



博多湾流入河川におけるナミスジシマドジョウからの未確認ハプロタイプの検出と PCR-RFLP 分析による種・亜種判別

永江栞奈¹・栗田喜久¹・鬼倉徳雄¹

Author & Article Info

¹九州大学大学院生物資源環境科学府（福津市）
KN: puranaria1839@gmail.com (corresponding author)
YK: kurita.yoshihisa.070@m.kyushu-u.ac.jp
NO: onikura@agr.kyushu-u.ac.jp

Received 09 December 2025
Revised 24 December 2025
Accepted 24 December 2025
Published 25 December 2025
DOI 10.34583/ichthy.61.0_24

Kanna Nagae, Yoshihisa Kurita and Norio Onikura. 2025. Detection of unidentified haplotypes from *Cobitis striata* identification using PCR-RFLP analysis in rivers flowing into Hakata Bay, Japan. Ichthy, Natural History of Fishes of Japan, 62: 31–36.

Abstract

Cobitis striata Ikeda, 1936 comprises three subspecies, among which *Cobitis striata hakataensis* Nakajima, 2012 and *Cobitis striata fuchigamii* Nakajima, 2012 are geographically restricted to northern Kyushu, Japan. *Cobitis striata striata* Ikeda, 1936 is distributed in parts of Honshu, Shikoku, and Kyushu. These subspecies are listed as critically endangered (*C. s. hakataensis*), endangered (*C. s. fuchigamii*), and vulnerable (*C. s. striata*) in the Red Data Book of Japan. In May 2025, a previously unrecorded haplotype closely matching *C. s. striata* or *C. s. fuchigamii* was detected in the river flowing into Hakata Bay. We developed a genetic screening method using PCR–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) targeting mitochondrial *cyt b* gene (1020 bp). Enzyme digestion revealed distinct band patterns for *C. s. hakataensis* (800, 210, 100 bp), *C. s. striata* / *C. s. fuchigamii* (900, 210 bp), *C. kaibarai* (800, 180, 100, 30 bp), and *C. matsubarae* (800, 310 bp). Rare polymorphisms were observed in some cases, indicating that PCR-RFLP is suitable for first-tier screening but should be combined with morphology and sequencing for final identification.

九州北部には、シマドジョウ属 *Cobitis* Linnaeus, 1758 に属する魚類が複数種・亜種分布しており、ヤマトシマドジョウ *Cobitis matsubarae* Okada and Ikeda, 1939 がほぼ全域に、アリアケスジシマドジョウ *Cobitis kaibarai* Nakajima, 2012 が有明海流入河川に、イシドジョウ *Cobitis takatsuensis* Mizuno, 1970 が一部の河川に生息する。本研究の対象であ

る、ナミスジシマドジョウ *Cobitis striata* Ikeda, 1936 は、3 亜種から構成される (Nakajima, 2012)。チュウガタスジシマドジョウ *Cobitis striata striata* Ikeda, 1936 は 3 亜種の中では最も広域分布であり、瀬戸内海に流入する河川と一部の日本海流入河川に生息する (中島・内山, 2017)。一方、ハカタスジシマドジョウ *Cobitis striata hakataensis* Nakajima, 2012 は博多湾流入河川に、オンガスジシマドジョウ *Cobitis striata fuchigamii* Nakajima, 2012 は遠賀川水系にのみ分布する (中島・内山, 2017)。

そのなかでも、ハカタスジシマドジョウは、環境省および福岡県のレッドデータブックにおいて、絶滅危惧 IA 類 (CR) に選定されている (環境省, 2020; 福岡県環境部自然環境課, 2025)。また、本亜種は種の保存法の国内希少野生動植物種 (環境省, 2024) および福岡県希少野生動植物種の保護に関する条例の指定種 (福岡県, 2021) でもある。本亜種の生息域は人為的な改変が著しい地域と重複しており、生息域である福岡平野は、九州島で最も人口が集中する福岡市を抱える (福岡県, 2023)。

これまでに、九州のナミスジシマドジョウについては、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の ND1 領域を対象とした制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析 (北川ほか, 2009) や *cyt b* 領域および D-loop 領域を対象とした遺伝的な研究 (Nagae et al., 2025) が行われ、分布パターンやその成立過程、集団構造やその保全について報告されている。ハカタスジシマドジョウの現存する生息地は博多湾流入 2 水系の数カ所に限られる。また、本亜種の遺伝的集団構造は水系ごとに固有のハプロタイプから構成され、本亜種内の遺伝的多様性は低いことが分かっている (Nagae et al., 2025)。さらに、これらの生息地は人為的な環境改変により危機的状況にあることから、著者らはハカタスジシマドジョウのモニタリング調査を継続的に実施してきた。

ハカタスジシマドジョウのモニタリング調査の過程で、これまで当該水系において生息記録のないチュウガタスジシマドジョウまたはオンガスジシマドジョウに由来すると考えられる mtDNA ハプロタイプ (H11) を有した個体が

採集されたため、本論文において報告する。また今後、保全対象である本亜種の生息地への外来種・亜種の移入に迅速に対応するために、本研究では、DNA シーケンシングを必要とせず、PCR 産物を制限酵素で処理し、電気泳動像より得られる切断断片長の組み合わせから遺伝型を判別できる PCR-RFLP 分析に着目した。九州北部に生息するイシドジョウを除くシマドジョウ属魚類 5 種・亜種を対象に、PCR-RFLP 分析による種・亜種判別の有効性を検討した。

材料と方法

サンプリング 2025 年 5 月に、福岡県の博多湾流入河川の 1 水系 1 地点で 20 個体のハカタスジシマドジョウを採集した。採集した魚類の尾鰭の一部を採取し 99% エタノールで固定した後、採集地点に放流した。鰭組織標本は DNA 抽出までの間、-20°C の低温フリーザ内に保管した。全てのサンプルは、九州大学生物資源環境科学府附属水産実験所に保管している。

DNA 抽出・増幅・配列決定 DNA 抽出は鰭組織より Quick DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, USA) を用いて行った。mtDNA における *cyt b* 領域 (1020 bp) の PCR 増幅には、Nagae et al. (2025) で設計された以下のプライマーを用いた：*cyt b* (CS_ *cytb*_F: 5'-CCCCTAATTAATAATGCTAACG-3', CS_ *cytb*_R: 5'-TGCCTGTTTCTAGTCATCCC-3')。PCR 反応液は 10 μM プライマー各 2 μl, EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (TaKaRa Bio Inc., Japan) 10 μl, milliQ 5 μl, template DNA 1 μl からなり、最終反応量が 20 μl となるように調整した。対象領域の塩基配列の増幅は Bio-RAD T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, USA) を用い、以下の条件で行った：初期変性は 95°C で 1 分とし、その後、95°C で 15 秒、56°C で 15 秒、72°C で 30 秒の 3 ステップを 30 サイクル繰り返した。反応終了後、72°C で 2 分間の最終伸長を行った。得られた PCR 産物と 1 kb Plus DNA Ladder (N3200S, New England Biolabs, USA) を ethidium bromide で染色した 1.0% アガロースゲルを用いて電気泳動し、目的配列が増幅されていることを確認した後、ExoSAP-IT (Applied Biosystems, USA) を用いて精製した。塩基配列の決定は FASMAC の DNA シーケンス解析サービス (FASMAC, Japan) を利用し、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) で行った。シーケンス反応には増幅時の Forward primer とシーケンス反応用に設計された *cyt b* (CS_ *cytb*_seqF: 5'-ACACTAACACGATTCTTTGCC-3') の ネ ス テッドプライマー (Nagae et al., 2025) を用いた。各遺伝子から得られた塩基配列を Finch TV ver. 1.4.0 (Geospiza, USA) により評価し、MEGA X (Kumar et al., 2018) の Clustal W (Thompson et al., 1994) を用いてアラインメントした。FaBox 1.61 (Villesen, 2007) を用いて *cyt b* 領域の配列デー

タからハプロタイプを同定した。

データ分析 最尤系統樹推定は IQ-TREE 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) を用いて実施した。塩基置換モデルは IQ-TREE に実装されている ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) を用いてベイズ情報量規準 (BIC) に基づいて選択した。各枝の信頼性評価値として、10000 回の ultrafast bootstrap approximation (Hoang et al., 2018) を使用した。*cyt b* 領域の配列データから同定されたハプロタイプである H11 の系統的位置を評価するため、ハカタスジシマドジョウ (LC829482–LC829488: Nagae et al., 2025), チュウガタスジシマドジョウ (LC829489, LC829490: Nagae et al., 2025), オンガスジシマドジョウ (LC829472–LC829481: Nagae et al., 2025), アリアケスジシマドジョウ (LC829491–LC829493: Nagae et al., 2025), ヤマトシマドジョウ (AP013310: Miya, 2013) の相同配列を用いた。また、PopART 1.7.1 (Leigh and Bryant, 2015) の統計最節約ネットワーク (statistical parsimony network) を用いてハプロタイプネットワークを構築し、亜種間および亜種内のハプロタイプ間の遺伝的関係を調べた。ハプロタイプネットワークには、ハカタスジシマドジョウおよびオンガスジシマドジョウについては Nagae et al. (2025) の登録配列を用い、チュウガタスジシマドジョウについては同文献で使用された配列に加え、GenBank ([URL](#)) から新たに取得した 2 件 (岐阜県産: LC859624 および産地不明: AP013311) を含めた。

PCR-RFLP 分析 PCR-RFLP 分析に用いる制限酵素選定にあたっては、GenBank に登録されている各種・亜種の *cyt b* 領域 (約 1020 bp: ハカタスジシマドジョウ: LC829482–LC829488, オンガスジシマドジョウ: LC829472–LC829476, チュウガタスジシマドジョウ: AP013311, LC829489, LC829490, アリアケスジシマドジョウ: LC829491–LC829493, ヤマトシマドジョウ: AP013310) を用いて、ハカタスジシマドジョウおよび九州北部に分布するシマドジョウ属魚類 4 種・亜種を判別可能な制限酵素を探索した。制限酵素の探索は NEBcutter (Vincze et al., 2003) により実施し、NEBcutter の制限酵素リストから種判別可能な断片を得ることができると推測された *Ssp I* (認識配列: AATATT) を採用した。PCR 条件およびプライマーは、前述の *cyt b* 領域の増幅に用いた条件と同一とした。RFLP 分析は、制限酵素 *Ssp I* (TaKaRa Bio Inc., Japan) 0.5 μl (5 units), 10 × *Ssp I* Buffer (TaKaRa Bio Inc., Japan) 1 μl, milliQ 4.5 μl, 増幅産物 4 μl からなる 10 μl に調整した後、37°C で 2 時間インキュベーションを行った。消化サンプルに 10 × Loading Buffer (TaKaRa Bio Inc., Japan) 1 μl を添加し、酵素反応を停止した後、1 kb Plus DNA Ladder (N3200S, New England Biolabs, USA) と共に ethidium bromide で染色した 2.0% アガロースゲルで 25 分間電気泳動 (10 μl) し、DNA 断片長を比較した。

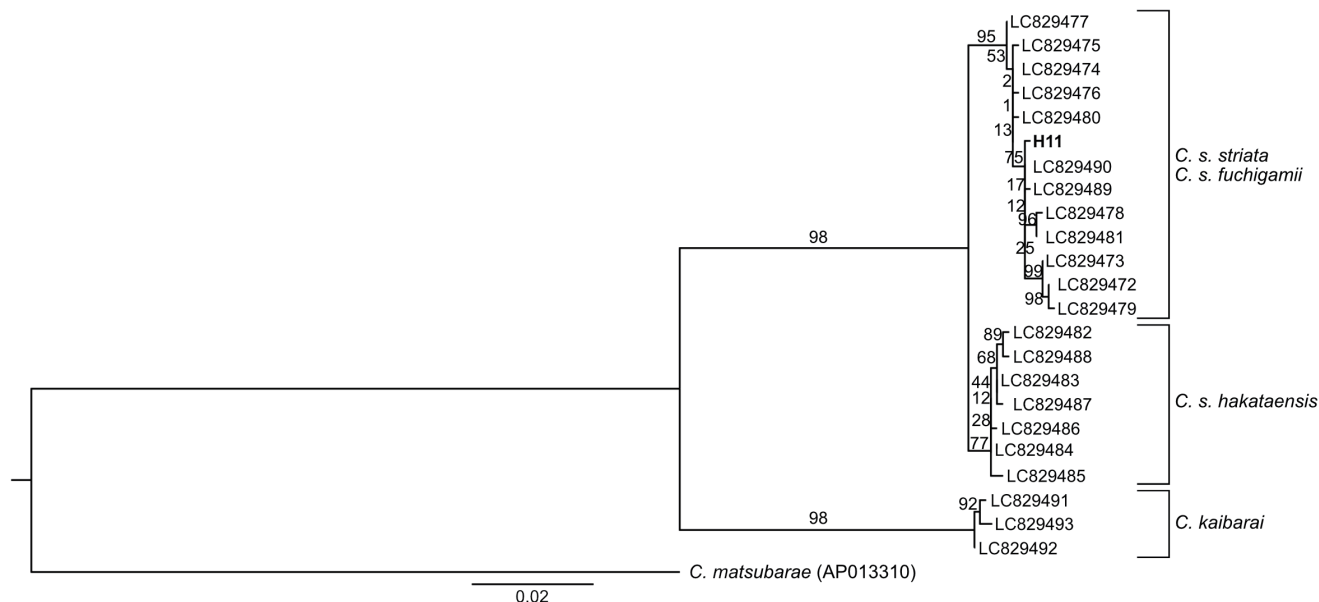


Fig. 1. Maximum likelihood tree of the haplotypes of *Cobitis striata striata* (LC829489, 829490), *Cobitis striata fuchigamii* (LC829472–829481), *Cobitis striata hakataensis* (LC829482–829488), and *C. s. striata* or *C. s. fuchigamii* (H11: LC907709) based on the *cyt b* region. The support of each branch is indicated by percentages on each node. The scale bar signifies a 0.02 substitutions/site. *Cobitis kaibarai* (LC829491–829493) and *Cobitis matsubarae* (AP013310) is used as the outgroups.

結果と考察

博多湾流入河川からの非在来 mtDNA ハプロタイプの

検出 博多湾に流入するハカタスジシマドジョウの生息水系 1 河川において、これまで確認されていなかったハプロタイプ (H11: LC907709) が確認され、この H11 の種判別と系統的位置の推定のため、既知のナミスジシマドジョウ 3 亜種の *cyt b* 部分配列に基づく系統樹 (Fig. 1), およびハプロタイプネットワークを構築した (Fig. 2). 系統解析の結果、H11 はハカタスジシマドジョウのクレードには属さず、チュウガタスジシマドジョウとオンガスジシマドジョウが属する集団内に位置付けられた (Figs. 1–2). この結果より、H11 がハカタスジシマドジョウ内にみられるハプロタイプではなく、調査水系には分布しないチュウガタスジシマドジョウまたはオンガスジシマドジョウのいずれかに由来するものである可能性が示された. BLAST ([URL](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) 検索の結果、H11 (LC90770) は岡山県産のチュウガタスジシマドジョウ (LC829490) の相同配列と最も高い一致率を示し (% identity = 99.9%, Query coverage = 100%, E-value = 0.0, Max and Total score = 1879), 次位ヒットは福岡県産のチュウガタスジシマドジョウ (LC829489; % identity = 99.8%, Query coverage = 100%, E-value = 0.0, Max and Total score = 1873), さらにオンガスジシマドジョウ (LC829474; % identity = 99.7%, Query coverage = 100%, E-value = 0.0, Max and Total score = 1867) の相同配列が続いた. ハプロタイプネットワークからも H11 は岡山県産のチュウガタスジシマドジョウの相同配列に最も類似することが示されたものの、本解析ではチュウガタスジシマドジョウの分布域である本州・四国を含む集団を網羅する登録データが得

られず、ネットワークは限定的な情報に基づくものであり、H11 の由来となる集団の特定には至らなかった. さらにチュウガタスジシマドジョウと遺伝的距離の近いオンガスジシマドジョウとハカタスジシマドジョウは、分布域が隣接していることを考慮すると、過去の二次接触に起因する集団内多型の可能性も排除できない.

以上の結果から、H11 はハカタスジシマドジョウのハプロタイプとは異なり、チュウガタスジシマドジョウもしくはオンガスジシマドジョウ由来である可能性が現時点では有力であるが、本研究の結果のみではその由来を断定することは困難であり、複数の可能性 (移入、過去の二次接触、集団内多型) を考慮する必要がある.

ハカタスジシマドジョウ、オンガスジシマドジョウとチュウガタスジシマドジョウは非繁殖期の体側の模様が異なることにより識別可能とされているが、繁殖期にはハカタスジシマドジョウとオンガスジシマドジョウの雄の模様が変化し、チュウガタスジシマドジョウと類似するため、外見的な判別が難しい時期を伴う (Nakajima, 2012; 中島・内山, 2017). したがって、これらの同定には形態的特徴と DNA バーコーディングを併用することが有効である.

制限酵素 *Ssp I* の推定切断長 ハカタスジシマドジョウではすべてのサンプルにおいて、1020 bp の配列中に *Ssp I* の認識配列が 2 カ所であるのに対し、オンガスジシマドジョウとチュウガタスジシマドジョウでは、認識配列が 1 カ所であり、アリアケスジシマドジョウでは認識配列が 3 カ所、ヤマトシマドジョウでは認識配列が 1 カ所であった. オンガスジシマドジョウとチュウガタスジシマドジョウを除く 3 種・亜種については、認識配列の位置や

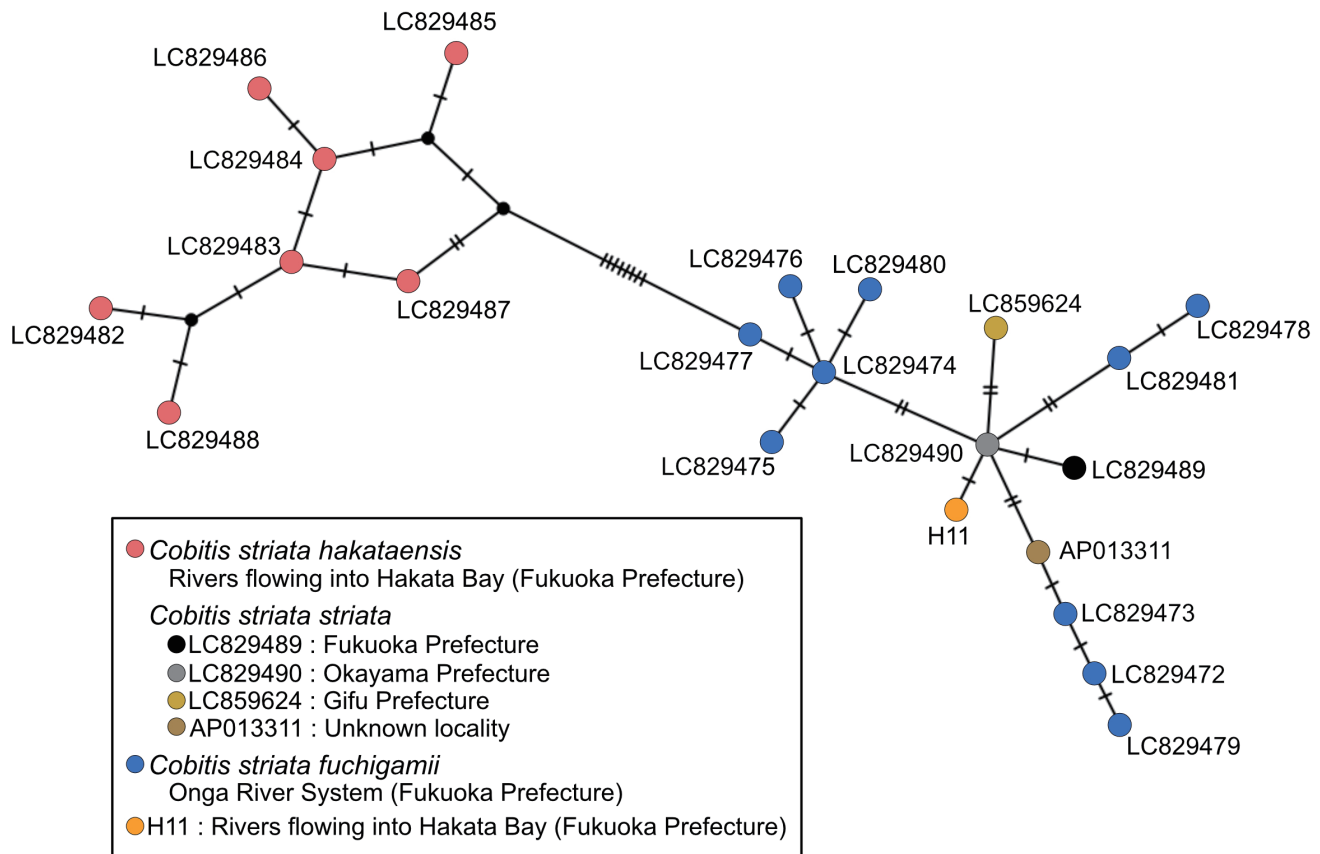


Fig. 2. The statistical parsimony network for mtDNA haplotypes of *Cobitis striata striata* (LC829489, 829490, 859624, AP013311), *Cobitis striata fuchigamii* (LC829472–829481), *Cobitis striata hakataensis* (LC829482–829488), and *C. s. striata* or *C. s. fuchigamii* (H11: C907709) using the *cyt b* genes. The number of lines between nodes indicates the number of base substitutions.

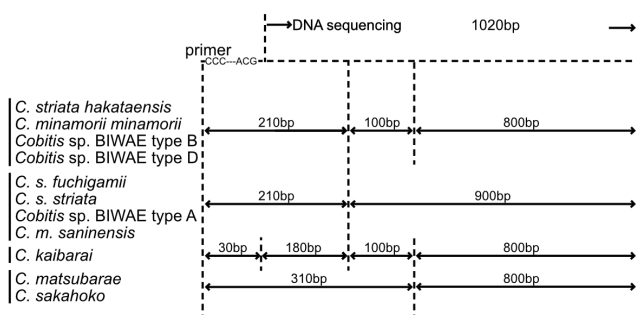


Fig. 3. Restriction profiles of the *cyt b* region fragment digested by restriction enzymes (*Ssp I*) for 11 species/subspecies of genus *Cobitis*. These profiles were created using registered sequences from GenBank: *Cobitis striata striata* (LC829489, 829490, AP013311), *Cobitis striata fuchigamii* (LC829472–829474), and *Cobitis striata hakataensis* (LC829482–829484), *Cobitis kaibarai* (LC829491–829493), *Cobitis matsubarae* (AP0133310), *Cobitis sakahoko* (LC819053, 819054), *Cobitis minamorii minamorii* (AP013309), *Cobitis minamorii saninensis* (PP895291), *Cobitis* sp. BIWAE type A (LC744429), *Cobitis* sp. BIWAE type B (LC744430, 744431, 535846), *Cobitis* sp. BIWAE type D (LC533345).

個数が異なっており (Fig. 3), この制限酵素を用いることで, PCR-RFLP 分析による種判別が可能であると推定された. なおオングスジシマドジョウとチュウガタスジシマド

ジョウでは, 本手法では切断長に差が認められず (Fig. 3), mtDNA に基づく系統解析でも両亜種は極めて近縁であり, 単系統性が認められない (中島・内山, 2017; Nagae et al., 2025). したがって, オングスジシマドジョウとチュウガタスジシマドジョウに関しては mtDNA *cyt b* 領域における両亜種の判別は困難であると推察される.

さらに, チュウガタスジシマドジョウと分布域が重複するシマドジョウ属の他種・亜種 [オオヨドシマドジョウ *Cobitis sakahoko* Nakajima and Suzawa, 2015 (LC819053, 819054: Oka et al., 2025a, b), サンヨウコガタスジシマドジョウ *Cobitis minamorii minamorii* Nakajima, 2012 (AP013309: Miya, 2016a), サンインコガタスジシマドジョウ *Cobitis minamorii saninensis* Nakajima, 2012 (PP895291: Heo et al., 2025), オオシマドジョウ *Cobitis* sp. BIWAE type A (LC744429: Sado et al., 2022a), ニシシマドジョウ *Cobitis* sp. BIWAE type B (LC744430, 744431, 535846: Miuchi and Sekiguchi, 2020; Sado et al., 2022b, c), トサシマドジョウ *Cobitis* sp. BIWAE type D (LC533345: Nakamura et al., 2020)] についても, 登録配列を用いて認識配列の有無を確認した. その結果, いずれの種・亜種でも *Ssp I* の認識配列は確認されたが, ハカタスジシマドジョウとサンヨウコガタスジシマドジョウ, ニシシマドジョウおよびトサシマドジョウ

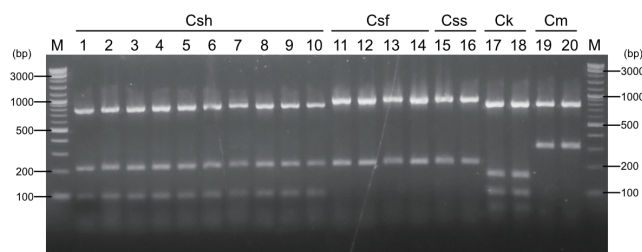


Fig. 4. Restriction profiles of the *cyt b* fragment digested by restriction enzymes (*Ssp I*) for the five species/subspecies of genus *Cobitis*. DNA ladder sizes are indicated on both sides. Csh: *Cobitis striata hakataensis*, Csf: *Cobitis striata fuchigamii*, Css: *Cobitis striata striata*, Ck: *Cobitis kaibarai*, Cm: *Cobitis matsubarae*.

は、同様の切断長パターンである可能性が示唆された (Fig. 3). このため、ハカタスジシマドジョウの生息地に上記3種・亜種が侵入した場合、本手法では判別ができないため、形態的特徴に基づく同定、他の制限酵素との組み合わせやシーケンシングの併用が必要である。

PCR-RFLP に基づく種・亜種判別 PCR-RFLP 分析の結果、確認された切断片長は推定切断長と合致していた (Figs. 3–4). BLAST 検索においてチュウガタスジシマドジョウの相同領域との一致率が高かった H11 を有する個体については、チュウガタスジシマドジョウおよびオンガスジシマドジョウと同様のバンド (900 bp, 210 bp) を示した (Fig. 5: H11 水色枠). さらに、オンガスジシマドジョウの1個体 (LC829477: Nagae et al., 2025) については、ハカタスジシマドジョウと同様のバンド (800 bp, 210 bp, 100 bp) を示した (Fig. 5: Csf 赤色枠). 当該サンプルの配列を確認したところ、認識配列 (AATATT) が2カ所存在していた. この変異により、切断パターンが推定切断長と異なると考えられる. さらに、登録配列を用いた検索では、オンガスジシマドジョウ 116 個体 (LC829472–LC829481: Nagae et al., 2025) のうち、この個体のみが認識配列を2カ所所有しており、出現率は 0.8% であった. チュウガタスジシマドジョウについては、本研究および登録配列 (LC829489, LC829490: Nagae et al., 2025; AP013311: Miya, 2016b) では、認識配列が1カ所であったが、LC859624 (Mukai and Tani-gawa, 2025) では同様に2カ所確認された. これらの結果は、種内多型および認識配列変異の存在を示唆しており、判別精度の向上には、より多くの地域集団を含む追加データの収集と検証が必要である。

本研究では、制限酵素 *Ssp I* を用いた PCR-RFLP 分析により、ハカタスジシマドジョウと九州北部に分布する他種・亜種を大部分の個体で判別できる可能性を示した. オンガスジシマドジョウとチュウガタスジシマドジョウについては、切断パターンが同一であり、PCR-RFLP のみで

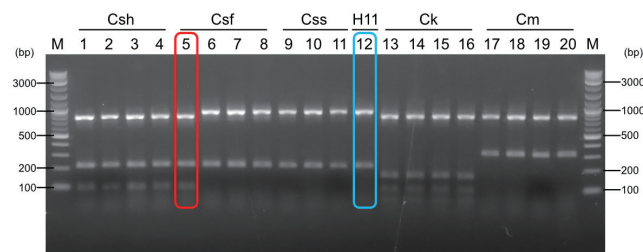


Fig. 5. Restriction profiles of the *cyt b* fragment digested by restriction enzymes (*Ssp I*) for the five species/subspecies of genus *Cobitis*. The left and right end lane represents the molecular marker. DNA ladder sizes are indicated on both sides. Csh: *Cobitis striata hakataensis*, Csf: *Cobitis striata fuchigamii*, Css: *Cobitis striata striata*, Ck: *Cobitis kaibarai*, Cm: *Cobitis matsubarae*. The red frame indicates an individual exhibiting an irregular band pattern. The light blue box indicates H11 (individuals showing the haplotype of *C. s. striata* or *C. s. fuchigamii*).

は明確な判別が困難である一方、ハカタスジシマドジョウを含むその他の種・亜種については、異なるバンドパターンが得られ、判別が可能であった. 今回見つかったハカタスジシマドジョウの生息地における非在来の可能性をもつ mtDNA に対し、この手法は迅速なスクリーニング法として有用となる. ただし、例外的な個体や種内多型の存在から、単独での判別には限界がある. したがって、形態学的特徴との併用が推奨され、判別困難な個体についてはシーケンシングによる確認が必要である. さらに、追加データの収集や他の制限酵素との組み合わせによる精度向上が今後の課題である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、九州大学アクアフィールド科学研究室の信澤 輝氏、田中武流氏をはじめとする皆様には採集にご協力いただいた. 福岡県保健環境研究所の中島淳博士には研究に対するご助言をいただいた. 九州大学技術職員の安藤大樹氏には、分子実験に関するご助言をいただいた. 以上の方々に謹んで感謝の意を表する. 本稿の改訂にあたり適切な助言をいただいた匿名の査読者に厚く感謝申し上げる. 本研究は、JSPS 研究奨励費 (24KJ1768) および環境省・(独) 環境再生保全機構の環境研究総合推進費 (JPMEERF20254003) により実施した. なお、ハカタスジシマドジョウの採捕に際しては、大学における教育又は学術研究のための国内希少野生動植物種捕獲等届出書 (九大環安第 22 号) を提出し、許可を得て実施した.

引用文献

- 福岡県. 2021. 福岡県希少野生動植物種の保護に関する条例. URL (4 Dec. 2025)
- 福岡県. 2023. 県政概要. URL (4 Dec. 2025)
- 福岡県環境部自然環境課. 2025. 福岡県の希少野生生物 — 福岡県レッドデータブック 2024 —. 福岡県環境部自然環境課, 福岡. 861 pp.

- Heo, J., N. Onikura, R. Y. Myung, D. S. Choi and Y. J. Won. 2025. *Cobitis minamorii saninensis* isolate Zammochi River mitochondrion, complete genome. GenBank. [URL](#) (16 Dec. 2025)
- Hoang, D. T., O. Chernomor, A. Von Haeseler, B. Q. Minh and L. S. Vinh. 2018. UFBBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 518–522.
- Kalyaanamoorthy, S., B. Q. Minh, T. K. Wong, A. Von Haeseler and L. S. Jermiin. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14: 587–589.
- 環境省. 2020. 環境省レッドリスト 2020. [URL](#) (4 Dec. 2025)
- 環境省. 2024. 国内希少野生動植物種一覧. 環境省ホームページ. [URL](#) (4 Dec. 2025)
- 北川えみ・中島 淳・星野和夫・北川忠生. 2009. 九州北東部におけるシマドジョウ属魚類の分布パターンとその成立過程に関する考察. *魚類学雑誌*, 56: 7–19.
- Kumar S, G. Stecher, Li. Michael, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549.
- Leigh, J. W. and D. Bryant. 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110–1116.
- Miuchi, Y and S. Sekiguchi. 2020. *Cobitis* sp. BIWAE type B mitochondrial CYTB gene for cytochrome b, partial cds, haplotype: B-Hap1. GenBank. [URL](#) (17 Dec. 2025)
- Miya, M. 2013. *Cobitis matsubarae* mitochondrial DNA, complete genome, specimen_voucher: CBM:ZF:1120. GenBank. [URL](#) (4 Dec. 2025)
- Miya, M. 2016a. *Cobitis minamorii minamorii* mitochondrial DNA, complete genome, specimen_voucher: CBM:ZF:11445. GenBank. [URL](#) (16 Dec. 2025)
- Miya, M. 2016b. *Cobitis striata striata* mitochondrial DNA, complete genome, specimen_voucher: CBM:ZF:11183. GenBank. [URL](#) (4 Dec. 2025)
- Mukai, T. and G. Tanigawa. 2025. *Cobitis striata striata* GPM:Z 43903 mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds. [URL](#) (4 Dec. 2025)
- Nagae, K., Y. Kurita, D. Ando and N. Onikura. 2025. Population structure of *Cobitis striata* complex (Cypriniformes, Cobitidae) based on the mitochondrial DNA in Northern Kyushu, Japan. *Ichthyological Research*, doi: 10.1007/s10228-025-01042-x (Sept. 2025).
- Nakajima, J. 2012. Taxonomic study of the *Cobitis striata* complex (Cypriniformes, Cobitidae) in Japan. *Zootaxa*, 3586: 103–130.
- 中島 淳・内山りゅう. 2017. 日本のドジョウ 形態・生態・文化と図鑑. 山と溪谷社, 東京. 223 pp.
- Nakamura, M., R. Souma, Y. Ichitsuka and T. Kushida. 2020. *Cobitis* sp. BIWAE type D JNC198 mitochondrial cytb gene for cytochrome b, partial cds. GenBank. [URL](#) (17 Dec. 2025)
- Nguyen, L. T., H. A. Schmidt, A. Von Haeseler and B. Q. Minh. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32: 268–274.
- Oka, H., Y. Yashima and T. Kitagawa. 2025a. *Cobitis sakahoko* h38 mitochondrial cytb gene for cytochrome b, partial cds. GenBank. [URL](#) (17 Dec. 2025)
- Oka, H., Y. Yashima and T. Kitagawa. 2025b. *Cobitis sakahoko* h39 mitochondrial cytb gene for cytochrome b, partial cds. GenBank. [URL](#) (17 Dec. 2025)
- Sado, T., T. Fukuchi and M. Miya. 2022a. *Cobitis* sp. BIWAE type A CB-M:ZF:15227 mitochondrial Cyt b gene for cytochrome b, complete cds. GenBank. [URL](#) (17 Dec. 2025)
- Sado, T., T. Fukuchi and M. Miya. 2022b. *Cobitis* sp. BIWAE type B CB-M:ZF:14817 mitochondrial Cyt b gene for cytochrome b, complete cds. GenBank. [URL](#) (17 Dec. 2025)
- Sado, T., T. Fukuchi and M. Miya. 2022c. *Cobitis* sp. BIWAE type B CB-M:ZF:14819 mitochondrial Cyt b gene for cytochrome b, complete cds. GenBank. [URL](#) (17 Dec. 2025)
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.
- Villesen, P. 2007. FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes*, 7: 965–968.
- Vincze, T., J. Posfai and R. J. Roberts. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31: 3688–3691.