver. 7 (Katoh and Standley 2013) を使用してアライメントした。 *18S rRNA* 配列のギャップは trimAl ver. 1.2 (Capella-Gutiérrez *et al.* 2009) を使用して, デフォルト・パラメータの下で除外した。 *COI* 配列はギャップを含まなかった。

系統学的再構築は 3 つのアプローチを使用して行った : 最尤法 Maximum likelihood (ML), ベイズ推定 Bayesian inference (BI), Neighbor-net 解析。 系統解析は遺伝子座ごとのデータセットと combined したデータセットに基づいて実施した。 Partitioned モデルは 2 つの遺伝子座の combined 配列を使用した解析に適用した。 BI による系統学的再構築を実施する前に, KAKUSAN4 ver. 4.0 (Tanabe 2011) を使用して Schwarz's Bayesian information criterion (Schwarz 1978) に基づく最適モデルを選択した : *COI* は HKY85+G, *18S rRNA* は K80+G+I が選ばれた。 ベイズ推定による解析は MrBayes5D ver. 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003;

Tanabe 2008) を使用して実施した: 4 本のマルコフ連鎖を同時に走らせ、10,000,000 世代解析し、100 世代ごとにサンプリングした。最初の 25,000 本を burn-in し、サンプリングした残りの樹形から 50% コンセンサス・ツリーを作成した。Tracer 1.6 (Rambaut *et al.* 2014) を用いて、サンプリングした樹の log-likelihood が定常分布に達したか否かを決定した。最尤法による解析は RAxML ver. 8 (Stamatakis 2014) を使用して GTR+G モデル下で行った。各ノードの評価は、ML 解析ではブートストラップ値 (BP) が 80% より大きい場合に十分に解明されたノードとして扱い、BI 解析ではベイズの事後確率 (PP) が 0.95 より大きい場合に有意に支持されるノードとして扱った。Neighbor-net 解析 (Bryant and Moulton 2004) は SplitsTree ver. 4 (Huson and Bryant 2005) を使用して実施した。データ間の分岐が大きいデータセットでは、Neighbor-net は split decomposition と比較してより解決されたネットワークを生成することができ、各分類群のパターンを検出し、関係性を表現する際に有用である (Bryant and Moulton 2004)。Neighbor-net ネットワークは *COI* および *18S rRNA* 遺伝子の配列アライメントそれぞれから *p*-distance に基づいて生成し、各スプリットの支持はブートストラップ 1,000 回反復により推定した。

種の区切り解析 (species delimitation analysis)

発見的アプローチを用い、*COI* と *18S rRNA* ハプロタイプに基づいて種区切り解析 species delimitation analysis を行った。種発見的アプローチは事前にグルーピングができない分類群において有用である (Ence and Carstens 2011)。ミトコンドリア DNA データに基づく種の区切り解析において、地理的集団レベルの構造を反映する多数の「マイクロクレード」が推定種として推定される可能性があるため (e.g. Satler *et al.* 2013; Ortiz and Francke 2016), *COI* と *18S rRNA* デー

タは別個に解析した。しかしながら、種の区切り解析の結果は必ずしも異なる方法間で一致するとは限らない (e.g. Satler *et al.* 2013; Ortiz and Francke 2016)。従って、ここでは4つの異なる発見的アプローチにより種の区切り解析を行った：第一に、statistical parsimony analysis (Templeton *et al.* 1992) は、個別のハプロタイプ・ネットワークのグループを識別するために、95%コネクション・リミット下で TCS ver. 1.21 (Clement *et al.* 2000) を使用して行った。第二に、TaxonDNA package (<http://taxondna.sourceforge.net/>) に含まれる SpeciesIdentifier ver. 1.7.7 (Meier *et al.* 2006) を使用して、距離に基づくクラスタリングを行い、ペアワイズ uncorrected *p*-distance に基づいて 1% (動物 ; Ratnasingham and Hebert 2007), 3% (昆虫 ; Hebert *et al.* 2003a), 4% (クモ ; Barrett and Hebert 2005), 8% (鋏角類 ; Hebert *et al.* 2003b) の各閾値において実施した。これらの閾値は *COI* あるいは mtDNA 配列の DNA バーコーディングのためのものであるが、ここでは *18S rRNA* データにも使用した。第三に、poisson tree processes (PTP; Zhang *et al.* 2013) 法を用いて、本研究で得られた樹形に基づいて遺伝的クレードを推定した。この解析は *COI* と *18S rRNA* データそれぞれの ML および BI 樹のトポロジーを使用して、ベイズ推定を伴う PTP モデルを実装したウェブ・サーバー (bPTP サーバー ; <http://species.h-its.org/ptp/>) (2017年5月16日にアクセス) 上で実施した。各解析は 100,000 世代, 100 世代ごとにサンプリングを行い, 最初の 10% を burn-in した。最後に generalised mixed Yule-coalescent (GMYC; Pons *et al.* 2006) 法を使用して、種分化の分岐率と合祖プロセス間の閾値における最尤解に基づく種数を推定した。GMYC 法が要求する多分岐がない ultrametric な系統樹を構築するために BEAST (Drummond and Rambaut 2007) を使用した。BEAST のインプット・ファイルは BEAST ver. 2.3.2 (Bouckaert *et al.* 2014) に実装されている BEAUti ver. 2.3.2 を使用して作成した。置換速度は *COI* 遺伝子で 2.5%/100 万年 (クモ ;

Bidegaray-Batista and Arnedo 2011), *18S rRNA* 遺伝子で 1.8%/100 万年 (カメムシ; Bargues *et al.* 2000) とし, Yule prior および strict clock/ uncorrelated relaxed lognormal clock 下で解析を実施した. 置換モデルは *COI* と *18S rRNA* 遺伝子の両方で HKY+G モデルを選択し, その他のパラメーターは BEAUti のデフォルト設定とした. 各データセットは 30,000,000 世代解析し, 1,000 世代ごとにサンプリングを行った. Tracer 1.6 (Rambaut *et al.* 2014) を使用して, サンプリングされた樹の log-likelihood が定常分布に達したか否かを決定した. サンプリングされた樹形は, TreeAnnotator ver. 2.3.2 を使用し, 最初の 25% を burn-in して要約された. 単一閾値の GMYC 解析は R (R Core Team 2017) および APE (Paradis *et al.* 2004), SPLITS (Ezard *et al.* 2009) パッケージを使用して行った.

形態解析

小型節足動物類における古典的な手法を用いて (cf. Okajima 2006), 虫体 (DNA 抽出のために付属肢 1 本を外した) の顕微鏡標本スライドを作製した. 標本の齢期と性別は触肢の刺毛配列パターンおよび生殖域の形態を観察することにより決定した. 形態的特徴に基づいて若虫の種あるいは亜種を同定することは困難であるため, 成体標本のみを形態測定に使用した. 体長と触肢腿節の長さおよび幅は, 接眼マイクロメーターを備えた光学顕微鏡 (ECLIPSE E200, Nikon, Japan) を用いて測定した. 加えて, 頭胸部および腹部第 1 から第 3 背板の刺毛数 (毛序式) を計数した. 全ての標本は福島大学の Insect Diversity and Morphology Laboratory で保管している.

結果

分子系統解析

雄 34 個体, 雌 68 個体, 3 齢若虫 1 個体の合計 103 の *Mundochthonius* 属の標本を採集, 解析した. 分子系統解析は *COI* (427 bp) および *18S rRNA* 遺伝子 (1218 bp) の部分配列に基づいて行い, それぞれ 46 (c1-c46) と 29 (s1-s29) のハプロタイプが検出された (付録 3). *Mundochthonius* 属の単系統性は, 系統樹 (図 3 および付録 2) および Neighbor-net ネットワーク (図 4) において高いブートストラップ値 (100% BP) とベイズの事後確率 (1.00 PP) によって強く支持された.

COI と *18S rRNA* の combined データセットに基づく系統解析は ML と BI 樹の両方で主要な 7 つのクレードの存在を明らかにした (図 3). ML 樹のトポロジーは BI 樹のトポロジーと一致しなかったものの (図 3 中の破線), 7 つの主要なクレードは BP > 80% および PP > 0.95 により支持された. これらの 7 つのクレードは *COI* および *18S rRNA* データセットを別個に解析した場合には必ずしも形成されなかった (付録 2). しかしながら, Neighbour-net 解析では, 7 つの主要なクレードが *COI* および *18S rRNA* データセットのそれぞれで形成され, 各クレードは *COI* および *18S rRNA* の combined データセットの系統樹と同じハプロタイプから構成された. これらのクレードは, *COI* のネットワークにおけるクレード 4 (図 4A, 50% BP) を除き, 高い BP 値によって支持された. 各クレード内の sequence divergence の平均値の範囲 (uncorrected *p*-distance) は, *COI* で 0.5–16.9%, *18S rRNA* で 0.2–0.8% であった (表 2). クレード内の *COI* divergence の範囲はクレード間よりも大きかったが, クレード内の *18S rRNA* のそれはクレード間よりも小さかった.

クレード 2, 4, 7 はそれぞれ *M. kiyoshii*, *M. japonicus*, *M. itohi* の基準産地から検出されたハプロタイプを含んだ. クレード 1, 2, 3, 6 に割り当てられたハプロタイプは 1 つまたは 2 つの地点からのみ検出され, クレード 4, 5, 7 に割

り当てられたハプロタイプはいくつかの地点から検出された（表3）。またクレード4, 5, 7は、それぞれ3-7の地域に対応する系統に分かれた。ほとんどのサンプリング地点において単一のクレードに割り当てられたハプロタイプが検出されたが、地点番号15だけはクレード4と7の両方に割り当てられたハプロタイプが検出された。

種の区切り解析（species delimitation analysis）

異なる4つの種の区切りアプローチにより、種数は *COI* ハプロタイプのデータセットでは21-32, *18S rRNA* ハプロタイプのデータセットでは1-9と推定された（表4）。種の区切りは、*COI* と *18S rRNA* の両方において、異なる種の区切り解析の方法間では一致しなかった。*COI* データにおいて、4%閾値の *speciesIdentifier* と *GMYC* 法の23クラスターが同じハプロタイプ組成であった。また、*18S rRNA* データにおいて、TCS, 1%閾値の *speciesIdentifier*, *Yule-strict clock prior* の *GMYC* 法の7クラスターが同じハプロタイプ組成であった。

COI および *18S rRNA* ハプロタイプのデータセットにおいて区切られた23および7クラスターは、それぞれ系統樹とネットワークの7つのクレードと地理的な系統に対応した。*COI* データに基づいて区切られた23種のうち3クラスターはクレード1, 2, 3に対応した。他のクラスターは概ねクレード4, 5, 6, 7の地理的な系統と対応したが、クレード4の茨城および奈良、愛知、九州南東部系統、クレード5の福島南西部系統、クレード6は2つのクラスターに分かれた。従って、*COI* データセットに基づいて区切られたこれらの23クラスターは、種よりも地理的集団レベルの構造を潜在的に反映するより細かいグループ（De Queiroz 2007; Satler *et al.* 2013）に細分される傾向があった。一方で、*18S rRNA* データセットの7つのクラスターは、系統樹およびネットワークにおいて

形成された7つのクレードと同じであった。これらの7つのクレードは、例えば Neighbor-net ネットワーク (図 4A) のように *COI* データでも部分的に支持された。ここでは保存的アプローチを採り、*18S rRNA* データにおける7つのクラスターを相互に独立した種として同定した。形態学的特徴の比較は、これらの7つのクラスターに基づいて実施した。

形態解析

日本産 *Mundochthonius* 属の分布域の大部分を網羅する 32 地点から採集された成体 102 標本から、これまでに *Mundochthonius j. scolytidis*, *M. kiyoshii*, *M. itohi* について記載された2つの毛序式のタイプが検出された。頭胸部毛序式は2標本を除くほぼ全ての標本で「6-4-4-2-2, 18」であり、また2つのタイプの腹部背板毛序式が検出された：クレード 1, 3, 4, 5, 6, 7 に割り当てられた標本から「4-4-6」、クレード 2 と 7 に割り当てられた標本から「4-6-6」(表 1; 付録 3 を参照)。いくつかの毛序式の変異タイプが検出された。頭胸部毛序式では、

「6-4-3-2-2, 17」がクレード 4 に割り当てられた 1 標本で観察され、「5-4-4-2-2, 17」はクレード 7 に割り当てられた 1 標本で観察された。腹部背板毛序式では、「5-4-6」がクレード 4 に割り当てられた 2 標本で観察され、「4-6-7」、「4-5-6」、「4-7-6」、「4-7-7」がクレード 7 に割り当てられた 6 標本, 6 標本, 2 標本, 1 標本でそれぞれ観察された。*Mundochthonius j. japonicus* として記載された頭胸部毛序式「4-4-4-2-2, 16」、腹部背板毛序式「4-4-4」に対応する標本はなかった。

標本の各部の測定長やその比率は広い範囲を示し、その範囲が互いに重複するクレードや既知種と一致しない値を示すクレードがあった。体長は 0.76–1.52 mm と大きな変異を示したものの、クレード 1, 2, 6 に割り当てられた標本の体長は 1 mm 未満で、これに対してクレード 3, 4, 5 の標本は 1 mm を越え、クレ

ード7の標本はおよそ1 mmであった。触肢腿節の長さとは幅は、それぞれ0.23–0.44 mm, 0.06–0.14 mmの範囲であった。触肢腿節の長さとは幅は正の相関があった(相関係数 $r = 0.90$, 付録4)。体長と触肢腿節の長さとは幅の比率は、既知3種の記載値の範囲に必ずしも一致しなかった(図5)。クレード1に割り当てられた雌の標本の値は *M. itohi* の既知の範囲と重複した。クレード3, 4, 5に割り当てられた標本の値は *M. j. scolytidis* の範囲に入り、クレード7のそれは *M. itohi* の範囲に入った。しかしながら、クレード2と6に割り当てられた標本の値はどの既知種の範囲からも外れた。

考 察

日本産土壌性 *Mundochthonius* の隠蔽種

本研究の結果は、日本産土壌性 *Mundochthonius* 属には隠蔽種が存在することを示唆しており、また形態学的特徴のみに基づく現在の種の分類に問題があることを強調している。本研究の系統解析で検出されたクレードの間の遺伝的相違は種間の差異を反映しており、従って、現在の日本産土壌性 *Mundochthonius* 属の種多様性は過小評価されているかもしれない。鋏角類の多くの同属種間は、DNA バーコーディングおよび種同定にしばしば使用されるミトコンドリア DNA *COI* 遺伝子において、少なくとも8%の *sequence divergence* を有する (Hebert *et al.* 2003b)。さらに、クモ目、サソリ目、ザトウムシ目のいくつかの同属種の間では、核 DNA *18S rRNA* 遺伝子において1%未満の *sequence divergence* がある (Hedin and Bond 2006; Ojanguren-Afflastro *et al.* 2016; Giriber *et al.* 2016)。本研究における7つのクレード間の *sequence divergence* の平均は、これらの値よりも高く (*COI* では13.1–19.8%, *18S rRNA* では1.6–5.8%), これらの7つのクレードはそれぞれ別個の種と見なすことが妥当であることを示唆している。また2つの

クレードが同所分布する場合であっても、ミトコンドリア DNA と核 DNA それぞれの系統に不一致がないため、クレード間で遺伝的な交流が生じていない、即ち各クレード間で交配隔離が成立していると考えられる。このことは、各クレードが互いに異なる種と見なすことが適当であることを強調する。このうち3つのクレードの形態的特徴は概ね *M. japonicus*, *M. kiyoshii* および *M. itohi* に対応しており、従って、日本の土壌性 *Mundochthonius* 属には、少なくともさらに4種の隠蔽種または未記載種が含まれている可能性が高い。

Mundochthonius kiyoshii と *M. itohi* は分子と形態解析の両方から独立種として支持される。クレード7に割り当てられた標本の形態学的特徴は *M. itohi* と明らかに一致した (図5)。クレード7の標本において優占的な腹部背板毛序式は、*M. itohi* の原記載 (Sakayori 2009) と同様に「4-5-6」または「4-6-6」であった。体長と触肢腿節の長さとは幅の比率も *M. itohi* と一致した。クレード2に割り当てられた2つの標本の腹部背板毛序式は「4-6-6」であり、その体長は本研究で解析された他の標本よりも小さかった。体長は *M. kiyoshii* や他の既知種について記載された値と一致しなかったが、*M. kiyoshii* は日本で最も小型の *Mundochthonius* 属種であり (Sakayori 2002, 2010)、これらの標本の腹部背板毛序式は *M. kiyoshii* の原記載 (Sakayori 2002) と同じである。従って、クレード2の標本は、腹部背板毛序式と体長の組み合わせに基づき、*M. kiyoshii* とみなすことができる。

Mundochthonius japonicus には土壌性の2亜種、*M. j. japonicus* と *M. j. scolytidis* が記載されているが、本研究では前者と同じ形態的特徴を示す標本が認められなかったため、これら2亜種の分類学的な取扱いは明確にできていない。

Mundochthonius. j. japonicus と *M. j. scolytidis* の基準産地 (Chamberlin 1929b; Morikawa 1954) から採集された全ての標本がクレード4に割り当てられたため、

少なくとも *M. japonicus* はクレード4と推定される。しかしながら、クレード4に割り当てられた標本の体長および触肢腿節の長さとの比率も、*M. j. solytidis* について記載された値と一致している（図5）。本研究では基準産地を含む網羅的な野外調査を実施したにもかかわらず、Morikawa（1960）以来、*M. j. japonicus* は記録されていない。これはこの種の記載が不十分であったためと考えられる（Chamberlin 1929b; Morikawa 1960）。この分類学的混乱は、*M. japonicus* の再定義によって解決されるかもしれない。

結論として、本研究では7つのクレードは既知種に対応する3つのクレード（クレード2, 4, 7）を含む独立種であることを提案する。加えて、クレード1, 3, 5, および6は隠蔽種として扱うことを提案する。これらの隠蔽種は伝統的な診断形質を使用して *M. j. solytidis* から識別することはできない。本研究で検出された隠蔽種を含む7種の存在は、日本産 *Mundochthonius* 属種がこれまでの想定（前原ら 2003; 坂寄 2010）よりも多様であることを示唆している。さらなる調査は、未知の系統またはハプロタイプを検出し、多様性のレベルをより増加させる可能性が高い。ユーラシア大陸、特にアジアおよびロシアに分布する種を含む解析は、日本産 *Mundochthonius* 属種の起源および種分化プロセスを推測することを可能にするだろう。大陸種と島嶼種間の系統に関する研究は、カニムシ類の生物地理学における重要な課題であり（Harrison *et al.* 2014; Cosgrove *et al.* 2016）、包括的なサンプリングと解析は日本産 *Mundochthonius* 属種の多様性のより正確な同定と記述を可能にすると考えられる。

カニムシ類の種分類への示唆

いくつかの先行研究は、高次分類群レベルにおけるカニムシ類の形態学的分類が分子系統解析によって支持されないことを強調している（Murienne *et al.*

2008; Harrison *et al.* 2014). 本研究はまた、伝統的な診断形質を使用した種の分類を根本的に改善する必要性を示唆している。カニムシ類の種分類は伝統的に体長, 毛序式, および特定の部分の形態等の診断形質に基づいている (Chamberlin 1929a; Beier 1932a; 1932b; Morikawa 1960). しかし, 最近の研究では種の分類に関するいくつかの形態学的な診断形質が信頼性を欠くことが示唆されている (Harvey 2014; 坂寄 2014; Ohira *et al.* 2016a). 本研究を含む分子系統学的研究 (e.g. Harrison *et al.* 2014) は, 形態学的な診断形質に基づく分類と系統関係には一致しない部分も多く, 各形質状態 (共有祖先形質および/または共有派生形質) の解釈が誤っている可能性もあることを示している.

カニムシ類を形態形質によって分類することは難しいものの, 形態学的に種を識別することは明らかに重要である. 形態学的な精査は, 分類群の再定義および有用な診断形質の検出等 (e.g. Zaragoza 2008), 分類学上の問題の解決に大きく貢献する. 本研究で使用した *Mundochthonius* 属の2種, *M. kiyoshii* および *M. itohi* は, 形態学的な精査の重要性を示している. 伝統的な診断形質を含む形態学的特徴の注意深く詳細な観察に基づいて記述されたそれらの種としての分類学的位置付けは, 本研究の分子系統解析によっても強く支持されている. しかし, 種分類において種間で測定値の範囲の重複が見られる診断形質や, 値が同一である診断形質 (例えば, 体長や腹部背板毛序式) を用いることは問題である. カニムシ類の種多様性を完全に理解するためには, より信頼できる診断形質が必要であり, それらの発見や提案はこれからの研究において欠かせない分野のひとつである.

信頼できる診断形質の発見や提案, または評価は, 分子系統解析に基づいた検討が必要であるかもしれない. 形態学的な種分類は詳細で専門的な検討を必要とするため, 伝統的な診断形質のみに基づく種の分類は依然として困難であ

る。特に単為生殖を行う *Microbisium* 属カニムシ類（コケカニムシ科）では、種間の形態的類似性からいくつかの種の存在に懐疑的な意見もある（Chamberlin 1930; Dashdamirov and Golovatch 2005）。このように形態形質だけでは分類学的な検討が困難である場合において、分子系統学的解析は種の区切りを明確にしたうえで形態形質の評価を行い、種の識別に有用な診断形質の検出を容易にする貴重な情報を提供することができる（*sensu* Page *et al.* 2005; Jörger and Schrödl 2013）。従って、分子系統解析に続く形態学的な検討は、カニムシ類の分類体系を整理するのに役立つだろう。

引用文献

- Bargues, M. D., Marcilla, A., Ramsey, J. M., Dujardin, J. P., Schofield, C. J., and Mas-Coma, S. (2000). Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **95**, 567–573.
- Barrett, R. D., and Hebert, P. D. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* **83**, 481–491.
- Beheregaray, L. B. B., and Caccone, A. (2007). Cryptic biodiversity in a changing world. *Journal of Biology* **6**, 9.
- Beier, M. (1932a). Pseudoscorpionidea I. Subord. Chthoniinea et Neobisiinea. *Tierreich* **57**, i–xx, 1–258.
- Beier, M. (1932b). Pseudoscorpionidea II. Subord. C. Cheliferinea. *Tierreich* **58**, i–xxi, 1–294.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., and Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and

- conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 148–155.
- Bidegaray-Batista, L., and Arnedo, M. A. (2011). Gone with the plate: the opening of the Western Mediterranean basin drove the diversification of ground-dweller spiders. *BMC Evolutionary Biology* **11**, 317.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard M. A., Rambaut, A., and Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* **10**, e1003537.
- Bryant, D., and Moulton, V. (2004). Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 255–265.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., and Gabaldón, T. (2009). TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**, 1972–1973.
- Chamberlin, J. C. (1929a). A synoptic classification of the false scorpions or chela-spinners, with a report on a cosmopolitan collection of the same. Part I. The Heterosphyronida (Chthoniidae) (Arachnida-Chelonethida). *Annals and Magazine of Natural History* **4**, 50-80.
- Chamberlin, J. C. (1929b). On some false scorpions of the suborder Heterosphyronida (Arachnida-Chelonethida). *Canadian Entomologist* **61**, 152–155.
- Chamberlin, J. C. (1930). A synoptic classification of the false scorpions or chela-spinners, with a report on a cosmopolitan collection of the same. Part II. The Diplosphyronida (Arachnida-Chelonethida). *Annals and Magazine of Natural History* **5**, 1–48, 585–620.
- Christophoryová, J., Mock, A., and Luptáček, P. (2011). *Chthonius* (*Chthonius*)

- carinthiacus* and *Chthonius (Ephippiochthonius) tuberculatus* new to the fauna of Slovakia (Pseudoscorpiones: Chthoniidae). *Arachnologische Mitteilungen* **42**, 23–28.
- Clement, M, Posada, D, and Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657–1659.
- Cosgrove, J. G., Agnarsson, I., Harvey, M. S., and Binford, G. J. (2016). Pseudoscorpion diversity and distribution in the West Indies: sequence data confirm single island endemism for some clades, but not others. *Journal of Arachnology* **44**, 257–271.
- Dashdamirov, S., and Golovatch, S. I. (2005). *Miscellanea chernetologica* (Arachnida: Pseudoscorpiones), based on the collection of the Natural History Museum in Vienna, Part 1. *Arthropoda Selecta* **14**, 299–301.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**, 407–415.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* **56**, 879–886.
- Drummond, A. J., and Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 214.
- Edward, K. L., and Harvey, M. S. (2008). Short-range endemism in hypogean environments: the pseudoscorpion genera *Tyrannochthonius* and *Lagynochthonius* (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) in the semiarid zone of Western Australia. *Invertebrate Systematics* **22**, 259–293.
- Ence, D. D., and Carstens, B. C. (2011). SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation. *Molecular Ecology Resources* **11**, 473–480.

- Ezard, T., Fujisawa, T., and Barraclough, T. (2009). 'Splits: species Limits by Threshold Statistics. R Package Version 1.0.' Available at <http://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>. [Accessed 8 May 2017.]
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vriegenhoek, 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.
- Giribet, G., Carranza, S., Bagaña, J., Riutort, M., and Ribera, C. (1996). First molecular evidence for the existence of a Tardigrada+Arthropoda clade. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 76–84.
- Giribet, G., Boyer, S. L., Baker, C. M., Fernández, R., Sharma, P. P., Bivort, B. L., Daniels, S. R., Harvey, M. S., and Griswold, C. E. (2016). A molecular phylogeny of the temperate Gondwanan family Pettalidae (Arachnida, Opiliones, Cyphophthalmi) and the limits of taxonomic sampling. *Zoological Journal of the Linnean Society* **178**, 523–545.
- Harrison, S. E., Guzik, M. T., Harvey, M. S., and Austin, A. D. (2014). Molecular phylogenetic analysis of Western Australian troglobitic chthoniid pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) points to multiple independent subterranean clades. *Invertebrate Systematics* **28**, 386–400.
- Harvey, M. S. (1990). 'Catalogue of the Pseudoscorpionida.' (Manchester University Press: Manchester, UK.)
- Harvey, M. S. (1992). The phylogeny and classification of the Pseudoscorpionida (Chelicerata: Arachnida). *Invertebrate Systematics* **6**, 1373–1435.
- Harvey, M. S. (2013a). Order Pseudoscorpiones. *Zootaxa* **3703**, 34–35.

- Harvey, M. S. (2013b). 'Pseudoscorpions of the World, Version 3.0.' Western Australian Museum, Perth. Available at <http://www.museum.wa.gov.au/catalogues/pseudoscorpions>. [Accessed 31 October 2016.]
- Harvey, M. S. (2014). A review and redescription of the cosmopolitan pseudoscorpion *Chelifer cancroides* (Pseudoscorpiones: Cheliferidae). *Journal of Arachnology* **42**, 86–104.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., and Ball, S. L. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**, 313–321.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., and de Waard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**, S96–S99.
- Hedin, M., and Bond, J. E. (2006). Molecular phylogenetics of the spider infraorder Mygalomorphae using nuclear rRNA genes (18S and 28S): conflict and agreement with the current system of classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **41**, 454–471.
- Heerden, J. V., Taylor, P. J., and Heerden, C. V. (2013). Genetic differentiation in *Horus* Chamberlin (Arachnida: Pseudoscorpiones: Olpiidae) as indicated by mitochondrial DNA analysis. *African Zoology* **48**, 351–358.
- Hillis, D. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 23–42.
- Huson, D. H., and Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in

- evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 254–267.
- 今立源太良, 石川和男, 石井 清, 小針 廣. (1985). 補遺 月山のブナ林, ブナ伐採跡地の土壌動物相. *Edaphologia* **33**, 30–34.
- Jörger, K. M., and Schrödl, M. (2013). How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers in Zoology* **10**, 59.
- 加藤 与志輝, 塘 忠顕. (2002). 福島県中通り北部および浜通り北部における土壌性カニムシ類. *福島生物* **45**, 19–24.
- Katoh, K., and Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 772–780.
- 川野敬介, 佐藤英文. (2015). 山口県のカニムシ類. *ホシザキグリーン財団研究報告* **18**, 251–272.
- 小針 廣. (1984). 筑波山における土壌性カニムシの年間消長. *Edaphologia* **30**, 1–10.
- 前原 忠, 萩原康夫, 石井 清, 伊藤良作, 黒住耐二, 坂寄 廣, 菅波洋平, 田村浩志, 茅根重夫, 中村修美, 直海俊一朗, 布村 昇, 萩野康則, 宮田俊晴, 石橋整司. (2003). 利尻島の土壌動物. *利尻研究* **22**, 55–72.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., and Ng, P. K. (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* **55**, 715–728.
- Morikawa, K. (1954). Two new species of Chthoniinea from Japan. *Japanese Journal of Zoology* **11**, 329–331.
- Morikawa, K. (1955). Pseudoscorpions of forest soil in Shikoku. *Memoirs of the Ehime University (2B)* **2**, 215–222.

- Morikawa, K. (1956). Cave pseudoscorpions of Japan (I). *Memoirs of the Ehime University (2B)* **2**, 271–282.
- Morikawa, K. (1960). Systematic studies of Japanese pseudoscorpion. *Memoirs of the Ehime University (2B)* **4**, 85–172.
- Morikawa, K. (1962). Ecological and some biological notes on Japanese pseudoscorpions. *Memoirs of the Ehime University (2B)* **4**, 417–435.
- 森川國康. (1971). JIBP 主調査地, 大雪山地域の動物相調査報告-VII. 大雪山地域における森林土壌中型動物相, 石鎚山・魚梁瀬国有林のそれとの比較を含む. In '陸上生態系における動物群集の調査と自然保護の研究 昭和 45 年度研究報告'. (加藤陸奥雄編.) pp. 99–117. (JIBP/CT-S セクション: 仙台.)
- Morikawa, K. (1972). Pseudoscorpions from Mt. Poroshiri-daké of the Hidaka Mountain Range, Northern Japan. *Memoirs of the National Science Museum of Tokyo* **5**, 33–35.
- 森川國康, 石川和男, 芝 実. (1972). JIBP 主調査地, 霧島山地域の動物相調査報告-V. 霧島地域における森林土壌中型動物相. In 陸上生態系における動物群集の調査と自然保護の研究 昭和 46 年度研究報告'. (加藤陸奥雄編.) pp. 81–98. (JIBP/CT-S セクション: 仙台.)
- Moulds, T. A., Murphy, N., Adams, M., Reardon, T., Harvey, M. S., Jennings, J., and Austin, A. D. (2007). Phylogeography of cave pseudoscorpions in Southern Australia. *Journal of Biogeography* **34**, 951–962.
- Murienne, J., Harvey, M. S., and Giribet, G. (2008). First molecular phylogeny of the major clades of Pseudoscorpiones (Arthropoda: Chelicerata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**, 170–184.
- Ohira, H., Kaneko, S., and Tsutsumi, T. (2016a). Is abdominal tergal chaetotaxy reliable

- for species diagnosis of Japanese soil-dwelling *Mundochthonius* pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae)?. *Proceedings of Arthropodan Embryological Society of Japan* **50**, 11–13.
- 大平 創, 兼子伸吾, 塘 忠顕. (2016b). 小型カニムシ類の付属肢を用いた迅速・安価な DNA 抽出法. *Acta Arachnologica* **65**, 89–95.
- Ojanguren-Affilastro, A. A., Mattoni, C. I., Ochoa, J. A., Ramírez, M. J., Ceccarelli, F. S., and Prendini, L. (2016). Phylogeny, species delimitation and convergence in the South American bothriurid scorpion genus *Brachistosternus* Pocock 1893: integrating morphology, nuclear and mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **94**, 159–170.
- Okajima, S. (2006). 'The Insects of Japan, Vol.2, the Suborder Tubulifera.' (Touka Syobo: Fukuoka, Japan.)
- Ortiz, D., and Francke, O. F. (2016). Two DNA barcodes and morphology for multi-method species delimitation in *Bonnetina tarantulas* (Araneae: Theraphosidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **101**, 176–193.
- Page, T. J., Choy, S. C., and Hughes, J. M. (2005). The taxonomic feedback loop: symbiosis of morphology and molecules. *Biology Letters* **1**, 139–142.
- Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20**, 289–290.
- Pfenninger, M., and Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 121.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., and Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species

- delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* **55**, 595–609.
- R Core Team (2017). 'R: A Language and Environment for Statistical Computing.' R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at <https://www.R-project.org/>. [Accessed 8 May 2017.]
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D., and Drummond, A. J. (2014). 'Tracer V1.6'. Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. [Accessed 8 May 2017.]
- Ratnasingham, S., and Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* **7**, 355–364.
- Ronquist, F., and Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
- 坂寄 廣. (1990). 関東平野北部低木林における土壌性カニムシの生態分布について. *Edaphologia* **43**, 31–40.
- 坂寄 廣. (1995). 足尾山地のカニムシ類. *栃木県立博物館研究報告書* **13**, 27–31.
- 坂寄 廣. (1998a). 尾瀬ヶ原およびその周辺山地の土壌性カニムシ類. In '尾瀬の総合調査'. (尾瀬総合学術調査団編.) pp. 705–710. (尾瀬総合学術調査団: 前橋.)
- 坂寄 廣. (1998b). カニムシ類. In '茨城県自然博物館第1次総合調査報告書 筑波山・霞ヶ浦を中心とする県南部地域の自然'. (茨城県自然博物館編.) pp. 299–301. (茨城県自然博物館: 岩井.)
- 坂寄 廣. (2000). 皇居の土壌性カニムシ. *国立科学博物館専報* **35**, 123–126.
- 坂寄 廣. (2001a). 茨城県下妻市における土壌性カニムシ類の季節消長. *茨城県自然博物館研究報告* **4**, 79–82.
- 坂寄 廣. (2001b). 土壌性カニムシ類. In '茨城県自然博物館第2次総合調査報告書

- 鶏足山塊・涸沼・県央海岸を中心とする県央地域の自然'. (茨城県自然博物館編.) pp. 329–331. (茨城県自然博物館: 岩井.)
- Sakayori, H. (2002). Two new species of the family Chthoniidae from Kyushu, in western Japan (Arachnida: Pseudoscorpionida). *Edaphologia* **69**, 1–8.
- 坂寄 廣. (2004). 土壌性カニムシ類. In '茨城県自然博物館第3次総合調査報告書 阿武隈山地・県北部海岸を中心とした県北東部地域の自然'. (茨城県自然博物館編.) pp. 363–365. (茨城県自然博物館: 岩井.)
- 坂寄 廣. (2007). 土壌性カニムシ類. In '茨城県自然博物館第4次総合調査報告書 八溝山地・久慈川を中心とする県北西地域の自然'. (茨城県自然博物館編.) pp. 327–331. (茨城県自然博物館: 坂東.)
- Sakayori, H. (2009). A new species of the genus *Mundochthonius* from Ibaraki Prefecture, central Japan (Arachnida: Pseudoscorpionida: Chthoniidae). *Bulletin of Ibaraki Nature Museum* **12**, 1–4.
- 坂寄 廣. (2010). 日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ分類の現状. In '茨城県自然博物館総合調査報告書 -2009年 茨城県の昆虫類およびその他の無脊椎動物の動向-'. (茨城県自然博物館編.) pp. 51–52. (茨城県自然博物館: 坂東.)
- 坂寄 廣. (2014). 岡山産オウギツチカニムシ *Allochthonius (Allochthonius) opticus* の再記載 (カニムシ目, ツチカニムシ科). *茨城県自然博物館研究報告* **17**, 1–6.
- Satler, J. D., Carstens, B. C., and Hedin, M. (2013). Multilocus species delimitation in a complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Antrodiaetidae, *Aliatypus*). *Systematic Biology* **62**, 805–823.
- 佐藤英文. (1978). 日本産カニムシ分布資料 I. *Atypus* **72**, 39–42.
- 佐藤英文. (1979a). 大山におけるシフティング調査法による標高別および植生別

- にみたカニムシ相. *Edaphologia* **19**, 13–24.
- 佐藤英文. (1979b). 屋久島における土壌生活性カニムシの垂直分布. *Edaphologia* **20**, 13–18.
- 佐藤英文. (1979c). 日本産カニムシ分布資料 II. *Atypus* **74**, 42–44.
- 佐藤英文. (1980). 鳥海山における土壌性カニムシの垂直分布. *Edaphologia* **22**, 9–14.
- 佐藤英文. (1982a). 軽井沢における土壌性カニムシの年間消長. *Edaphologia* **25**, 57–64.
- 佐藤英文. (1982b). カニムシ分布資料 III. *Atypus* **81**, 31–34.
- Sato, H. (1983). Altitudinal distribution of soil pseudoscorpions at Mt. Fuji. *Edaphologia* **28**, 13–22.
- 佐藤英文. (1985). 山形県船形山における土壌性カニムシの垂直分布. *日本生物地理学会会報* **40**, 21–24.
- 佐藤英文. (1988). 横浜における土壌性カニムシの年間消長. *Edaphologia* **38**, 11–16.
- 佐藤英文. (2011). 北海道の山地における土壌性カニムシ類の垂直分布. *鶴見大学紀要 第4部 人文・社会・自然科学編* **48**, 15–21.
- 佐藤英文. (2012). 山形県における土壌性カニムシ類の季節消長. *鶴見大学紀要 第4部 人文・社会・自然科学編* **49**, 117–130.
- 佐藤英文, 山内 智. (2001). 青森県八甲田山のカニムシ類について. *青森自然誌研究* **6**, 61–65.
- Schlick-Steiner, B. C., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R. H., and Steiner, F. M. (2007). Without morphology, cryptic species stay in taxonomic crypsis following discovery. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 391–392.

- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* **6**, 461–464.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313.
- Tanabe, A. S. (2008) 'MrBayes5D.' Available at <http://fifthdimension.jp/products/mrbayes5d>. [Accessed 31 January 2017.]
- Tanabe, A. S. (2011). Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Molecular Ecology Resources* **11**, 914–921.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A., and Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**, 619–633.
- 鶴崎展巨. (2012). 松山市産カニムシ類目録. In '松山市野生動植物目録 2012'. (まつやま自然環境調査会編.) pp. 279–280. (松山市環境部: 松山.)
- 塘 忠顕. (2012). 福島県相馬市の土壌動物に対する東日本大震災の影響 震災後に実施したカニムシ類とアザミウマ類の調査から. *福島大学プロジェクト研究 [自然と人間] 研究報告* **9**, 1–12.
- 塘 忠顕, 加藤与志輝, 吉澤 領, 河端将太. (2011). 福島県会津地方南部における土壌性カニムシ相. 付. 福島県におけるカニムシ類の記録. *福島生物* **54**, 1–12.
- Weygoldt, P. (1969). 'The Biology of Pseudoscorpions.' (Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, US.)

- Whiting, M. F., Carpenter, J. C., Wheeler, Q. D., and Wheeler, W. C. (1997). The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Systematic Biology* **46**, 1–68.
- 山本哲也, 頭山冒郁. (1995). 広島県西部周辺のカニムシ相とアリ相について ブナ林帯と照葉樹帯の比較. *Edaphologia* **54**, 33–38.
- Yamamoto, T., Nakagoshi, N., and Touyama, Y. (2001). Ecological study of pseudoscorpion fauna in the soil organic layer in managed and abandoned secondary forests. *Ecological Research* **16**, 593–601.
- 山内健生, 門脇久志, 山本哲也, 佐藤英文. (2009). 隠岐諸島で採集された土壌性カニムシ類. *ホシザキグリーン財団研究報告* **12**, 281–284.
- Zaragoza, J. A. (2008). On the status of the subspecies of *Roncocreagris galeonuda* (Pseudoscorpiones: Neobisiidae): importance of the chelal microsetae pattern. Remarks on the genus *Roncocreagris* Mahnert. *Revista Ibérica de Aracnología* **15**, 35–46.
- Zaragoza, J. A., and Harvey, M. S. (2006). The first record of the genus *Mundochthonius* Chamberlin (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) from Spain: *Mundochthonius gallaecicus* sp. nov. *Revista Ibérica de Aracnología* **12**, 17–23.
- Zeh, J. A., Zeh, D. W., and Bonilla, M. M. (2003). Phylogeography of the harlequin beetle-riding pseudoscorpion and the rise of the Isthmus of Panamá. *Molecular Ecology* **12**, 2759–2769.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., and Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* **29**, 2869–2876.

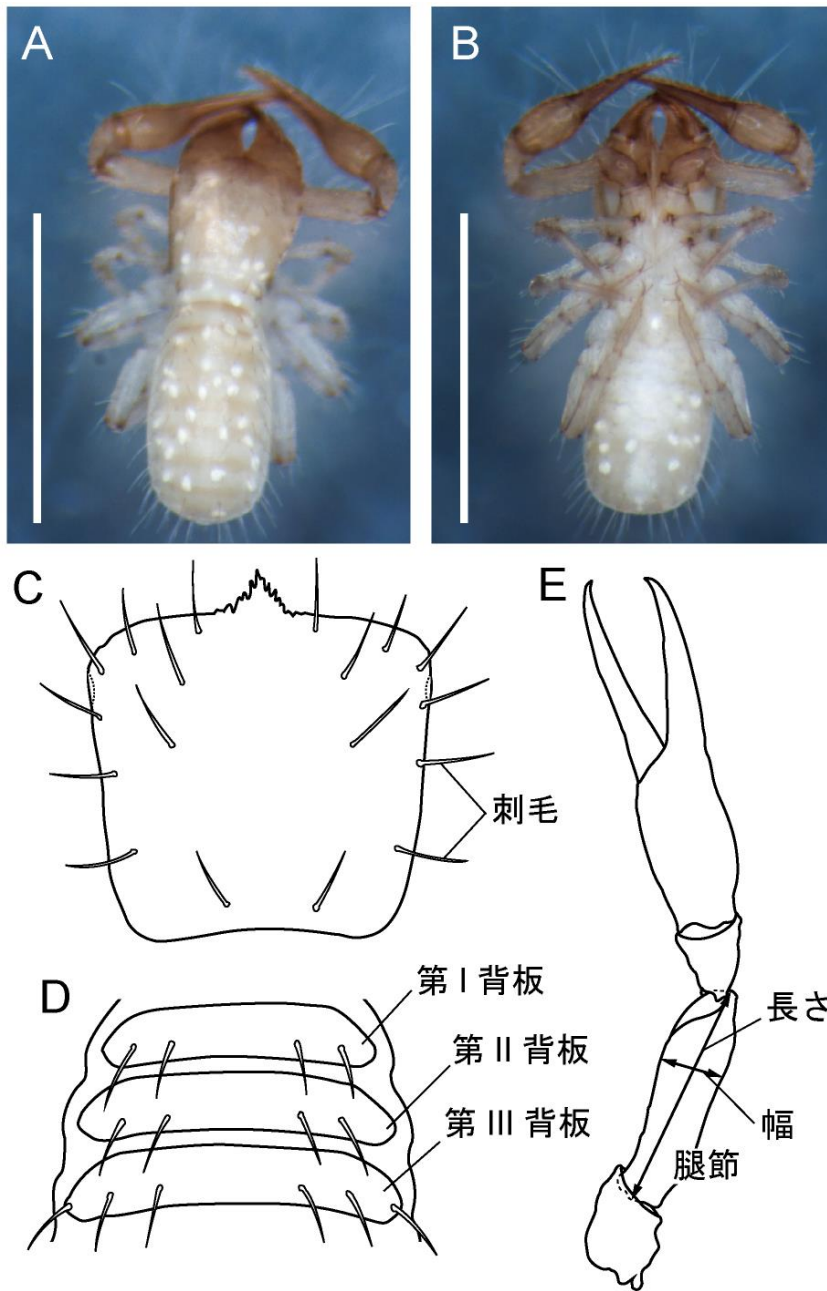


図1. (A, B) *Mundochthonius japonicus* Chamberlin, 1929 および (C-E) 日本産 *Mundochthonius* 属の種同定のためのキーキャラクター.

(A) 背面 ; (B) 覆面 ; (C) 頭胸部 ; (D) 腹部第1-3背板 ; (E) 右の触肢. スケールは 1 mm.

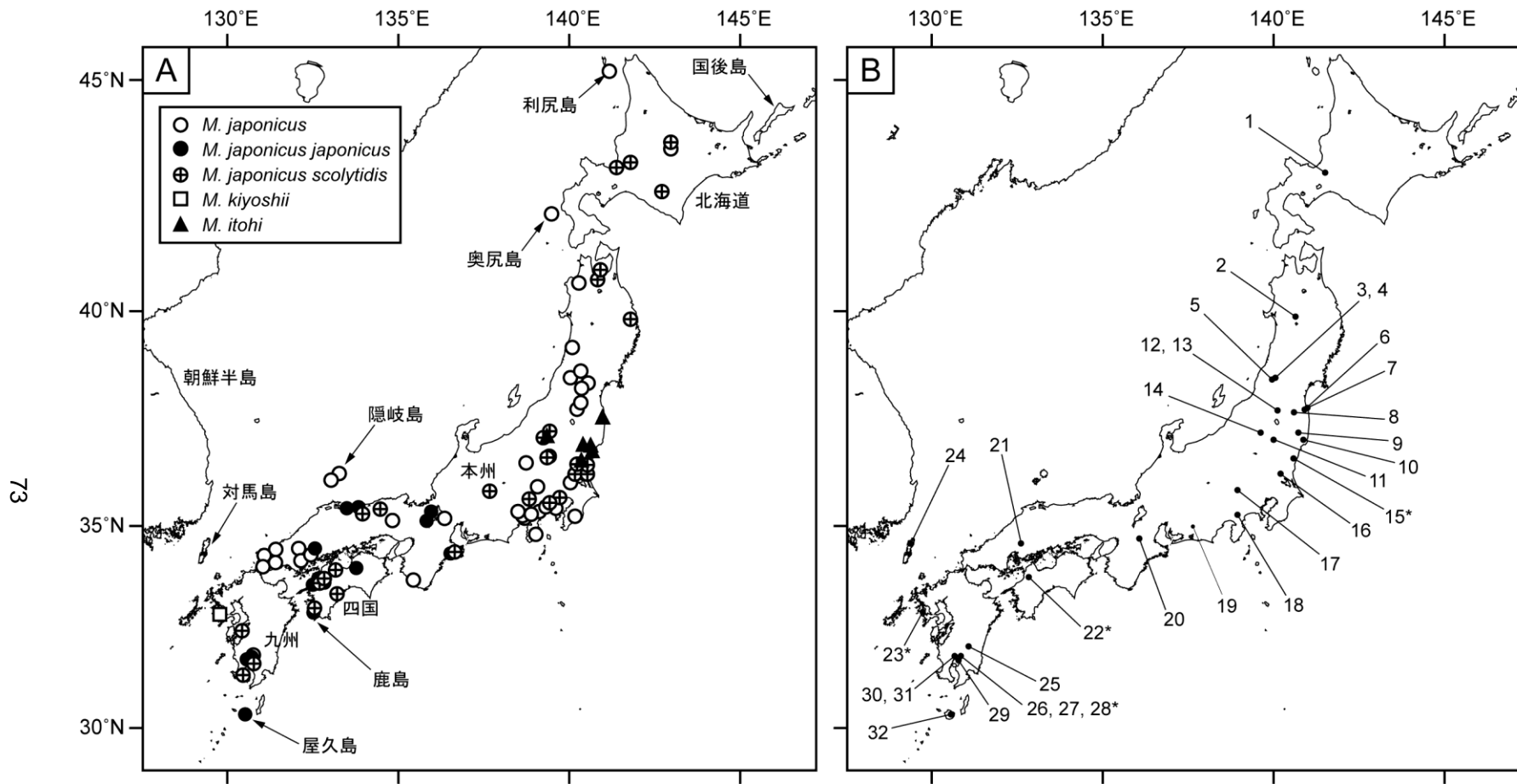


図2. (A) 分布記録および (B) 日本産土壌性 *Mundochthonius* 属カニムシ類の採集地点. 分布記録はシンボルで示した. 採集地点はアラビア数字 (1-32) で示した. アラビア番号のアスタリスク (*) は基準産地を表す: *M. japonicus japonicus*, 地点 28; *M. japonicus scolytidis*, 地点 22; *M. kiyoshii*, 地点 23; *M. itohi*, 地点 15.

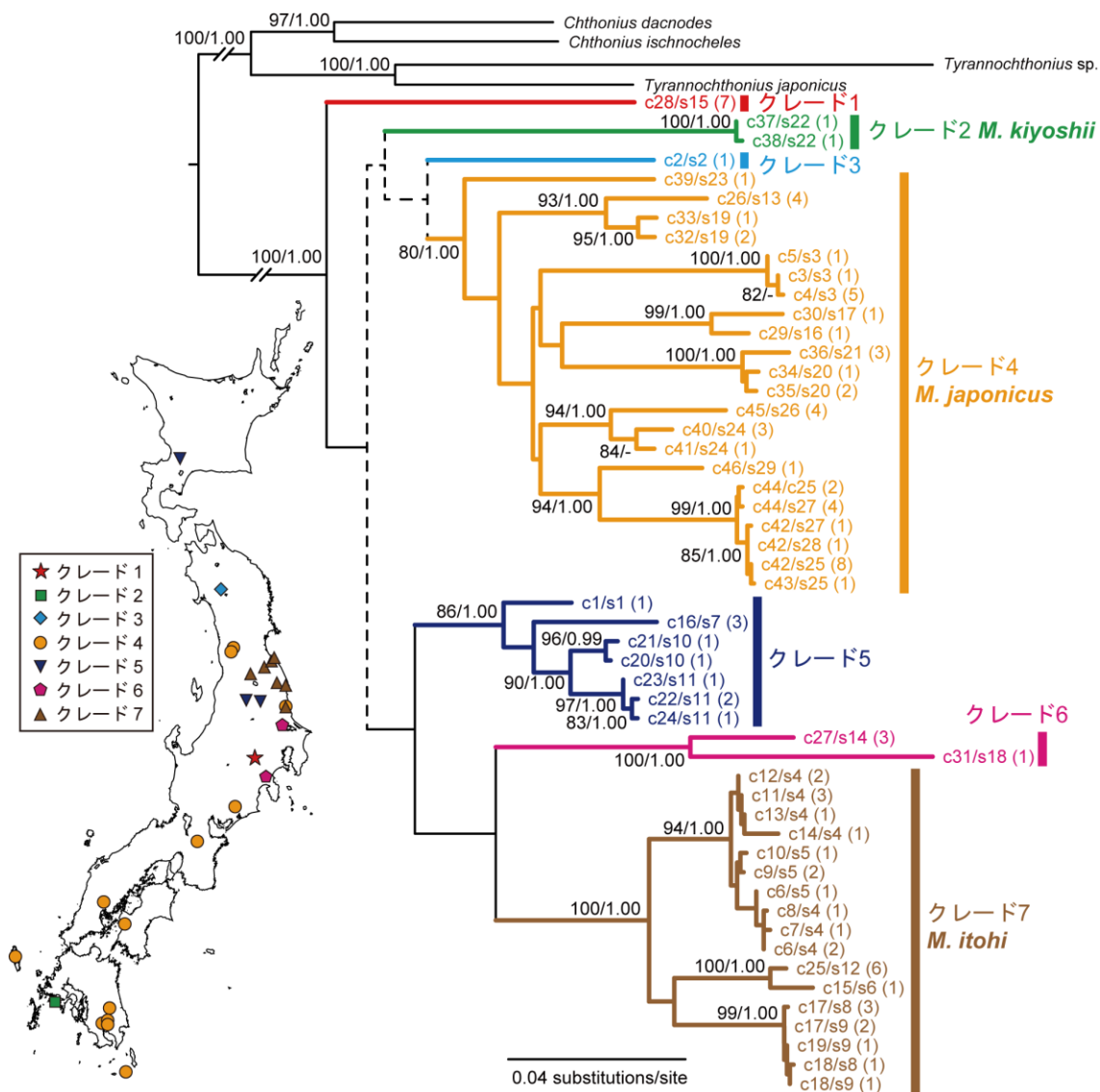


図 3. 日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ類のミトコンドリア DNA シトクロム *c* オキシダーゼ I (*COI*) と核 DNA *18S rRNA* 遺伝子の部分配列の combined データセットに基づく最尤 (ML) 樹.

ノード付近の数字はそれぞれ ML ブートストラップ値 (BP) とベイズの事後確率 (PP). BP 80% 未満あるいは PP 0.95 未満の値は示さなかった. ML 樹と BI 樹間で一致しなかったトポロジーは破線で示した. 操作的分類単位 (OTU) は *COI/18S* ハプロタイプの組み合わせ (付録 3) で示し, 各ハプロタイプに割り当てられた個体数は括弧内に示した. *Mundochthonius* 属の既知 3 種, *M. kiyoshii*,

M. japonicus, *M. itohi*, は標本の形態的特徴と採集地に基づいて同定した（詳細は本文参照のこと）。系統樹の左側に挿入された地図は、各クレードの地理的分布を示す。

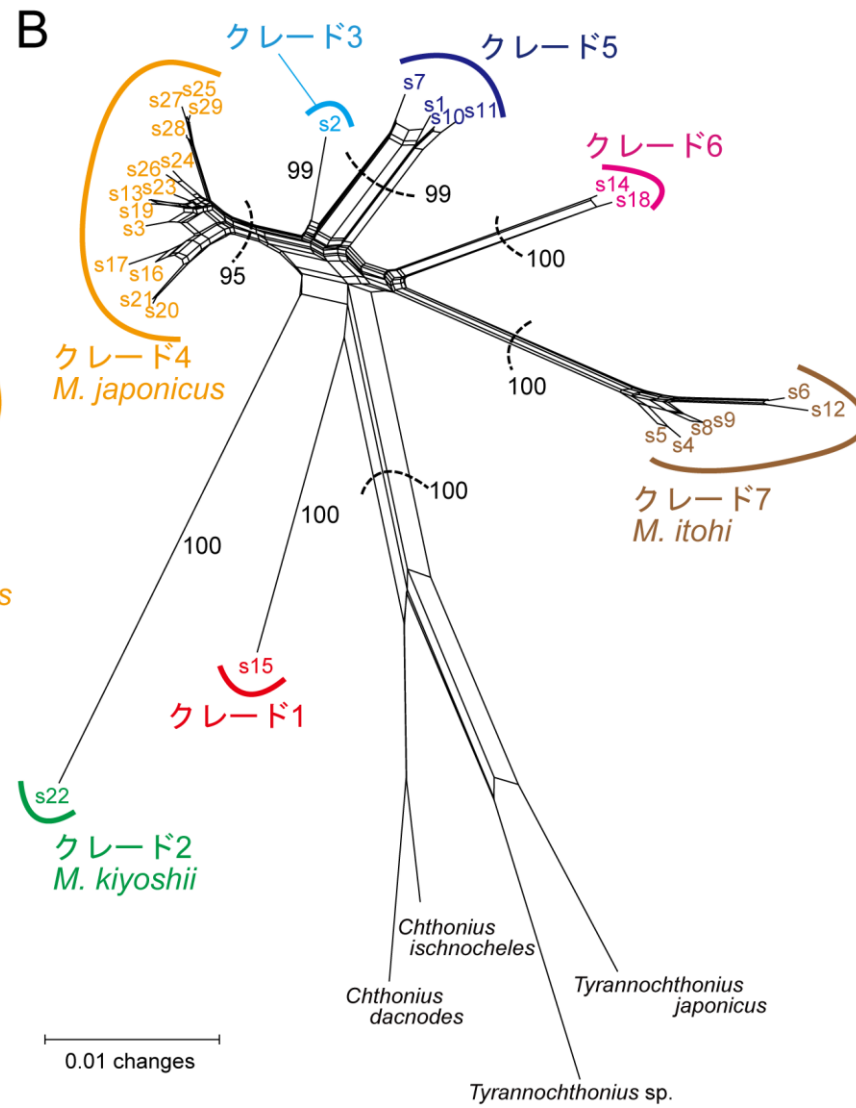
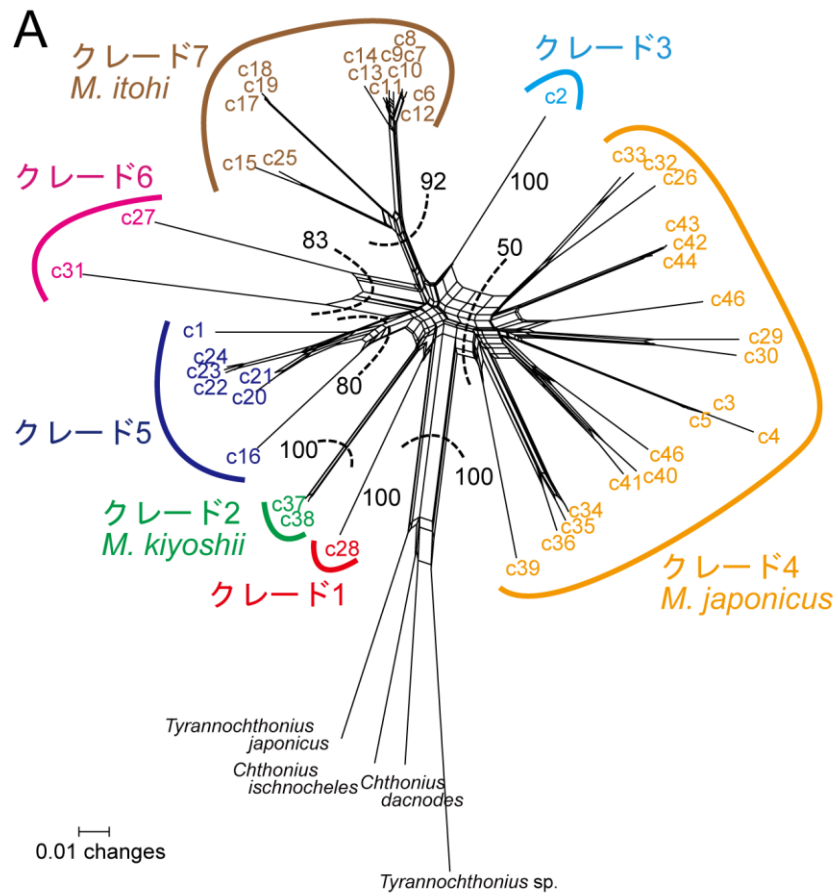


図 4. ミトコンドリア DNA シトクロム *c* オキシダーゼ I (*COI*) と核 DNA *18S rRNA* 遺伝子のハプロタイプに基づく Neighbour-net ネットワーク.

エッジの数字はブートストラップ値を示す. 操作的分類単位は付録 3 に示したハプロタイプに従う. *Mundochthonius* 属種, *M. kiyoshii*, *M. japonicus*, *M. itohi*, は標本の形態的特徴と採集地に基づいて同定した (詳細は本文参照のこと).

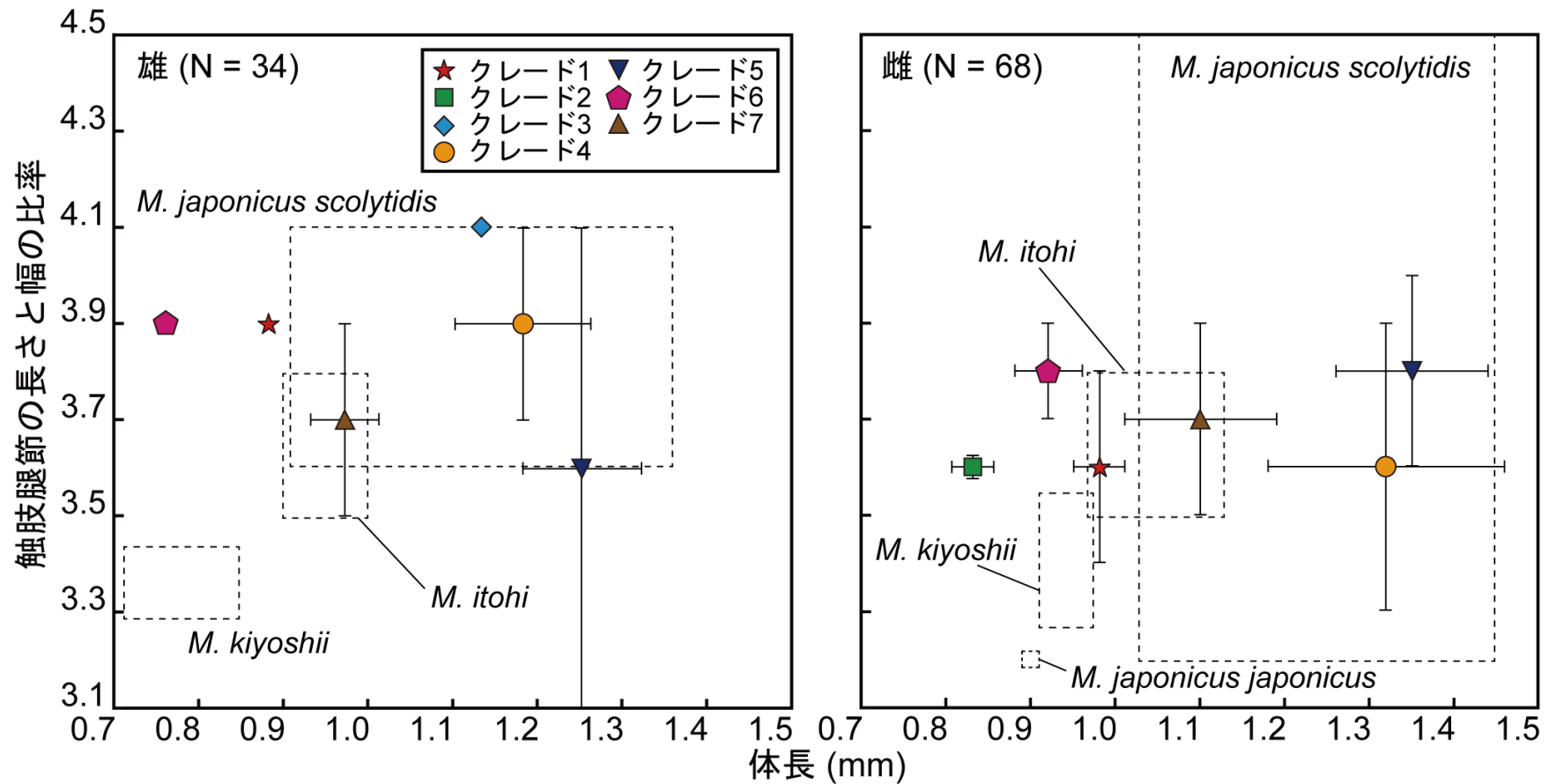


図5. 各クレードに割り当てられた *Mundochthonius* 属標本の体長と触肢腿節の長さとの比率の関係。

エラー・バーは標準偏差を示し、破線で囲まれたボックス・エリアは既知種または亜種の記載値の範囲を示す (Chamberlin 1929b; Morikawa 1954, 1960; Sakayori 2002, 2009). *Mundochthonius japonicus japonicus* の雄の値は不明。

表 1. 日本産土壌性 *Mundochthonius* 属種および亜種の診断形質（上）および分子系統解析に基づく各クレードに割り当てられた標本の測定値および計数値の要約（下）

M, 雄成体；F, 雌成体；個体数を括弧内に示す；体長は各クレードの性別ごとに平均値±標準偏差で示す；

^A*M. japonicus japonicus* の体長および触肢腿節の長さとの比率の範囲は記載されておらず，雄の値は不明．

種/亜種/分子系統解析におけるクレード	性別	N	背板毛序式		体長 (mm)	触肢腿節の長さとの比率
			頭胸部	腹部第I-III背板		
<i>M. japonicus</i>	F		4-4-4-2-2, 16	4-4-4	~ 0.9	~ 3.2
<i>M. japonicus scolytidis</i>	M		6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.91-1.36	3.6-4.1
	F				1.03-1.45	3.2-4.6
<i>M. kiyoshii</i>	M		6-4-4-2-2, 18	4-6-6	0.71-0.85	3.3-3.4
	F				0.91-0.98	3.3-3.6
<i>M. itohi</i>	M		6-4-4-2-2, 18	4-6-6/ 4-5-6	0.90-1.00	3.5-3.8
	F				0.97-1.13	3.5-3.8
クレード1	M	1	6-4-4-2-2, 18 (1)	4-4-6 (1)	0.88	3.8
	F	6	6-4-4-2-2, 18 (6)	4-4-6 (6)	0.98 ± 0.03	3.6 ± 0.2
クレード2	F	2	6-4-4-2-2, 18 (2)	4-6-6 (2)	0.83 ± 0.03	3.6 ± 0.1
クレード3	M	1	6-4-4-2-2, 18 (1)	4-4-6 (1)	1.13	4.1
クレード4	M	14	6-4-4-2-2, 18 (14)	4-4-6 (13) 5-4-6 (1)	1.18 ± 0.08	3.9 ± 0.2
	F	35	6-4-4-2-2, 18 (34) 6-4-3-2-2, 17 (1)	4-4-6 (33) 5-4-6 (1) 4-4-5 (1)	1.32 ± 0.14	3.6 ± 0.3
クレード5	M	2	6-4-4-2-2, 18 (2)	4-4-6 (2)	1.25 ± 0.07	3.6 ± 0.5
	F	7	6-4-4-2-2, 18 (7)	4-4-6 (7)	1.35 ± 0.09	3.8 ± 0.2
クレード6	M	1	6-4-4-2-2, 18 (1)	4-4-6 (1)	0.76	3.9
	F	3	6-4-4-2-2, 18 (3)	4-4-6 (3)	0.92 ± 0.04	3.8 ± 0.1
クレード7	M	15	6-4-4-2-2, 18 (14) 5-4-4-2-2, 17 (1)	4-4-6 (2) 4-5-6 (5) 4-6-6 (6) 4-6-7 (2)	0.97 ± 0.04	3.7 ± 0.2
	F	15	6-4-4-2-2, 18 (15)	4-5-6 (1) 4-6-6 (7) 4-6-7 (4) 4-7-6 (2)	1.10 ± 0.09	3.7 ± 0.2

表 2. ミトコンドリア DNA シトクロム *c* オキシダーゼ I (*COI*) (左下) および核 DNA *18S rRNA* (右上) 遺伝子の部分配列を用いた分子系統解析で同定された 7 つのクレード内およびそれらの間の sequence divergence (uncorrected *p*-distance) の平均値 (% ± SD)

クレード	クレード内		クレード間						
	<i>COI</i>	<i>18S rRNA</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	-	-		5.8	3.3	3.6 ± 0.2	3.1 ± 0.1	4.0	4.6 ± 0.3
2	0.5	-	13.1		5.0	4.4 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.3	5.7 ± 0.2
3	-	-	17.6	15.2 ± 0.3		1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.4	3.3 ± 0.3
4	13.1 ± 3.4	0.8 ± 0.3	16.5 ± 0.9	15.6 ± 1.3	15.9 ± 1.3		2.1 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.6 ± 0.4
5	6.7 ± 3.5	0.5 ± 0.2	14.4 ± 0.9	13.7 ± 0.4	14.4 ± 0.4	15.9 ± 1.2		2.6 ± 0.1	3.4 ± 0.3
6	16.9	0.2	17.7 ± 1.5	19.8 ± 0.4	18.7 ± 2.0	18.4 ± 2.0	16.0 ± 1.2		3.4 ± 0.3
7	6.3 ± 4.2	0.8 ± 0.4	16.1 ± 0.8	16.1 ± 0.6	13.8 ± 1.2	16.2 ± 2.1	14.3 ± 1.3	17.5 ± 2.2	

表3. クレードまたはクレード内の系統に割り当てられたハプロタイプおよびそれらのハプロタイプが検出された標本の採集地

クレード/クレード内の系統	地点番号
クレード1 (埼玉)	17
クレード2 (長崎)	23
クレード3 (秋田)	2
クレード4	
山形	3, 4, 5
茨城・奈良	15, 20
愛知	19
広島・愛媛	21, 22
対馬	24
九州南東部	25, 29
九州南西部	26, 27, 28, 30, 31, 32
クレード5	
北海道	1
福島南央部	11
福島南西部	14
クレード6 (茨城・静岡)	16, 18
クレード7	
福島北東部	6, 7, 8, 9
福島南東部・茨城北部	10, 15
福島北西部	12, 13

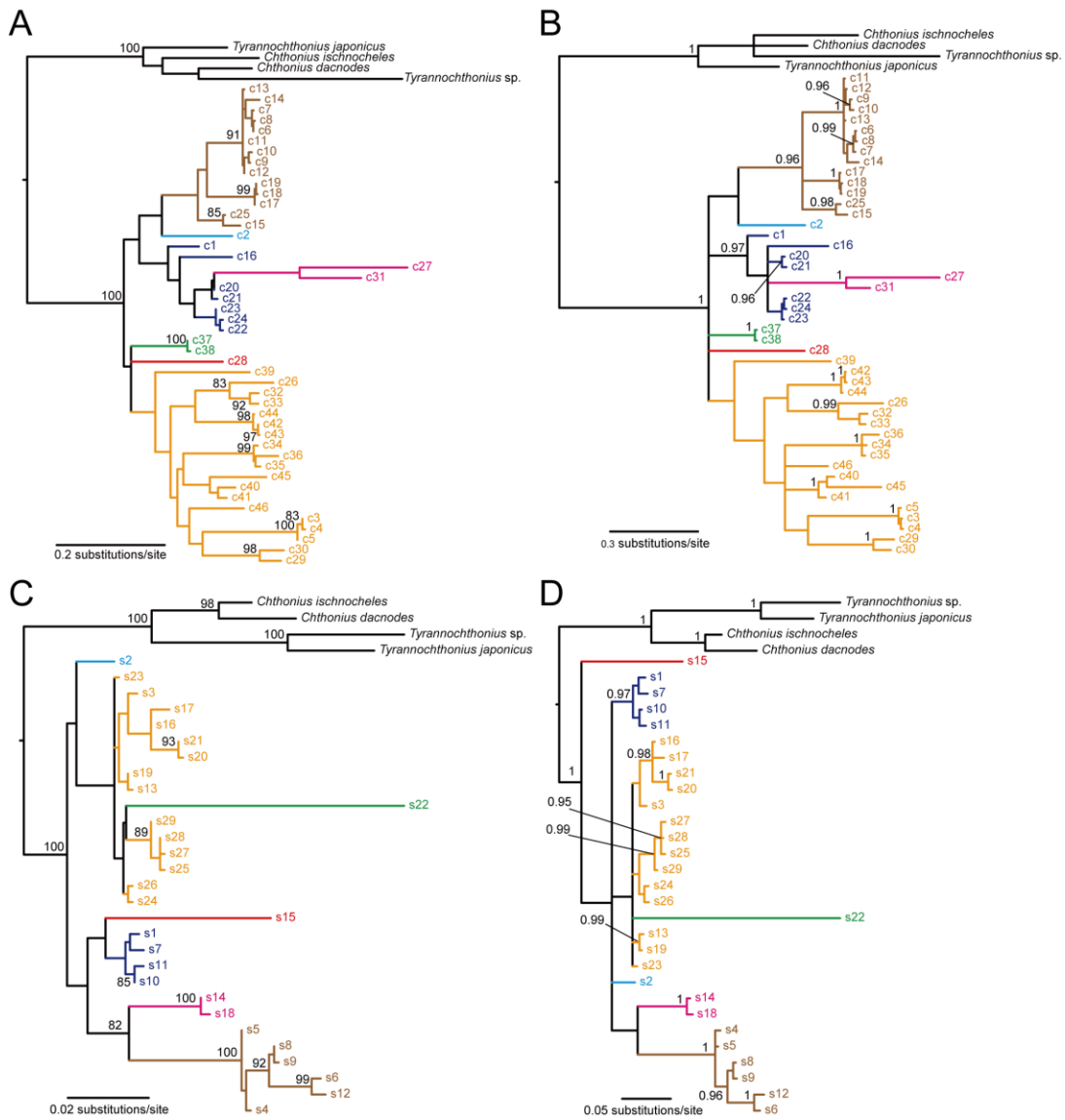
表 4. シトクロム *c* オキシダーゼ I (*COI*) および *18S rRNA* データにそれぞれ
 基づく 4 つの異なる解析方法を使用して区切られた種数

bPTP, Bayesian implementation of the Poisson tree process ; GMYC, generalised mixed
 Yule-coalescent.

種の区切り解析の方法		種数	
		<i>COI</i>	<i>18S rRNA</i>
TCS	Connection limit 95%	28	7
SpeciesIdentifier	Threshold 1%	32	7
	Threshold 3%	24	2
	Threshold 4%	23	2
	Threshold 8%	21	1
bPTP	Maximum-likelihood tree	24	9
	Bayesian inference tree	24	9
GMYC	Yule-strict	23	7
	Yule-relaxed	23	2

付録 1. 採集地点情報

地点 番号	地方	都道府県	産地	緯度 (N)	経度 (E)	標高 (m)
1	北海道	北海道	札幌市 厚別	43°1'1"	141°28'59"	50
2	東北	秋田	仙北市 田沢湖町	39°49'44"	140°38'37"	330
3	東北	山形	庄内町 月山	38°35'48"	140°0'4"	1000
4	東北	山形	鶴岡市 月山	38°37'48"	139°59'33"	500
5	東北	山形	鶴岡市 湯殿山	38°32'21"	139°58'25"	930
6	東北	福島	相馬市 西山	37°47'23"	140°54'24"	30
7	東北	福島	相馬市 磯辺	37°45'57"	140°59'29"	20
8	東北	福島	福島市 飯野町	37°41'22"	140°32'8"	430
9	東北	福島	いわき市 川前町	37°16'18"	140°43'59"	610
10	東北	福島	いわき市 平	37°0'49"	140°55'18"	60
11	東北	福島	西郷村	37°10'38"	140°1'3"	790
12	東北	福島	北塩原村 北山	37°43'50"	140°3'14"	870
13	東北	福島	北塩原村 曾原	37°41'22"	140°4'1"	850
14	東北	福島	南会津町 田島	37°12'46"	139°37'5"	1120
15	関東	茨城	常陸太田市 茅根町	36°35' 28"	140°34'28"	300
16	関東	茨城	つくば市 筑波山	36°13' 24"	140°6'22"	750
17	関東	埼玉	秩父市	35°54'53"	138°57'1"	1050
18	中部	静岡	小山町	35°22'1"	138°54'40"	580
19	中部	愛知	新城市	35°0'42"	137°37'23"	220
20	近畿	奈良	奈良市 月ヶ瀬	34°41'55"	136°1'21"	240
21	中国	広島	東広島市	34°33'57"	132°45'15"	610
22	四国	愛媛	松山市 小野町	33°51'9"	132°51'52"	480
23	九州	長崎	長崎市 琴海	32°54'41"	129°45'13"	420
24	九州	長崎	対馬市 上県	34°33'60"	129°23'30"	100
25	九州	宮崎	綾町	32°1'45"	131°10'17"	200
26	九州	鹿児島	霧島市 田口	31°52'8"	130°53'21"	770
27	九州	鹿児島	霧島市 田口	31°52'3"	130°52'25"	620
28	九州	鹿児島	霧島市 牧園町	31°54'9"	130°50'42"	620
29	九州	鹿児島	霧島市 国分	31°42'44"	130°47'39"	240
30	九州	鹿児島	霧島市 溝辺	31°50'25"	130°38'11"	520
31	九州	鹿児島	始良市 北山	31°49'58"	130°36'51"	180
32	九州	鹿児島	屋久島町	30°22'48"	130°34'27"	650



付録 2. (A, B) ミトコンドリア DNA シトクロム *c* オキシダーゼ I (*COI*) および (C, D) 核 DNA *18S rRNA* 遺伝子の部分配列に基づく分子系統樹.

(A) *COI* 遺伝子に基づく最尤 (ML) 樹 ; (B) *COI* 遺伝子に基づくベイズ樹 ; (C) *18S rRNA* 遺伝子に基づく ML 樹 ; (D) *18S rRNA* 遺伝子に基づくベイズ樹. ノード付近の値は, ML ブートストラップ値 (BP) とベイズの事後確率 (PP) の値. 80% (BP) または 0.95 (PP) 未満の値は示していない. 操作的分類単位は, 付録 3 に示したハプロタイプ指定に従っており, 図 3 および図 4 の 7 つのクレードに対応して色付けしてある.

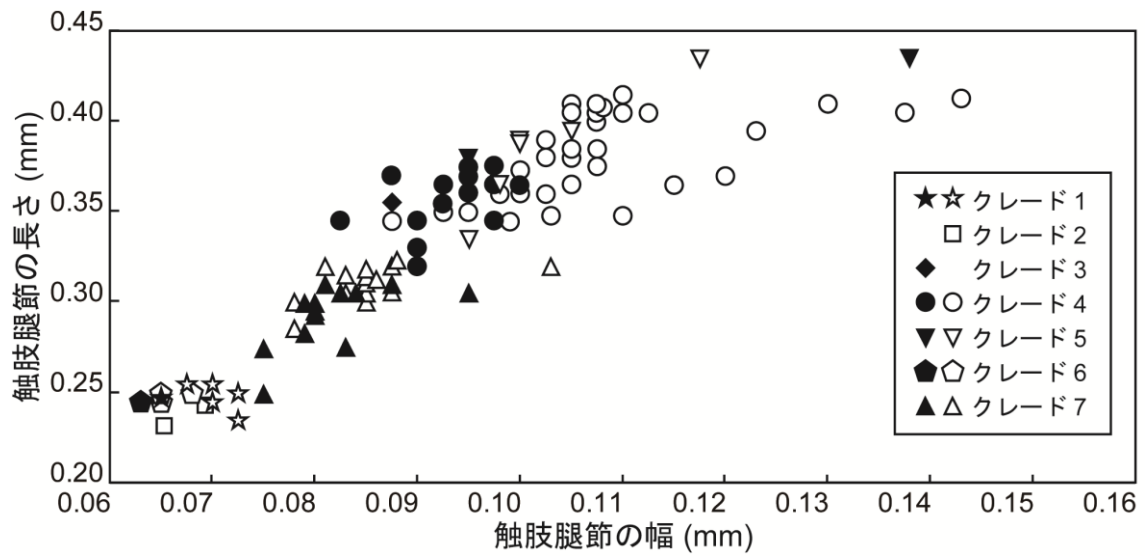
付録 3. 形態測定値および GenBank/DDBJ アクセション番号を含む標本データ

M, 雄成体 ; F, 雌成体 ; t, 三齢若虫 ; *COI*, シトクロム *c* オキシダーゼ I ; 18S, 核 DNA *18S rRNA* 遺伝子 ; DDBJ, DNA Data Bank of Japan.

サンプル ID	地点 番号	性/ 年齢	背板毛序式		体長 (mm)	触肢腿節		長さ 幅 (mm) (mm)	長さ 幅 の比率	ハプロタイプ (GenBank/DDBJ アクセション番号)		分子系統解 析における クレード
			頭胸部	腹部第I- III背板		<i>COI</i>	<i>18S rRNA</i>					
M22	1	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.19	0.44	0.14	3.2	c1 (LC200828)	s1 (LC200868)	クレード5	
M74	2	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.13	0.36	0.09	4.1	c2 (LC200808)	s2 (LC200853)	クレード3	
M80	3	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.34	0.36	0.10	3.8	c3 (LC200822)	s3 (LC200867)	クレード4	
M81	3	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.43	0.41	0.11	3.8	c4 (LC200823)	s3 -	クレード4	
M82	3	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-5	1.22	0.38	0.11	3.6	c4 -	s3 -	クレード4	
M83	5	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.17	0.39	0.11	3.6	c4 -	s3 -	クレード4	
M84	5	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.30	0.40	0.11	3.7	c4 -	s3 -	クレード4	
M85	5	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.48	0.41	0.11	3.9	c4 -	s3 -	クレード4	
M78	4	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.26	0.37	0.09	4.2	c5 (LC200821)	s3 -	クレード4	
M11	6	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	1.02	0.32	0.10	3.1	c6 (LC200841)	s4 (LC200874)	クレード7	
M12	6	M	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	0.98	0.30	0.08	3.8	c6 -	s4 -	クレード7	
M13	6	F	6-4-4-2-2, 18	4-7-6	1.00	0.31	0.09	3.6	c7 (LC200842)	s4 -	クレード7	
M14	6	F	6-4-4-2-2, 18	4-7-7	0.93	0.30	0.09	3.5	c8 (LC200843)	s4 -	クレード7	
M7	7	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	0.99	0.32	0.09	3.7	c9 (LC200839)	s5 (LC200875)	クレード7	
M10	7	M	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	0.94	0.28	0.08	3.3	c9 -	s5 -	クレード7	
M8	7	M	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	0.96	0.29	0.08	3.7	c10 (LC200840)	s5 -	クレード7	
M9	7	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-7	1.28	0.31	0.09	3.6	c6 -	s5 -	クレード7	
M1	8	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	1.14	0.32	0.09	3.7	c11 (LC200836)	s4 -	クレード7	
M3	8	M	6-4-4-2-2, 18	4-6-7	0.91	0.25	0.08	3.3	c11 -	s4 -	クレード7	
M4	8	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-7	1.07	0.30	0.08	3.8	c11 -	s4 -	クレード7	
M2	8	M	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	0.96	0.28	0.08	3.7	c12 (LC200837)	s4 -	クレード7	
M6	8	F	6-4-4-2-2, 18	4-7-6	1.13	0.32	0.09	3.7	c12 -	s4 -	クレード7	
M5	8	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	1.19	0.31	0.08	3.7	c13 (LC200838)	s4 -	クレード7	
M15	9	M	6-4-4-2-2, 18	4-5-6	0.92	0.28	0.08	3.6	c14 (LC200844)	s4 -	クレード7	
M59	10	M	6-4-4-2-2, 18	4-5-6	0.95	0.30	0.08	3.7	c15 (LC200849)	s6 (LC200876)	クレード7	
M23	11	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.32	0.34	0.10	3.5	c16 (AB855647)	s7 (LC200869)	クレード5	
M24	11	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.21	0.37	0.10	3.7	c16 -	s7 -	クレード5	
M25	11	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.38	0.37	0.10	3.7	c16 -	s7 -	クレード5	
M16	12	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-7	1.14	0.32	0.08	4.0	c17 (LC200845)	s8 (LC082336)	クレード7	
M17	12	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-7	1.17	0.32	0.08	3.8	c17 -	s8 (LC082337)	クレード7	
M19	12	M	6-4-4-2-2, 18	4-6-7	1.01	0.31	0.08	3.8	c17 -	s8 (LC082338)	クレード7	
M18	12	M	6-4-4-2-2, 18	4-5-6	0.99	0.31	0.08	3.6	c17 -	s9 (LC082339)	クレード7	
M28	12	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.96	0.30	0.08	3.8	c17 -	s9 (LC082340)	クレード7	
M20	13	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	1.10	0.29	0.08	3.7	c18 (LC200846)	s9 (LC082341)	クレード7	
M21	13	M	6-4-4-2-2, 18	4-5-6	0.97	0.29	0.08	3.7	c19 (LC200847)	s9 (LC082342)	クレード7	
M29	13	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.99	0.30	0.08	3.8	c18 -	s8 (LC082343)	クレード7	
M26	14	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.50	0.39	0.10	3.9	c20 (LC200829)	s10 (LC200870)	クレード5	
M27	14	t	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.07	0.29	0.09	3.3	c21 (LC200830)	s10 -	クレード5	
M90	14	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.31	0.38	0.10	4.0	c22 (LC200831)	s11 (LC200871)	クレード5	
M91	14	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.36	0.40	0.11	3.8	c22 -	s11 -	クレード5	
M92	14	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.36	0.39	0.10	3.9	c23 (LC200832)	s11 -	クレード5	
M93	14	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.33	0.44	0.12	3.7	c24 (LC200833)	s11 -	クレード5	
M49	15	M	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	1.01	0.31	0.09	3.5	c25 (LC200848)	s12 (LC082344)	クレード7	
M50	15	M	6-4-4-2-2, 18	4-5-6	1.00	0.31	0.10	3.2	c25 -	s12 (LC082345)	クレード7	
M51	15	F	6-4-4-2-2, 18	4-5-6	1.12	0.31	0.09	3.6	c25 -	s12 (LC082346)	クレード7	
M54	15	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	1.12	0.31	0.09	3.5	c25 -	s12 (LC082349)	クレード7	
M56	15	M	5-4-4-2-2, 17	4-6-6	0.92	0.31	0.08	3.7	c25 -	s12 (LC082347)	クレード7	
M58	15	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	1.10	0.32	0.09	3.7	c25 -	s12 (LC082348)	クレード7	
M52	15	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.38	0.41	0.11	3.8	c26 (LC200815)	s13 (LC082350)	クレード4	
M53	15	F	6-4-4-2-2, 18	5-4-6	1.15	0.38	0.11	3.5	c26 -	s13 (LC082351)	クレード4	
M55	15	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.19	0.35	0.10	3.5	c26 -	s13 (LC082352)	クレード4	
M57	15	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.42	0.41	0.11	3.6	c26 -	s13 (LC082353)	クレード4	

付録 3. (続き)

サンプル ID	地点 番号	性/ 年齢期	背板毛序式		体長 (mm)	触肢腿節			ハプロタイプ (GenBank/DDBJ アクセション番号)		分子系統解析における クレード
			頭胸部	腹部第I-III背板		長さ (mm)	幅 (mm)	長さ と 幅 の比率	<i>COI</i>	<i>18S rRNA</i>	
M30	16	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.94	0.25	0.07	3.7	c27 (LC200834)	s14 (LC200872)	クレード6
M31	16	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.87	0.25	0.07	3.8	c27 -	s14 -	クレード6
M32	16	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.94	0.25	0.07	3.8	c27 -	s14 -	クレード6
M66	17	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.98	0.25	0.07	3.5	c28 (LC200805)	s15 (LC200851)	クレード1
M69	17	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.00	0.24	0.07	3.2	c28 -	s15 -	クレード1
M70	17	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.02	0.26	0.07	3.6	c28 -	s15 -	クレード1
M86	17	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.97	0.26	0.07	3.8	c28 -	s15 -	クレード1
M87	17	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.93	0.25	0.07	3.4	c28 -	s15 -	クレード1
M88	17	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.88	0.25	0.07	3.8	c28 -	s15 -	クレード1
M89	17	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.97	0.26	0.07	3.6	c28 -	s15 -	クレード1
M34	19	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.12	0.35	0.09	3.8	c29 (LC200809)	s16 (LC200854)	クレード4
M35	19	F	6-4-3-2-2, 17	4-4-6	1.05	0.35	0.11	3.2	c30 (LC200810)	s17 (LC200855)	クレード4
M33	18	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.76	0.25	0.06	3.9	c31 (LC200835)	s18 (LC200873)	クレード6
M60	20	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.50	0.37	0.12	3.1	c32 (LC200816)	s19 (LC200861)	クレード4
M62	20	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.27	0.35	0.09	3.9	c32 -	s19 -	クレード4
M61	20	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.24	0.38	0.10	3.8	c33 (LC200817)	s19 -	クレード4
M63	21	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.24	0.39	0.10	3.8	c34 (LC200819)	s20 (LC200862)	クレード4
M64	21	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.15	0.35	0.10	3.7	c35 (LC200820)	s20 -	クレード4
M65	21	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.12	0.35	0.09	3.8	c35 -	s20 -	クレード4
M36	22	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.37	0.41	0.14	2.9	c36 (LC200811)	s21 (LC200856)	クレード4
M37	22	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.39	0.41	0.11	3.9	c36 -	s21 -	クレード4
M38	22	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.30	0.38	0.10	3.9	c36 -	s21 -	クレード4
M47	23	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	0.85	0.24	0.07	3.5	c37 (LC200806)	s22 (LC200852)	クレード2
M48	23	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	0.80	0.23	0.07	3.6	c38 (LC200807)	s22 -	クレード2
M68	24	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.11	0.33	0.09	3.7	c39 (LC200818)	s23 (LC200866)	クレード4
M106	25	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.40	0.38	0.10	3.7	c40 (LC200824)	s24 (LC200864)	クレード4
M108	25	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.17	0.36	0.09	3.8	c40 -	s24 -	クレード4
M109	25	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.43	0.41	0.11	3.8	c40 -	s24 -	クレード4
M107	25	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.10	0.32	0.09	3.6	c41 (LC200827)	s24 -	クレード4
M95	28	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.32	0.41	0.11	3.9	c42 (LC200812)	s25 (LC200863)	クレード4
M97	28	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.33	0.35	0.10	3.7	c42 -	s25 -	クレード4
M98	26	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.24	0.39	0.11	3.7	c42 -	s25 -	クレード4
M99	26	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.36	0.36	0.10	3.5	c42 -	s25 -	クレード4
M100	26	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.15	0.37	0.10	3.9	c42 -	s25 -	クレード4
M101	26	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.46	0.42	0.11	3.8	c42 -	s25 -	クレード4
M104	27	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.18	0.36	0.10	3.6	c42 -	s25 -	クレード4
M105	27	F	6-4-4-2-2, 18	4-6-6	1.48	0.41	0.14	2.9	c42 -	s25 -	クレード4
M102	27	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.49	0.41	0.13	3.2	c43 (LC200826)	s25 -	クレード4
M94	28	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.20	0.37	0.10	3.7	c44 (LC200813)	s25 -	クレード4
M96	28	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.18	0.37	0.10	3.7	c44 -	s25 -	クレード4
M110	29	M	6-4-4-2-2, 18	5-4-6	1.07	0.35	0.08	4.2	c45 (LC200825)	s26 (LC200865)	クレード4
M111	29	M	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.09	0.37	0.09	3.9	c45 -	s26 -	クレード4
M112	29	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.24	0.37	0.11	3.5	c45 -	s26 -	クレード4
M113	29	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.48	0.41	0.11	3.7	c45 -	s26 -	クレード4
M41	30	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	0.92	0.35	0.10	3.5	c44 -	s27 (LC200857)	クレード4
M42	30	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.29	0.37	0.10	3.7	c44 -	s27 -	クレード4
M43	30	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.26	0.35	0.10	3.4	c44 -	s27 -	クレード4
M44	30	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.38	0.36	0.10	3.7	c44 -	s27 -	クレード4
M39	31	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.40	0.37	0.12	3.2	c42 -	s27 -	クレード4
M40	31	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-5	1.37	0.40	0.12	3.2	c42 -	s28 (LC200858)	クレード4
M46	32	F	6-4-4-2-2, 18	4-4-6	1.52	0.41	0.11	3.8	c46 (LC200814)	s29 (LC200859)	クレード4



付録 4. 日本産 *Mundochthonius* 属標本の触肢腿節の長さとの幅の関係.

シンボルは分子系統解析に基づく各クレードに割り当てられた標本 ; 雄=closed
シンボル ; 雌=open シンボル.

第 4 章

日本産 *Mundochthonius* 属カニムシの形態形質の多変量解析

A multivariate analysis of morphological characteristics among Japanese

Mundochthonius pseudoscorpions

要旨 — カニムシ種は伝統的に多くの量的形態形質を用いて分類されてきたが、最近の分類学的研究によってそれらの形質の非信頼性が示唆されている。形態形質の多変量解析は、遺伝的にグルーピングされた分類群について、それらの有用な診断形質を探索する際に特に有効である。本研究は日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ種の雄 34 標本、雌 76 標本を含む 101 標本における 83 の形態形質に基づいて判別分析を行い、遺伝的クレードと量的形態形質との関連性を検討した。遺伝的クレードの判別率は、全標本 74%、雄標本 48%、雌標本 76%と低かった。また、正準軸と関連があると見なされた 7 つの形質は、各クレードを識別するために必ずしも有用ではなかった。これらの結果は、量的形態形質によってカニムシ種を識別することの困難さを示唆している。対照的に、質的形態形質はカニムシ種の診断形質として重要であることが強調される。

キーワード — 診断形質, *Mundochthonius*, カニムシ, 質的形態形質, 量的形態形質, 種分類.

はじめに

カニムシ類の種分類は外部形態に基づいて行われている。カニムシ種は必ずしも明瞭な質的形態形質によって識別されるわけではなく、体長、刺毛の数や配列（毛序式）、触肢腿節の長さとの比率等の量的形態形質によって伝統的に分類されてきた（e.g. Chamberlin 1929; Beier 1932a, 1932b; Morikawa 1960）。しかしながら、独立種としての分類学的位置付けを担保するこれらの量的形態形質は、それらの種の診断形質として必ずしも信頼できない、あるいは適切でないことが指摘されている（e.g. Harvey 2014; 坂寄 2014; Ohira *et al.* 2016）。

いくつかの先行研究はカニムシ類の近縁種間の形態形質を精査し、種間の差異の検討（Muster *et al.* 2004）や、新たな診断形質の提案（Christophoryová *et al.* 2016）、分類階級の変更および新種記載（Zaragoza 2008）を行っている。特に Muster *et al.* (2004) および Christophoryová *et al.* (2016) は、複数の形態形質について多変量解析を実施し、それぞれ *Ehippochthonius* 属 2 種（当時は *Chthonius* 属の亜属）、*Lasiochernes* 属 3 種の分類学的検討を行った。形態形質データに基づく多変量解析は、形態的に分類された種の分類学的位置付けを検討、あるいは定義するためにしばしば用いられ、遺伝的な背景に基づいたグルーピングが可能な分類群で特に有用であるとされる（Marhold 2011）。

日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ種は、伝統的に体長、触肢腿節の長さや幅、その比率等の量的形態形質に基づいて分類されているが、実際にはそれらを用いて各種を識別することは難しい（Ohira *et al.* 2016; 第 3 章）。しかしながら、第 3 章で示したように、日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ種には既知 3 種 *M. japonicus*, *M. kiyoshii*, *M. itohi*（遺伝的クレード 2, 4, 7）に加え、隠蔽種または未記載種と考えられる 4 種（遺伝的クレード 1, 3, 5, 6）が存在することが分かっている。本研究の目的は、日本産 *Mundochthonius* 属カニムシ各種あるいは遺伝

的クレードが，形態形質の多変量解析によって識別可能か否かを検証することである．また，カニムシ類の種分類における量的形態形質や質的形態形質の信頼性や有用性についても議論した．

材料と方法

日本における *Mundochthonius* 属の分布域の大部分（北海道から屋久島）から採集した雄 34 標本，雌 67 標本を含む 101 標本について，量的形態形質の測定を行った．標本は，第 3 章で解析された *M. japonicus*, *M. kiyoshii*, *M. itohi* および隠蔽種または未記載種と考えられる 4 種が含まれる同じ標本を使用した（第 3 章の付録 3 参照）．第 3 章で使用された 103 標本のうち，虫体の一部を欠損している雌標本（ID M23）と 3 齢若虫の標本（ID M27）は使用しなかった．

全 101 標本の 36 の測定値および測定値から算出された 47 の比率を含む，83 形質を解析に使用した（図 1）．測定した形質および算出した比率は基本的に Christophoryová *et al.* (2016) で測定された項目に従った．ただし，頭胸部毛序式は種間でほとんど違いがなく（多くの種または遺伝的クレードにおいて 6-4-4-2-2, 18; 第 3 章を参照），腹部背板毛序式は *M. itohi* のみで変異が大きいことから（塘 2012; 第 3 章），ここでは毛序式（刺毛数）は対象としなかった．多重共線性の発生を避けるために，解析に用いたすべての量的形態形質は，形質間の相関係数が高いもの（0.5 以上）を独立性の低い形質として除外した．

独立性の高い形質を用いて，それぞれ独立種に対応すると考えられる 7 つの遺伝的クレードについて正準判別分析（canonical discriminant analysis; CDA）を実施した．判別率は交差検証法（cross validation; CV）によって算出した．各正準軸（CD）は形質との相関によって関連を確認し，相関係数が高い（0.5 以上）形質を関連があるものと見なした．全ての形質の相関係数が 0.5 未満の場合は，

最も相関係数が高い形質を CD と関連するものと見なした。各分析は、全標本、雄標本のみ、雌標本のみを用いてそれぞれ実施した。分析には統計解析用ソフトウェア R (R Core Team 2017) に実装されているパッケージ MASS (Venables and Ripley 2002) を使用した。

結 果

測定または算出した 83 形質のうち、形質間の相関が低く (0.5 未満) 独立性が高いものは 23 形質あった (表 1)。このうち測定値の形質は、「第 I 歩脚の基腿節の幅」と「第 IV 歩脚の基付節の長さ」の 2 つのみであった。

正準判別分析 (CDA) において、遺伝的クレードに対する量的形態形質に基づいた判別率は、全標本で 74%、雄標本で 48%、雌標本で 76% であった。各 CD に関連があると見られた形質は 8 形質あった (表 2)。CD1 および CD2 の proportion of trace の累積値は、それぞれ全標本で 73.7%、雄標本のみで 77.9%、雌標本のみで 74.3% であった (図 2)。全標本を用いた解析における CD1 (proportion of trace 62.9%) は「第 I 歩脚の基腿節の幅」、「第 IV 歩脚の基付節の長さ」、「第 I 歩脚の端腿節の長さ」と幅の比率」、「第 I 歩脚の転節の長さ」と基腿節の長さの比率」と関連し、CD2 (10.8%) は「第 IV 歩脚の腿膝節の長さ」と端付節の長さの比率」と関連した (図 2A)。雄標本のみを用いた解析における CD1 (60.0%) は「第 I 歩脚の基腿節の幅」、「第 IV 歩脚の腿膝節の長さ」と幅の比率」と関連し、CD2 (17.9%) は「触肢の転節の長さ」と腿節の長さの比率」と関連した (図 2B)。雌標本のみを用いた解析における CD1 (54.2%) は「第 I 歩脚の基腿節の幅」、「第 IV 歩脚の基付節の長さ」、「第 I 歩脚の端腿節の長さ」と幅の比率」、「第 I 歩脚の転節の長さ」と基腿節の長さの比率」と関連し、CD2 (20.1%) は相関係数が 0.5 以上の形質がなかったが、最も相関係数が高い形質は「触肢の鋏部の長さ」と鋏掌部の幅の

比率」であった (図 2C).

各 CD と関連があると見なされた 8 つの形質のうち、「触肢の鋏部の長さ」と掌部の幅の比率」を除く 7 つの形質は、いくつかの遺伝的クレード間において Steel-Dwass の多重比較検定により有意な差が検出された (図 3-5). 特に、クレード 1, 4, 5, 7 は複数の形質において有意差が検出された. 個体数が限定されているクレード 2 (2 個体) および 3 (1 個体) は、いずれの形質においても、他のクレードとの間で有意差が検出されなかった.

考 察

本研究の結果は、日本産 *Mundochthonius* 属 7 種, *M. japonicus*, *M. kiyoshii*, *M. itohi* の既知 3 種および未記載種または隠蔽種 4 種, を量的形態形質によって明確に識別することが困難であることを示唆している. 判別分析における遺伝的クレードの判別率は 80% 未満と低く, またいくつかの形質は遺伝的クレード間で有意差があったものの, ほとんどの形質の測定値の範囲はクレード間で重複している. 現在の日本産 *Mundochthonius* 属の種分類に診断形質として用いられている量的形態形質 (体長, 触肢腿節の長さとの比率) は, 既に各種を識別するためには必ずしも信頼できないことが分かっているが (Ohira *et al.* 2016; 第 3 章), それらの形質以外の量的形態形質も同様に信頼性が低い可能性が高い.

量的形態形質をカニムシ種の診断形質として偏重することは, 種分類を混乱させる原因になり得る. 本研究よりも少ない標本 (N=19) に基づいて解析された *Lasiochernes* 属では, 触肢動指の長さや第 IV 歩脚の腿膝節の長さ等の量的形態形質は種の識別に有用であるとしている (Christophoryová *et al.* 2016). 一方で, Christophoryová *et al.* (2016) は, より多くの個体数に基づいて検討した場合には, それらの形質の範囲が種間で重複する可能性があることにも言及している.

実際に多くの標本 (N=307) に基づいて解析された *Ephippiochthonius* 属では、量的形態形質は種間で有意差があるものの、形態測定値の範囲が大きく重複し、明確に分離されない (Muster *et al.* 2004). このことは、量的形態形質に基づいて分類されている種群では、分布記録や標本数の充実に伴って、近縁種間の境界が曖昧になる恐れがあることを示唆している。

伝統的なカニムシ類の記載分類においては、量的形態形質により重きが置かれてきたために、多くの有用な質的形態形質が見落とされている可能性がある。前述した *Lasiochernes* 属および *Ephippiochthonius* 属種は、それぞれ長毛の生じる位置と副歯の有無という質的形態形質によって識別することができる (Muster *et al.* 2004; Christophoryová *et al.* 2016). *Mundochthonius* 属では *Lasiochernes* 属や *Ephippiochthonius* 属種の識別に使用されているような質的形態形質は知られていないが、本研究で使用した標本の形態形質を精査したところ、いくつかの遺伝的クレード間で異なる質的形態形質があることが分かった：鋏角固定指内歯の形状や動指の瘤状紡角の有無 (図 6), 頭胸部腹面前縁の歯の形状 (図 7), および腹部背板刺毛の長短 (図 8). これらの形態形質およびその組み合わせは、日本産 *Mundochthonius* 属の隠蔽種を記載するための診断形質として使用することができるかもしれない。最近では、診断形質として質的形態形質を積極的に提案し、分類学的な整理や新種記載を行っている研究もある (e.g. Zaragoza 2008; Harvey and Wynne 2014). カニムシ類の分類学者は、種間で異なる質的形態形質を発見するために、より積極的な努力を行うべきである。

分子データと形態データの両方から検討することによって、カニムシ類の種分類はより「種」という実体を反映したものになると考えられる。独立した種であることは、分子データと形態データという複数の証拠によって、より強く支持することが可能である。系統学的種概念 Phylogenetic Species Concept (Cracraft

1983) や進化的種概念 Evolutionary Species Concept (Wiley 1978) の下では、単系統的であることや表現型によって区別がつくことが「種」であることを判断するための重要な証拠となる。分子データによってカニムシ類には多くの隠蔽種や未記載種が存在することが示唆されているが (e.g. Harrison *et al.* 2014; Cosgrove *et al.* 2016), 同様に形態データに基づいた支持も欠かせない。最近では、種の記載に合わせて分子データを示している研究も増えてきている (Harvey *et al.* 2015, 2016a, 2016b). 分子データと形態データの両方を考慮した分類学的な研究によって、カニムシ類の完全な分類学的多様性の記述が導かれるだろう。

引用文献

- Beier, M. (1932a). Pseudoscorpionidea I. Subord. Chthoniinea et Neobisiinea. *Tierreich* **57**, i–xx, 1–258.
- Beier, M. (1932b). Pseudoscorpionidea II. Subord. C. Cheliferinea. *Tierreich* **58**, i–xxi, 1–294.
- Chamberlin, J. C. (1929). A synoptic classification of the false scorpions or chela-spinners, with a report on a cosmopolitan collection of the same. Part I. The Heterosphyronida (Chthoniidae) (Arachnida-Chelonethida). *Annals and Magazine of Natural History* **4**, 50–80.
- Christophoryová, J., Krajčovičová, K., Henderickx, H., and Španiel, S. (2016). A multivariate study of differentiating characters between three European species of the genus *Lasiochernes* Beier, 1932 (Pseudoscorpiones, Chernetidae). *ZooKeys* **629**, 51–81.
- Cosgrove, J. G., Agnarsson, I., Harvey, M. S., and Binford, G. J. (2016). Pseudoscorpion diversity and distribution in the West Indies: sequence data

- confirm single island endemism for some clades, but not others. *Journal of Arachnology* **44**, 257–271.
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* **1**, 159–187.
- Harrison, S. E., Guzik, M. T., Harvey, M. S., and Austin, A. D. (2014). Molecular phylogenetic analysis of Western Australian troglobitic chthoniid pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) points to multiple independent subterranean clades. *Invertebrate Systematics* **28**, 386–400.
- Harvey, M. S. (2014). A review and redescription of the cosmopolitan pseudoscorpion *Chelifer cancroides* (Pseudoscorpiones: Cheliferidae). *Journal of Arachnology* **42**, 86–104.
- Harvey, M. S., and Wynne, J. J. (2014). Troglomorphic pseudoscorpions (Arachnida: Pseudoscorpiones) of northern Arizona, with the description of two new short-range endemic species. *Journal of Arachnology* **42**, 205–219.
- Harvey, M. S., Abrams, K. M., and Burger, M. A. (2015). A new species of the pseudoscorpion genus *Synsphyronus* (Pseudoscorpiones: Garypidae) from Barrow Island, Western Australia. *Records of the Western Australian Museum* **137**, 137–143.
- Harvey, M. S., Huey, J. A., Hillyer, M. J., McIntyre, E., and Giribet, G. (2016a). The first troglobitic species of Gymnobisiidae (Pseudoscorpiones: Neobisioidea), from Table Mountain (Western Cape Province, South Africa) and its phylogenetic position. *Invertebrate Systematics* **30**, 75–85.
- Harvey, M. S., Abrams, K. M., Beavis, A. S., Hillyer, M. J., and Huey, J. A. (2016b). Pseudoscorpions of the family Feaellidae (Pseudoscorpiones: Fealloidea) from

- the Pilbara region of Western Australia show extreme short-range endemism. *Invertebrate Systematics* **30**, 491–508.
- Marhold, K. (2011). Multivariate morphometrics and its application to monography at specific and infraspecific levels. In 'Monographic Plant Systematics: Fundamental Assessment of Plant Biodiversity, Regnum Vegetabile, Vol. 153'. (Eds T. F. Stuessy and H. W. Lack.) pp. 73–99. (Koeltz Scientific Books: Königstein, Germany.)
- Morikawa, K. (1960). Systematic studies of Japanese pseudoscorpion. *Memoirs of the Ehime University (2B)* **4**, 85–172.
- Muster, C., Schmarda, T., and Blick, T. (2004). Vicariance in a cryptic species pair of European pseudoscorpions (Arachnida, Pseudoscorpiones, Chthoniidae). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology* **242**, 299–311.
- Ohira, H., Kaneko, S., and Tsutsumi, T. (2016). Is abdominal tergal chaetotaxy reliable for species diagnosis of Japanese soil-dwelling *Mundochthonius* pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae)?. *Proceedings of Arthropodan Embryological Society of Japan* **50**, 11–13.
- R Core Team (2017). 'R: A Language and Environment for Statistical Computing.' R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at <https://www.R-project.org/>. [Accessed 8 May 2017.]
- 坂寄 廣. (2014). 岡山産オウギツチカニムシ *Allochthonius (Allochthonius) opticus* の再記載 (カニムシ目, ツチカニムシ科). *茨城県自然博物館研究報告* **17**, 1–6.
- 塘 忠顕. (2012). 福島県相馬市の土壌動物に対する東日本大震災の影響 震災後に実施したカニムシ類とアザミウマ類の調査から. *福島大学プロジェクト*

ト研究 [自然と人間] 研究報告 **9**, 1–12.

Venables, W. N., and Ripley, B. D. (2002). 'Modern Applied Statistics with S-PULS. (Fourth edition).' (Springer: New York, US.)

Wiley, E. O. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Biology* **27**, 17–26.

Zaragoza, J. A. (2008). On the status of the subspecies of *Roncocreagris galeonuda* (Pseudoscorpiones: Neobisiidae): importance of the chelal microsetae pattern. Remarks on the genus *Roncocreagris* Mahnert. *Revista Ibérica de Aracnología* **15**, 35–46.

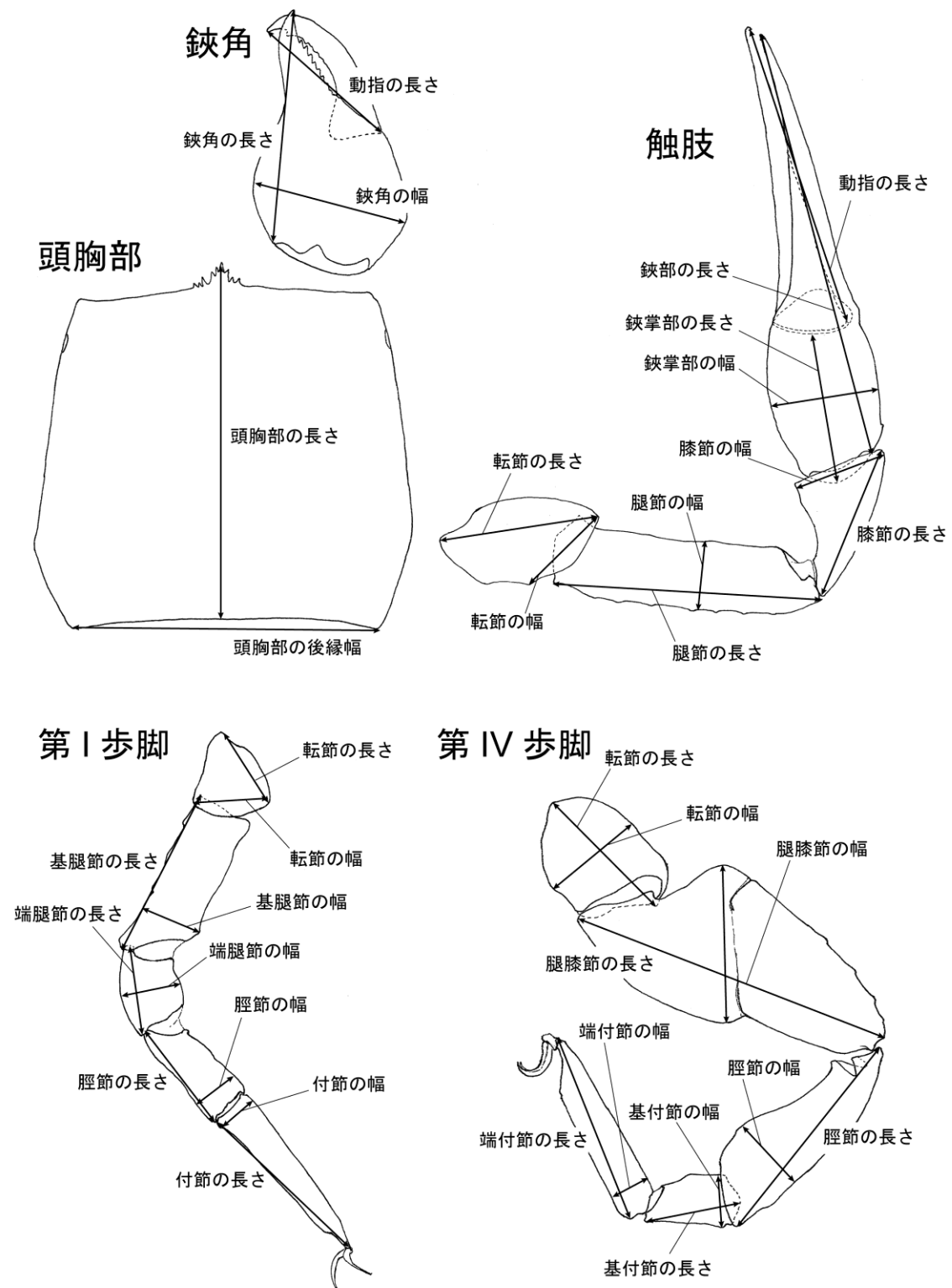


図 1. 標本の形態測定部位

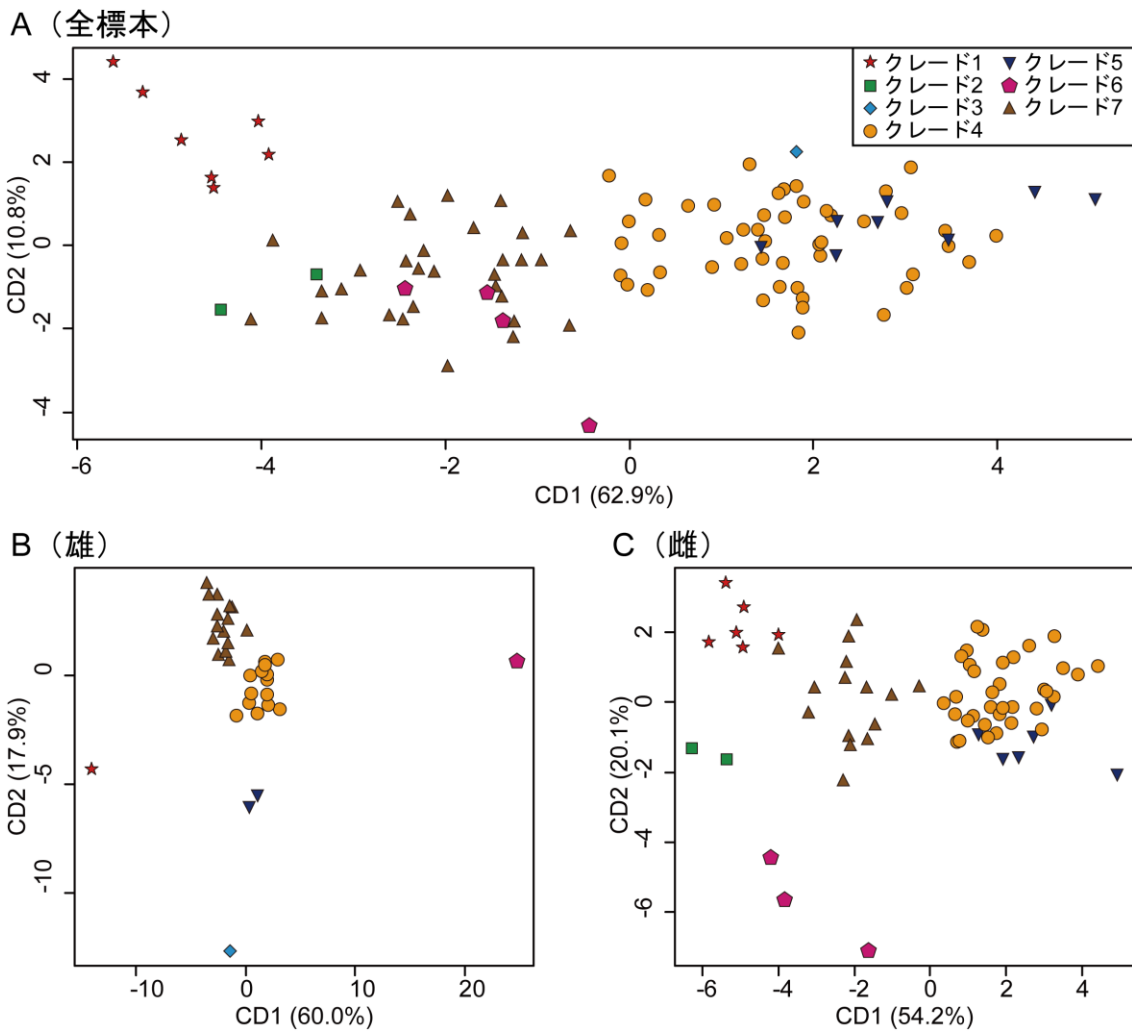


図 2. *Mundochthonius* 属の (A) 全標本, (B) 雄標本のみ, (C) 雌標本のみ
 の 23 の量的形態形質に基づく遺伝的クレードの正準判別分析結果.

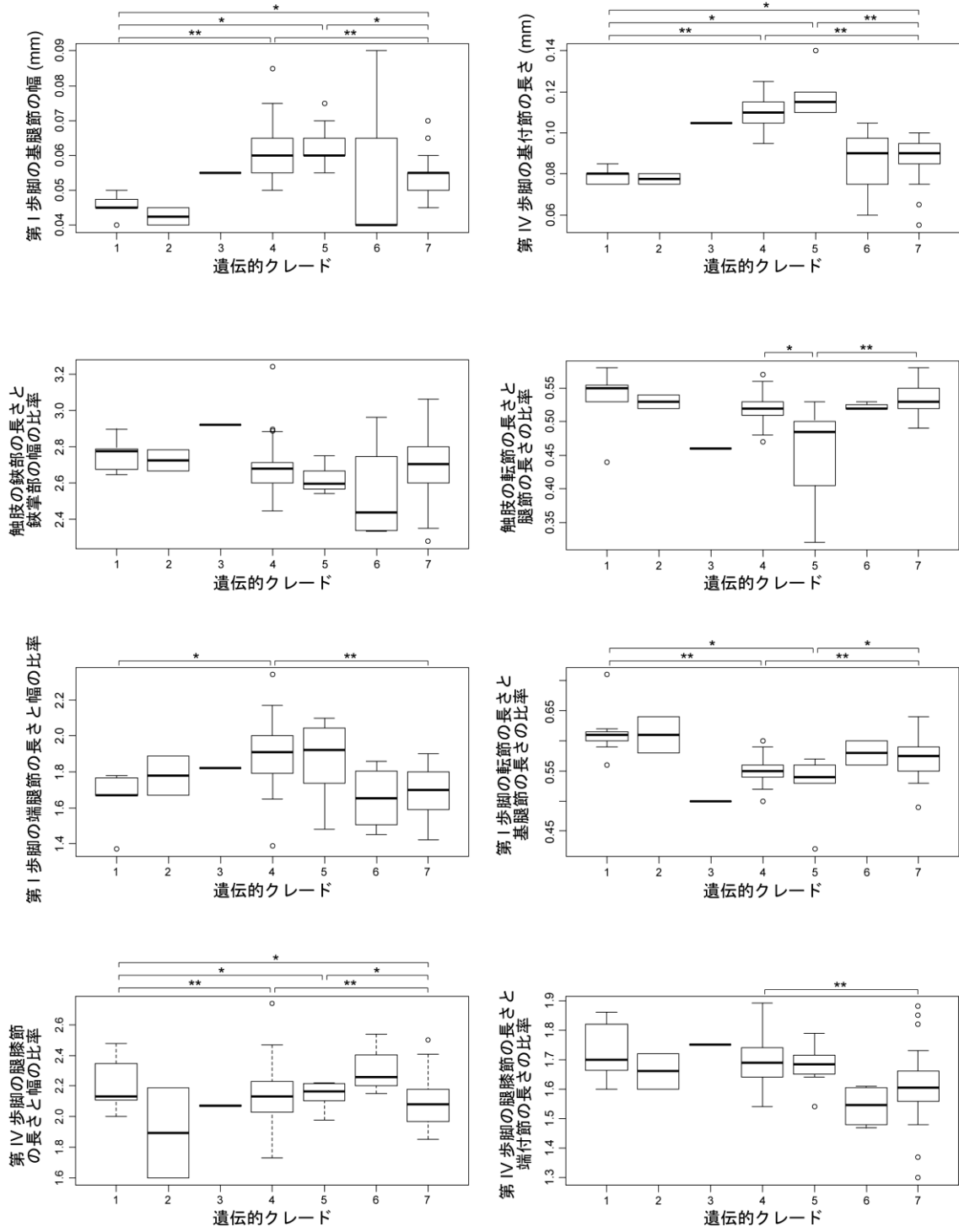


図3. 正準判別分析においてCD1およびCD2と関連が見られた *Mundochthonius* 属全標本の量的形態形質の遺伝的クレードごとの箱ひげ図。

箱は25%および75%, 横線は中央値, ひげは10%から90%を示す. Open circle

は外れ値を示す. Steel-Dwass の多重比較検定におけるクレード間の有意差は, *
は $P < 0.05$, **は $P < 0.01$ で示した.

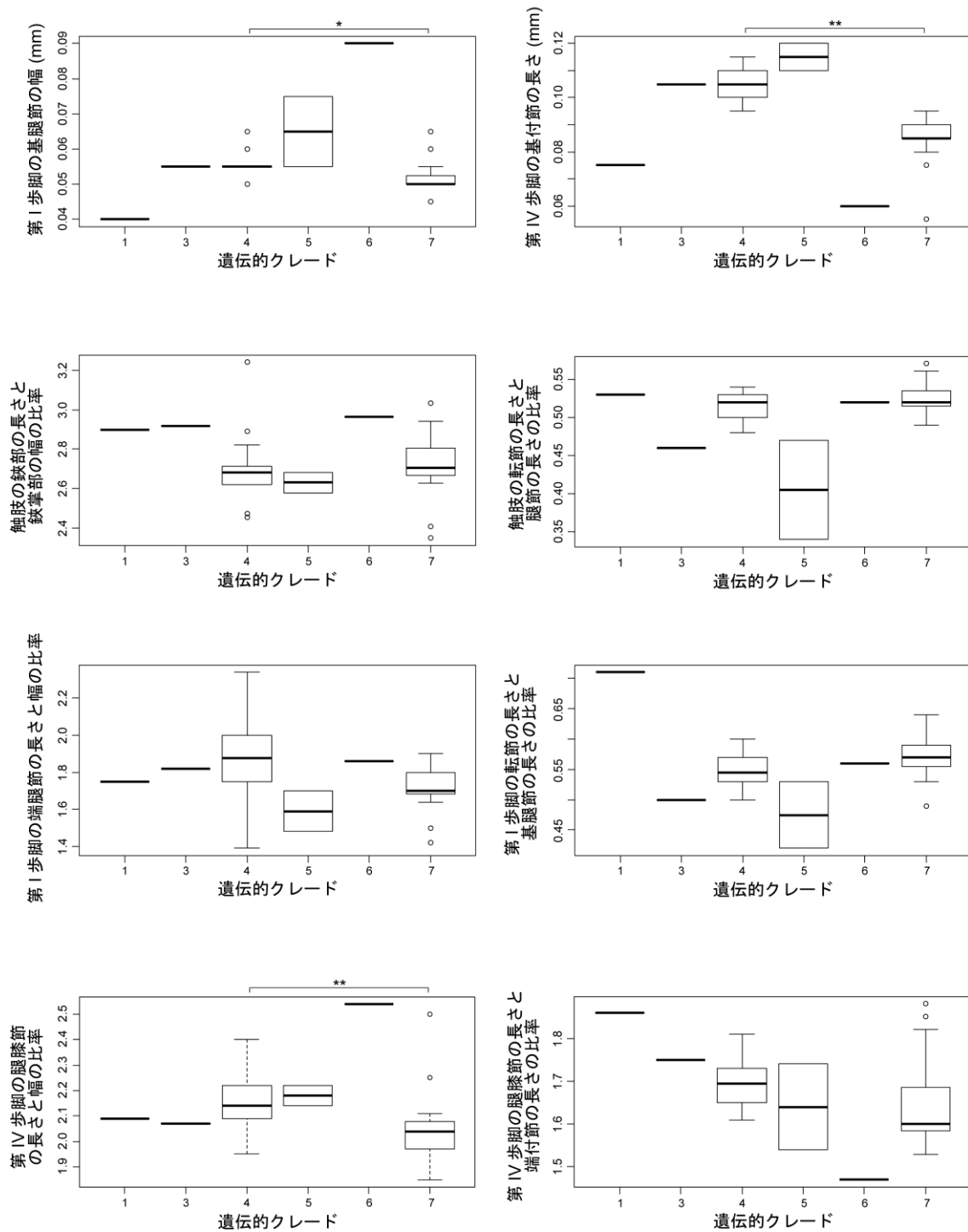


図4. 正準判別分析においてCD1およびCD2と関連が見られた *Mundochthonius* 属雄標本の量的形態形質の遺伝的クレードごとの箱ひげ図.

箱は25%および75%, 横線は中央値, ひげは10%から90%を示す. Open circle

は外れ値を示す. Steel-Dwass の多重比較検定におけるクレード間の有意差は, *
は $P < 0.05$, **は $P < 0.01$ で示した.

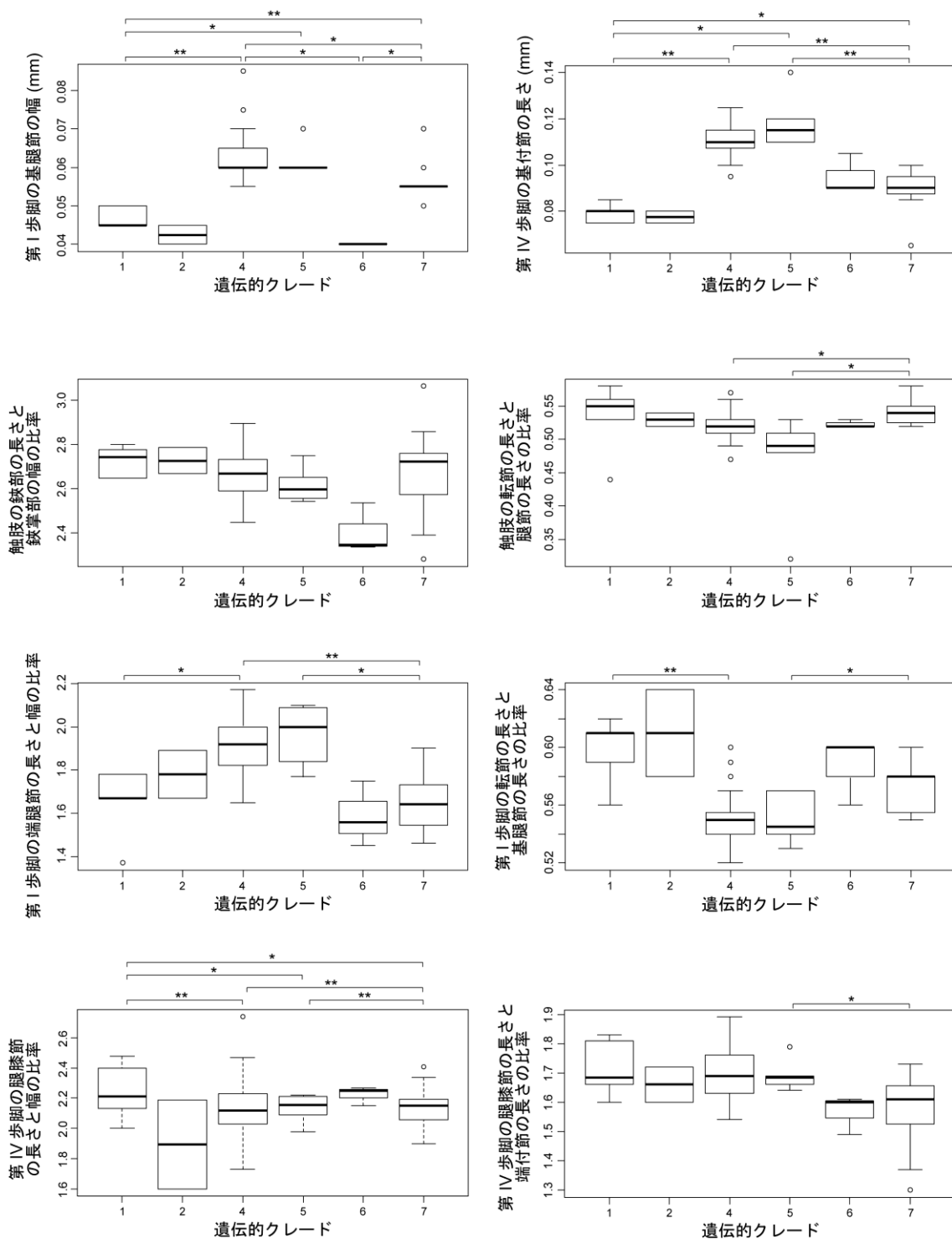


図5. 正準判別分析においてCD1およびCD2と関連が見られた *Mundochthonius* 属雌標本の量的形態形質の遺伝的クレードごとの箱ひげ図。

箱は25%および75%, 横線は中央値, ひげは10%から90%を示す. Open circle

は外れ値を示す. Steel-Dwass の多重比較検定におけるクレード間の有意差は, * は $P < 0.05$, ** は $P < 0.01$ で示した.

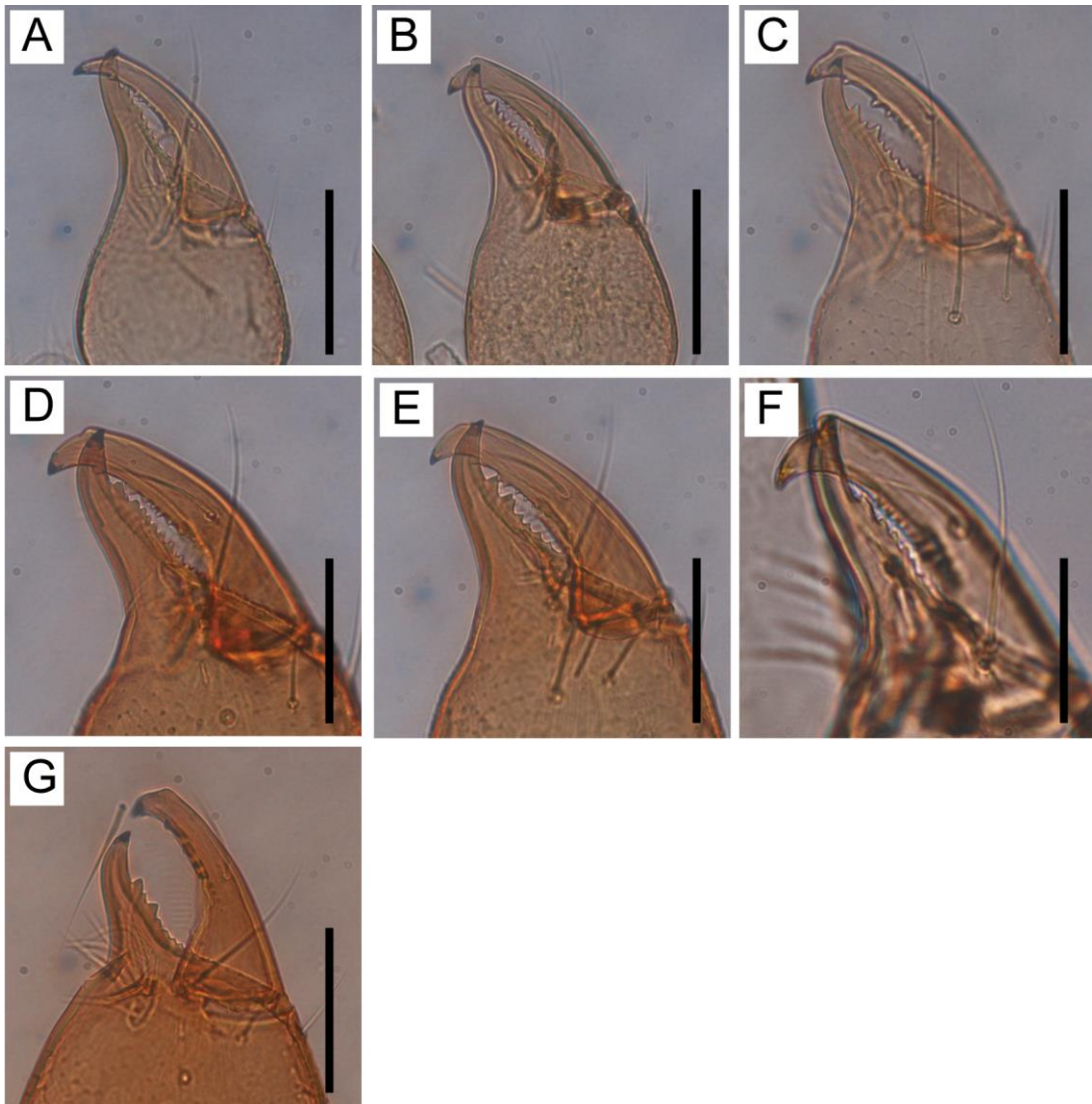


図 6. 日本産 *Mundochthonius* 属プレパラート標本の鋏角固定指および動指。それぞれの写真は、第 3 章の分子系統解析における各遺伝的クレードに対応する：(A) 遺伝的クレード 1, (B) 遺伝的クレード 2 (*M. kiyoshii*), (C) 遺伝的クレード 3, (D) 遺伝的クレード 4 (*M. japonicus*), (E) 遺伝的クレード 5, (F) 遺伝的クレード 6, (G) 遺伝的クレード 7 (*M. itohi*)。A-E および G のスケールは 0.1 mm, F のスケールは 0.05 mm.

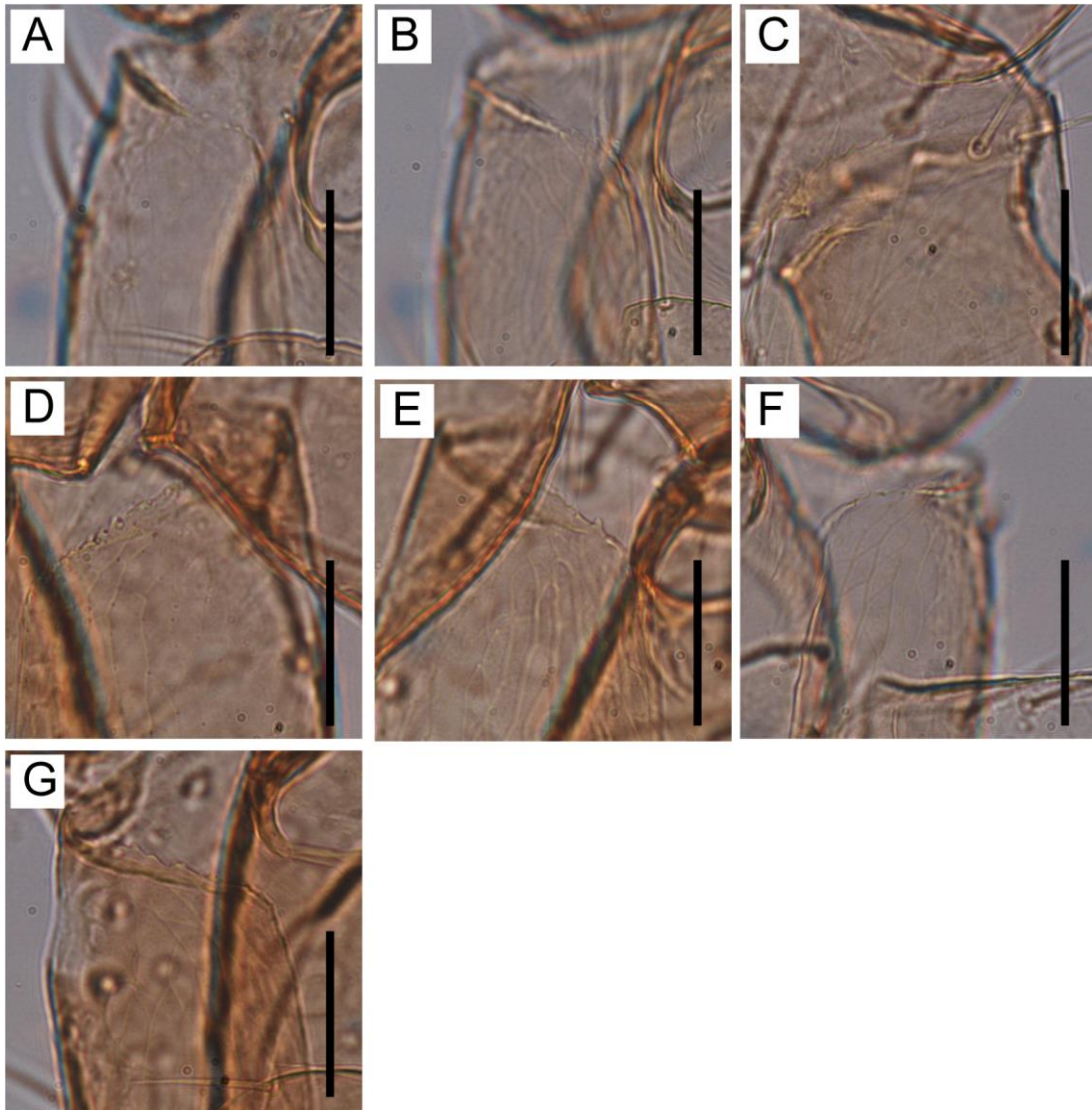


図7. 日本産 *Mundochthonius* 属プレパラート標本の頭胸部腹面前縁の歯.
それぞれの写真は、第3章の分子系統解析における各遺伝的クレードに対応する：(A) 遺伝的クレード1, (B) 遺伝的クレード2 (*M. kiyoshii*), (C) 遺伝的クレード3, (D) 遺伝的クレード4 (*M. japonicus*), (E) 遺伝的クレード5, (F) 遺伝的クレード6, (G) 遺伝的クレード7 (*M. itohi*). すべてのスケールは0.1 mm.

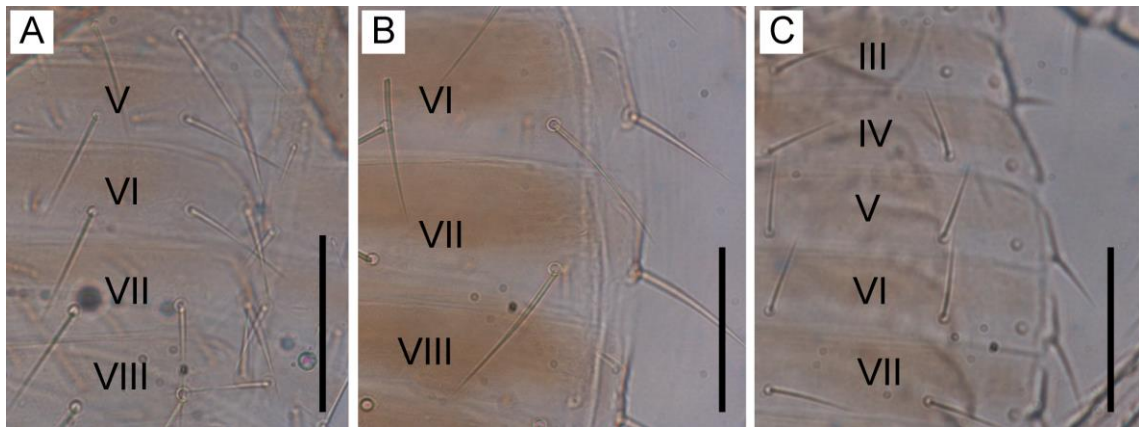


図 8. 日本産 *Mundochthonius* 属プレパラート標本の腹部背面.

それぞれの写真は、第 3 章の分子系統解析における遺伝的クレード 1 (A), 遺伝的クレード 5 (B) および遺伝的クレード 6 (C) に対応する. ローマ数字は腹部背板 (腹部第 IV–VIII 背板) を示す. すべてのスケールは 0.1 mm.

表 1. *Mundochthonius* 属 101 標本に基づくクレードおよび雌雄ごとの独立性が高い 23 の形態学的形質の測定値

値は上段に平均±標準偏差, 下段の括弧内に最小値-最大値を示した. 判別分析の各 CD において関連が高いと見られた形質は太字で示した.

形態形質	クレード1		クレード2	クレード3	クレード4		クレード5		クレード6		クレード7	
	♂ N=1	♀ N=6	♀ N=2	♂ N=1	♂ N=14	♀ N=35	♂ N=2	♀ N=6	♂ N=1	♀ N=3	♂ N=15	♀ N=15
第1歩脚の基腿節の幅	0.040	0.047 ± 0.003 (0.045-0.050)	0.043 ± 0.004 (0.040-0.045)	0.055	0.056 ± 0.003 (0.050-0.065)	0.063 ± 0.007 (0.055-0.085)	0.065 ± 0.014 (0.055-0.075)	0.062 ± 0.004 (0.060-0.070)	0.090	0.040	0.052 ± 0.005 (0.045-0.065)	0.056 ± 0.006 (0.050-0.070)
第IV歩脚の基付節の長さ	0.075	0.079 ± 0.004 (0.075-0.085)	0.078 ± 0.004 (0.075-0.080)	0.105	0.105 ± 0.006 (0.095-0.115)	0.111 ± 0.007 (0.095-0.125)	0.115 ± 0.007 (0.110-0.120)	0.118 ± 0.011 (0.110-0.140)	0.060	0.095 ± 0.009 (0.090-0.105)	0.085 ± 0.010 (0.055-0.095)	0.090 ± 0.009 (0.065-0.100)
頭胸部の長さとは後縁幅の比率	0.99	1.08 ± 0.07 (0.98-1.15)	1.10 ± 0.01 (1.05-1.06)	1.16	1.11 ± 0.06 (1.02-1.24)	1.17 ± 0.10 (0.91-1.31)	1.17 ± 0.18 (1.04-1.3)	1.06 ± 0.10 (0.94-1.23)	1.16	1.13 ± 0.03 (1.10-1.16)	1.01 ± 0.10 (0.85-1.33)	1.02 ± 0.07 (0.87-1.15)
触角の長さとは幅の比率	1.58	1.56 ± 0.10 (1.41-1.68)	1.64 ± 0.04 (1.61-1.66)	1.60	1.60 ± 0.13 (1.27-1.73)	1.52 ± 0.18 (1.17-1.88)	1.47 ± 0.07 (1.42-1.52)	1.46 ± 0.15 (1.19-1.65)	1.71	1.64 ± 0.09 (1.54-1.70)	1.46 ± 0.18 (1.17-1.79)	1.44 ± 0.20 (1.14-1.87)
触肢の転節の長さとは幅の比率	1.45	1.45 ± 0.10 (1.30-1.59)	1.52 ± 0.02 (1.50-1.53)	1.34	1.68 ± 0.06 (1.59-1.77)	1.59 ± 0.11 (1.33-1.78)	1.44 ± 0.45 (1.12-1.75)	1.54 ± 0.18 (1.22-1.69)	1.57	1.72 ± 0.04 (1.67-1.74)	1.60 ± 0.12 (1.41-1.83)	1.54 ± 0.16 (1.10-1.75)
触肢の腿節の長さとは幅の比率	3.81	3.54 ± 0.19 (3.25-3.78)	3.55 ± 0.02 (3.53-3.56)	4.06	3.84 ± 0.20 (3.54-4.23)	3.58 ± 0.28 (2.89-3.95)	3.58 ± 0.59 (3.16-4.00)	3.79 ± 0.08 (3.71-3.90)	3.89	3.76 ± 0.08 (3.68-3.84)	3.61 ± 0.18 (3.22-3.83)	3.65 ± 0.19 (3.11-3.96)
触肢の掌部の長さとは幅の比率	1.53	1.44 ± 0.07 (1.37-1.55)	1.33 ± 0.02 (1.31-1.34)	1.48	1.56 ± 0.17 (1.30-2.00)	1.39 ± 0.13 (1.09-1.67)	1.44 ± 0.21 (1.29-1.58)	1.41 ± 0.15 (1.15-1.59)	1.43	1.46 ± 0.04 (1.43-1.50)	1.45 ± 0.12 (1.25-1.70)	1.36 ± 0.13 (1.11-1.53)
触肢の触角の長さとは腕部の幅の比率	2.90	2.73 ± 0.07 (2.65-2.80)	2.73 ± 0.08 (2.67-2.79)	2.92	2.70 ± 0.19 (2.46-3.24)	2.67 ± 0.11 (2.45-2.90)	2.63 ± 0.07 (2.58-2.68)	2.62 ± 0.08 (2.54-2.75)	2.96	2.40 ± 0.11 (2.33-2.53)	2.71 ± 0.18 (2.35-3.03)	2.67 ± 0.20 (2.28-3.06)
触肢の転節の長さとは腿節の長さの比率	0.53	0.54 ± 0.05 (0.44-0.58)	0.53 ± 0.01 (0.52-0.54)	0.46	0.52 ± 0.02 (0.48-0.54)	0.52 ± 0.02 (0.47-0.57)	0.41 ± 0.09 (0.34-0.47)	0.47 ± 0.08 (0.32-0.53)	0.52	0.52 ± 0.01 (0.52-0.53)	0.53 ± 0.02 (0.49-0.57)	0.54 ± 0.02 (0.52-0.58)
触肢の腿節の長さとは膝節の長さの比率	1.78	1.70 ± 0.08 (1.57-1.76)	1.61 ± 0.06 (1.57-1.65)	1.83	1.79 ± 0.05 (1.70-1.88)	1.76 ± 0.07 (1.62-1.93)	1.82 ± 0.06 (1.78-1.86)	1.78 ± 0.08 (1.69-1.91)	1.69	1.69 ± 0.04 (1.66-1.73)	1.78 ± 0.09 (1.62-2.00)	1.73 ± 0.07 (1.61-1.90)
触肢の腿節の長さとは動指の長さの比率	0.89	0.90 ± 0.04 (0.86-0.95)	0.94 ± 0.04 (0.91-0.96)	0.96	0.97 ± 0.02 (0.92-1.00)	0.98 ± 0.04 (0.91-1.04)	1.00 ± 0.01 (0.99-1.00)	0.97 ± 0.02 (0.94-0.99)	0.90	1.01 ± 0.10 (0.95-1.12)	0.95 ± 0.04 (0.85-0.99)	0.95 ± 0.03 (0.90-1.00)
第1歩脚の転節の長さとは幅の比率	1.42	1.21 ± 0.03 (1.16-1.24)	1.29 ± 0.07 (1.24-1.34)	1.67	1.34 ± 0.19 (1.11-1.75)	1.24 ± 0.08 (1.10-1.40)	1.19 ± 0.27 (1.00-1.38)	1.29 ± 0.06 (1.22-1.36)	1.28	1.33 ± 0.07 (1.25-1.37)	1.29 ± 0.12 (1.06-1.47)	1.27 ± 0.08 (1.18-1.40)

表 1. (続き)

形態形質	クレード1		クレード2		クレード3	クレード4		クレード5		クレード6		クレード7	
	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
	N=1	N=6	N=2	N=1	N=14	N=35	N=2	N=6	N=1	N=3	N=15	N=15	
第I歩脚の端腿節の長さ と幅の比率	1.75	1.66±0.15	1.78±0.16	1.82	1.87±0.22	1.91±0.15	1.59±0.16	1.97±0.13	1.86	1.59±0.15	1.71±0.13	1.65±0.14	
		(1.37-1.78)	(1.67-1.89)		(1.39-2.34)	(1.65-2.17)	(1.48-1.70)	(1.77-2.10)		(1.45-1.75)	(1.42-1.90)	(1.46-1.90)	
第I歩脚の脛節の長さ と幅の比率	5.00	5.27±0.21	5.70±0.14	5.13	6.16±0.56	5.91±0.52	6.46±1.17	5.87±0.27	5.40	5.55±0.62	5.45±0.50	5.68±0.45	
		(5.00-5.60)	(5.60-5.80)		(5.13-7.17)	(5.00-7.80)	(5.63-7.29)	(5.50-6.29)		(4.84-6.00)	(4.50-6.17)	(5.15-6.50)	
第I歩脚の転節の長さ と基腿節の長さの比率	0.71	0.60±0.02	0.61±0.04	0.50	0.55±0.03	0.55±0.02	0.48±0.08	0.55±0.02	0.56	0.59±0.02	0.58±0.04	0.57±0.02	
		(0.56-0.62)	(0.58-0.64)		(0.50-0.60)	(0.52-0.60)	(0.42-0.53)	(0.53-0.57)		(0.56-0.60)	(0.49-0.64)	(0.55-0.60)	
第I歩脚の基腿節の長さ と脛節の長さの比率	0.80	0.91±0.04	0.94±0.09	0.98	0.93±0.04	0.94±0.05	0.97±0.04	0.95±0.03	0.93	0.88±0.02	0.92±0.04	0.93±0.04	
		(0.85-0.97)	(0.87-1)		(0.87-1.00)	(0.83-1.06)	(0.94-0.99)	(0.90-1.00)		(0.87-0.90)	(0.83-0.98)	(0.86-1.00)	
第IV歩脚の転節の長さ と幅の比率	1.40	1.27±0.07	1.34±0.09	1.25	1.31±0.07	1.26±0.13	1.46±0.04	1.28±0.06	1.47	1.40±0.07	1.26±0.20	1.24±0.09	
		(1.18-1.40)	(1.27-1.4)		(1.19-1.40)	(1.00-1.48)	(1.43-1.48)	(1.22-1.39)		(1.34-1.47)	(1.00-1.82)	(1.05-1.37)	
第IV歩脚の腿膝節の長さ と幅の比率	2.09	2.24±0.18	1.90±0.42	2.07	2.16±0.11	2.14±0.19	2.18±0.06	2.14±0.09	2.54	2.22±0.06	2.06±0.15	2.13±0.15	
		(2.00-2.48)	(1.6-2.19)		(1.95-2.40)	(1.73-2.74)	(2.14-2.22)	(1.98-2.22)		(2.15-2.27)	(1.85-2.50)	(1.90-2.41)	
第IV歩脚の脛節の長さ と幅の比率	2.75	3.02±0.12	3.10±0.13	3.43	3.32±0.25	3.43±0.37	3.20±0.20	3.42±0.15	2.78	3.25±0.27	3.26±0.20	3.26±0.25	
		(2.92-3.19)	(3.00-3.19)		(2.88-3.86)	(2.42-4.42)	(3.06-3.34)	(3.25-3.58)		(3.10-3.56)	(2.93-3.59)	(2.75-3.67)	
第IV歩脚の基付節の長さ と幅の比率	4.50	4.46±0.38	4.42±0.35	5.58	5.03±0.32	5.23±0.56	5.69±0.79	5.44±0.29	5.2	5.30±0.70	5.08±0.36	5.20±0.40	
		(4.00-5.00)	(4.17-4.67)		(4.45-5.63)	(3.78-6.72)	(5.13-6.25)	(5.00-5.86)		(4.50-5.80)	(4.43-5.84)	(4.63-6.00)	
第IV歩脚の転節の長さ と腿膝節の長さの比率	0.42	0.43±0.03	0.46±0.03	0.37	0.40±0.02	0.40±0.04	0.44±0.01	0.40±0.02	0.50	0.44±0.03	0.40±0.03	0.43±0.05	
		(0.40-0.47)	(0.44-0.48)		(0.37-0.44)	(0.34-0.50)	(0.43-0.45)	(0.37-0.42)		(0.42-0.47)	(0.33-0.45)	(0.37-0.52)	
第IV歩脚の腿膝節の長さ と付節の長さの比率	1.52	1.41±0.05	1.30±0.11	1.42	1.39±0.04	1.37±0.07	1.38±0.06	1.41±0.03	1.52	1.40±0.06	1.39±0.04	1.40±0.13	
		(1.35-1.46)	(1.22-1.38)		(1.33-1.45)	(1.16-1.49)	(1.33-1.42)	(1.38-1.47)		(1.35-1.46)	(1.29-1.45)	(1.24-1.73)	
第IV歩脚の腿膝節の長さ と端付節の長さの比率	1.86	1.71±0.09	1.66±0.08	1.75	1.70±0.05	1.69±0.09	1.64±0.14	1.69±0.05	1.47	1.57±0.07	1.65±0.11	1.57±0.12	
		(1.06-1.83)	(1.6-1.72)		(1.61-1.81)	(1.54-1.89)	(1.54-1.74)	(1.64-1.79)		(1.49-1.61)	(1.53-1.88)	(1.30-1.73)	

表 2. 全標本, 雄標本のみ, および雌標本のみを用いた正準判別分析の正準軸 CD 1 および CD 2 と *Mundochthonius* 属 101 標本について測定または算出した 23 の形態形質との相関係数

判別分析の各 CD において関連が高いと見られた形質は太字で示した.

形態形質	全標本		雄		雌	
	CD1	CD2	CD1	CD2	CD1	CD2
第I歩脚の基腿節の幅	0.588	-0.073	0.808	-0.175	0.731	0.300
第IV歩脚の基付節の長さ	0.896	0.140	-0.025	-0.487	0.909	-0.131
頭胸部の長さの後縁幅の比率	0.331	0.158	0.346	-0.416	0.197	-0.060
触角の長さの比率	0.055	0.073	0.258	-0.200	-0.065	-0.115
触肢の転節の長さの比率	0.179	-0.405	0.126	0.370	0.190	-0.339
触肢の腿節の長さの比率	0.118	-0.032	0.196	-0.317	0.014	-0.246
触肢の掌部の長さの比率	0.078	0.118	0.025	-0.102	0.012	-0.052
触肢の鉗部の長さの比率	-0.112	0.226	0.098	-0.118	-0.031	0.476
触肢の転節の長さの比率	-0.406	-0.197	-0.074	0.596	-0.339	0.186
触肢の腿節の長さの比率	0.301	0.093	-0.163	-0.178	0.420	0.096
触肢の腿節の長さの比率	0.454	-0.342	-0.011	-0.133	0.403	-0.401
第I歩脚の転節の長さの比率	0.016	-0.035	-0.064	-0.267	-0.044	-0.372
第I歩脚の端腿節の長さの比率	0.552	0.163	0.192	-0.069	0.650	0.084
第I歩脚の脛節の長さの比率	0.463	-0.080	0.189	-0.169	0.384	-0.050
第I歩脚の転節の長さの比率	-0.622	0.077	-0.333	0.344	-0.706	-0.030
第I歩脚の基腿節の長さの比率	0.349	-0.001	0.283	-0.193	0.319	0.163
第IV歩脚の転節の長さの比率	0.037	-0.042	0.179	-0.196	-0.079	-0.294
第IV歩脚の腿膝節の長さの比率	0.041	0.125	0.524	-0.132	-0.027	0.041
第IV歩脚の脛節の長さの比率	0.389	-0.112	-0.092	0.001	0.417	-0.066
第IV歩脚の基付節の長さの比率	0.364	-0.283	0.151	-0.259	0.388	-0.236
第IV歩脚の転節の長さの比率	-0.273	-0.181	0.428	-0.028	-0.400	-0.139
第IV歩脚の腿膝節の長さの比率	-0.106	0.078	0.153	-0.128	-0.052	-0.006
第IV歩脚の腿膝節の長さの比率	0.211	0.537	-0.393	-0.239	0.271	0.251

第 5 章

日本産 *Mundochthonius* 属の 3 新種

Three new species of the genus *Mundochthonius* from Japan

Abstract — Three new species of the genus *Mundochthonius*, *M. longisetosus* sp. nov., *M. aizuensis* sp. nov. and *M. sakayorii* sp. nov., were described from Japan. These new species are distinguished from other species of congener by following qualitative characteristics: presence/absence of eyes, length of setae on abdominal tergites, and the morphology of knob-like spinneret, ventral anterior teeth of carapace, and type of inner-teeth of cheliceral fixed finger, and can be identified by DNA barcoding. An identification key to Japanese *Mundochthonius* species and subspecies is provided.

Keywords — Fukushima Prefecture, Ibaraki Prefecture, *Mundochthonius aizuensis*, *Mundochthonius longisetosus*, *Mundochthonius sakayorii*, new species, pseudoscorpion, Saitama Prefecture.

Introduction

Genus *Mundochthonius* belonging to Chthoniidae was established by Chamberlin (1929a). Twenty-three *Mundochthonius* species have been described from Holarctic region so far. This genus can be distinguished from other genera of Chthoniidae by following diagnoses: 1) coxal spines present only on coxae II; 2) contiguous teeth on fingers of palpal chela; 3) trichobothrium *sb* closer to *st* than to *b* on movable finger of palpal chela; 4) epistome prominent, serrate; 5) one or more microsetae on anteromedial process (apex) of coxa I; 6) a bisetose intercoxal tubercle present between coxae III and IV (Muchmore 2001).

Three species of the genus *Mundochthonius* have been described from Japan: *M. japonicus* Chamberlin, 1929, *M. kiyoshii* Sakayori, 2002 and *M. itohi* Sakayori, 2009. In addition, three subspecies of *M. japonicus* have been known as *M. japonicus* "complex" (Zaragoza and Harvey 2006): *M. j. scolytidis* Morikawa, 1954, *M. j. imadatei* Morikawa, 1956 and *M. j. tripartitus* Morikawa, 1956. Two subspecies of *M. japonicus*, *M. j. imadatei* and *M. j. tripartitus*, are troglobitic without eyes (Morikawa 1956, 1960), and *M. j. japonicus*, *M. j. scolytidis*, *M. kiyoshii* and *M. itohi* are soil-dwellingeyed (sub) species (Chamberlin, 1929b; Morikawa, 1954, 1960; Sakayori, 2002, 2009).

Soil-dwelling species and subspecies have been distinguished from each other by body length, chaetotaxies, and length: width ratio of pedipalpal femur (Morikawa 1954, 1960; Sakayori 2002, 2009). Furthermore, several undescribed or cryptic species which resemble *M. j. scolytidis* have been reported (Maehara *et al.* 2003; Sakayori 2010).

In the previous study (chapter 3 of this thesis), the presence of four cryptic species within Japanese soil-dwelling *Mundochthonius* species have been indicated by the molecular phylogenetic analyses based on the sequences of mitochondrial DNA

cytochrome *c* oxidase I (*COI*) and nuclear DNA *18S rRNA* genes. However, these could not be distinguished from other species of congener using typical diagnoses such as body length, chaetotaxies and length: width ratio of pedipalpal femur. I surveyed the morphological characteristics of specimens of these *Mundochthonius* species in details, and then found that three species can to be distinguished from each other and from known species by not quantitative characteristics but several qualitative characteristics (see chapter IV). Here, I describe these three species as new, and indicate some information of cryptic species of *M. japonicus*.

Materials and methods

The same specimens as used in chapter 3 and 4 of this thesis were examined and measured their body regions. Microscopical examination was performed using ECLIPSE E200 (Nikon, Japan) with an ocular micrometer. Nomenclature and familial affiliation is after Chamberlin (1931) and Harvey (1992).

Systematics

FAMILY Chthoniidae

GENUS *Mundochthonius* Chamberlin

***Mundochthonius longisetosus* sp. nov.**

(Figs. 1–4, 9A, 10A and 11A)

Material examined. Holotype: male, Mt. Mitsumine, Chichibu city, Saitama Prefecture, Kanto region, Japan, 1050 m altitude, geographic coordinates: 35°54'53"N, 138°57'1"E. Collected on 25 May 2014, from A₀ layer of soil in broadleaved forest, leg.

Hajime Ohira; Paratypes: 3 females, same locality and date as holotype. Other specimens examined: 3 females, same locality and date as type specimens. All specimens are deposited in Insect Biodiversity and Morphology Laboratory of Fukushima University, Japan.

Diagnosis. This species is similar to *M. japonicus scolytidis* Chambelin, *M. kiyoshii* Sakayori and *M. itohi* Sakayori but can be distinguished from these species by no distinct processes on ventral anterior margin of carapace (Figs. 1, 10A, 10D, 10E and 10F). Moreover, this species can be distinguished from *M. sakayorii* sp. nov. by longer setae on abdominal tergites (Fig. 11A). This species can be identified easily by DNA barcoding for mitochondrial DNA *COI* and nuclear DNA *18S rRNA* sequences.

Description. *Carapace* (Fig 1): typical; subquadrate, epistome well-developed and serrated; two eyed; some lyrissures present: 6 on the anterior and 2 on the posterior; weak knob-like teeth on anterior margin of ventral carapace; carapacial chaetotaxy 6-4-4-2-2, 18.

Coxal area: typical; three microsetae present on anteromedial process (apex) of coxa I; single coxal spine present only on coxa II, blade-like, deeply-incised; a bisetose intercoxal tubercle present between coxa III and IV; manducatory process with 2 setae; palpal coxa with 3 setae, coxa I with 3–4 setae and 3 microsetae, coxa II with 6 setae, coxa III with 6–7 setae, and coxa IV with 6–7 setae.

Abdomen: ovate; anterior half of tergite brownish; setae on tergite, longer distinctly than tergite length (Fig. 11A); tergal chaetotaxy I–V 4: 4: 6: 6: 6; genital chaetotaxy including microsetae 2/2/6/4: [4-4]: 17-16/18 (male), 2(3)/2(1)/6/1: 7(7-9)-7(7-9) (female).

Chelicera (Figs. 1 and 10A): typical; 6 setae on palm and 1 seta on movable finger,

palm with scale-like granulations; fixed finger with 8–10 innerteeth and the most distal teeth higher than the others (single-peaked teeth); movable finger with 7–8 innerteeth; knob-like spinneret, with rounded tubercle.

Pedipalp (Fig. 2): moderately slender; measurements and ratios presented in Table 1; hand and the base of fixed finger with scale-like granulations; fixed and movable fingers with 35–39 and 38–41 contiguous teeth, respectively; teeth generally quadrate-shaped to flatted and rounded, basal teeth reduced.

Leg I and IV: measurements and ratios presented in Table 1; leg IV with a long seta on tibia, bsitarsus and telotarsus, respectively.

Remarks. This species is corresponded to genetic Clade 1 in the molecular phylogenetic tree (Fig. 12; see chapter 3 in this thesis).

DNA barcoding (GenBank/DDBJ/EMBL accession numbers). Mitochondrial DNA *COI*: LC200805. Nuclear DNA *18S rRNA*: LC200851.

Etymology. In reference to the longer setae on abdominal tergites of this species.

***Mundochthonius aizuensis* sp. nov.**

(Figs. 5, 7, 9B, 10B and 11B)

Material examined. Holotype: male, Tajima, Minami-aizu town, Fukushima Prefecture, Tohoku region, Japan, 1120 m altitude, geographic coordinates: 37°12'46"N, 139°37'5"E. Collected on 24 September 2014, from A₀ layer of soil in broadleaved forest, leg. Tsutsumi Tadaaki; Paratypes: 3 females, same locality and date as holotype. Other specimens examined: one male, Atsubetsu, Sapporo city, Hokkaido Prefecture, Hokkaido region, Japan, 50 m altitude, geographic coordinates: 43°1'1"N, 141°28'59"E. Collected on 14 September 2013, from A₀ layer of soil in broadleaved forest, leg.

Hajime Ohira; 4 females, Nishigo village, Fukushima Prefecture, Japan, 790 m altitude, geographic coordinates: 37°10'38"N, 140°1'3"E. Collected on 19 May 2012, from A₀ layer of soil in broadleaved forest, leg. Tsutsumi Tadaaki. All specimens are deposited in Insect Biodiversity and Morphology Laboratory of Fukushima University, Japan.

Diagnosis. This species is closely similar to *M. basarukini* Schawaller, but can be distinguished from *M. basarukini* by the presence of eyes or eye-spots (Schawaller, 1989). Moreover, this species is similar to *M. jaonicus scolytidis* Morikawa, but can be distinguished easily from *M. j. scolytidis* by the morphology of spinneret and teeth on ventral anterior margin of carapace. This species can be identified easily by DNA barcoding for mitochondrial DNA *COI* and nuclear DNA *18S rRNA* sequences.

Discription. *Carapace:* typical; subquadrate, epistome well-developed and serrated; two eyed; some lyrissures present: 6 on the anterior and 2 on the posterior; knob-like processes on anterior margin of ventral carapace; carapacial chaetotaxy 6-4-4-2-2, 18.

Coxal area: typical; three microsetae present on anteromedial process (apex) of coxa I; single coxal spine present only on coxa II, blade-like, deeply-incised; a bisetose intercoxal tubercle present between coxa III and IV; manducatory process with 2 setae, palpal coxa with 3 setae, coxa I with 3 setae and 2 microsetae, coxa II with 6 setae, coxa III with 6–7 setae, coxa IV with 6–7 setae.

Abdomen: ovate; anterior half of tergite brownish; setae on tergites, same long as tergite length (Fig. 11B); tergal chaetotaxy I–V, 4: 4: 6: 6: 6; genital chaetotaxy including microsetae: 2/2/6/5: [4-4]: 20-18/17 (male), 2/2(1)/6/2(3): 10-10 (female).

Chelicera (Fig. 5 and 10B): typical; 6 setae on palm and 1 seta on movable finger; palm with scale-like granulations; fixed finger with 9–11 innerteeth and distal first and second (or third) teeth higher than the others (two- or three-peaked teeth); movable

finger with 7–9 innerteeth; spinneret without process.

Pedipalp (Fig 6): moderately slender; measurements and ratios presented in Table 1; hand and the base of fixed finger with scale-like granulations; fixed and movable finger with 45–55 and 46–53 contiguous teeth, respectively; teeth are generally quadrate-shaped to flatted and rounded.

Leg I and IV: measurements and ratios presented in Table 1; leg IV with a long seta on tibia, bsitarsus, and telotarsus, respectively.

Remarks. This species is corresponded to genetic Clade 5 in the molecular phylogenetic tree (Fig. 12; see chapter 3 in this thesis).

DNA barcoding (GenBank/DDBJ/EMBL accession numbers). Mitochondrial DNA *COI*: AB855647, LC200828, LC200829, LC200831 (detected from holotype), LC200832, LC200833. Nuclear DNA *18S rRNA*: LC200868, LC200869, LC200870, LC200871 (detected from holotype).

Etymology. In reference to the locality of this species, Aizu region in Fukushima Prefecture.

Mundochthonius sakayorii sp. nov.

(Figs. 6, 8, 9C, 10C and 11C)

Material examined. Holotype: male, Fuji Graveyard, Oyama town, Shizuoka Prefecture, Chubu region, Japan, 580 m altitude, geographic coordinates: 35°22'1"N, 138°54'40"E. Collected on 18 May 2013, from A₀ layer of soil in broadleaved forest, leg. Tsutsumi Tadaaki; Paratypes: 3 females, Mt. Tsukuba, Tsukuba city, Ibaraki Prefecture, Kanto region, Japan, 750 m altitude, geographic coordinates: 36°13' 24"N, 140°6'22"E. Collected on 18 May 2013, from A₀ layer of soil in broadleaved forest, leg. Tsutsumi

Tadaaki. Type series are deposited in Insect Biodiversity and Morphology Laboratory of Fukushima University, Japan.

Diagnosis. This species is similar to *M. japonicus scolytidis* Chambelin, *M. kiyoshii* Sakayori and *M. itohi* Sakayori but can be distinguished from these species by no distinct teeth on ventral anterior margin of carapace (Figs. 10D, 10E and 10F). This species can be identified easily by DNA barcoding for mitochondrial DNA *COI* and nuclear DNA *18S rRNA* sequences.

Description. *Carapace*: typical; subquadrate; epistome well-developed and serrated; two eyed; some lyrissures are present: 6 on the anterior and 2 on the posterior; knob-like processes on anterior margin of ventral carapace; carapacial chaetotaxy 6-4-4-2-2, 18.

Coxal area: typical; three microsetae present on anteromedial process (apex) of coxa I; single coxal spine present only on coxa II, blade-like, deeply-incised; a bisetose intercoxal tubercle present between coxa III and IV; manducatory process with 2 setae, palpal coxa with 3 setae, coxa I with 3 setae and 3 microsetae, coxa II with 6–7 setae, coxa III with 6–7 setae, coxa IV with 6–7 setae.

Abdomen: ovate; anterior half of tergite brownish; setae on tergite are same long as tergite length (Fig. 11C); tergal chaetotaxy I–V, 4: 4: 6: 6: 6; genital chaetotaxy including microsetae: 2/2/6/4: [4-4]: 17-16/18 (male), 2/2/6(5-8)/2: 6(6-9)-8(7) (female).

Chelicera (Fig. 7 and 10C): typical; 6 setae on palm and 1 seta on movable finger; palm with scale-like granulations; fixed finger with 7–9 innerteeth, the most distal first teeth higher than the others (single-peaked teeth); movable finger with 8–9 innerteeth; knob-like spinneret, with rounded tubercle.

Pedipalp (Fig. 8): moderately slender; measurements and ratios presented in Table 1; hand and the base of fixed finger with scale-like granulations; fixed and movable finger with 35–43 and 35–45 contiguous teeth, respectively; teeth generally quadrate-shaped to flatted and rounded.

Leg I and IV: measurements and ratios presented in Table 1; leg IV with a long seta on tibia, bsitarsus, and telotarsus, respectively.

Remarks. This species is corresponded to genetic Clade 6 in the molecular phylogenetic tree (Fig. 12; see chapter 3 in this thesis). This species may be corresponded to undescribed species which has been reported in Sakayori (2010) because of its smaller sized body and same chaetaxy of abdominal tergites.

DNA barcoding (GenBank/DDBJ/EMBL accession numbers). Mitochondrial DNA *COI*: AB855647, LC200834, LC200835 (detected from holotype). Nuclear DNA *18S rRNA*: LC200872, LC200873 (detected from holotype).

Etymology. In reference to the name of Dr. Hiroshi Sakayori, a famous pseudoscorpion taxonomist of Japan.

Mundochthonius sp.

Material examined. One male from Tazawako town, Senboku city, Akita Prefecture, Tohoku region, Japan, 330 m altitude, geographic coordinates: 39°49'44"N 140°38'37"E. Collected on 23 September 2014, from A₀ layer of soil in broadleaved forest, leg. Hajime Ohira.

Remarks. This undescribed species could not be distinguished morphologically from *M. japonicus* Chamberlain, 1929, but was assigned to different genetic group from one including *M. japonicus* in the molecular phylogenetic analyses (Fig. 12; as genetic

Clade 3 in chapter 3 in this thesis). This species can be identified only by DNA barcoding, with the present condition.

DNA barcoding (GenBank/DDBJ/EMBL accession numbers). Mitochondrial DNA *COI*: LC200808. Nuclear DNA *18S rRNA*: LC200853.

Key to Japanese *Mundochthonius* species and subspecies

(Available only for adult specimen)

- 1a. No eyed.....2
- 1b. Two eyed.....3
- 2a. Elongated femur of pedipalp (length is 3.7 times long as width). Bigger (1.81 mm in total length, female).....*M. japonicus tripartitus* Morikawa, 1956
- 2b. Typical femur of pedipalp (length is 2.6 times long as width). Smaller (1.26 mm in total length, female).....*M. japonicus imadatei* Morikawa, 1956
- 3a. Cheliceral fixed finger with single-peaked teeth (Figs. 10A and 10C).....4
- 3b. Cheliceral fixed finger with two-peaked teeth (Fig. 10B).....6
- 4a. Weak knob-like teeth on ventral anterior margin of carapace (Figs. 9A and 9C)...5
- 4b. Distinct knob-like teeth with two rows on ventral anterior margin of carapace (Fig. 9E).....*M. kiyoshii* Sakayori, 2002
- 5a. Setae on abdominal tergite approximately 1.5 times as long as tergite length (Fig. 11A).....*M. longisetosus* sp. nov.
- 5b. Setae on abdominal tergite subequal to tergite length; Fig. 11C).....
.....*M. sakayorii* sp. nov.
- 6a. Knob-like spinneret absent (Fig. 10B).....*M. aizuensis* sp. nov.
- 6b. Knob-like spinneret present.....7

- 7a. Spine-like teeth on ventral anterior margin of carapace (Fig. 9D)
*M. japonicus* Chamberlin, 1929*
- 7b. Knob-like teeth on ventral anterior margin of carapace (Fig. 9F)
*M. itohi* Sakayori, 2009

*Soil-dwelling subspecies *M. j. scolytidis* Morikawa, 1954 and cryptic species *Mundochthonius* sp. (as genetic Clade 3 in the molecular phylogenetic tree) have been known within *M. japonicus*, but these cannot be distinguished from species showed in this key by the morphological characteristics.

Discussion

In the description of three new species belonging to genus *Mundochthonius* in this chapter, the quantitative characteristics are used as a basic information for species description and the qualitative characteristics as a diagnostics for individual species. This is the improved species description for classification of pseudoscorpions. The teeth on ventral anterior margin of carapace (Fig. 9) are adopted for the first time as a diagnostic characteristic for description of *Mundochthonius* species. This characteristic has not been described and illustrated in previous taxonomic studies of *Mundochthonius*. Although a row of small teeth on ventral antero-lateral margin of carapace was illustrated in the description of *M. decoui* (Fig. 1 in Dumitresco and Orghidan 1970), this seems to be a pinecone-like scales on the surface of carapace. Function of the teeth on ventral anterior margin of carapace is unknown, but this characteristic is definitely different among species. This characteristic, therefore, may be a promising character for species classification in pseudoscorpions.

Species description with the information of genotype must contribute to the future

work for pseudoscorpion taxonomy, because the information of genotype allows comparison among species and species identification through DNA barcoding. Furthermore, it is probable that many of the known pseudoscorpion are divided into more distinct species since they show potentially their high genetic diversity (Arabi *et al.* 2012). For future revision of species classification, a holotype should be the individual with most derived (apomorphic) genotype in phylogenetic tree (e.g. *M. aizuensis* sp. nov., Fig. 12). If so, when the species was to be paraphyly or polyphyly the confusion about species classification can be avoided. Species description and classification with the information of genotype are essential for the progress of pseudoscorpion taxonomy.

References

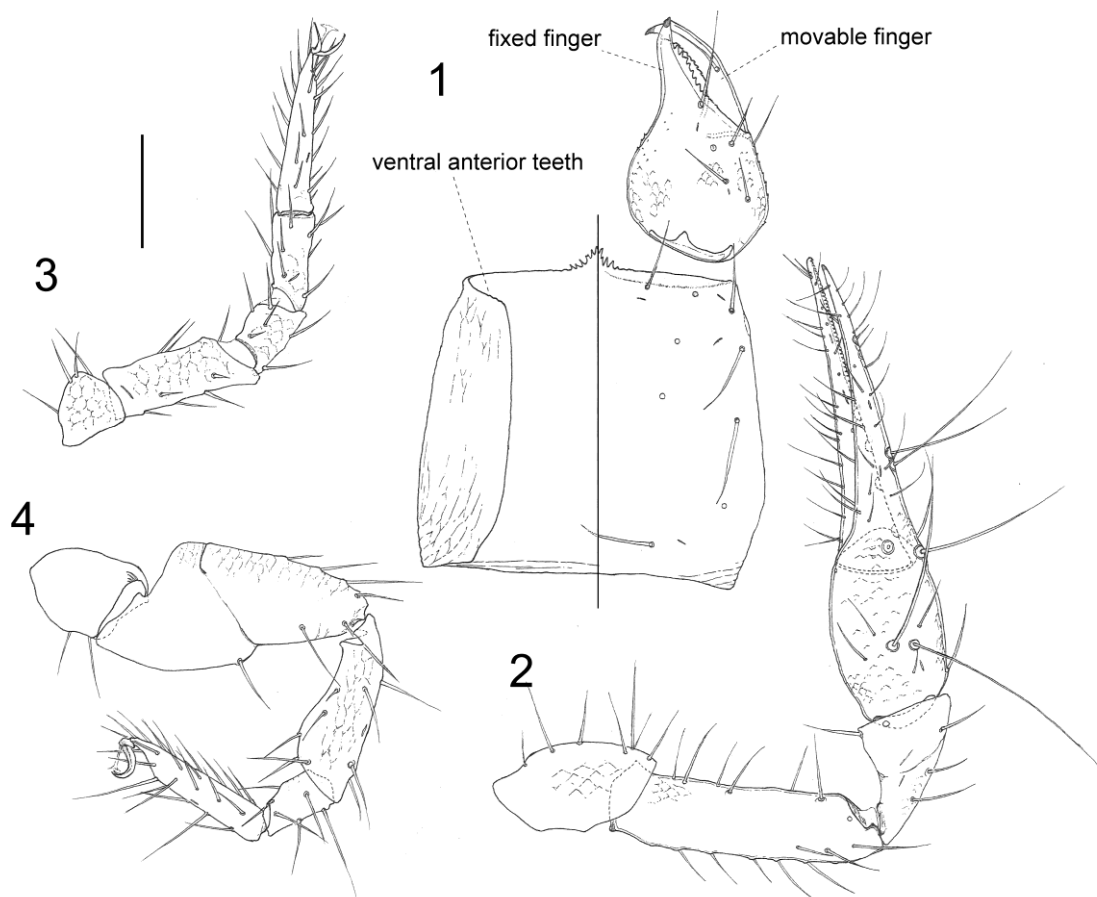
- Arabi, J., Judson, M. L., Deharveng, L., Lourenço, W. R., Cruaud, C., and Hassanin, A. (2012). Nucleotide composition of CO1 sequences in Chelicerata (Arthropoda): detecting new mitogenomic rearrangements. *Journal of Molecular Evolution* **74**, 81–95.
- Chamberlin, J. C. (1929a). A synoptic classification of the false scorpions or chela-spinners, with a report on a cosmopolitan collection of the same. Part I. The Heterosphyronida (Chthoniidae) (Arachnida-Chelonethida). *Annals and Magazine of Natural History* **4**, 50–80.
- Chamberlin, J. C. (1929b). On some false scorpions of the suborder Heterosphyronida (Arachnida-Chelonethida). *Canadian Entomologist* **61**, 152–155.
- Chamberlin, J. C. (1931). 'The arachnid order Chelonethida.' (Stanford University Press: California, US.)
- Dumitresco, M., and Orghidan, T. (1970). Contribution à la connaissance des

- Pseudoscorpions souterrains de Roumanie. *Travaux de l'Institut de Spéologie Émile Racovitza* **9**, 97–111.
- Harvey, M. S. (1992). The phylogeny and classification of the Pseudoscorpionida (Chelicerata: Arachnida). *Invertebrate Systematics* **6**, 1373–1435.
- Maehara, T., Hagiwara, Y., Ishii, K., Ito, R., Kurozumi, T., Sakayori, H., Suganami, Y., Tamura, H., Chinone, S., Nakamura, O., Naomi, S., Nunomura, N., Hagino, Y., Miyata, T., and Ishibashi, S. (2003). Soil animals from Rishiri Island, Northern Hokkaido. *Rishiri Kenkyu* **22**, 55–72. [In Japanese, with English abstract].
- Morikawa, K. (1954). Two new species of Chthoniinea from Japan. *Japanese Journal of Zoology* **11**, 329–331.
- Morikawa, K. (1956). Cave pseudoscorpions of Japan (I). *Memoirs of the Ehime University (2B)* **2**, 271–282.
- Morikawa, K. (1960). Systematic studies of Japanese pseudoscorpion. *Memoirs of the Ehime University (2B)* **4**, 85–172.
- Muchmore, W. B. (2001). An unusual new species of *Mundochthonius* from a cave in Colorado, with comments on *Mundochthonius montanus* (Pseudoscorpiones, Chthoniidae). *Journal of Arachnology* **29**, 135–140.
- Sakayori, H. (2002). Two new species of the family Chthoniidae from Kyushu, in western Japan (Arachnida: Pseudoscorpionida). *Edaphologia* **69**, 1–8.
- Sakayori, H. (2009). A new species of the genus *Mundochthonius* from Ibaraki Prefecture, central Japan (Arachnida: Pseudoscorpionida: Chthoniidae). *Bulletin of Ibaraki Nature Museum* **12**, 1–4.
- Sakayori, H. (2010). The current situation in the classification of the genus *Mundochthonius* pseudoscorpions in Japan. In 'Report of Comprehensive Surveys of

Plants, Animals and Geology in Ibaraki Prefecture by the Ibaraki Nature Museum
-Trends of Insects and Other Invertebrates in 2009-'. (Ed Ibaraki Nature Museum.)
pp. 51–52. (Ibaraki Nature Museum: Bando, Japan.) [In Japanese].

Schawaller, W. (1989). Pseudoskorpione aus der Sowjetunion, Teil 3. *Stuttgarter
Beiträge zur Naturkunde (A)* **440**, 1–30.

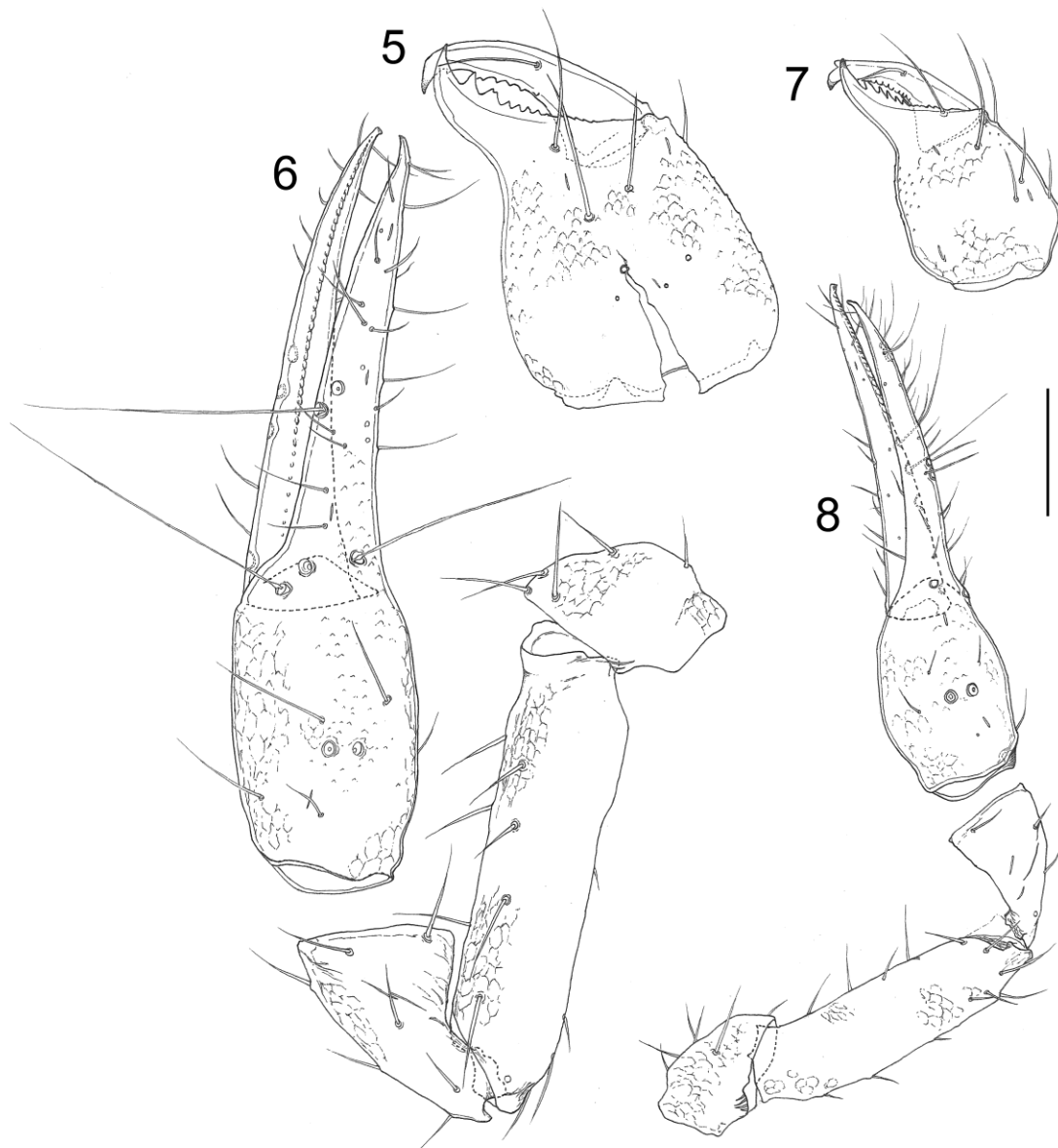
Zaragoza, J. A., and Harvey, M. S. (2006). The first record of the genus
Mundochthonius Chamberlin (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) from Spain:
Mundochthonius gallaecicus sp. nov. *Revista Ibérica de Aracnología* **12**, 17–23.



Figs. 1–4. *Mundochthonius longisetosus* sp. nov., holotype, male.

1, carapace (left, ventral view; right, dorsal view) and right chelicera; 2, right pedipalp;

3, leg I; 4, leg IV. Scale = 0.1 mm.



Figs. 5–8. *Mudochthonius aizuensis* sp. nov., holotype, male (5 and 6) and *Mudochthonius sakayorii* sp. nov., holotype, male (7 and 8).

5 and 7, right chelicerae; 6 and 8, left and right pedipalps. Scale = 0.1 mm.

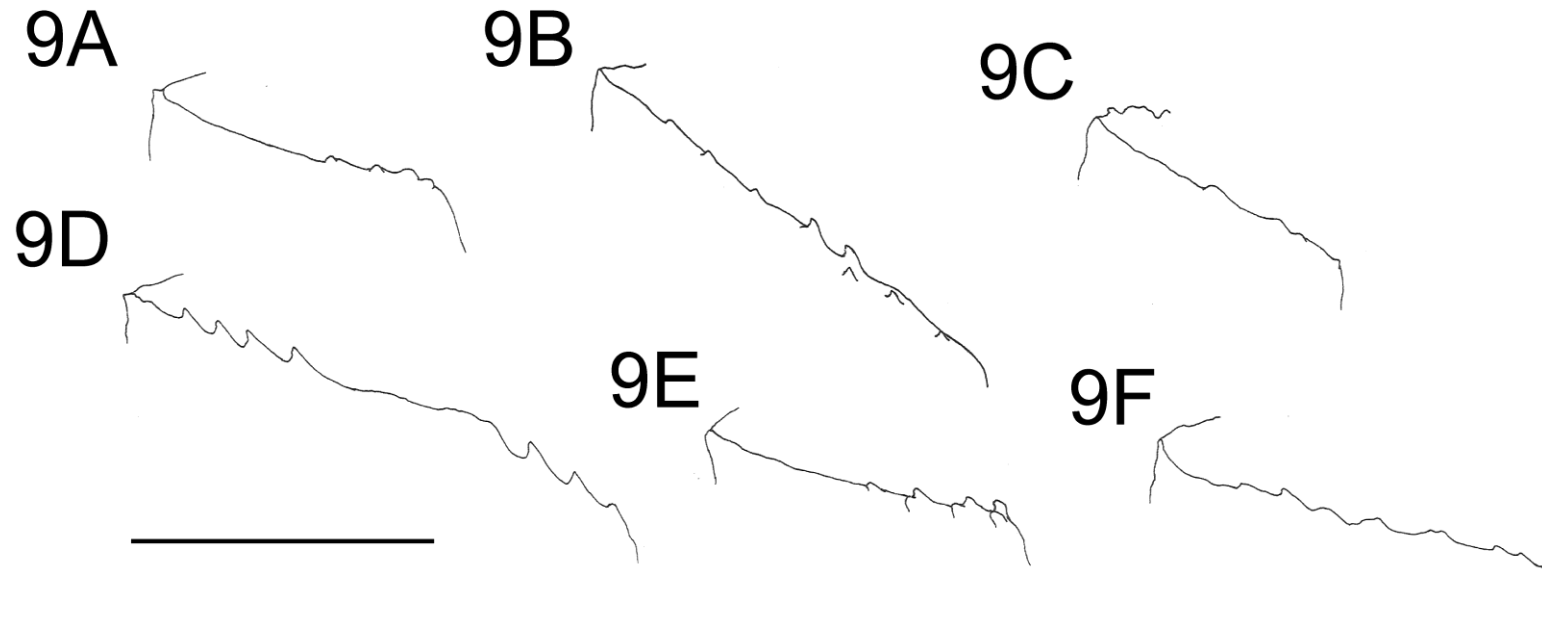


Fig. 9. Ventral anterior teeth of carapace.

A, *Mudochthonius longisetosus* sp. nov., holotype, male; B, *M. aizuensis* sp. nov., holotype, male; C, *M. sakayorii* sp. nov., holotype, male; D, *M. japonicus* Chamberlin, male, collected in the type locality (Kirishima city, Kagoshima Pref.); E, *M. kiyoshii* Sakayori, female, collected in the type locality (Nagasaki city, Nagasaki Pref.); F, *M. itohi* Sakayori, male, collected in the type locality (Hitachi-ota city, Ibaraki Pref.) . Scale = 0.05 mm.

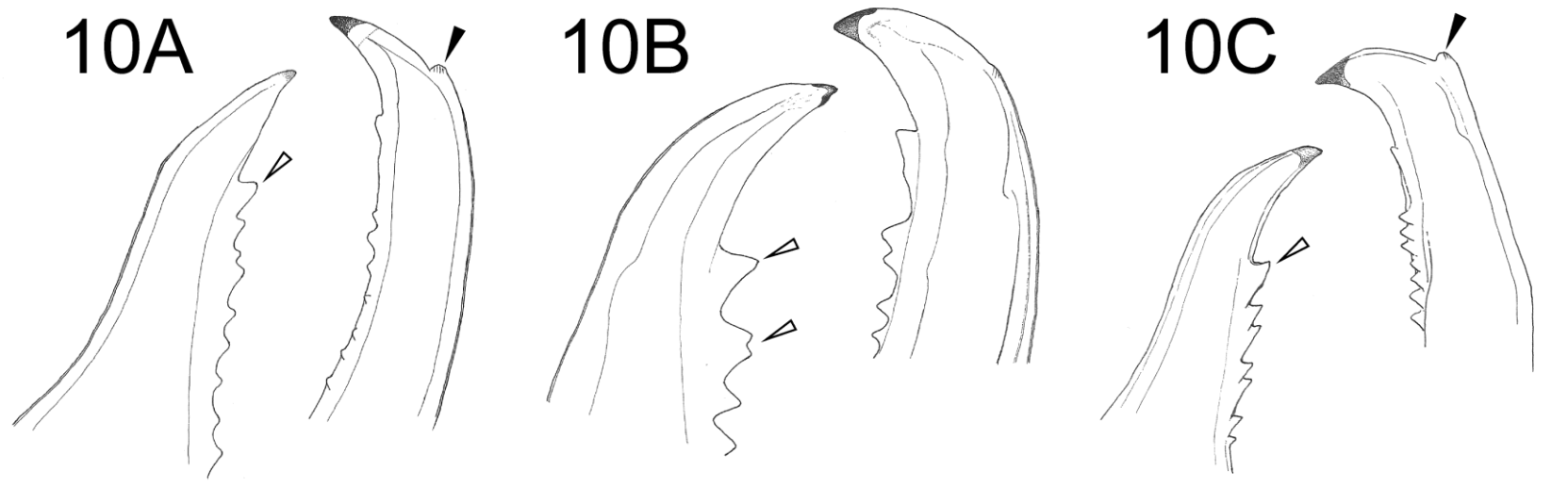


Fig. 10. Cheliceral fixed finger (left) and movable finger (right)

A, *Mundochthonius longisetosus* sp. nov.; B, *M. aizuensis* sp. nov.; C, *M. sakayorii* sp. nov. Open arrowheads indicate the higher peak of teeth. Closed arrowheads indicate the position of knob-like spinneret. Scale = 0.05 mm.

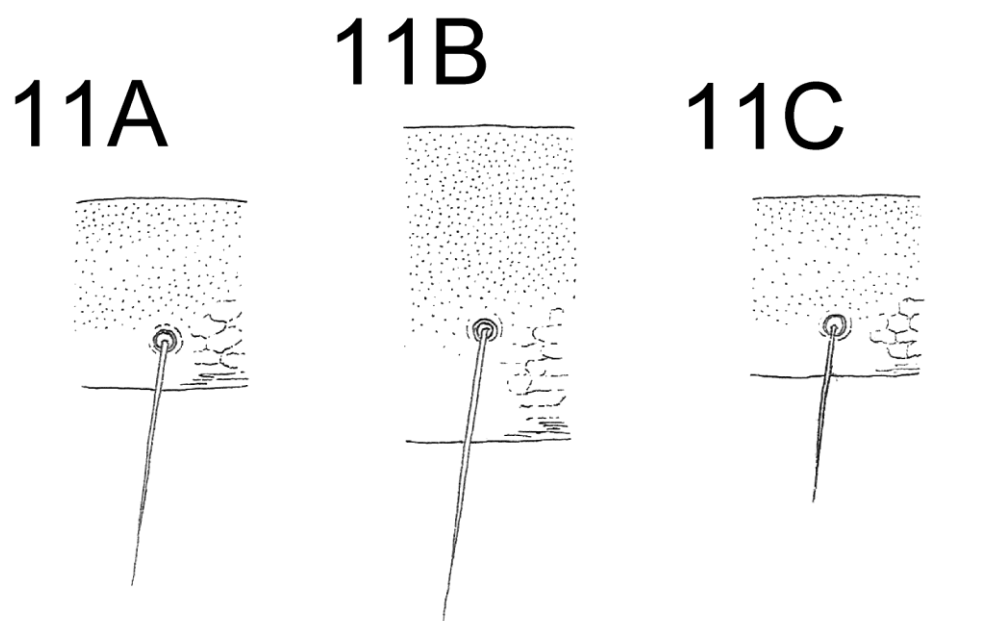


Fig. 11. The seta on the abdominal tergite VI.

A, *Mundochthonius longisetosus* sp. nov.; B, *M. aizuensis* sp. nov.; C, *M. sakayorii* sp.

nov. Scale = 0.1 mm

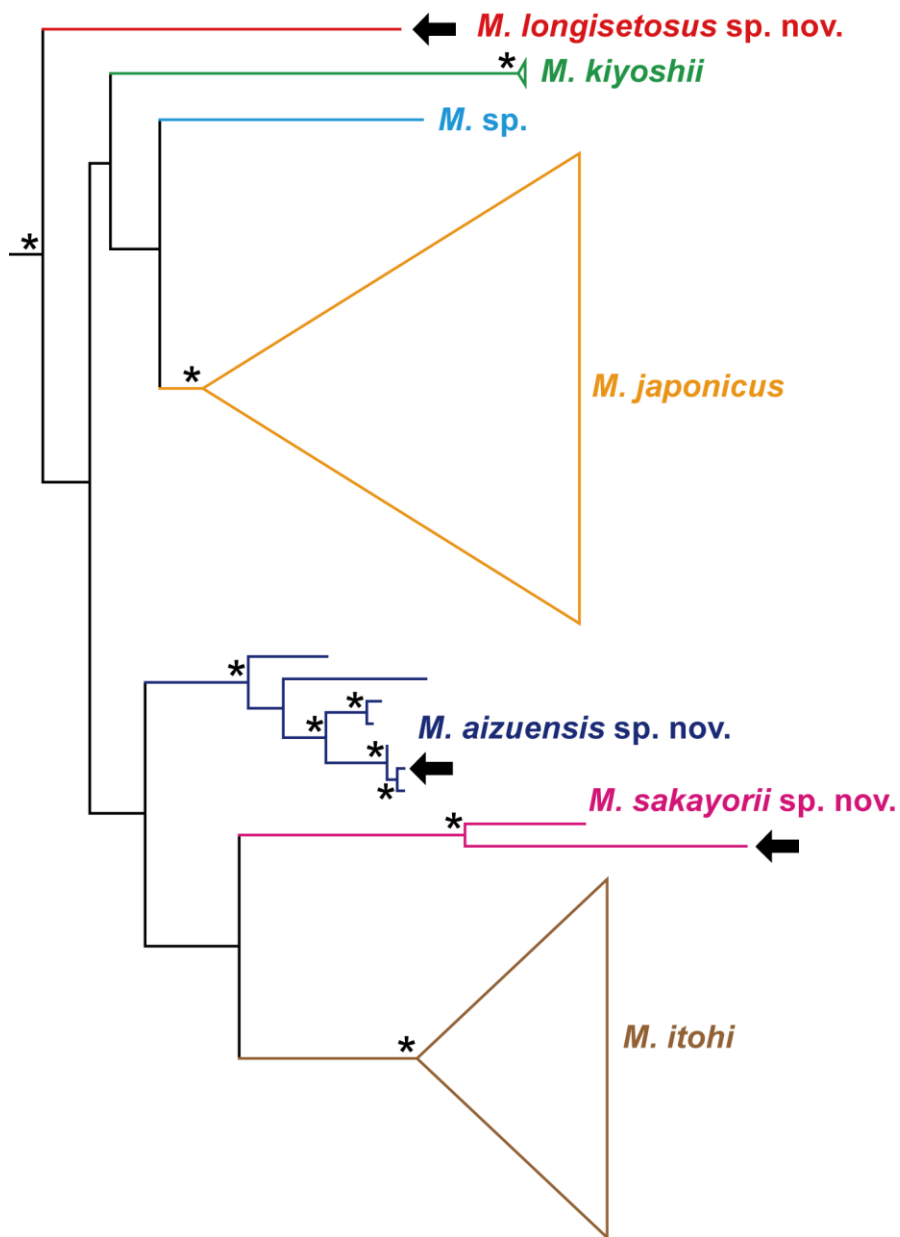


Fig. 12. Phylogenetic tree of Japanese *Mundochthonius* species.

Tree topology is based on from the result of molecular phylogenetic analysis (chapter 3 in this thesis): Phylogenetic relationship among species is not always robust and topologies within known species are omitted; asterisks are represented for node supported strongly (bootstrap value > 80% in maximum-likelihood tree and posterior probavirity >0.95 in Baysian tree). The arrows are shown a phylogenetic position of the genotype detected from holotype of each new species.

Table 1. Measurement (mm) of morphological characteristics and pedipalpal femur length: width ratio of three *Mundochthonus* species

Measurements are indicated as "length min. - max. / width min. - max." for female paratypes.

	<i>M. longisetosus</i> sp. nov.		<i>M. aizuensis</i> sp. nov.		<i>M. sakayorii</i> sp. nov.	
	♂ Holotype	♀ Paratypes (N=3)	♂ Holotype	♀ Paratypes (N=3)	♂ Holotype	♀ Paratypes (N=3)
Body length	0.875	0.925-1.000	1.310	1.325-1.360	0.760	0.865-0.935
Carapace	0.305/0.310	0.325-0.350/0.305-0.335	0.410/0.395	0.425-0.465/0.415-0.460	0.300/0.260	0.295-0.305/0.255-0.275
Chelicera						
Chela	0.205/0.130	0.215-0.235/0.140-0.160	0.295/0.195	0.315-0.355/0.220-0.240	0.205/0.120	0.210-0.220/0.125-0.140
Movable finger	0.130	0.140-0.145	0.175	0.185-0.200	0.115	0.130-0.135
Pedipalp						
Trochanter	0.130/0.090	0.110-0.135/0.085-0.090	0.175/0.100	0.190-0.220/0.115-0.150	0.125/0.080	0.125-0.130/0.075
Femur	0.248/0.065	0.235-0.250/0.070-0.073	0.380/0.095	0.390-0.435/0.100-0.118	0.245/0.063	0.245-0.250/0.065-0.068
Femur ratio	3.81	3.25-3.50	4.00	3.71-3.90	3.89	3.68-3.84
Patella	0.140/0.090	0.145-0.150/0.090-0.095	0.205/0.125	0.205-0.250/0.135-0.155	0.145/0.085	0.145-0.150/0.085-0.090
Hand	0.145/0.095	0.155/0.100-0.110	0.220/0.140	0.240-0.270/0.160-0.235	0.135/0.095	0.145-0.150/0.100-0.105
Movable finger	0.280	0.275-0.285	0.385	0.400-0.445	0.275	0.225-0.260
Leg I						
Trochanter	0.085/0.060	0.075-0.085/0.065-0.070	0.110/0.080	0.115-0.130/0.095-0.105	0.070/0.055	0.075-0.075/0.055-0.060
Basifemur	0.120/0.040	0.130-0.140/0.045-0.050	0.210/0.055	0.205-0.245/0.060-0.070	0.125/0.090	0.125-0.135/0.040
Telofemur	0.070/0.040	0.075-0.080/0.045-0.045	0.110/0.065	0.110-0.130/0.060-0.065	0.065/0.035	0.065-0.070/0.040-0.045
Patella	0.090/0.035	0.075-0.095/0.035-0.040	0.125/0.045	0.130-0.150/0.045-0.050	0.075/0.030	0.080-0.085/0.030-0.035
Tarsus	0.150/0.030	0.140-0.160/0.025-0.030	0.225/0.040	0.230-0.260/0.040-0.045	0.135/0.025	0.145-0.150/0.025-0.030
Leg IV						
Trochanter	0.105/0.075	0.095-0.110/0.075-0.090	0.150/0.105	0.145-0.155/0.115-0.125	0.095/0.065	0.090-0.100/0.065-0.075
Femoropatella	0.250/0.120	0.235-0.255/0.095-0.120	0.355/0.160	0.365-0.420/0.175-0.190	0.190/0.075	0.215-0.225/0.095-0.100
Tibia	0.165/0.060	0.170-0.175/0.055-0.060	0.250/0.075	0.260-0.300/0.075-0.090	0.125/0.045	0.155-0.160/0.045-0.050
Basitarsus	0.075/0.045	0.075-0.080/0.040-0.045	0.110/0.055	0.110-0.140/0.055-0.060	0.060/0.030	0.090-0.105/0.035-0.035
Telotarsus	0.135/0.030	0.130-0.150/0.030-0.035	0.205/0.040	0.220-0.250/0.040-0.050	0.130/0.025	0.135-0.145/0.025-0.030

第6章

総合考察

General discussion

なぜ量的形態形質が偏重され、質的形態形質が見落とされてきたのか？

伝統的なカニムシ類の種分類と、本研究で実践した現代的な動物分類学研究の手法を取り入れた種分類との間において、最も大きく異なる点は、量的形態形質と質的形態形質の扱いである。なぜ伝統的なカニムシ類の種分類においては、量的形態形質が偏重され、質的形態形質は見落とされてきたのだろうか？ これは (1) カニムシ類の種間における形態的な分化が小さいことに加え、(2) 少数の標本に基づいた検討によって量的形態形質の非連続的な変異が検出されたことが原因であると考えられる。

まず (1) カニムシ類の種間における形態的な分化が小さいことは、種分化における遺伝的な分化と表現型の分化（ここでは形態的分化）の関係から説明可能である。Winker (2009) によれば、遺伝的分化—形態的分化の種分化過程の空間的分布（図 1）に基づいて考えると、動物の種分化の経路はふたつに大別される。通常、種分化は遺伝的分化—形態的分化が緊密に連結して生じることはないため（図 1 の A 経路）、種分化のふたつの経路とは、遺伝的分化に対して形態的分化が顕著な場合（図 1 の B 経路）、もしくは形態的分化に対して遺伝的分化が大きい場合（図 1 の C 経路）である。前者は、種分化が環境の淘汰圧によってより強く支配され、後者は地理的構造による長期間の隔離等の中立的な選択による影響（遺伝的浮動）をより強く受けている分類群で生じるとされる

（Winker 2009）。Winker (2009) の理論に従えば、カニムシ類の近縁種間における形態的分化は必ずしも顕著に生じていないと予想される；図 1 の C 経路の種分化が生じているかもしれない。カニムシ類の潜在的多様性が高いことは、本研究の第 3 章のみならず、多くの研究によって明らかにされている（Wilcox *et al.* 1997; Zeh *et al.* 2003; Arabi *et al.* 2012; Heerden *et al.* 2013; Harrison *et al.* 2014; Cosgrove *et al.* 2016; Harms 2018 in press）。これは、多くカニムシ類が土壌や洞穴

といった特定の生息環境に強く依存し、かつ自力による分散力が弱いため、集団が容易に隔離される結果、遺伝的浮動の影響を強く受けた（受けている）ことに起因すると考えられている（Harrison *et al.* 2014; Cosgrove *et al.* 2016; Harvey *et al.* 2016; Harms 2018 in press). また Muster *et al.* (2004) は、*Ephippiochthonius* 属（当時は *Chthonius* 属の亜属）の2種 *E. boldorii* と *E. fuscimanus* の量的形態形質が種間で大きく重複している、即ち、種間の形態的な差異が小さいことを認めている。彼は洞穴性 *Nesticus* 属クモ類の研究における「現在の形態学的系譜としての種は、進化学的あるいは系統学的な基本単位よりもより包括的である（Hedin 1997）」という指摘が、カニムシ類にもよく当てはまると述べている（Muster *et al.* 2004）。これらのことは、カニムシ類の種分化の過程が、Winker (2009) の理論における C 経路（図 1）とよく一致することを示唆する。

カニムシ類の種間における形態的分化は小さいと予想されるが、これまでの種分類では (2) 少数の標本に基づいた検討によって量的形態形質の非連続的な変異が検出されてきた。多くのカニムシ種は、ごく限られた標本に基づいて記載されており、研究初期にはわずか 1 標本のみに基づいて記載された種も少なくない (e.g. Chamberlin 1929a, 1929b, 1930; Beier 1932a, 1932c)。標本数が限定されていたのは、カニムシ類の生息密度が必ずしも高くないこと (e.g. Deleporte and Tillier 1999; Menta 2012) に起因すると考えられる。限られた標本しか検討できない状況下で、カニムシ分類学者は量的形態形質の「疑似的な」非連続性を種の識別形質として認め、種を記載してきたのだろう。この「疑似的な」種の識別形質は、カニムシ分類学者の分類学的直観 taxonomic instinct (Stevens 1990) に対する客観性を担保するために利用され続けたことによって、種間で異なる質的形態形質の発見における障害となってしまった可能性さえある。

Muster *et al.* (2004) は、カニムシ類の種を形態形質によって識別することに

は限界があると指摘したが、決してまだ限界に達したわけではない。最近では、Muster *et al.* (2004) が検討した *E. fuscimanus* に近縁な新種が記載されており (Gardini 2013; Zaragoza 2017), 種間の識別に有用な質的形態形質はこれからも見つかると思われる。特に、本研究で実践した現代的なカニムシ類の種分類は、遺伝的グループの認識によって分類学的直観を可能な限り排除し、その分類に「疑似的ではない」客観性を与えることができる。また、基準標本の遺伝子型をより派生的な位置に置くことによって種の過度な細分または包括を避け (第5章参照), 分類学者や分類群間の taxonomic bias が解消されたリーズナブルな分類体系の構築が導かれるだろう。

カニムシ類の「亜種」

遺伝的分化に対して形態的分化が顕著であるときには、種内分類群である「亜種」(動物の亜種, 植物等は含まない) を容易に検出することができる (Winker 2009)。Patten (2015) は、Winker (2009) の理論に基づいて、亜種の基準を提案している: 系統学的種概念あるいは進化学的種概念の下で、表現型によって明確に診断可能で、地理的にも隔離されているが、明確な遺伝的クラスターを形成しないあるいは他の集団から単系統的に分離されない集団を亜種とする。即ち、これは「種は形態的にも遺伝的にも明確に識別可能な集団」であり、「亜種は形態的には識別できるが遺伝的には明確に識別できない集団」とする基準である。実際に、昆虫類のカミキリムシ (Wallin *et al.* 2017) や哺乳類のサル (Serrano-Villavicencio *et al.* 2017) では、この基準に従って亜種とする立場を採った研究もある。

カニムシ類の場合は近縁種間における形態的分化できえ必ずしも顕著に生じ

ていないことが予想されるため、亜種を検出することは困難であるだろう。現在までに少数のカニムシ類の亜種が知られているが、それらのほとんどは Max Beier 博士（1903–1978）と森川國康博士（1919–2009）によって記載されたものである（Harvey 2013）。Max Beier 博士はオーストリアのカニムシ分類学者であり、世界でも最も多くのカニムシ種を記載した人物である（Harvey 2007）。森川國康博士は日本のカニムシ分類学の権威であると共に、日本の土壌動物学の先駆者としても著名である（鶴崎 2009）。両博士は、カニムシ分類学の基礎を築いた偉大な分類学者であるが、彼らの分類学的研究における「亜種」と「種」を分ける基準は判然としていなかった。例えば、Beier 博士は、触肢腿節表面の粗滑に基づいて *Paratemnus* 属（現在は *Paratemnoides* 属）の数種を記載しているが（Beier 1932b）、後年には同じ形質に基づいて *Microcreagris* 属の種をいくつかの亜種に細分している（Beier 1959）。現在では、それらの *Microcreagris* 属の亜種分類は再検討され、別属（*Roncocreagris* 属または *Occitanobisium* 属）の独立種に格上げされている（Judson 1992; Zaragoza 2008）。森川博士は、初期の研究で記載した種を、後に自らの手で別の種の亜種に格下げしている（Morikawa 1960）。本研究の材料としても用いられた *Mundochthonius japonicus scolytidis* Morikawa, 1954 は、独立種 *M. scolytidis* として記載された後（Morikawa 1954）、一旦は *M. japonicus* のシノニムにされたが（ここでは亜種として扱っていない、Morikawa 1955）、最終的に *M. japonicus* の亜種にされた（Morikawa 1960）。*Mundochthonius scolytidis* がシノニム化された根拠は、眼の形態的な変異が大きいためであるとされる（詳細は不明；Morikawa 1955）。洞穴性の無眼種として記載された *M. imadatei* と *M. tripartitus* も、同様に独立種から格下げされ、*M. japonicus* の亜種として扱われている（Morikawa 1956, 1960）。しかしながら、基本的に「眼の有無」は、それだけで別種の根拠と成り得る形態形質である（Zaragoza and Harvey

2006; Harms and Harvey 2013; Harrison *et al.* 2014). このような種と亜種における分類学的変遷を考慮すると, Beier 博士と森川博士によって記載された「亜種」は, 実際には伝統的なカニムシ類の種分類における「種」に相当し得るものと考えられる. しかしながら, 分類学的な検討は行われたが, 未だに亜種に置かれている分類群も存在している (例えば *Dactylochelifera latreillii latreillii* (Leach, 1817) と *D. l. septentrionalis* Beier, 1932 ; Van den Tooren 2005). 少なくとも現在記載されているカニムシ類の亜種は, 最近の研究と同様に (e.g. Judson 1992; Zaragoza 2008; Harvey 2014; Nassirkhani and Shoushtari 2014), 独立種として分類階級を変更するか, シノニム化の分類学的措置をとるべきであろう.

カニムシ類の「種」

種は遺伝子や細胞等と同様に, 生物学上の重要な基本単位のひとつである (cf. De Queiroz 2005). 今日までの種の記載分類は, 形態的特徴の類似性に基づいて種を定義する「類型学的種概念 Typological Species Concept」(Mayr and Ashlock 1991) あるいは「形態学的種概念 Morphological Species Concept」(Cronquist 1978; Shull 1923) によって支えられてきた. 今日における種という単位は, 必ずしも形態的特徴のみによって定義されるものではなく, 20 を超える様々な種概念が定義されている (see Mayden 1997; Harrison 1998). 西海 (2012) によれば, 現代的な種概念は, 「生物学的種概念 Biological Species Concept」(Mayer 1942) に代表される「不可逆性」を重視する概念と, 「系統学的種概念 Phylogenetic Species Concept」(Cracraft 1983; Rosen 1979) に代表される「識別可能性 (あるいは単系統性)」を重視する概念に大別される.

伝統的なカニムシ類の分類における種は, 専ら「識別可能性」によって認識されてきた. 特に量的形態形質によって記載されてきたため, 量的差異による

クラスターの形成を定義特性とした「表形学的種概念 Phenetic Species Concept (Sokal and Crovello 1970)」に基づいて種が定義されてきたと言える。一方で、生物学的種概念の定義特性である「交雑可能性」は、カニムシ類において検証することが難しい。カニムシ類は体サイズが小さく、土壌中や洞穴といった環境に生息しているため、直接的な観察は容易でない。さらに、カニムシ類の生殖行為は、精胞の受け渡しのみであり、交尾をしない (Weygoldt 1969)。そのため、生殖域の形態が近縁種間でほとんど変わらず、形態的特徴に基づいて交雑可能性を推察することも難しい。従って、体サイズや特定の部位の比率のような生殖とは関連がない（と思われる）形態形質によって、種を認識する必要があった。

本研究の結果を総括すると、現代的な動物分類学研究の手法を取り入れたカニムシ類の種分類（現代的なカニムシ類の種分類）において、種は「ミトコンドリア DNA および核 DNA の中立の分子マーカーを用いて遺伝的グループとして認識でき、その遺伝的グループが量的形態形質ではなく質的形態形質によって明確に識別されるもの」と見なされる。このカニムシ「種」は「識別可能性（または単系統性）」をより重視しており、伝統的なカニムシ類の種分類における「表形学的種概念」ではなく、質的形態形質に基づく共有派生形質ならびに分子系統樹における排他的合着を定義特性とする「単系統重視型の系統学的種概念」(Rosen 1979) や、固定した質的形質による識別可能なグループの形成を定義特性とする「識別可能性重視型の系統学的種概念」(Cracraft 1983)、独自の進化的歴史を有することを定義特性とする「進化学的種概念 (Grismer 1999)」、形態的にあるいは遺伝的に区別できる独立したクラスターの形成を定義特性とした「遺伝子型クラスター概念 (Mallet 1995)」等で定義される。

この現代的なカニムシ類の種分類は、ミトコンドリア DNA と核 DNA の分子

マーカーを併用することによって、種が「独自の進化的歴史をもった異なる系統学的系譜であること」を堅牢に示すことを可能にしている。ミトコンドリア DNA の *COI* 遺伝子の 5'-末端側 648 bp は、動物における標準的なバーコード領域として採用されている (Folmer 1994; Avise 2004; Hebert *et al.* 2003)。カニムシ類を含む鋏角亜門の *COI* 配列組成から高次系統を検討した研究例もあり (Arabi *et al.* 2012), 優先的に解析すべき領域であることは間違いない。その一方で、ミトコンドリア DNA は、雌の分散性が低い分類群において地理的集団レベルの構造を潜在的に反映し易いことが知られている (De Queiroz 2007; Satler *et al.* 2013)。また、ミトコンドリア DNA は母系遺伝するため、過去の交雑による別種のミトコンドリアゲノムの完全な移行 (ミトコンドリア捕獲 mitochondrial capture) や、不完全な系統ソーティング incomplete lineage sorting とそれによるヘミプラシー hemiplasy (Avise and Robinson 2008) が生じていることがある (e.g. Leaché *et al.* 2009; Funk *et al.* 2012; Alström *et al.* 2013)。従って、各種の進化あるいは種分化の歴史的歴史を把握するためには、ミトコンドリア DNA の解析だけではなく、核 DNA の分子マーカーによる解析が必要である。実際に、本研究の第 3 章では、*M. japonics* と *M. itohi* が同所分布する地点が検出されたが、両種のミトコンドリア DNA と核 DNA の系統間に不一致がないことを確認している。このことは、両種が独自の進化的歴史をもった全く異なる系統学的系譜であることをより強く示唆する証拠であると言える。

現代的なカニムシ類の種分類による他分野への貢献

種分類の不確実性は、生物学および生態学を含む他分野の発展や知見の蓄積における大きな障害のひとつである (May 1990; Mace 2004; de Queiroz 2005; Tobias *et al.* 2010)。現代的なカニムシ類の種分類は、これらの研究分野の発展に

貢献するだろう。例えば、第5章の *Mundochthonius* 属の新種記載で提案した新規の診断形質は、生態学的な知見の提供に貢献するかもしれない。鋏角内歯形状の類型や感覚毛の長短は、異なる生態学的ニッチに対する適応の可能性がある。ツチカニムシ科やコケカニムシ科は餌を捕らえる際に、触肢よりも鋏角を利用することが多いため (Weygoldt 1969), 鋏角内歯の形状の差異は利用する餌資源に対応するかもしれない。カニムシ類は様々な無脊椎動物類を捕食対象としているが (Gilbert 1951; Weygoldt 1969; Jones 1975; Durden 1987; de Andrade and Gnaspini 2002; Tizo-Pedroso and Del-Claro 2007), 特定の餌資源を利用する分類群の存在も示唆されている (Turk 1952; Cole *et al.* 1994; Pollierer *et al.* 2009)。また、感覚毛の長短は、生息環境や捕食圧と関連しているかもしれない。実際に、洞穴性種の付属肢や感覚毛は、地表性種に比べて長大になる傾向がある (e.g. Harms and Harvey 2013)。

また現代的なカニムシ類の種分類は、それぞれのカニムシ種が担う捕食者としての生態系機能や資源としての利用価値の解明の一助にもなり得る。一般に捕食者の生態学的機能は、病虫害の防除に関わる農業生態系の基盤サービスを提供することである (Brussaard 2012)。捕食者の減少に伴って病虫害による被害が増大すると、梨や林檎の果樹農家において1ヘクタールあたりおよそ 89–2187ユーロ (11,837–290,871円, 2018年2月10日現在1ユーロ133円で換算) の経済的損害が生じるという試算がある (Daniels *et al.* 2017)。病虫害の天敵としてのカニムシ類は、特に蜂群崩壊症候群 (Colony Collapse Disorder; CCD) の原因のひとつであるミツバチヘギイタダニ *Varroa destructor* によるミツバチへの外部寄生と病原ウィルスの媒介 (Oldroyd 2007; vanEngelsdorp *et al.* 2010; 中村 2015; 芳山 2010) を抑制する生物農薬として有望視されている (e.g. Rosenkranz *et al.* 2010; Fagan *et al.* 2012; Read *et al.* 2012, 2014; van Toor *et al.* 2015)。しかしな

がら、土壌生態系におけるカニムシ類の位置付けはまだ完全には解明されておらず (Pollierer *et al.* 2009; Huang *et al.* 2012), ハチ類の巣に生息するカニムシ類の調査, 研究も充分ではない (Gonzalez *et al.* 2007). 分類学的な整理や DNA バーコーディングによって種同定が容易になることで, カニムシ類の生態系機能やサービスの解明が進むだろう. また生態系機能やサービスの解明に伴うカニムシ類への社会的関心の向上は, カニムシ類を含むクモガタ類全般の問題として指摘されている生物多様性研究や保全に対する負の分類学的バイアス (Troudet *et al.* 2017) の解消に繋がることが期待される.

引用文献

- Alström, P., Barnes, K. N., Olsson, U., Barker, F. K., Bloomer, P., Khan, A. A., Qureshi, M. A., Guillaumet, A., Crochet, P.-A., and Ryan, P. G. (2013). Multilocus phylogeny of the avian family Alaudidae (larks) reveals complex morphological evolution, non-monophyletic genera and hidden species diversity. *Molecular phylogenetics and evolution* **69**, 1043–1056.
- Avise, J. C. (2004). 'Molecular Markers, Natural History, and Evolution.' (Sinauer Associates Inc.: Sunderland, Massachusetts, US.)
- Avise, J. C., and Robinson, T. J. (2008). Hemiplasy: a new term in the lexicon of phylogenetics. *Systematic Biology* **57**, 503–507.
- Arabi, J., Judson, M. L., Deharveng, L., Lourenço, W. R., Cruaud, C., and Hassanin, A. (2012). Nucleotide composition of CO1 sequences in Chelicerata (Arthropoda): detecting new mitogenomic rearrangements. *Journal of Molecular Evolution* **74**, 81–95.
- Beier, M. (1932a). Pseudoscorpionidea I. Subord. Chthoniinea et Neobisiinea. *Tierreich*

57, i–xx, 1–258.

Beier, M. (1932b). Revision der Atemnidae (Pseudoscorpionidea). *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere* **62**, 547–610.

Beier, M. (1932c). Pseudoscorpionidea II. Subord. C. Cheliferinea. *Tierreich* **58**, i–xxi, 1–294.

Beier, M. (1959). Ergänzungen zur iberischen Pseudoscorpioniden-Fauna. *Eos* **35**, 113–131.

Brussaard, L. (2012). Ecosystem services provided by the soil biota. In 'Soil and Ecology and Ecosystems Services'. (Eds D. H. Wall, R. D. Bardgett, V. Behan-Pelletier, J. E. Herrick, T. H. Jones, K. Ritz, J. Six, D. R. Strong and W. H. van der Putten.) pp.45–48. (Oxford University Press, Oxford, UK.)

Chamberlin, J. C. (1929a). A synoptic classification of the false scorpions or chela-spinners, with a report on a cosmopolitan collection of the same. Part I. The Heterosphyronida (Chthoniidae) (Arachnida-Chelonethida). *Annals and Magazine of Natural History* **4**, 50-80.

Chamberlin, J. C. (1929b). On some false scorpions of the suborder Heterosphyronida (Arachnida-Chelonethida). *Canadian Entomologist* **61**, 152–155.

Chamberlin, J. C. (1930). A synoptic classification of the false scorpions or chela-spinners, with a report on a cosmopolitan collection of the same. Part II. The Diplosphyronida (Arachnida-Chelonethida). *Annals and Magazine of Natural History* **5**, 1–48, 585–620.

Cole, D. C., Elgar, M. A., and Harvey, M. S. (1994). Associations between Australian pseudoscorpions and ants. *Psyche* **101**, 221–228.

- Cosgrove, J. G., Agnarsson, I., Harvey, M. S., and Binford, G. J. (2016). Pseudoscorpion diversity and distribution in the West Indies: sequence data confirm single island endemism for some clades, but not others. *Journal of Arachnology* **44**, 257–271.
- Cronquist, A. (1978). Once again, what is a species? In 'Biosystematics in Agriculture'. (Ed J. A. Ramberger.) pp. 3–20. (Allanheld and Osmun: Montclair, New Jersey, US.)
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* **1**, 159–187.
- Daniels, S., Witters, N., Beliën, T., Vrancken, K., Vangronsveld, J., and Van Passel, S. (2017). Monetary valuation of natural predators for biological pest control in pear production. *Ecological Economics* **134**, 160–173.
- De Andrade, R., and Gnaschini, P. (2002). Feeding in *Maxcheres iporangae* (Pseudoscorpiones, Chernetidae) in captivity. *Journal of Arachnology* **30**, 613–617.
- Deleporte, S., and Tillier, P. (1999). Long-term effects of mineral amendments on soil fauna and humus in an acid beech forest floor. *Forest Ecology and Management* **118**, 245–252.
- De Queiroz, K. (2005). Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 6600–6607.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* **56**, 879–886.
- Durden, L. A. (1987). Predator-prey interactions between ectoparasites. *Parasitology Today* **3**, 306–308.

- Fagan, L. L., Nelson, W. R., Meenken, E. D., Howlett, B. G., Walker, M. K., and Donovan, B. J. (2012). Varroa management in small bites. *Journal of Applied Entomology* **136**, 473–475.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and 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.
- Funk, W. C., Caminer, M., and Ron, S. R. (2012). High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**, 1806–1814.
- Gardini, G. (2013) A revision of the species of the pseudoscorpion subgenus *Chthonius* (*Ephippiochthonius*) (Arachnida, Pseudoscorpiones, Chthoniidae) from Italy and neighbouring areas. *Zootaxa* **3655**, 1–151.
- Gilbert, O. (1951). Observations on the feeding of some British false scorpions. *Proceedings of the Zoological Society of London* **121**, 547–555.
- Gonzalez, V. H., Mantilla, B., and Mahnert, V. (2007). A new host record for *Dasychernes inquilinus* (Arachnida, Pseudoscorpiones, Chernetidae), with an overview of pseudoscorpion-bee relationships. *Journal of Arachnology* **35**, 470–474.
- Grismer, L. L. (1999). An evolutionary classification of reptiles on islands in the Gulf of California, México. *Herpetologica* **55**, 446–469.
- Harms, D. (2018). The origins of diversity in ancient landscapes: deep phylogeographic structuring in a pseudoscorpion (Pseudotyranochthoniidae: Pseudotyranochthonius) reflects Plio-Pleistocene climate fluctuations. *Zoologischer Anzeiger*. (in press).

- Harms, D., and Harvey, M. S. (2013). Review of the cave-dwelling species of *Pseudotyranochthonius* Beier (Arachnida: Pseudoscorpiones: Pseudotyranochthoniidae) from mainland Australia, with description of two troglobitic species. *Austral Entomology* **52**, 129–143.
- Harrison, R. G. (1998). Linking evolutionary pattern and process: the relevance of species concepts for the study of speciation. In 'Endless Forms: Species and Speciation'. (Eds D. J. Howard, and S. H. Berlocher.) pp. 19–31. (Oxford University Press: New York, US.)
- Harrison, S. E., Guzik, M. T., Harvey, M. S., and Austin, A. D. (2014). Molecular phylogenetic analysis of Western Australian troglobitic chthoniid pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) points to multiple independent subterranean clades. *Invertebrate Systematics* **28**, 386–400.
- Harvey, M. S. (2007). The smaller arachnid orders: diversity, descriptions and distributions from Linnaeus to the present (1758–2007). *Zootaxa* **1668**, 363–380.
- Harvey, M. S. (2013). 'Pseudoscorpions of the World, Version 3.0.' Western Australian Museum, Perth. Available at <http://www.museum.wa.gov.au/catalogues/pseudoscorpions>. [Accessed 20 January 2018.]
- Harvey, M. S. (2014). A review and redescription of the cosmopolitan pseudoscorpion *Chelifer cancroides* (Pseudoscorpiones: Cheliferidae). *Journal of Arachnology* **42**, 86–104.
- Harvey, M. S., Abrams, K. M., Beavis, A. S., Hillyer, M. J., and Huey, J. A. (2016). Pseudoscorpions of the family Feaellidae (Pseudoscorpiones: Fealloidea) from the Pilbara region of Western Australia show extreme short-range endemism.

- Invertebrate Systematics* **30**, 491–508.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., and de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**, S96–S99.
- Hedin, M. C. (1997). Molecular phylogenetics at the population/species interface in cave spiders of the southern Appalachians (Araneae: Nesticidae: Nesticus). *Molecular Biology and Evolution* **14**, 309–324.
- Heerden, J. V., Taylor, P. J., and Heerden, C. V. (2013). Genetic differentiation in *Horus* Chamberlin (Arachnida: Pseudoscorpiones: Olpiidae) as indicated by mitochondrial DNA analysis. *African Zoology* **48**, 351–358.
- Huang, C. Y., Tully, K. L., Clark, D. A., Oberbauer, S. F., and McGlynn, T. P. (2012). The $\delta^{15}\text{N}$ signature of the detrital food web tracks a landscape-scale soil phosphorus gradient in a Costa Rican lowland tropical rain forest. *Journal of Tropical Ecology* **28**, 395–403.
- Jones, P. E. (1975). Notes on the predators and prey of British pseudoscorpions. *Bulletin of the British Arachnological Society* **3**, 104–105.
- Judson, M. L. (1992). *Roncocreagris murphyorum* n. sp. and *Occitanobisium nanum* (Beier) n. comb.(Neobisiidae) from Iberia, with notes on the sternal glands of pseudoscorpions (Chelonethi). *British Arachnological Society* **9**, 26–30.
- Leaché, A. D., Koo, M. S., Spencer, C. L., Papenfuss, T. J., Fisher, R. N., and McGuire, J. A. (2009). Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 12418–12423.

- Mace, G. M. (2004). The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **359**, 711–719.
- Mallet, J. (1995). A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology and Evolution* **10**, 294–299.
- May, R. M. (1990). Taxonomy as destiny. *Nature* **347**, 129–130.
- Mayden, R. L. (1997). A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In 'Species: The units of Biodiversity'. (Eds M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson.) pp. 381–424 (Chapman and Hall: London, UK.)
- Mayr, E. (1942). 'Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist.' (Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, US.)
- Mayr, E., and Ashlock, P. D. (1991). 'Principles of Systematic Zoology (2nd Edition).' (McGraw-Hill: New York, US.)
- Menta, C. (2012). Soil fauna diversity -function, soil degradation, biological indices, soil restoration. In 'Biodiversity Conservation and Utilization in a Diverse World'. (Ed G. A. Lameed.) InTech. DOI: 10.5772/51091. Available at <https://www.intechopen.com/books/biodiversity-conservation-and-utilization-in-a-diverse-world/soil-fauna-diversity-function-soil-degradation-biological-indices-soil-restoration>. [Accessed 12 February 2018.]
- Morikawa, K. (1954). Two new species of Chthoniinea from Japan. *Japanese Journal of Zoology* **11**, 329–331.
- Morikawa, K. (1955). Pseudoscorpions of forest soil in Shikoku. *Memoirs of the Ehime University (2B)* **2**, 101–108.
- Morikawa, K. (1956). Cave pseudoscorpions of Japan (I). *Memoirs of the Ehime University (2B)* **2**, 271–282.

- Morikawa, K. (1960). Systematic studies of Japanese pseudoscorpion. *Memoirs of the Ehime University (2B)* **4**, 85–172.
- Muster, C., Schmarda, T., and Blick, T. (2004). Vicariance in a cryptic species pair of European pseudoscorpions (Arachnida, Pseudoscorpiones, Chthoniidae). *Zoologischer Anzeiger—A Journal of Comparative Zoology* **242**, 299–311.
- 中村 純. (2015). ネオニコチノイド系農薬の使用規制でミツバチを救えるか. *日本農薬学会誌* **40**, 191–198.
- Nassirkhani, M., and Shoushtari, R. V. (2014). Redescription and remarks on the species *Minniza persica* (Pseudoscorpiones: Olpiidae) from Iran. *Zoology in the Middle East* **60**, 272–277.
- 西海 功. (2012). DNA バーコーディングと日本の鳥の種分類. *日本鳥学会誌* **61**, 223–237.
- Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey bees?. *PLoS Biology* **5**, e168.
- Patten, M. A. (2015). Subspecies and the philosophy of science. *The Auk* **132**, 481–485.
- Pollierer, M. M., Langel, R., Scheua, S., and Marauna, M. (2009).
Compartmentalization of the soil animal food web as indicated by dual analysis of stable isotope ratios ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 1221–1226.
- Read, S., Howlett, B. G., Donovan, B. J., Nelson, W. R., van Toor, R. F., and Leung, G. (2012). Chelifers may control varroa. *New Zealand Beekeeper* **20**, 12–13.
- Read, S., Howlett, B. G., Donovan, B. J., Nelson, W. R., and Toor, R. F. (2014).
Culturing chelifers (Pseudoscorpions) that consume Varroa mites. *Journal of Applied Entomology* **138**, 260–266.
- Rosen, D. E. (1979). Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala:

- revisionary studies and comparative geography. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **162**, 267–376.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., and Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S96–S119.
- Satler, J. D., Carstens, B. C., and Hedin, M. (2013). Multilocus species delimitation in a complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Antrodiaetidae, *Aliatypus*). *Systematic Biology* **62**, 805–823.
- Serrano-Villavicencio, J. E., Vendramel, R. L., and Garbino, G. S. T. (2017). Species, subspecies, or color morphs? Reconsidering the taxonomy of *Callicebus* Thomas, 1903 in the Purus–Madeira interfluvium. *Primates* **58**, 159–167.
- Shull, G. H. (1923). The species concept from the point of view from the geneticist. *American Journal of Botany* **10**, 221–228.
- Sokal, R. R., and Crovello, T. J. (1970). The biological species concept: a critical evaluation. *The American Naturalist* **104**, 127–153.
- Stevens, P. F. (1990). Nomenclatural stability, taxonomic instinct, and flora writing—a recipe for disaster?. In 'The Plant Diversity of Malesia'. (Eds P. Baas, K. Kalkman and R. Geesink.) pp. 387–410. (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands.)
- Tizo-Pedroso, E., and Del-Claro, K. (2007). Cooperation in the neotropical pseudoscorpion, *Paratemnoides nidificator* (Balzan, 1888): Feeding and dispersal behavior. *Insectes Sociaux* **54**, 124–131.
- Tobias, J. A., Seddon, N., Spottiswoode, C. N., Pilgrim, J. D., Fishpool, L. D., and Collar, N. J. (2010). Quantitative criteria for species delimitation. *Ibis* **152**, 724–746.

- Troutet, J., Grandcolas, P., Blin, A., Vignes-Lebbe, R., and Legendre, F. (2017). Taxonomic bias in biodiversity data and societal preferences. *Scientific Reports* **7**, 9132.
- 鶴崎展巨. (2009). 訃報: 森川國康博士 (1919–2009). *Acta Arachnologica* **58**, 112–114.
- Turk, F. A. (1952). A new genus and species of pseudoscorpion with some notes on its biology. *Proceedings of the Zoological Society of London* **122**, 951–954.
- Van den Tooren, D. (2005). The subspecies of the pseudoscorpion *Dactylochelider latreillei* in the Netherlands (Pseudoscorpiones: Cheliferidae). *Nederlandse Faunistische Mededelingen* **23**, 77–89.
- VanEngelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R. M., and Pettis, J. S. (2010). A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research* **49**, 7–14.
- Van Toor, R. F., Thompson, S. E., Gibson, D. M., and Smith, G. R. (2015). Ingestion of *Varroa destructor* by pseudoscorpions in honey bee hives confirmed by PCR analysis. *Journal of Apicultural Research* **54**, 555–562.
- Wallin, H., Kvamme, T., and Bergsten, J. (2017). To be or not to be a subspecies: description of *Saperda populnea lapponica* ssp. n. (Coleoptera, Cerambycidae) developing in downy willow (*Salix lapponum* L.). *ZooKeys* **691**, 101–148.
- Wang, B., and Wang, X. R. (2014). Mitochondrial DNA capture and divergence in *Pinus* provide new insights into the evolution of the genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **80**, 20–30.
- Weygoldt, P. (1969). 'The Biology of Pseudoscorpions.' (Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, US.)

- Wilcox, T. P., Hugg, L., Zeh, J. A., and Zeh, D. W. (1997). Mitochondrial DNA sequencing reveals extreme genetic differentiation in a cryptic species complex of neotropical pseudoscorpions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7**, 208–216.
- Winker, K. (2009). Reuniting phenotype and genotype in biodiversity research. *BioScience* **59**, 657–665.
- 芳山三喜雄. (2010). 世界におけるミツバチ減少の現状と欧米における要因. ミツバチ科学 **28**, 65–72.
- Zaragoza, J. A. (2008). On the status of the subspecies of *Roncocreagris galeonuda* (Pseudoscorpiones: Neobisiidae): Importance of the chelal microsetae pattern. Remarks on the genus *Roncocreagris* Mahnert. *Revista Ibérica de Aracnología* **15**, 35–46.
- Zaragoza, J. A. (2017). Revision of the *Ephippiochthonius* complex in the Iberian Peninsula, Balearic Islands and Macaronesia, with proposed changes to the status of the *Chthonius* subgenera (Pseudoscorpiones, Chthoniidae). *Zootaxa* **4246**, 1–221.
- Zaragoza, J. A., and Harvey, M. S. (2006). The first record of the genus *Mundochthonius* Chamberlin (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) from Spain: *Mundochthonius gallaecicus* sp. nov. *Revista Ibérica de Aracnología* **12**, 17–23.
- Zeh, J. A., Zeh, D. W., and Bonilla, M. M. (2003). Phylogeography of the harlequin beetle-riding pseudoscorpion and the rise of the Isthmus of Panamá. *Molecular Ecology* **12**, 2759–2769.

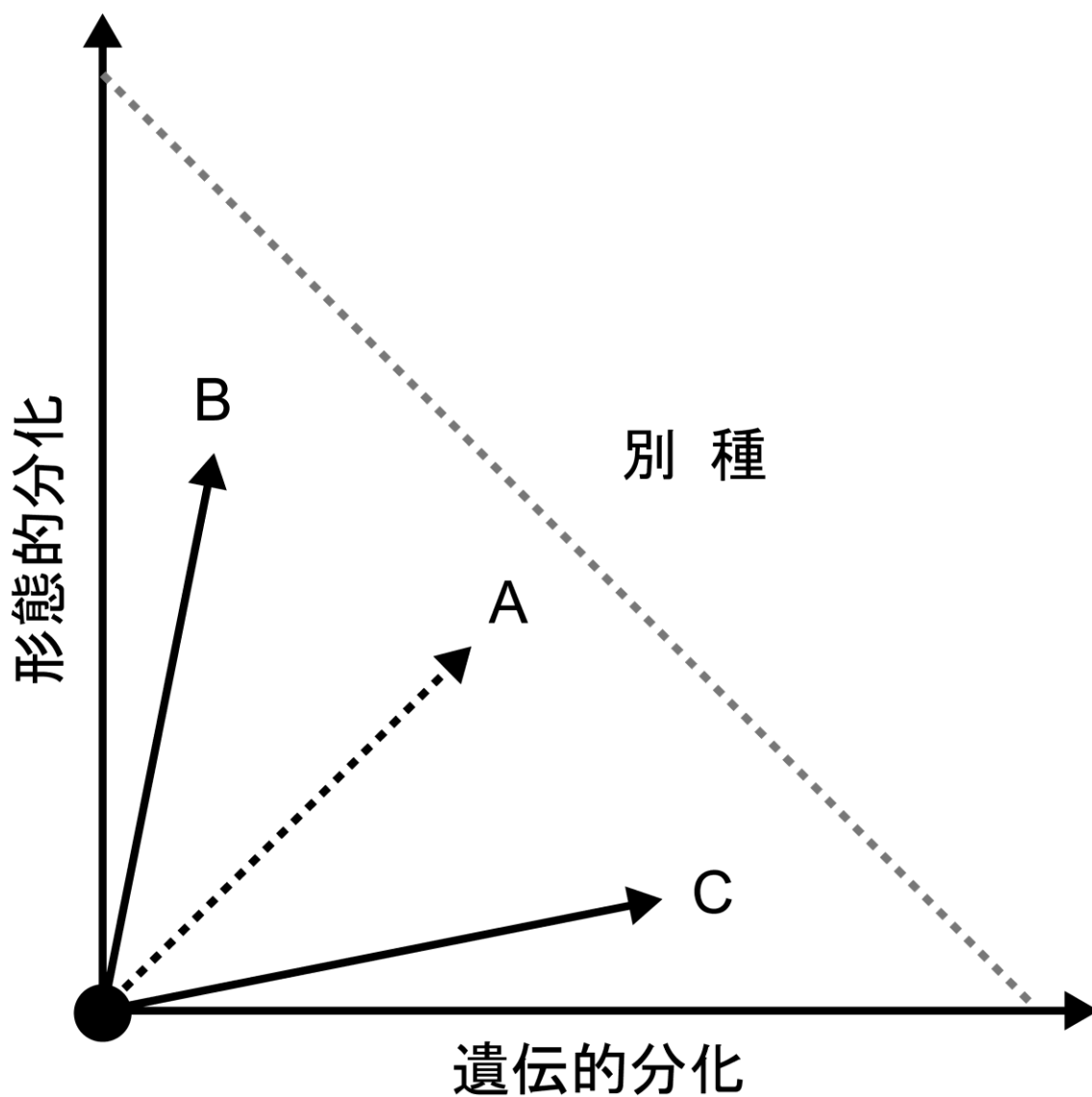


図 1. 遺伝的分化—形態的分化の種分化過程の空間的分布における種分化の経路.

A, 遺伝的分化と形態的分化が緊密に連結している場合 (通常, 遺伝的分化と形態的分化は連結して生じないため破線で示されている); B, 環境の淘汰圧によって強く支配されている場合; C, 中立的な選択による影響を強く受けている場合. (Winker 2009 を改変).

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧なご指導と的確なご助言を賜った福島大学共生システム理工学類の塘 忠顕教授に深く感謝いたします。時に厳しく、時に優しく接して下さったことを通して、研究者として、人として成長することができました。

本研究を遂行するにあたり、福島大学共生システム理工学類の兼子伸吾准教授には熱心なご指導と励まし、また副査として多くの有益なご助言を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本論文を作成するにあたり、福島大学共生システム理工学類の黒沢高秀教授には副査として多くの有益なご助言を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所の Leanne Faulks Kay 特任助教には、有益なご助言を賜ると共に、英文についてもご指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。

茨城県つくば市の坂寄 廣氏には、*Mundochthonius* 属カニムシの種分類に関して、有益なご意見を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本研究で使用した標本の採集にあたり、文化庁、南会津町教育委員会、愛知公園協会から許可と便宜を図って頂きました。ここに深く感謝いたします。

本研究は株式会社ニチレイ、磐梯朝日遷移プロジェクト：遷移途中にある自然環境を自然遺産として良好に保全するための研究モデルの策定—磐梯朝日国立公園の人間と自然環境系（生物多様性の保全）に関する研究—」（文部科学省特別経費（プロジェクト）採択事業）の支援を受けて行なわれました。ここに厚く御礼申し上げます。

そして、研究に打ち込むことを許し、そして支えてくれた両親に心から感謝いたします。