

## ●総説

# DNA多型解析による昆虫の種間および種内変異解析 —基礎的研究から応用面への適用まで—

野村昌史

千葉大学大学院園芸学研究科

## Inter- and intra-specific variation of insects using DNA polymorphism —From fundamental study to adaptation for applied entomology—

Masashi Nomura

Graduate School of Horticulture, Chiba University

Molecular approach - such as evaluation of species diversity, and molecular phylogenetic study - is major technique for numerous fields of biology. Insects are highly evolved organisms because of their species richness and population size. And there are many studies using DNA in entomology. Then, I reviewed molecular study of insects such as RAPD, RFLP, PCR-RFLP, Multiplex PCR and DNA barcode based on references published so far. In addition, I discussed the problem of molecular adaptation to DNA barcode of insects. Then, I introduced molecular phylogenetic analysis and molecular identification study of our laboratory. In conclusion, I pointed out prospects of the adaptation molecular technique to agricultural pests or natural enemies.

### はじめに

PCR (polymerase chain reaction) の普及により現在、様々な生物を対象に、いろいろな分野において遺伝子を用いた研究が行われている。その研究する分野については遺伝学や分類学的な領域はもちろん、生態学的な研究においても活用されており、分子マーカーという形で今やなくてはならない研究手法である。分類学的な領域については形態では進化の道筋が明らかにできなかったような生物群 (例えばバクテリアなどの微生物) では遺伝子の違いで種の記載が行われている (例えば Ivanovaa et al., 2007; Boltyanskaya et al., 2007など)。またこれまでの形態による系統発生とは異なる新たな視点で進化を論じる研究も盛んに行われている (例えば Nikaido et al., 1999; Whiting et al., 2003; Als et al., 2004など)。このようにこれまでの遺伝子を用いた研究を一変させてしまった画期的な手法であるPCRだが、現在では世界中のほとんどの研究機関ではこの装置を用いて遺伝子の解析を行うことができる環境が整っている。

昆虫類はその多様性と適応力でこの地球上でもっとも繁栄している生物であるから、この多様性の秘密を解き明かすべく多くの遺伝子に関する研究がどんどん公表されている。そして形態やその他の形質と遺伝子情報を組み合わせながら多くの興味深い研究が行われている。

こういった研究に用いられている手法としては、遺伝子の塩基配列を直接比較する他に、塩基配列情報からDNAの変異している部位を利用して簡易に比較を行うDNA多型解析も盛んである。

本稿では主としてDNA多型解析を用いた昆虫類の種間の比較や種内変異解析に関する研究を紹介するとともに、この分野の農業関係への適用についても言及したい。また最後に研究室でこれまで行ってきたヤガ科のキンウワバ類を材料とした系統発生的なアプローチや種間比較の研究を紹介する。

### 1. RFLP, RAPD法

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 制限酵素断片長多型) は、DNAを抽出し、これを制限酵素によって切断して得られたDNA断片の長さが、種間や同一種内の個体間で異なる、つまり多型を示すことである。制限酵素は特定の配列を検出してその部位を切断するが、突然変異により比較する種や個体間で制限酵素の認識する位置の塩基配列が置換されていると、切断されたりされなくなったりするので、この多型を検出することができる。核DNAは長すぎるので、たいいてい場合はミトコンドリアなど短い塩基配列のDNAを抽出してこれを制限酵素で処理する。わざわざミトコンドリアDNAを核のDNAと分けて抽出する必要があるなど手間がかかってしまうので、今では後述するPCR-RFLPの方が一般的となっている。

一方、RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) とは10bp程度の短いランダムな (遺伝子などの意味を持たない) プライマーを1種類入れてPCR反応させ、ランダムに増幅されたDNA断片を種間等で比較して種の同定や系統関係を推定する方法であるが、ランダムなプライマーを低いアニーリング温度で増幅するという手法のため、得られた断片の出現

には再現性が得られない場合もあって、今ではあまり用いられていない。

Vanlerberghe - Masutti(2004) は卵寄生蜂であるタマゴバチにこのRFLPとRAPDを適用し、種の同定や系統関係を推定している。タマゴバチという大変微小な昆虫のしかもミトコンドリアDNAを抽出するには、母系遺伝するミトコンドリアDNAの性質から単メス系統にした大量のタマゴバチを供試しているが、写真などが判然としないため(写真を掲載したのは評価したいが) わかりづらい結果となっている。

## 2. PCR-RFLP法

PCRに用いるプライマーの設計が容易になったため、現在ではPCRでDNAの一部を増幅し、その反応生成物を制限酵素で切断する手法であるPCR-RFLP法が主流になっている。つまり目的とする遺伝子をPCRで増やした後、得られたDNA領域を制限酵素で切断してから電気泳動を行い断片の比較を行うものである。この場合だと制限酵素で切断するDNAが増幅されているものなので、切断したDNA断片ははっきり確認できる。

大類ら(2000)は、外部形態による識別が困難であるオオタバコガとタバコガについてミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子の一部を使ってPCR-RFLP法による解析を行っている。その結果、塩基配列の変異性から2種の制限酵素で両種の識別が可能であることが明らかとなった。さらにこの断片長の違いをマーカーとして全国各地の両種の分布についても調査を行い、両種が国内に広く分布していることを示している。はじめに目的とする領域の塩基配列も明らかにするなど大類ら(2000)の研究は緻密なものであるが、塩基配列解析を行う事ができない場合には増幅した断片にいくつかの制限酵素を処理して断片に差がみられるかどうかを細かくスクリーニングしていく手法も可能である。またDNAの塩基配列を受託解析してからルーチンワークとしてPCR-RFLPを行う研究実施体制も十分可能である。

この他にPCR-RFLPを利用した研究としては野外での生態解明の一環としてヤガ科の蛾であるオオタバコガの仲間 *Heliothis* (現 *Helicoverpa*) *virescens* とその近縁種 *H. subflexa* との交雑個体を識別するのに適用した研究(Roehrdanz, 1994) や卵寄生蜂のタマゴバチの解析例が報告されている(Silva et al., 1999)。またやはり寄生蜂だがコガネバチの仲間の同定にも用いられている(Taylor, 1999)。また、外部形態の同定がきわめて困難な *Liriomyza* 属のハモグリバエ類の同定にもこの手法が活用されており、アシグロハモグリバエ *L. huidobrensis* と他種との識別(Scheffer et al., 2001; Masetti et al., 2006)、マメハモグリバエやアシグロハモグリバエなどの識別(Kox et al., 2005) と、研究例も多くみられる。いずれもゲル上のバンド

で視覚的に種の識別が行える。

## 3. マルチプレックスPCR

マルチプレックス(Multiplex)PCRは、一つのPCR反応系に複数のプライマー対を同時に使用することで、複数の遺伝子領域を同時に増幅する方法である。これによって一度のPCRと電気泳動で複数の増幅産物が同時に検出できることから、迅速に変異を識別することができる。しかし、マルチプレックスPCRを行う際には、それぞれのターゲットの増幅が一回のPCR反応系で良好に行えるように、使用するプライマーの設定、反応条件の検討を行わなければならない、煩雑な作業が必要となる。特に近縁種の比較を行う際はわずかに異なる塩基配列をもとに一方の種の配列しかアニールしないプライマー配列と反応条件を決めていくので、はじめに塩基配列の解析を行いその情報を基にプライマー条件を決定していくことになる。しかし一度この条件が決まってしまうあとはPCR反応を行うだけなので、手軽な同定法になる。公表されている研究の多くは、300bp程度の比較的短い塩基配列をもとに分類群間で比較し、その中のわずかな塩基配列の違いを検出できるようプライマーを設計し、これらのプライマーを用いてDNAを増幅してそのバンドの数や位置から識別を行っているものが多い。

マルチプレックスPCRを同定に活用した例は *Cecidophyopsis* 属のダニ類7種の同定(Lava Kumar et al., 1999) や、RAPDのマーカーを活用してコガタハマダラカの同定を行った例(Kengne et al., 2001)、オオサシガメ類の隠蔽的な種群の同定(Pavan and Monteiro, 2007) に活用されている。また天敵昆虫にもなっているヒメハナカメムシ類5種の同定や(Hinamoto et al., 2004)、卵寄生蜂のタマゴバチの同定にも有用な結果が得られている(Davies, 2006)。さらにはトウモロコシの重要害虫であるハムシ(甲虫)の Northern Corn Rootworm やその近縁種の識別に使用している(Roehrdanz, 2003)。また日本のトマトハウスで混発しているトマトハモグリバエとナスハモグリバエの識別にもマルチプレックスPCRが役立っている(Miura et al., 2004)。

## 4. DNAバーコードと遺伝子適用の問題点

ミトコンドリアの *COI*(Cytochrome c oxidase subunit I) 遺伝子の塩基配列情報を用いた場合、ほぼすべての動物を種レベルで識別することができ、これを照らし合わせればだいたいどの分類群に属するかわかるということで「DNAバーコード」と命名され(Hebert et al., 2003)、その後、「DNAバーコードに基づく同定支援システム」のもとに Consortium for The Barcode of Life(CBOL) という組織が設立され、全動物群の

DNAバーコードのデータベース化を目的とした情報の蓄積が進んでいる。農業害虫は鳥類、魚類、外来生物とともに重点課題の一つとされていることから昆虫の情報蓄積や研究も盛んに行われている。例えば熱帯のチョウ目昆虫について (Hajibabaei et al., 2006) トンボの仲間についての解析 (Rach et al., 2008) など多数の研究が行われており、いずれもDNAバーコードによって種の識別や同定等に有効であることを示しているものが多い、さらにはDNAバーコードの解析を進める過程で隠蔽種 (形態的に区別が困難であるが、生物学的に別種と認識される種) の存在が明らかになった例もある (Hebert et al., 2004)。このHebert et al. (2004) によると1種とされてきたセセリチョウが10種にも分かれるほどDNAの塩基配列が異なっており、この情報に基づいて改めて他の形質すなわち生態や幼虫形態を調べてみるとやはり別種であることが判明したということである。また寄生性のハエ類についての解析では寄生バエとその寄主との関係でこれまで判明していなかった関係が明らかになったり (Smith et al., 2007b)、いろいろな寄主に寄生するジェネラリストだと思われていた16種は特定の寄主に寄生する種であったことが明らかになるなど (Smith et al., 2007b)、バーコードによってこれまで分からなかった新しい知見も明らかになっている。

このように今後ますます発展していく印象が強いDNAバーコードプロジェクトであるが、問題点もある。大きな問題点は selective sweep と呼ばれるミトコンドリアDNAが特定のタイプに置き換わってしまう遺伝子浸透現象である。この現象には *Wolbachia* など細胞質共生微生物が大きく関与している。Jiggins (2003) の報告では寄生することによってオスの胚が死んでしまうオス殺しという現象を引き起こす *Wolbachia* によってタテハチョウの一種であるエンケドンホソチョウと近縁種のミトコンドリアDNAは、*Wolbachia* の寄生によって特定の型の遺伝子が両種間に広まってしまいミトコンドリア遺伝子では両種の識別が出来ないことになってしまう。これと全く同じ現象を我々もキチョウで発見した (Narita et al., 2006)。日本に生息しているキチョウは現在、南西諸島に分布するキチョウと、南西諸島以北に分布しているキタキチョウに分かれることが最近明らかとなったが、細胞質不適合性を引き起こす *Wolbachia* の寄生によって、キチョウとキタキチョウのミトコンドリアDNAはほとんど同じタイプが広まってしまっており、*Wolbachia* 寄生個体が大多数となっている日本のキチョウ2種を *COI* の塩基配列で分けることは出来ない。もちろん核DNAは2種間で異なるので、きちんと両種を分けることが出来る (Narita et al., 2006)。こうした *Wolbachia* の感染とミトコンドリアDNAが一致しない例は他にもクロバエの仲間でも報告されており (Whitworth et al., 2007)、ミトコンドリアDNAの *COI* 遺伝子を用いたDNAバーコードだけで種を同定することは出来ない例が今後も多く

なってくると考えられる。

しかしながら *Wolbachia* の寄生の有無を確認するなどの手順は必用かもしれないが、多くの種においてバーコード情報は有効だと考えられ、完全ではないが今後の動物の同定作業において1つの柱となる可能性を秘めている。

## 5. 研究の具体例：キンウワバ類のDNA解析

キンウワバ類とはヤガ科のキンウワバ亜科に属する蛾の仲間であら世界に約400種、日本には60余種が記載されており (Kitching, 1987; 杉, 1982; 杉, 2000)、成虫および他のステージの外部形態の安定性からまとまった一群とみなされている。アメリカ合衆国ではイラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* をはじめ、日本には未分布だが *Autographa californica* や *Pseudoplusia includence* といった著名な害虫を含んでいるが、日本ではアブラナ科野菜等を食害するタマナギンウワバ *Autographa nigrisigna* やイラクサギンウワバ以外は防除の対象になっていない。しかしながら幼虫が狭食性から広食性を示す種類も多く、総合的害虫管理 (IPM) の普及に伴い減農薬によってこれまで圃場に進出していなかった種の発生がみられている。

キンウワバ類は各ステージの外見の安定性に反して、成虫の雌雄交尾器には変異性が高く、これを重視した分類体系は多くの属を創設し細分化が起こっている。一方、成虫だけでなく幼虫の形態も加味した研究では属をまとめる傾向がみられる。そこで研究室のグループではこれまでキンウワバ類について分子生物学的な解析を行い、系統関係や種内変異等を明らかにする研究を行っている。酵素の遺伝子頻度等による解析も行っているが (Nomura and Ichinose, 1990; Nomura, 1998)、ここでは本稿に関連したDNAの系統解析や近縁種の同定法について紹介したい。

### (1) ミトコンドリアDNAによる系統解析

日本産キンウワバ類25種を供試し、ミトコンドリアDNAの *ND5* (NADH dehydrogenase subunit 5) と *Cyt-b* (Cytchrome-b) の2遺伝子についてそれぞれ一部の塩基配列を決定した。*ND5* 遺伝子722bpと *Cyt-b* 遺伝子680bpを合わせて1402bpを用い、これを幼虫の腹脚が2対のキンウワバ類の中で4対の腹脚を持つなど原始的な種であることが明らかになっているマダラウワバを外群として、最節約法により系統図としたのがFig. 1である。

50%以上のブートストラップ確率を示す分岐も多く、概ね信頼度の高い系統図が得られた。系統図の構成種をみると既存の族 (tribe) や属 (genus) で比較的好くまとまっておき、これまでの形態による系統関係をよく反映しているものが多かった。しかしそれに当てはまらない関係、つまり既往

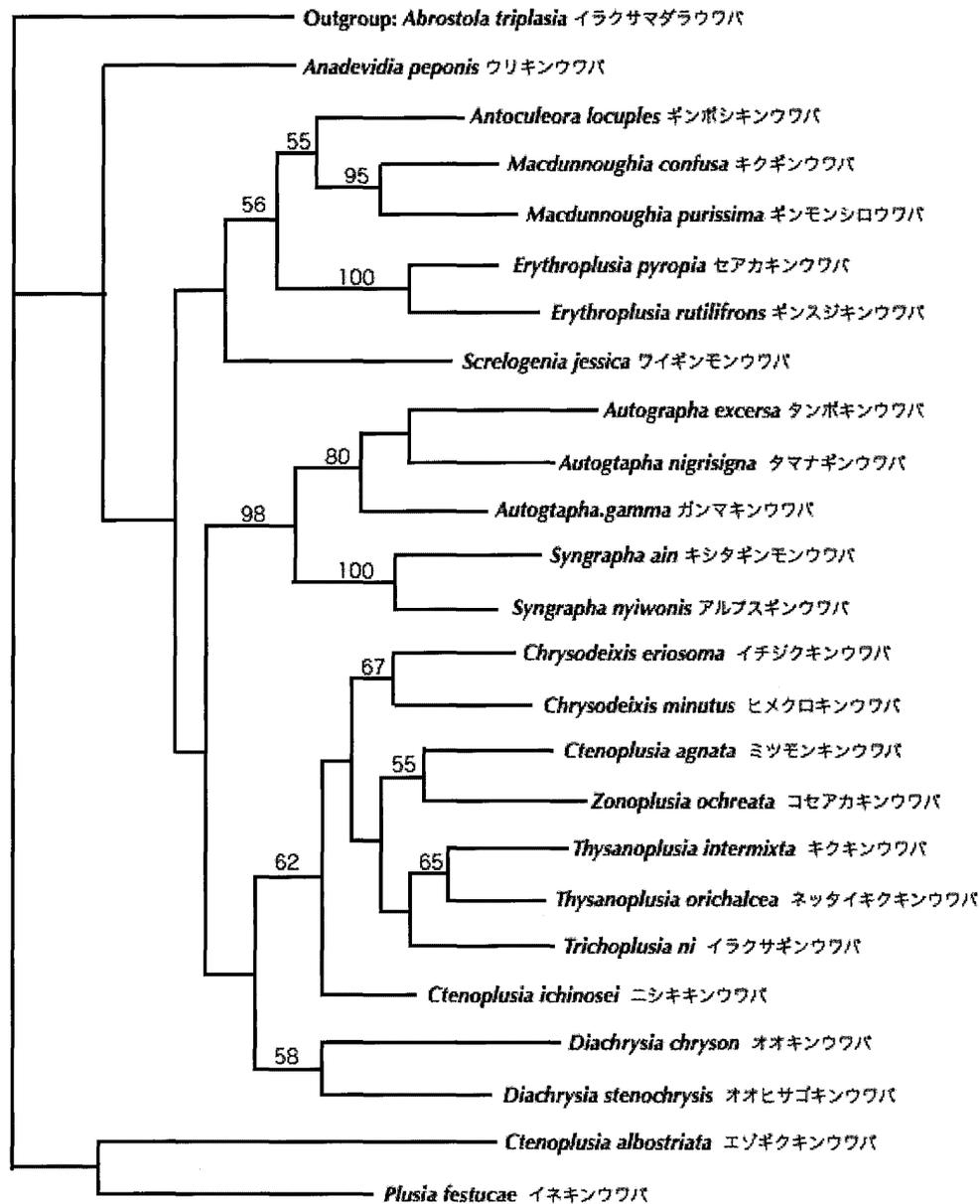


Fig. 1 Parsimony tree of 25 plusiine moths using 1404bp of *ND5* and *Cyt-b* genes of mitochondrial DNA

の形態形質による属の類縁関係と大きく異なる種もみられた。これについては今後の更なる解析が必要であるが、こうしたこれまでの系統関係と大きく異なっていた種は、これまでに酵素の遺伝子頻度解析で Nomura (1998) が指摘した種と同じであった。

その種とはウリキンウワバ *Anadevidia peponis*, イネキンウワバ *Plusia festucae* そしてエゾギクキンウワバ *Ctenoplusia albostrata* である。なかでもイネキンウワバとエゾギクキンウワバは外群指定したイラクサマダラウワバと同じぐらい亜科内の他種とは離れた関係を示し、ユニークな存在といえよう。次に遠縁な関係を示したウリキンウワバとともにこれら3種は、形態形質により所属している族の他種とは異なる食性を示すことが共通しており、それぞれの和名に代表的な食草の名前がキンウワバの前に冠されている。これらの種の存在はキンウワバ類の進化の道筋を考える上で大変興味深く、今後の解析もこれらの種を中心に進めていく予定である。さ

らに今後は現在盛んに行われているDNAバーコードの普及も視野に入れながら *COI* 遺伝子の解析なども行っていきたい。

## (2) 種の同定 (分子同定)

キンウワバ類は成虫の形態が類似した種も多いが、幼虫についてはどの種も似たような形態をしており、同定はきわめて困難である。一瀬 (1962) による腹部刺毛配列をもとにグループ分けすることは可能であるが、同じグループには複数の種が含まれるため、刺毛配列だけで種の同定には至らない。

そこで分子同定の手法を適用するために、レタスに発生し同じ刺毛配列を持つことから幼虫での同定が困難なタマナギンウワバとキクギンウワバの2種について、マルチプレックスPCRによって種の同定を試みた。両種のミトコンドリアDNAの *COII* (Cytochrome c oxidase subunit II) の一部の塩基配列を決定し、その配列からプライマーを設計し、タマナギンウ

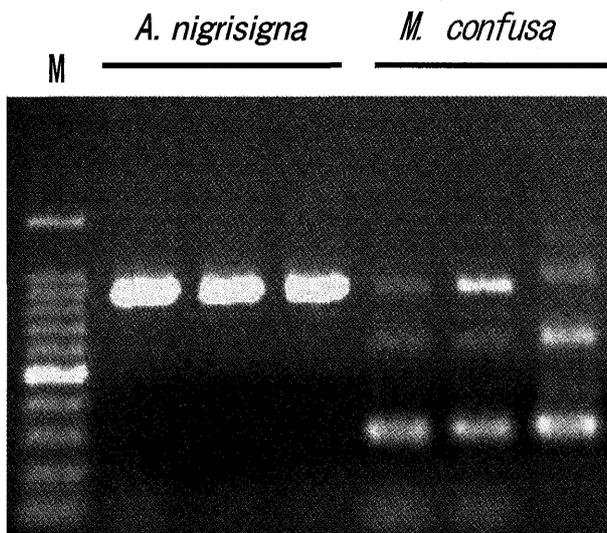


Fig. 2 PCR products of *Autographa nigrisigna* (left) and *Macdunnoughia confusa* (right) M: Marker (100bp DNA ladders) (Hashiyama et al., unpublished data)

ワバでは1つ、キクギンウワバでは3つの部位の増幅産物が現れるようにしたところFig. 2のような泳動像が得られ、識別できることが確認された。これを受けて圃場に発生する実際の幼虫の同定を行い、レタス圃場における両種の構成比などを明らかにしようと計画している。

## 6. 農業現場への適用

圃場に発生している害虫種については、採集して同定を行うおうにも寄生種による寄生や病気により飼育途中で死亡するものの割合が高く、これまでは不明とされるものが多かった。このため圃場における「真の」発生割合が明らかにできなかったが、今回紹介したような同定法により死亡個体でも種の識別ができる可能性が高くなった。今後はこういった手法の利用により多くのデータが蓄積されることが望ましい。

データの蓄積に際し、手法の改良も望まれるところである。研究機関では比較的簡単に遺伝子の解析を行うことができる状況にあるが、実際の農業の現場においてここで紹介したような種の同定技術などをすぐに行えるかとなると、現段階ではまだ難しいだろう。発生している害虫種を採集後、速やかに同定することができれば、防除を行う際の農業の選択などに役立つことが多いと考えられる。しかしながら今回挙げた手法はまだまだ解析に時間を要するものばかりである。どうしても採集して試験研究機関等で解析を行うことになる。

しかし今後の技術革新により、短時間で結果が得られ、誰にも簡単に使える新しい手法が開発され普及し、さらにコンパクトで安価な機器（または簡易なキット等）が出回れば、いつかは農業の現場での種の同定も可能な時代が来るかもしれないし、是非そういう段階になってほしいと希望したい。

## おわりに

遺伝子を使った昆虫の主な研究を紹介したが、もちろんここでは紹介しきれなかった様々な研究が行われており、昆虫の多様性や進化の道筋への解明に役立っている。

また今回あげた問題点はあるものの、遺伝子解析がここまで普及した現在、必要なのにも関わらずDNAを無視した研究は成り立たないといってもいいだろう。新しい手法を適用するごとに「この結果がこれまでの結果と違ったらどうするか？」というような声を聞くが、塩基配列解析が進み情報量が多くなった今ではそういう問題はほとんどなくなってしまった。全ゲノムを短期間に解析できてしまうような次世代型シーケンサーも登場している現在だが、一方では実験器具を必要としないほど簡便でコストも低い解析手法なども登場してほしいものである。

## 摘 要

分子生物学的なアプローチによる種の多様性評価や、進化の道筋を明らかにする分子系統解析は、今や様々な分野で主要な手法になっている。昆虫は種の多様性、個体数の多さで進化の頂点に立つ生物群であるが、遺伝子を使った解析には多くの研究がみられる。そこで様々な研究例を1) RFLP, RAPD法, 2) PCR-RFLP法, 3) マルチプレックスPCR, そして最近注目を集めている4) DNAバーコードについてまとめて整理するとともに、遺伝子の適用についての問題点を指摘した。またこうした分子アプローチの研究例として我々が行っているキンウワバ類の分子系統解析や分子同定法について紹介した。そして農業害虫や天敵類にこうした手法を適用するにあたっての今後の展望についても示した。

## 引用文献

- [1] Als, T.D., R. Vila, N.P. Kandul, D.R. Nash, S.H. Yen, Y.F. Hsu, A.A. Mignault, J.J. Boomsma and N.E. Pierce (2004) The evolution of alternative parasitic life histories in large blue butterflies. *Nature* 432. 386-390.
- [2] Boltysanskaya, Y.V., V.V. Kevbrin, A.M. Lysenko, T.V. Kolganova, T.P. Tourova, G.A. Osipov and T.N. Zhilina (2007) *Halomonas mongoliensis* sp. nov. and *Halomonas kenyensis* sp. nov., new haloalkaliphilic denitrifiers capable of N<sub>2</sub>O reduction, isolated from soda lakes. *Microbiology* 76. 739-747.
- [3] Davies, A.P., C.L. Lange and S.L. O'Neill (2006) A rapid single-step multiplex method for discriminating between *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species in Australia. *Journal of Economic Entomology* 99. 2142-2145.

- [4] Dupas, S., C. Gitau, B. Le Ru and J.-F. Silvain (2006) Single-step PCR differentiation of *Cotesia sesamiae* (Cameron) and *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) using poly DNA virus markers. *Annales de la Societe Entomologique de France* 42. 319–323.
- [5] Hajibabaei, M., D.H. Janzen, J.M. Burns, W. Hallwachs and P.D.N. Hebert (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103. 968–971.
- [6] Hebert, P.D., A. Cywinska, S.L. Ball, J. and R. DeWaard (2003) Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)*. S96–S99.
- [7] Hebert, P.D., E.H. Penton, J.M. Burns, D.H. Janzen and W. Hallwachs (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101. 14812–14817.
- [8] Hinomoto, N., M. Muraji, T. Noda, T. Shimizu and K. Kawasaki (2004) Identification of five *Orius* species in Japan by multiplex polymerase chain reaction. *Biol. Control* 16. 276–279.
- [9] Ivanovaa, E., N. Doroninaa and Y. Trotsenko (2007) *Hansschlegelia plantiphila* gen. nov. sp. nov., a new aerobic restricted facultative methylotrophic bacterium associated with plants. *Systematic and Applied Microbiology* 30. 444–452.
- [10] Jiggins, F.M. (2003) Male-Killing *Wolbachia* and Mitochondrial DNA: Selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics*. 164. 5–12.
- [11] Kengne, P., H.D. Trung, V. Baimai, M. Coosemans and S. Manguin (2001) A multiplex PCR-based method derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the identification of species of the *Anopheles minimus* group in southeast Asia. *Insect Mol. Biol.* 10. 427–435.
- [12] Kitching, I.J. (1987) Spectacles and silver Y's: a synthesis of the systematics, cladistics and biology of the Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull. Br. Mus. nat. Hist. (Ent.)* 54. 75–261.
- [13] Kox, L. F. F., H. E. van den Beld, B. I. Lindhout and L. J. W. de Goffau (2005) Identification of economically important *Liriomyza* species by PCR-RFLP analysis. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35. 79–85
- [14] Lava Kumar, P., B.Fenton, A. T.Jones (1999) Identification of *Cecidophyopsis mites* (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Mol. Biol.* 8. 347–357.
- [15] Masetti, A., A. Luchetti, B. Mantovani and G. Burgio (2006) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assays to distinguish *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) from associated species on lettuce cropping systems in Italy. *J. Econ. Entomol.* 99. 1268–1272.
- [16] Mitchell, A., C. Mitter and J. C. Regier (2000) More taxa or more characters revised: Combining data from nuclear protein-encoding genes for phylogenetic analyses of Noctuoidea (Insecta: Lepidoptera). *Syst. Biol.* 49. 202–224.
- [17] Miura, K., Y. Tagami, M. Ohtaishi and A. Iwasaki (2004) Application of molecular techniques to distinguish *Liriomyza trifolii* from *L. sativae* (Diptera: Agromyzidae) on tomato cultivation in Japan. *J. Econ. Entomol.* 97. 964–969.
- [18] Narita, S., M. Nomura, Y. Kato and T. Fukatsu (2006) Genetic structure of sibling butterfly species affected by *Wolbachia* infection sweep: Evolutionary and biogeographical implications. *Molecular Ecology*. 15. 1095–1108.
- [19] Nikaido, M., A.P. Rooney and N. Okada (1999) Phylogenetic relationships among Cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96. 10261–10266.
- [20] Nomura, M. and T. Ichinose (1990) Comparison of esterase zymograms among genera and species of Japanese Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 25. 140–143.
- [21] Nomura, M. (1998) Allozyme variation and genetic analyses of genera and species of Japanese Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 33. 513–523
- [22] 大類幸夫・松沢春雄・小池芳昭・吉松慎一 (2000) オオタバコガとタバコガのPCR-RFLP法による識別および日本のタバコ圃場におけるオオタバコガの発生調査への応用. *応動昆* 44. 73–79.
- [23] Pavan, M.G. and F.A. Monteiro (2007) A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Tropical Medicine and International Health*. 12. 751–758.
- [24] Rach, J., R. DeSalle, I.N. Sarkar, B. Schierwater and H. Hadrys (2008) Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proc. R. Soc. B* 275. 237–247.
- [25] Roehrdanz, R.L. (1994) Simple method for monitoring dispersal of *Heliothis* (Lepidoptera, Noctuidae) backcross sterility genes. *J. Econ. Entomol.* 87. 676–679.
- [26] Roehrdanz, R.L. (2003) Multiplex polymerase chain reaction method for differentiating western and northern corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 96. 669–672.
- [27] Scheffer, S.J., A. Wijesekara, D. Visser and R. H. Hallett (2001) Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism method to distinguish *Liriomyza huidobrensis* from *L. langei* (diptera: agromyzidae) applied to three recent leafminer invasions. *J. Econ. Entomol.* 94. 1177–1182.
- [28] Silva, I.M.M.S., J. Honda, F. van Kan, J. Hu, L. Neto, B. Pintureau and R. Stouthamer (1999) Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biol. Control*. 16. 177–184.
- [29] Smith, M.A., N.E. Woodley, D.H. Janzen, W.Hallwachs, P.D.N. Hebert (2007a) DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Dip-

- tera: Tachinidae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103. 3657-3662.
- [30] Smith, M.A., D.M. Wood, D.H. Janzen, W. Hallwachs and P.D.N. Hebert (2007b) DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104. 4967-4972.
- [31] 杉 繁郎 (1982) キンウワバ亜科. 日本産蛾類大図鑑 第一卷 (井上 寛・杉 繁郎・黒子 浩・森内 茂・川辺 湛 著) 講談社. 東京. pp. 827-838.
- [32] 杉 繁郎 (2000) 日本産蛾類大図鑑以後の追加種と学名の変更, 日本蛾類学会事務局. 東京. pp. 123-146.
- [33] Taylor, D. B. and A. L. Szalanski (1999) Identification of *Muscidifurax* spp. by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Biol. Control 15. 270-273.
- [34] Vanlerberghe-Masutti, F. (1994) Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. Insect Mol. Biol. 3. 229-237.
- [35] Weller, S. J., D. P. Pashley, J. A. Martin, J. and L. Constable (1994) Phylogeny of noctuid moths and the utility of combining independent nuclear and mitochondrial genes. Syst. Biol. 43. 194-211.
- [36] Whiting, M.F., Bradler, S. and Maxwell, T. (2003) Loss and recovery of wings in stick insects. Nature 421. 264-267.
- [37] Whitworth, T.L., R.D. Dawson, H. Magalon and E. Baudry (2007) DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Procalliphora* (Diptera: Calliphoridae). Proc. R. Soc. B 274. 1731-1739.

(受付：2008年1月28日 受理：2008年2月18日)