

愛知県に生息するカエル8種の16S rDNAと トノサマガエル属2種の*rhod*塩基配列

徳本 雄史 RAMAMONJISOA, Noelikanto
鄭 小軍 木村 咲稀 夏原 由博

名古屋大学大学院環境学研究科生態学講座 〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町

16S rDNA sequences of 8 frog species and *rhod* sequences of two *Pelophylax* spp. in Aichi prefecture, Japan

Yuji TOKUMOTO Noelikanto RAMAMONJISOA
Xiao jun ZHENG Saki KIMURA Yoshihiro NATUHARA

Ecology Group, Graduate School of Environmental Studies, Nagoya University
Furo, Chikusa, Nagoya, Aichi 464 8601, Japan

Correspondence:

Yoshihiro NATUHARA E-mail: natuhara@nagoya-u.jp

Yuji TOKUMOTO E-mail: tokumoto.ug@gmail.com

要旨

世界的にカエル類の種数や個体数の減少が確認されており、開発などによる生息地の荒廃などが原因とされている。愛知県内でも14種のカエル種が確認されているが、そのうち10種のカエルが、国、県、地域レベルでレッドリストに登録されている。カエル群集の種多様性を評価するに際し、個体数や種数のみならず遺伝的な情報を把握することが重要であるが、愛知県内に生息するカエル類の遺伝子データは十分とは言えない。本研究では、愛知県内に生息するカエル8種（ニホンアマガエル (*Hyla japonica*), ツチガエル (*Glandirana rugosa*), トノサマガエル (*Pelophylax nigromaculatus*), ナゴヤダルマガエル (*Pelophylax porosus brevipodus*), ニホンアカガエル (*Rana japonica*), ヤマアカガエル (*Rana ornativentris*), モリアオガエル (*Rhacophorus arboreus*), シュレーゲルアオガエル (*Rhacophorus schlegelii*)) について、ミトコンドリアのリボソームにおける16S rDNAの塩基配列と、トノサマガエル属2種（トノサマガエル, ナゴヤダルマガエル）については、核に含まれる遺伝子の1つの*rhod*の一部配列を決定し、DDBJデータベース（DNA Data Bank of Japan, DDBJ Center）に登録したことを報告する。

都市化や湿地の分断化などによって、世界的に両生類の種数や個体数が減少している (Blaustein and Kiesecker 2002; Naito 2012)。カエル類は地域生態系のおもな食物連鎖の中で中間的な階層に位置し、上位の消費者や下位の生産者の個体群および生態系の安定に大きな役割を果たしている。そのため、現状のカエル相を評価する

ことは、地域の水田生態系の健全性の評価につながると考えられる。

愛知県内には14種のカエル類が生息（移入種のウシガエル1種を含む）しており、そのうち10種が国や県、市のレベルで絶滅危惧種として指定されている（愛知県環境部。第三次レッドリスト。レッドリストあいち

2015. <http://www.pref.aichi.jp/kankyo/sizen-ka/shizen/yasei/redlist/>. 2018年3月確認, 名古屋市. 名古屋市版レッドリスト2015. <http://www.city.nagoya.jp/shisei/category/53-5-22-2-3-3-0-0-0-0.html>. 2018年3月確認, 豊田市. 豊田市生物調査報告書2018. <http://www.city.toyota.aichi.jp/kurashi/kankyoku/sizen/1016111.html>. 2018年3月確認.). カエル相の評価を行うにあたり直接観察や夜間の鳴き声による判別が行われているが, 近縁種や雑種の種判別は熟練者以外では難しく, 遺伝子を用いた種同定が確実であると考えられる. 特にナゴヤダルマガエル (*Pelophylax porosus brevipodus*) は各地でトノサマガエル (*Pelophylax nigromaculatus*) との雑種が形成されていることが確認されており, 純系種や雑種などの評価のために, 遺伝子情報が必要である (Komaki et al. 2012; 名古屋市. 名古屋市版レッドリスト2015.). 生物の遺伝子情報がまとめられている National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースには愛知県のカエル種の配列情報は, 著者らが確認した2018年3月現在で, 種判別などに使用するミトコンドリア内のリボソーマルDNA (rDNA) の登録数は非常に少なく, ツチガエル (*Glandirana rugosa*) の12SリボソーマルDNA (12S rDNA) で3件登録されているのみであった. そのため, 近縁種間の種判別などを行う基盤が整っていないと考え

られた.

そこで本報告では, 愛知県に生息するカエル14種のうち8種を対象に, カエル種の分類に利用されるミトコンドリアの16SリボソーマルDNA (16S rDNA) の配列を決定した. さらに絶滅が危惧されているナゴヤダルマガエルとトノサマガエルについて, 核由来の遺伝子での配列比較のために, *rhod* 遺伝子の一部配列を決定した.

まず, 愛知県内の池や田に生息するカエル8種23個体を捕獲した (表1). MS-222によって麻酔後, 各個体の指の一部を切り取り, NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel社, ドイツ) の標準プロトコールを使用し, ゲノムDNAの抽出を行った. 16S rDNAの配列について, 既報の両生類用のミトコンドリア16S rDNAプライマー (フォワード側: 5'-CGCCTGTTTAYCAAAAACATC-3', リバーズ側: 5'-GACCCYATGGAGCTTHAAAC-3', Simon et al. 1994; Bossuyt and Millinkovitch 2000) を用い, EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ, 大阪) を混合した反応液を調製し, GeneAmp PCR Thermal Cycler System 9700 (Applied Biosystems, アメリカ) を用いて対象領域を増幅した. PCR条件は, 初期の熱変性を94℃, 5分間, サイクリングは, 熱変性を94℃, 30秒間, アニーリングを55℃, 30秒間, 伸長反応を72℃, 1分間で, 35サイクルとした. 増幅後の反応液を1.5%アガロースゲル (Merck, ドイツ) に入れ, 電気

表1. 本研究で使用したサンプルリストと登録配列の番号

Table 1. Sample list used in this study with Accession numbers

Family name	Frog species	Japanese frog name	Sample name	Stage	Collection date	Collection place	Collector	Accession number of		
								16S rDNA	<i>rhod</i> (ca. 600 bp)	ca. 400 bp band in <i>rhod</i> PCR gel
Hylidae	<i>Hyla japonica</i> Günther, 1859	Nihon amagaeru	Hj1	Tadpole	05-Jun-17	Toyota	Ramamonjisoa, N.	LC389197	-	-
Hylidae	<i>Hyla japonica</i> Günther, 1859	Nihon amagaeru	Hj2	Tadpole	05-Jun-17	Toyota	Ramamonjisoa, N.	LC389198	-	-
Hylidae	<i>Hyla japonica</i> Günther, 1859	Nihon amagaeru	Hj3	Adult	10-Jul-17	Toyota	Tokumoto, Y.	LC389199	-	-
Ranidae	<i>Glandirana rugosa</i> Temminck et Schlegel, 1838	Tuchi gaeru	Gr1	Adult	10-Jul-17	Toyota	Zheng, X.	LC389200	-	-
Ranidae	<i>Pelophylax nigromaculatus</i> Hallowell, 1861	Tonosama gaeru	Pn1	Tadpole	05-Jun-17	Toyota	Kimura, S.	LC389201	-	-
Ranidae	<i>Pelophylax nigromaculatus</i> Hallowell, 1861	Tonosama gaeru	Pn2	Tadpole	05-Jun-17	Toyota	Kimura, S.	LC389202	-	-
Ranidae	<i>Pelophylax nigromaculatus</i> Hallowell, 1861	Tonosama gaeru	Pn3	Tadpole	10-Jul-17	Nisshin	Natuhara, Y.	LC389203	-	-
Ranidae	<i>Pelophylax nigromaculatus</i> Hallowell, 1861	Tonosama gaeru	Pn4	Adult	10-Jul-17	Toyota	Tokumoto, Y.	LC389204	LC389585	LC390044
Ranidae	<i>Pelophylax nigromaculatus</i> Hallowell, 1861	Tonosama gaeru	Pn5	Adult	19-Jun-17	Toyota	Natuhara, Y.	LC389205	-	-
Ranidae	<i>Pelophylax nigromaculatus</i> Hallowell, 1861	Tonosama gaeru	Pn6	Adult	19-Jun-17	Toyota	Natuhara, Y.	LC389206	-	-
Ranidae	<i>Pelophylax nigromaculatus</i> Hallowell, 1861	Tonosama gaeru	Pn7	Adult	19-Jun-17	Toyota	Natuhara, Y.	LC389207	-	-
Ranidae	<i>Pelophylax nigromaculatus</i> Hallowell, 1861	Tonosama gaeru	Pn8	Adult	19-Jun-17	Toyota	Natuhara, Y.	LC389208	LC389586	LC390045
Ranidae	<i>Pelophylax porosus brevipodus</i> Ito, 1941	Nagoya daruma gaeru	Pp1	Adult	10-Jul-17	Nisshin	Natuhara, Y.	LC389209	LC389587	-
Ranidae	<i>Pelophylax porosus brevipodus</i> Ito, 1941	Nagoya daruma gaeru	Pp2	Adult	10-Jul-17	Nisshin	Natuhara, Y.	LC389210	LC389588	-
Ranidae	<i>Rana japonica</i> Boulenger, 1879	Nihon akagaeru	Rj1	Adult	19-Jun-17	Toyota	Kimura, S.	LC389211	-	-
Ranidae	<i>Rana japonica</i> Boulenger, 1879	Nihon akagaeru	Rj2	Adult	19-Jun-17	Toyota	Natuhara, Y.	LC389212	-	-
Ranidae	<i>Rana japonica</i> Boulenger, 1879	Nihon akagaeru	Rj3	Adult	19-Jun-17	Toyota	Natuhara, Y.	LC389213	-	-
Ranidae	<i>Rana japonica</i> Boulenger, 1879	Nihon akagaeru	Rj4	Adult	19-Jun-17	Toyota	Natuhara, Y.	LC389214	-	-
Ranidae	<i>Rana ornativentris</i> Werner, 1903	Yama akagaeru	Ro1	Tadpole	05-Jun-17	Toyota	Kimura, S.	LC389215	-	-
Rhacophoridae	<i>Rhacophorus arboreus</i> Okada et Kawano, 1924	Mori aogaeru	Ra1	Tadpole	19-Jun-17	Toyota	Ramamonjisoa, N.	LC389216	-	-
Rhacophoridae	<i>Rhacophorus arboreus</i> Okada et Kawano, 1924	Mori aogaeru	Ra2	Tadpole	19-Jun-17	Toyota	Ramamonjisoa, N.	LC389217	-	-
Rhacophoridae	<i>Rhacophorus schlegelii</i> Günther, 1858	Syuregeru aogaeru	Rs1	Tadpole	05-Jun-17	Toyota	Ramamonjisoa, N.	LC389218	-	-
Rhacophoridae	<i>Rhacophorus schlegelii</i> Günther, 1858	Syuregeru aogaeru	Rs2	Tadpole	05-Jun-17	Toyota	Ramamonjisoa, N.	LC389219	-	-

泳動（Mupid-2, コスモバイオ）を行なった後に、染色液（GelRed, Biotium, アメリカ）を入れたTAEバッファーに浸し、増幅産物を紫外線光により励起させて確認した。増幅産物はExoSAP-IT PCR Product Cleanup（Affymetrix, アメリカ）を用いて短い増幅産物やプライマーを除去した後、BigDye Terminator ver3（Applied Biosystems）を用いてシーケンス反応を行い、ABI3100（Applied Biosystems）で配列を決定した。シーケンス反応以降の操作は、名古屋大学遺伝子実験施設に依頼した。今回得られた16S rDNAの配列は、新たに愛知県内で得られたものであるため（表1）、国立遺伝学研究所のDNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した（表1, Accession number: LC389197-LC389219）。配列決定後に、各カエル種の増幅産物をNCBIに登録されているデータベース上の配列と比較を行った（表2, 附表1）。今回配列を決定した全8種は、愛知県由来の16S rDNAの既存配列が確認できなく、岐阜県関ヶ原で採取されたツチガエルの既存配列が最も地理的な距離に近いものであった（Mawaribuchi et al. 2016）。ナゴヤダルマガエルは登録されている配列がなく、我々のサンプルが初めての登録となった。トノサマガエル、モリアオガエル（*Rhacophorus arboreus*）、シュレーゲルアオガエル（*Rhacophorus schlegelii*）についても、国内で採取されたとはっきりわかる既存配列はこれまでになかった。モリアオガエルについては、既存の配列（AY880523, unknown origin）と同一であったが、トノサマガエルとシュレーゲルアオガエルについては、既存の配列とは3塩基以上異なっていた。ニホンアカガエル（*Hyla japonica*）、ツチガエル、ニホンアカガエル（*Rana*

japonica）、ヤマアカガエル（*Rana ornativentris*）の4種の配列は、登録されている配列のいずれとも合致しなかった。

トノサマガエルとナゴヤダルマガエルの2種については、NCBIに登録されている核由来の遺伝子の中で *rhod* 遺伝子の28配列（附表2）をダウンロードし、2種間で配列を比較した。配列中にトノサマガエルだけの変異が見つかったため、その変異を中心として増幅産物が約600 bp（base pair）となるようプライマーを新たに設計した（フォワード側：5'-TAGAAGAGCAGAATGAGGCAG-3', リバース側：5'-GCCACTTACCTTCCACCACAC-3'）。理論上、このプライマーを使用すれば、参考にした28配列14地域の全てにおいて増幅でき、配列を比較することで種の判別が可能であると考えられる。分析するサンプルは豊田市で採取したトノサマガエル2個体（Pn4, 8）と、日進市で採取したナゴヤダルマガエル2個体（Pp1, 2）を使用した（表1）。上記と同じ機器と試薬を用いてPCRを行った。設計したプライマーのPCR条件を検討するため、上記のPCR条件に対して、3つのアニーリング温度条件（60, 62, 64℃）を試した（図1）。3つの条件のうちいずれの温度でも対象となる増副産物である600 bp付近に明瞭なバンドが見られた。しかし、60℃では非特異的なバンドが数多くみられ、特にトノサマガエル（Pn4, 8）のサンプルでは400 bp付近にも明るいバンドが見られた。62℃の条件では多くの非特異的なバンドは減少し、64℃ではほとんど見られなくなった。このプライマーセットのPCR条件を、初期の熱変性を94℃、5分間、サイクリングは、熱変性を94℃、30秒間、アニーリングを64℃、30秒間、伸長反応を72℃、30秒間で、30サ

表2. データベース上の16S rDNA配列と本研究で明らかにした配列の比較結果

Table 2. Summary of comparison of 16S rDNA sequences between database and our samples.

Frog species	Japanese frog name	No. registered sequences in NCBI	No. registered sequences originated in		The location which has most similar sequences with our samples	The differences between most similar sequences and our samples
			Japan	Aichi pref.		
<i>Hyla japonica</i>	Nihon amagaeru	5 (18*)	2	0	Unknown, Japan	1
<i>Glandirana rugosa</i>	Tuchi gaeru	23	15	0	Sekigahara, Gifu	1
<i>Pelophylax nigromaculatus</i>	Tonosama gaeru	12	0	0	China	3
<i>Pelophylax porosus brevipodus</i>	Nagoya daruma gaeru	0	0	0	NA	NA
<i>Rana japonica</i>	Nihon akagaeru	9	8	0	Fukuoka, Japan	4
<i>Rana ornativentris</i>	Yama akagaeru	5	4	0	Unknown	3
<i>Rhacophorus arboreus</i>	Mori aogaeru	3	0	0	Unknown	0
<i>Rhacophorus schlegelii</i>	Syuregeru aogaeru	1	0	0	Unknown	6

*: The sequences were excluded from the comparison data because these matched only 80 bp with our samples.

イクルとして、対象領域を増幅し、得られた産物を上記と同様に処理し、配列を決定した。16S rDNA 同様に DDBJ に登録した (表 1, Accession number: LC389585-LC389588)。トノサマガエルのサンプルで見られた 400 bp 付近のバンドについて、62℃ の条件の増幅産物の切り出しと精製を行い (Gel/PCR エクストラクションキット, 日本ジェネティックス, 東京), 配列を解読したところ、2018 年 3 月現在で NCBI のデータベースには登録されていなかった。ナゴヤダルマガエルでは増幅産物が見られないことから、トノサマガエルだけが持っている遺伝子配列が増幅された可能性が高く、このバンド

の有無で種判別ができる可能性がある。この配列についても DDBJ に登録した (表 1, Accession number: LC390044, LC390045)。今後サンプル数を増やすことやゲノムの解読などの研究が進むことで、この増幅産物が種判別に使用できるかどうかなどが明らかになると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター 受託研究費「生物多様性を活用した安定的農業生産技術の開

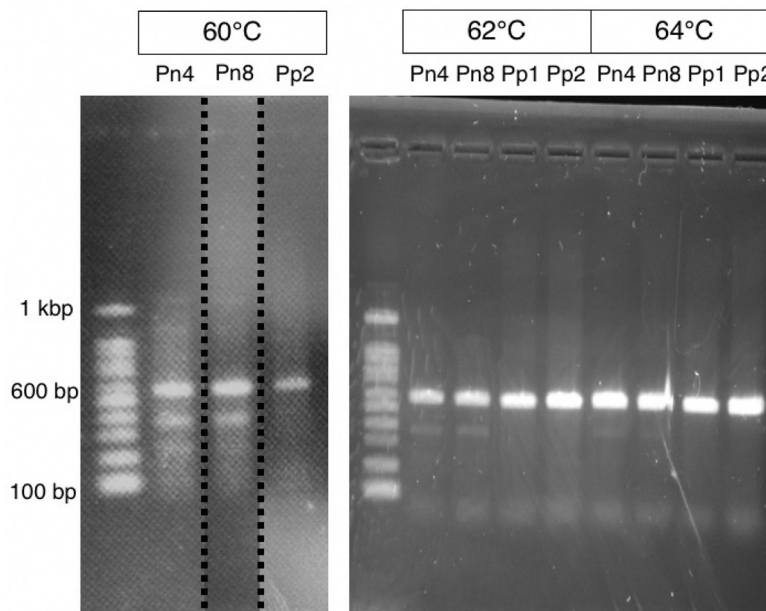


図1 トノサマガエルとナゴヤダルマガエルの *rhod* の一部配列の決定のための PCR 条件を検討するために行った電気泳動ゲルの様子。アニーリング温度を 60, 62, 64℃ の 3 段階に分けて検証した。アニーリング温度の下のアلفベットはサンプルの名前を示す (表 1 参照)。ゲルの一番左には 100 bp DNA 分子量マーカーを同時に流した。一番下のバンドが 100 bp で、1 kbp まで 100 bp ずつ分子量が大きくなる。60℃ では設計したプライマーで増幅する 600 bp のバンド以外にも、400 bp などのバンドが増幅している。温度を 64℃ まで上昇させていくと、このような非特異的なバンドが消えていく。本報告では、64℃ で増幅した産物を *rhod* の配列決定に用いた。62℃ で増幅させた時にトノサマガエル (Pn4, 8) で見える 400 bp のバンドはナゴヤダルマガエルでは見られないことから、ゲルから切り出した後、配列を決定した。60℃ のゲルには、一度に様々な個体の増幅産物を流したため、対象個体だけを切り取って示している。

Fig. 1. A state of the electrophoresis gel for the examining of the PCR condition for determining the partial sequence of *rhod* gene of *Pelophylax nigromaculatus* and *Pelophylax porosus brevipodus*. The annealing temperature was verified by three different temperatures: 60, 62 and 64℃. Alphabets under the annealing temperature indicated the name of the sample (see Table 1). A 100 bp DNA ladder was shown on the left of the gel. The bottom band is 100 bp and the molecular weight increases by 100 bp until 1 kbp. The primers designed in this study targeted the 600 bp band, however, at 60℃, non-specific bands such as 400 bp were also amplified. When the temperature was raised to 64℃, nonspecific band disappeared. In this report, the product amplified at 64℃ was used for *rhod* sequencing. When amplifying at 62℃, the 400 bp bands were confirmed in *P. nigromaculatus* (Pn 4, 8) which were not observed in *P. porosus brevipodus*. We used 400 bp bands amplified at 62℃ for the determination of the sequences. Amplified products of various individuals were contained in a same gel at the 60℃ gel; we showed only the target individuals by cutting out the others.

発], 科学研究費助成金・基盤研究 (B) 16H04735 によって行われた。DNA 実験の一部は, 名古屋大学大学院・生命農学研究科・森林生態学研究分野, 戸丸信弘教授の実験室で実施した。名古屋大学遺伝子実験施設にシーケンス解析を行なってもらった。名古屋大学大学院・環境学研究科・生態学講座の杉谷健一郎教授, 依田憲教授及びメンバー各位より実験機器の使用などでサポートを受けた。

引用文献

- Blaustein, AR. and Kiesecker, JM. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters*. 5: 597-608.
- Bossuyt, F. and MC. Millinkovitch. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 6585-6590.
- Che, J., J. Pang, H. Zhao, G. Wu, E. Zhao, and Y. Zhang. 2007. Phylogeny of Raninae (Anura: Ranidae) inferred from mitochondrial and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43: 1-13.
- Chen, X., Z. Chen, J. Jiang, L. Qiao, Y. Lu, K. Zhou, G. Zheng, X. Zhai, and J. Liu. 2013. Molecular phylogeny and diversification of the genus *Odorrana* (Amphibia, Anura, Ranidae) inferred from two mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 69: 1196-1202.
- Delorme, M. 2004. Phylogeny of Ranidae, Rhacophorinae: Conflicts between molecular and morphological analyses and study of its nature. Thesis, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, 334 pp
- Frost, DR., T. Grant, JN. Faivovich, RH. Bain, A. Haas, CFB. Haddad, RO. De Sa, A. Channing, M. Wilkinson, SC. Donnellan, CJ. Raxworthy, JA. Campbell, BL. Blotto, P. Moler, RC. Drewes, RA. Nussbaum, JD. Lynch, DM. Green, and WC. Wheeler. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 297: 1-370.
- Igawa, T., S. Komaki, T. Takahara, and M. Sumida. 2015. Development and validation of PCR-RFLP assay to identify three Japanese brown frogs of the true frog genus *Rana*. *Current Herpetology*. 34: 89-94.
- Jeong, TJ., J. Jun, S. Han, HT. Kim, K. Oh, and M. Kwak. 2013. DNA barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications. *Molecular Ecology Resources*. 13: 1019-1032.
- Jiang, JP. and K. Zhou. 2005. Phylogenetic relationships among Chinese Ranids inferred from sequence data set of 12s and 16s rDNA. *Herpetological Journal*. 15: 1-8
- Kurabayashi, A., N. Yoshikawa, N. Sato, Y. Hayashi, S. Oumi, T. Fujii, and M. Sumida. 2010. Complete mitochondrial DNA sequence of the endangered frog *Odorrana ishikawae* (family Ranidae) and unexpected diversity of mt gene arrangements in ranids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56: 543-553.
- Kuraishi, N., M. Matsui, A. Hamidy, DM. Belabut, N. Ahmad, S. Panha, A. Sudin, HS. Yong, JP. Jiang, H. Ota, HT. Thong, and K. Nishikawa. 2013. Phylogenetic and taxonomic relationships of the *Polypedates leucomystax complex* (Amphibia). *Zoologica Scripta*. 42: 54-70.
- Komaki, S., A. Kurabayashi, MM. Islam, K. Tojo, and M. Sumida. 2012. Distributional change and epidemic introgression in overlapping areas of Japanese pond frog species over 30 years. *Zoological Science* 29(6): 351-358.
- Komaki, S., T. Igawa, SM. Lin, K. Tojo, MS. Min, and M. Sumida. 2015. Robust molecular phylogeny and palaeodistribution modelling resolve a complex evolutionary history: glacial cycling drove recurrent mtDNA introgression among *Pelophylax* frogs in East Asia. *Journal of Biogeography* 42: 2159-2171.
- Lemmon, EM., AR. Lemmon, and DC. Cannatella. 2007. Geological and climatic forces driving speciation in the continentally distributed trilling chorus frogs (*Pseudacris*). *Evolution*. 61: 2086-2103.

- Li, JT., JS. Wang, HH. Nian, SN. Litvinchuk, J. Wang, Y. Li, DQ. Rao, and S. Klaus. 2015. Amphibians crossing the bering land bridge: evidence from holarctic treefrogs (*Hyla*, Hylidae, Anura). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 87: 80–90.
- Mawaribuchi, S., M. Ito, M. Ogata, H. Oota, T. Katsumura, N. Takamatsu, and I. Miura. 2015. Meiotic recombination counteracts male-biased mutation (male-driven evolution). *Proceedings of the royal society B Biological Sciences*. 283: 20152691.
- Naito, R. 2012. Perspectives of conservation of pond-breeding frogs (focusing on the Nagoya Daruma pond frog) in rice paddy areas in Japan. *Landscape Ecology and Management*. 17: 57–73.
- Oliver, LA., E. Prendini, F. Kraus, CJ. Raxworthy. 2015. Systematics and biogeography of the *Hylarana* frog (Anura: Ranidae) radiation across tropical Australasia, Southeast Asia, and Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 90: 176–192.
- Richards, CM. and WS. Moore. 1998. A molecular phylogenetic study of the Old World treefrog family Rhacophoridae. *Herpetological Journal*. 8: 41–46.
- Roelants, K., J. Jiang, and F. Bossuyt. 2004. Endemic ranid (Amphibia: Anura) genera in southern mountain ranges of the Indian subcontinent represent ancient frog lineages: evidence from molecular data *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31: 730–740.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651–701.
- Smith, SA., PR. Stephens, and JJ. Wiens. 2005. Replicate patterns of species richness, historical biogeography, and phylogeny in holarctic treefrogs. *Evolution*. 59: 2433–2450.
- Sumida, M., H. Ueda, and M. Nishioka. 1993. Reproductive isolating mechanisms and molecular phylogenetic relationships among palearctic and oriental brown frogs. *Zoological Science*. 20: 567–580.
- Yuan, ZY., WW. Zhou, X. Chen, NA. Poyarkov Jr, HM. Chen, NH. Jang-Liaw, WH. Chou, NJ. Matzke, K. Iizuka, MSMSL. Kuzmin, YP. Zhang, DC. Cannatella, DM. Hills, and J. Che. 2016. Spatiotemporal diversification of the true frogs (genus *Rana*): a historical framework for a widely studied group of model organisms. *Systematic Biology*. 65: 824–842.
- Wilkinson, JA., RC. Drewes, and OL. Tatum. 2002. A molecular phylogenetic analysis of the family Rhacophoridae with an emphasis on the Asian and African genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 24: 265–273.

徳本ほか（2019） 愛知県に生息するカエル 8 種の 16S rDNA と トノサマガエル 属 2 種の *rhod* 塩基配列

附表 1. 本研究で対象としたカエル種の 16S rDNA の配列比較に用いたデータリスト
Supplementary table 1. Sequence list used for comparison of 16S rDNA of frog species targeted in this study.

Frog species	Origin		Accession ID			References	
	Country	Subordinate class					
<i>Hyla japonica</i> (Nihon ama gaeru)							
	Japan	Hiroshima	DQ055821			Smith et al. 2005	
		Tsushima	KP742742*			Li et al. 2015	
		Unknown	EF566952			Lemmon et al. 2007	
	Korea		JQ815325*	JQ815326*	JQ815327*	Jeong et al. 2013	
	China		KP742724*	KP742725*	KP742734*	Li et al. 2015	
			KP742735*	KP742736*	KP742737*	Li et al. 2015	
			KP742738*	KP742739*	KP742740*	Li et al. 2015	
			KP742741*			Li et al. 2015	
	Rossia		KP742726*	KP742727*	KP742828*	Li et al. 2015	
			KP742729*	KP742730*	KP742731*	Li et al. 2015	
			KP742732*			Li et al. 2015	
<i>Glandirana rugosa</i> (Tuchi gaeru)							
Japan	Sekigahara, Gifu	LC068818				Mawaribuchi et al. 2016	
	Hiroshima	AB511300				Kurabayashi et al. 2010	
	Kanto	AB430340				Kurabayashi et al. 2010	
	West Japan	AB430341				Kurabayashi et al. 2010	
	Hamamatsu, Shizuoka	AB430342				Kurabayashi et al. 2010	
	Ohtsu, Shiga	AB430343				Kurabayashi et al. 2010	
	Niigata, Niigata	AB430344				Kurabayashi et al. 2010	
	Kanazawa, Ishikawa	AB430345				Kurabayashi et al. 2010	
	Sado, Niigata	AB430347	AB430348	AB430349		Kurabayashi et al. 2010	
		AB430350	AB430351	AB430352		Kurabayashi et al. 2010	
	Korea		AB430346			Kurabayashi et al. 2010	
			JQ815304	JQ815305	JQ815306	Jeong et al. 2013	
China		AY322281	AY322320		Roelants et al. 2004		
		KU865180	KU865181		Song et al. unpublished		
<i>Pelophylax nigromaculatus</i> (Tonosama gaeru)							
China	Anhui	AF315138				Jiang & Zhou 2005	
		KF185062				Chen et al. 2013	
		DQ283137				Frost et al. 2006	
	Sichuan	KX269216				Yuang et al. 2016	
		DQ359991				Che et al. 2007	
	Korea	JQ815319	JQ815320	JQ815321		Jeong et al. 2013	
	India	AY322278				Roelants et al. 2004	
	Unknown	JQ621942				Gao & Fan unpublished	
	<i>Rana japonica</i> (Nihon akagaeru)						
	Japan	Hiroshima	AB058876				Sumida et al. 1993
Ichinoseki, Iwate		AB058877				Sumida et al. 1993	
Hiroshima		AB511305				Kurabayashi et al. 2010	
Tateyama, Chiba		AB728192				Kuraishi et al. 2013	
Kagoshima		LC014153				Igawa et al. 2015	
Fukuoka		LC014154				Igawa et al. 2015	
Hiroshima		LC014155				Igawa et al. 2015	
Fukushima		LC014156				Igawa et al. 2015	
China		Sichuan	DQ283136			Frost et al. 2006	
Unknown			KR264033			Oliver et al. 2015	
			KX269220				Yuan et al. 2016
<i>Rana ornativentris</i> (Yama akagaeru)							
Japan	Hiroshima	AB058874				Sumida et al. 1993	
	Aomori	AB058875				Sumida et al. 1993	
	Hiroshima	LC014157				Igawa et al. 2015	
	Mie	LC014158				Igawa et al. 2015	
	Unknown	KX269187				Yuan et al. 2016	
<i>Rhacophorus arboreus</i> (Mori aogaeru)							
Unknown		AF026379				Richards & Moore 1998	
		AY880523				Delorme 2004	
		AF458142				Wilkinson et al. 2002	
<i>Rhacophorus schlegelii</i> (Syuregeru aogaeru)							
Unknown		AY880528				Delorme 2004	

*: The sequences were excluded from the comparison data because these matched only 80 bp with our samples.

附表 2. ナゴヤダルマガエルと トノサマガエルの *rhod* 遺伝子の配列決定のために参考にしたデータリスト
Supplementary table 2. Sequence list referred for the determination of *rhod* gene sequences of
Pelophylax porosus brevipodus and *Pelophylax nigromaculatus*.

Frog species	Origin		Accession ID	
	Country	Subordinate class		
<i>Pelophylax nigromaculatus</i> (Tonosama gaeru)				
	Japan	Gotsu, Shimane	AB980497	AB980498
		Kagoshima, Kagoshima	AB980503	AB980504
		Kizaki, Nagano	AB980505	AB980506
		Mikuni, Fukui	AB980515	AB980516
		Mishima, Shizuoka	AB980517	AB980518
		Munakata, Fukuoka	AB980529	AB980530
		Namioka, Aomori	AB980533	AB980534
		Shibata, Niigata	AB980541	AB980542
		Shingu, Wakayama	AB980543	AB980544
		Tottori, Tottori	AB980549	AB980550
		Uwajima, Ehime	AB980555	AB980556
<i>Pelophylax porosus brevipodus</i> (Nagoya daruma gaeru)				
	Japan	Iga, Mie	AB980499	AB980500
		Konko, Okayama	AB980507	AB980508
		Osaka, Osaka	AB980535	AB980536

All sequences in this table were determined by Komaki et al. 2015