

植物検疫で問題となるハダニ類及びマイマイガ類の

分子生物学的手法による簡易識別法の開発

Development of a simple molecular identification method of spider mites and gypsy moths,

both problematic in plant quarantine

2018. 3

有本 誠

ARIMOTO Makoto

目 次

第 I 章 緒 言.....	1
第 II 章 輸入植物検疫で発見されるハダニ科 <i>Tetranychus</i> 属の PCR-RFLP 法による識別.....	12
はじめに	12
第 1 節 休眠雌成虫、幼若虫及び卵の DNA 調製法	15
1. 材料と方法.....	15
2. 結果と考察.....	19
第 2 節 輸入植物検疫で採集された雌成虫を用いた識別.....	24
1. 材料と方法	24
2. 結果	31
3. 考察	36
第 III 章 アジア型マイマイガを含むドクガ科 <i>Lymantria</i> 属の PCR-RFLP 法による識別	38
はじめに	38
第 1 節 ミトコンドリア DNA を用いた識別	44
1. 材料と方法	44
2. 結果	51
3. 考察	56
第 2 節 核リボソーム RNA を用いた識別	58
1. 材料と方法	58

2. 結果	63
3. 考察	66
第 IV 章 総合考察	69
摘 要.....	77
Summary.....	79
謝 辞.....	82
引用文献.....	83
付表・付図	93

第I章 緒言

我が国では、植物防疫法に基づき、農業生産の安全及び助長を図ることを目的として、農林水産省植物防疫所が植物検疫を行っている。植物検疫は、海外からの病虫害の侵入を防ぐために行う輸入植物検疫、輸出相手国の求めに応じて行う輸出植物検疫、国内における病虫害のまん延を防ぐために行う国内植物検疫からなる。近年、海上コンテナ輸送や航空機による国際的な物流の発達により、新規害虫等の国際的な発生事例が増加しており (Hulme 2009)、植物検疫の重要性が高まっている。

植物検疫では、発見される病虫害の種により検疫措置が異なるため、正確な種同定が求められる。一般的に、害虫の種を同定するためには、成虫の交尾器等の形態的特徴を確認する必要がある。しかしながら、植物検疫では害虫が卵や幼虫等の同定困難な発育ステージで発見される事例が多く、成虫を得るための飼育に時間と労力を要することが問題となっている。そのため、植物検疫の現場では、形態同定を補完する迅速かつ簡便な同定識別技術の導入が喫緊の課題となっている。

近年、ミトコンドリア DNA の cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) 領域や COII 領域、核リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の内部転写スペーサー (ITS) 領域等が様々な分類群の種の識別に有用であることが明らかにされている (Li et al. 2004; Su et al. 2006; Elfékih and Haymer 2010; Farris et al. 2010; Abd-Rabou et al. 2012; Matsuda et al. 2012)。植物検疫において同定困難な発育ステージで発見される害虫についても、これらの領域を用いた遺伝子診断により迅速に種を識別できる可能性がある。そこで本研究では、日本の輸入植物検疫及び輸出植物検疫において種の同定が問題となっている代表的な分類群を対象として、検疫の現場で採集されたサンプルを用いて解析・検証することにより、植物検疫における遺伝子診断の有用性を明らかにし、ひいては遺伝子診断による植物検疫の迅速化を提唱することを目的とした。

第 II 章では、輸入植物検疫で問題となっているハダニ科 *Tetranychus* 属を対象とした (図 1~図 4)。我が国の植物防疫法では、日本未記録種が検疫有害動物に指定されている。輸入植物検疫では、検疫有害動物種だけでなく、日本に分布する非検疫有害動物種も発見される。従って、検疫有害動物及び非検疫有害動物の両方の種の正確な同定が植物検疫措置を実施するために必要不可欠である。輸入植物検疫で発見される害虫の中で、ダニ目は発見頻度が高い主要 7 目の一つである (榎本ら 2001)。その中で、ハダニ科 *Tetranychus* 属は苗、切り花、生果実及び野菜等から最も多くの種が発見されている (真崎 1991, 2001; 真崎ら 1991; 金田・真崎 1994; 真崎・北村 2004)。これらの品目は長時間留め置くと品質が低下して商品価値が下がるため、発見される *Tetranychus* 属の迅速な種同定が強く求められている。同属の種を同定するためには雄成虫の挿入器の形態を確認する必要があるが、輸入植物検疫ではその他の発育ステージで発見される事例が多い。そこで第 1 節では、休眠雌成虫、若虫、幼虫及び卵 (図 5) を対象として、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅した遺伝子領域を制限酵素で切断して得られる断片長多型 (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) を使って種の識別を行う方法に利用可能な DNA 調製法を開発することを目的とした。続いて第 2 節では、輸入植物検疫で発見される可能性が高い日本未記録種 5 種を含む合計 14 種 (図 1~図 4) について、主として輸入植物検疫で採集されたサンプルを材料に用いて同識別法の検証を行い、有用性を評価した。

第 III 章では、輸出植物検疫で問題となっているドクガ科 *Lymantria* 属を対象とした。日本から記録されている同属 13 種 (Pogue and Schaefer 2007; 岸田・真鍋 2012) の中で、4 種がアジア型マイマイガに指定されている (Pogue and Schaefer 2007) (図 6)。近年、米国、カナダ、チリ及びニュージーランド政府が船舶を経路としたアジア型マイマイガの侵入を警戒しており、発生国に対して、アジア型マイマイガを対象とした船舶検査及び不在証明書の発給を求めている (NAPPO 2015; SAG 2015; MPI 2017)。万が一これらの国々への入港時の船舶検査でアジア型マイマイガが発見された場



図 1. 材料に用いた *Tetranychus* 属の 14 種 (1)

(a) カンザワハダニ雌成虫、(b) カンザワハダニ雄成虫、(c) ナミハダニ (黄緑型) 雌成虫、(d) ナミハダニ (黄緑型) 雄成虫、(e) ナミハダニ (赤色型) 雌成虫、(f) ナミハダニ (赤色型) 雄成虫、(g) アシノワハダニ雌成虫、(h) アシノワハダニ雄成虫

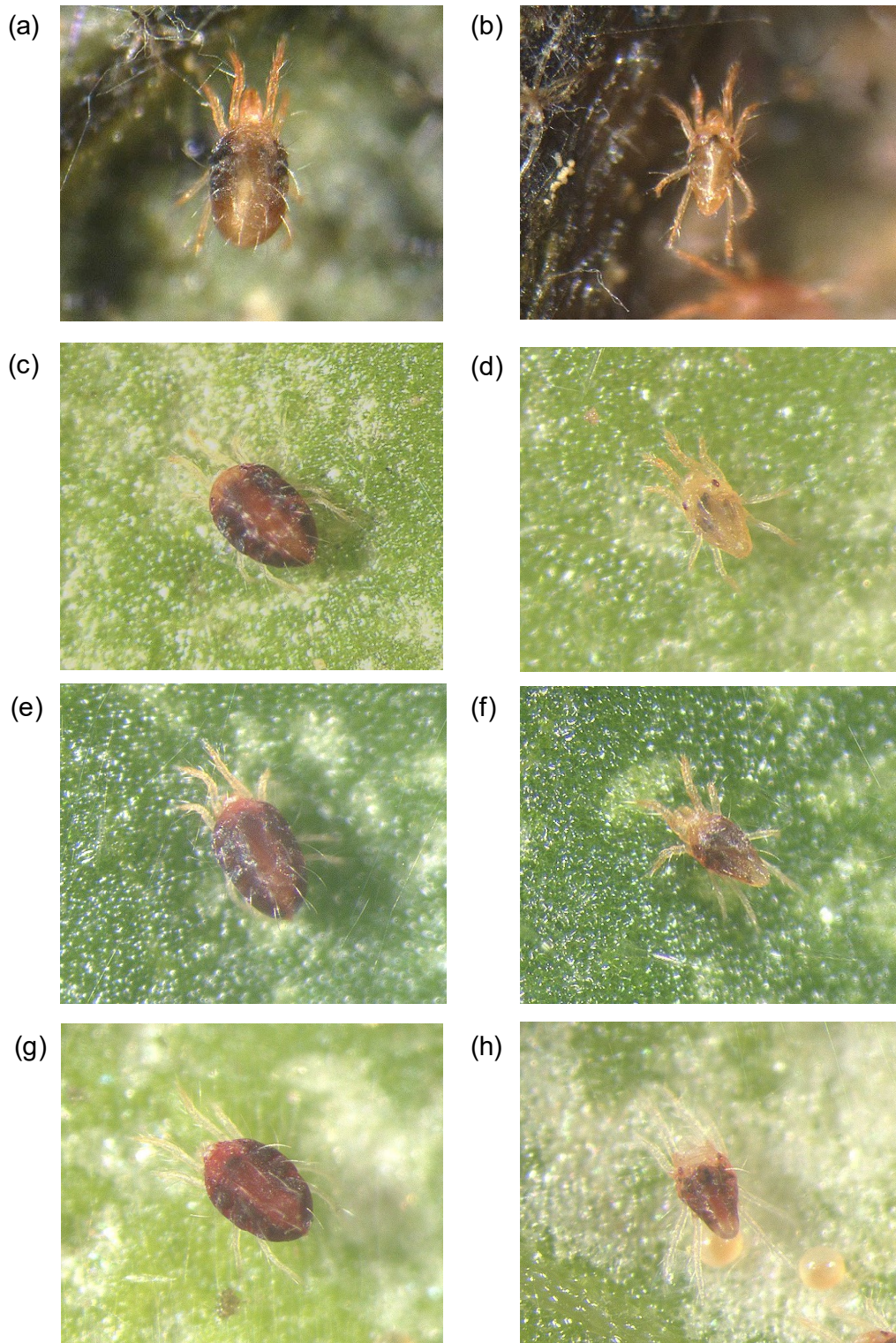


図 2. 材料に用いた *Tetranychus* 属の 14 種 (2)

(a) ミツユビナミハダニ雌成虫、(b) ミツユビナミハダニ雄成虫、(c) イシイナミハダニ雌成虫、
 (d) イシイナミハダニ雄成虫、(e) サガミナミハダニ雌成虫、(f) サガミナミハダニ雄成虫、(g) ミ
 ヤラナミハダニ雌成虫、(h) ミヤラナミハダニ雄成虫



図 3. 材料に用いた *Tetranychus* 属の 14 種 (3)

(a) ナンゴクナミハダニ雌成虫、(b) ナンゴクナミハダニ雄成虫、(c) *T. lambi* 雌成虫、(d) *T. lambi* 雄成虫、(e) *T. pacificus* 雌成虫、(f) *T. pacificus* 雄成虫、(g) *T. turkestani* 雌成虫、(h) *T. turkestani* 雄成虫

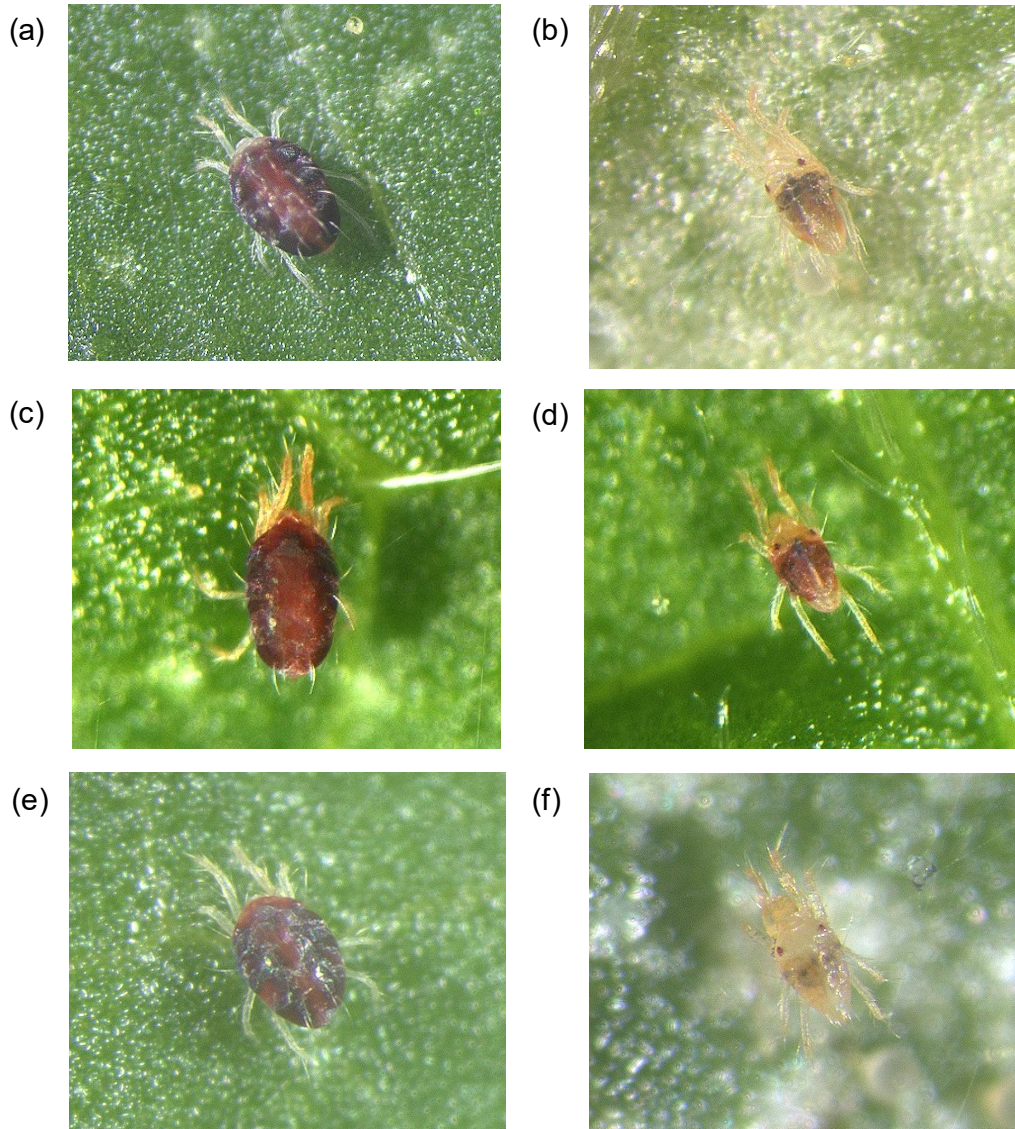


図4. 材料に用いた *Tetranychus* 属の14種 (4)

(a) *T. merganser* 雌成虫、(b) *T. merganser* 雄成虫、(c) *T. macfarlanei* 雌成虫、(d) *T. macfarlanei* 雄成虫、(e) ナンセイナミハダニ雌成虫、(f) ナンセイナミハダニ雄成虫

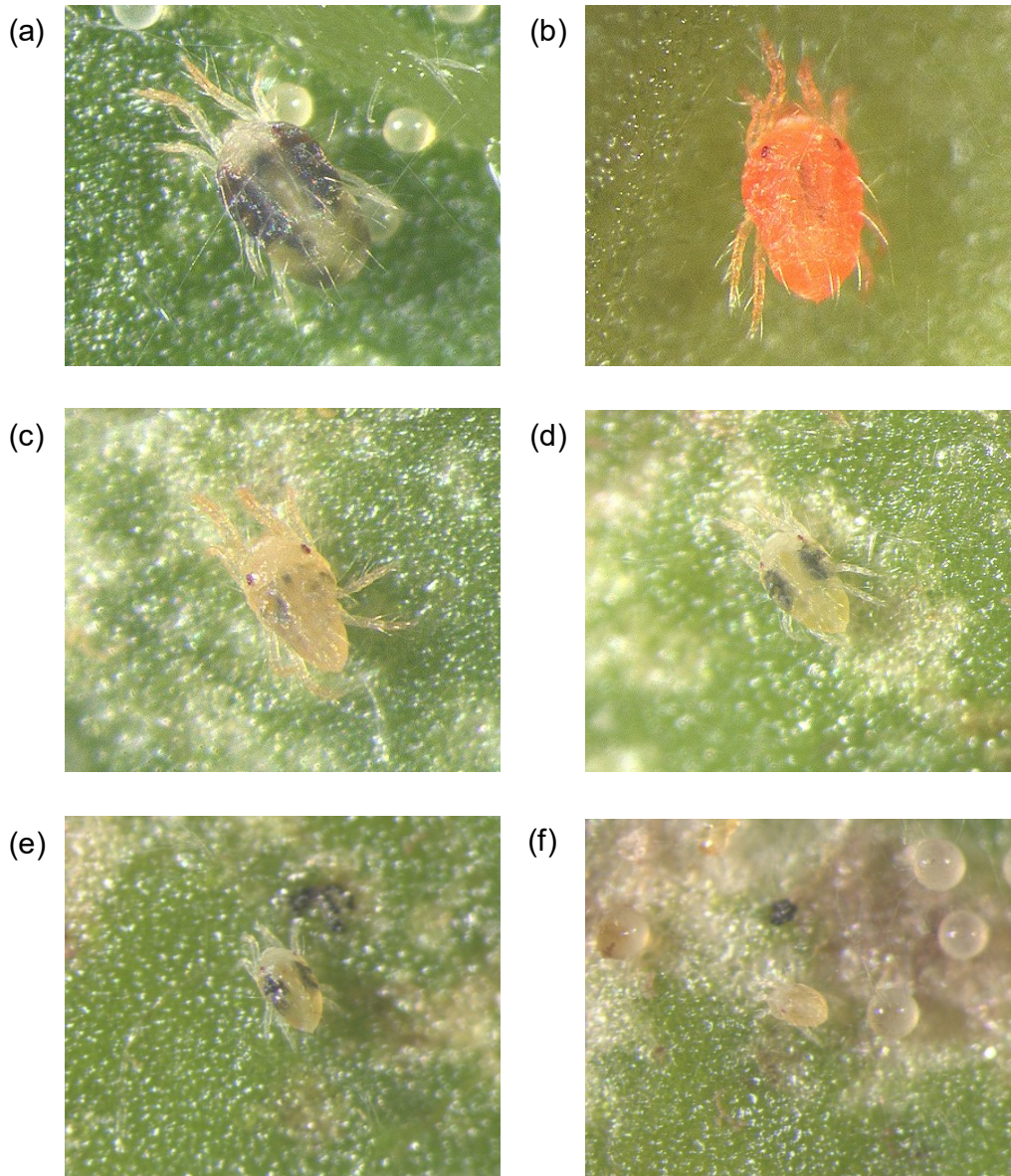


図 5. ナミハダニ (黄緑型) の各発育ステージ

(a) 非休眠雌成虫及び卵、(b) 休眠雌成虫、(c) 雄成虫、(d) 第 2 若虫、(e) 第 1 若虫、(f) 幼虫及び卵

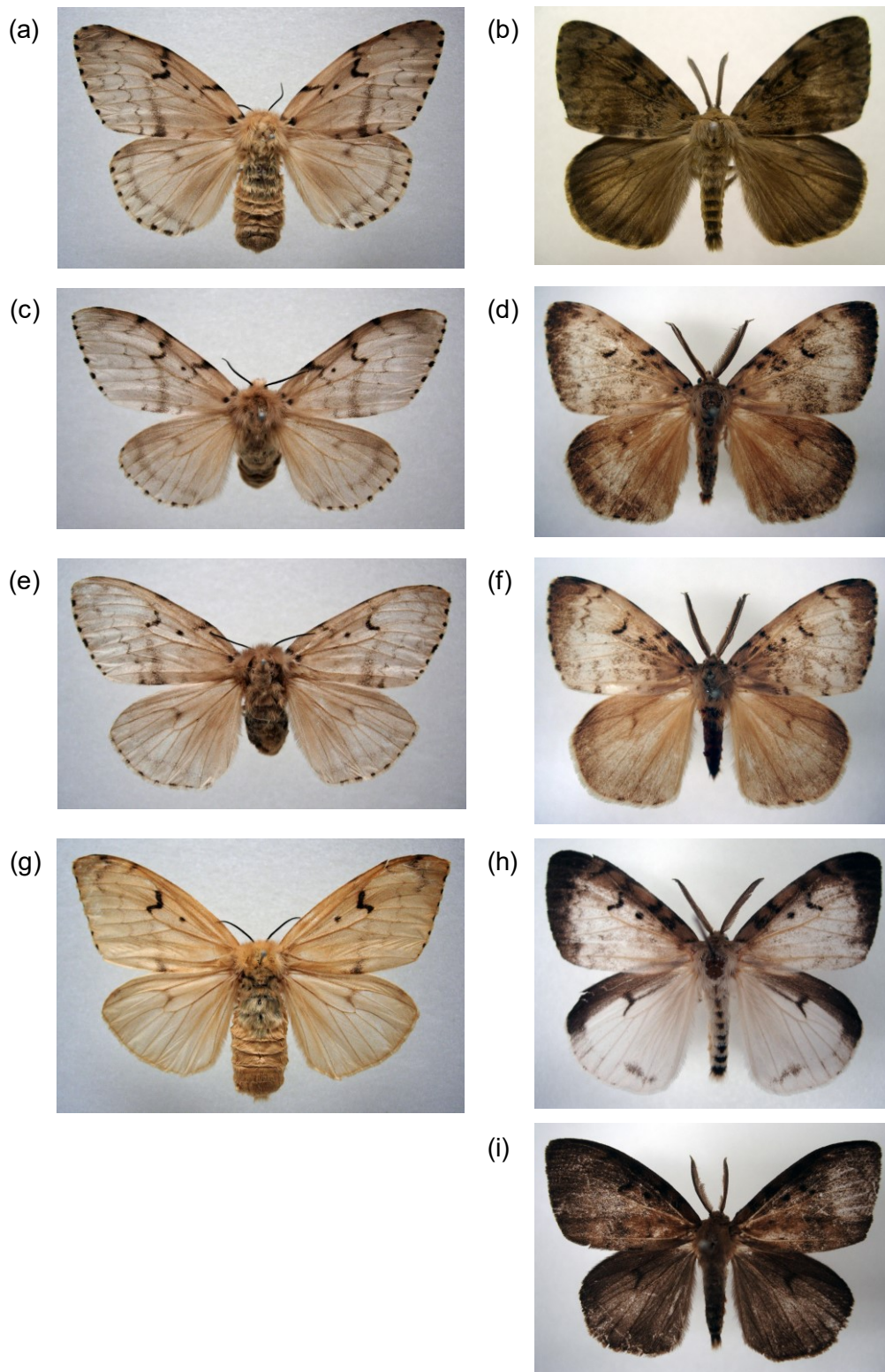


図 6. 材料に用いた *Lymantria* 属のアジア型マイマイガ指定種 4 種

(a) 本州産 *L. dispar japonica* 雌成虫、(b) 本州産 *L. dispar japonica* 雄成虫、(c) 北海道産 *L. dispar japonica* 雌成虫、(d) 北海道産 *L. dispar japonica* 雄成虫、(e) *L. umbrosa* 雌成虫、(f) *L. umbrosa* 雄成虫、(g) *L. albescens* 雌成虫、(h) *L. albescens* 雄成虫、(i) *L. postalba* 雄成虫

合、沖合退避及び虫体の除去を命じられる可能性がある (NAPPO 2015; SAG 2015; MPI 2017)。その場合、入港が遅延することとなり、我が国の輸出産業に及ぼす影響が非常に大きい。*Lymantria* 属の同定は成虫の形態的特徴に基づいて行われるが、港湾では同定困難な卵塊 (図 7) のみが発見される事例が多い。そこで第 1 節では、日本の港湾で発見される可能性があるアジア型マイマイガを含む日本産 *Lymantria* 属 7 種 (図 6、図 8; a-f) を対象として、ミトコンドリア DNA を用いた PCR-RFLP 法による識別技術を開発し、日本全国の主として港湾で採集されたサンプルを用いて検証を行い、その有用性を評価した。港湾で発見された *Lymantria* 属の卵塊の識別結果は、高い信頼性が求められる。そのため、ミトコンドリア DNA 以外のもう一つの遺伝子領域を用いて識別を行い、二重に点検することが望ましい。そこで第 2 節では、ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法について、第 1 節で用いた 7 種に分布域は限られるが強い飛翔力をもつオオヤママイマイ *Lymantria lucescens* (Butler) (図 8 g, h) を加えた 8 種 (図 6、図 8) を対象として、日本全国の主として港湾で採集されたサンプルを用いて検証を行い、同識別法の有用性を評価した。

これらの結果を踏まえて、第 IV 章の総合考察では、植物検疫において形態同定が困難な発育ステージで発見される害虫の種を識別する手法としての遺伝子診断法の有用性について考察し、本研究における問題解決の一連の手順を他の分類群の害虫に対して一般化できるかどうかを検討した。

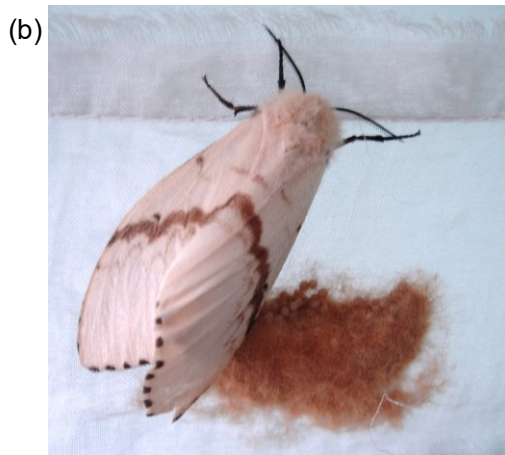


図 7. *Lymantria* 属の雌成虫と卵塊

(a) *L. dispar japonica*、(b) *L. xyliina*

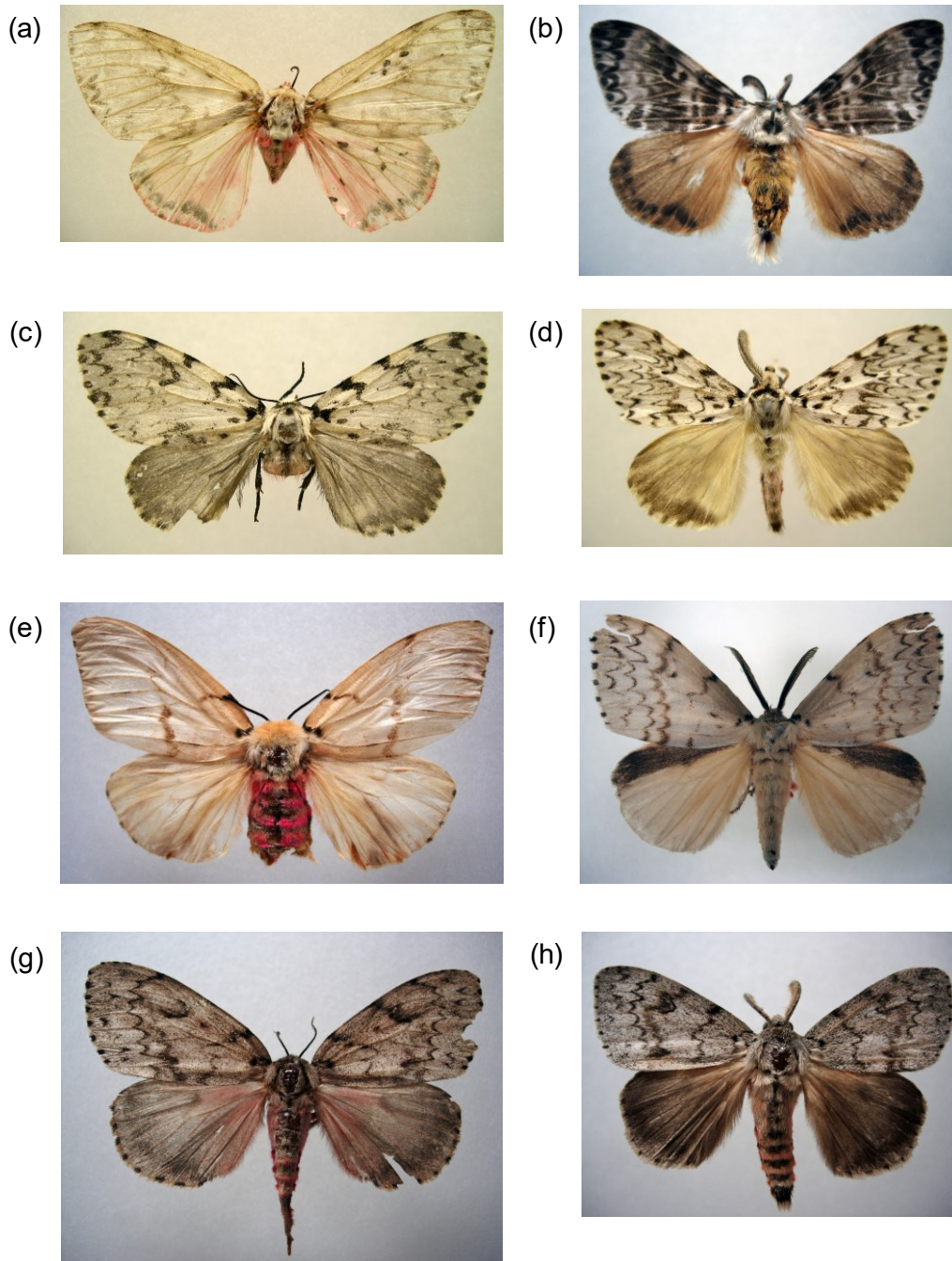


図 8. 材料に用いた *Lymantria* 属の 4 種

(a) *L. mathura* 雌成虫、(b) *L. mathura* 雄成虫、(c) *L. monacha* 雌成虫、(d) *L. monacha* 雄成虫、(e) *L. xyлина* 雌成虫、(f) *L. xyлина* 雄成虫、(g) *L. lucescens* 雌成虫、(h) *L. lucescens* 雄成虫

第 II 章 輸入植物検疫で発見されるハダニ科 *Tetranychus* 属の PCR-RFLP 法による識別

はじめに

Tetranychus 属のハダニは、農業生産物の国際貿易を妨げる多くの重要な農業害虫種を含んでいる。現在までに、世界で 154 種 (Migeon and Dorkeld 2006-2017)、日本で 13 種が報告されている (Ehara 1999; 江原・山口 2001; Ehara and Ohashi 2002; Ehara and Gotoh 2007)。近年の農業生産物の輸入の増加に伴い、日本の輸入植物検疫において外国産のハダニはより頻繁に発見されており (真崎 1991, 2001; 真崎ら 1991; 金田・真崎 1994; 真崎・北村 2004)、それらの侵入に対する警戒が植物検疫上重要な課題の一つになっている。

従来、ハダニは成虫の形態的特徴に基づいて同定されてきた。特に、*Tetranychus* 属では、雄成虫の挿入器の形態を精査する必要がある (Pritchard and Baker 1955; Tuttle et al. 1976; Meyer 1987; Baker and Tuttle 1994; Ehara 1999; 江原・後藤 2009)。しかしながら、ハダニの性比は雌に偏っているため (Sabelis 1991)、輸入植物検疫で発見されるほとんどの個体は雌成虫である (図 1~図 4)。まれに、休眠雌成虫、幼若虫 (第 2 若虫、第 1 若虫または幼虫) または卵のみが発見される (図 5)。さらに、同じ植物体上に複数の *Tetranychus* 属の種が混在する可能性もある。そのような場合、多くのハダニを個別に飼育し、後代で雄を出現させて種を同定する必要がある。この方法は時間を要することから、輸入植物の流通を妨げ、植物検疫の検査において高い労働コストを招くため、植物検疫において *Tetranychus* 属の種を迅速かつ正確に同定するための新たな識別法の開発が必要である。

近年、リボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域の PCR-RFLP 法が、経済的に重要な分類群において非常に有用であることが明らかにされてきている (Orui 1996; Armstrong et al. 1997, 2003; Orui and Mizukubo 1999; Toda and Komazaki 2002)。本手法は、*Tetranychus* 属の種の識別にも利用されてきた (Gotoh et al. 1998; Navajas and Boursot 2003; Hurtad et al. 2008)。Osakabe et al. (2002) は、本手法が日

本産の *Tetranychus* 属 4 種 [カンザワハダニ *Tetranychus kanzawai* Kishida (図 1 a、b)、ナミハダニ *Tetranychus urticae* Koch (図 1 c-f)、ナミハダニモドキ *Tetranychus pueraricola* Ehara and Gotoh 及びアシノワハダニ *Tetranychus ludeni* Zacher (図 1 g、h)] を識別するために利用可能であることを初めて示した。その後、Osakabe et al. (2008) は本手法が他の日本産の *Tetranychus* 属 7 種 [ミツユビナミハダニ *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (図 2 a、b) (当初 *Tetranychus takafujii* Ehara and Ohashi として記載された)、ニセカンザワハダニ *Tetranychus parakanzawai* Ehara、アララギナミハダニ *Tetranychus ezoensis* Ehara、イシイナミハダニ *Tetranychus truncatus* Ehara (図 2 c、d)、サガミナミハダニ *Tetranychus phaseus* Ehara (図 2 e、f)、ミヤラナミハダニ *Tetranychus piercei* McGregor (図 2 g、h) 及びナンゴクナミハダニ *Tetranychus okinawanus* Ehara (図 3 a、b)] の識別にも適用可能であることを報告した。この手法は、日本の輸入植物検疫において同定困難な発育ステージで発見される外国産の *Tetranychus* 属の種の識別に利用できる可能性がある。

しかしながら、ハダニでは非休眠雌成虫以外の発育ステージの DNA サンプルの調製法に関する情報がない。*Tetranychus* 属の休眠雌成虫は体色が透明な赤橙色または橙色であり (図 5 b)、ケトカロテノイドの含有量の変化が原因である可能性が指摘されている (Veerman 1974)。そのような脂質が DNA 調製の有効性に影響を及ぼすかどうかは不明である。一方、第 2 若虫を除き、幼若虫及び卵は非休眠雌成虫よりはるかに小さい (図 5)。Osakabe et al. (2008) は、DNA 調製のためにサンプルチューブ内でガラス棒を用いて非休眠雌成虫 1 個体を磨砕する方法を示した。しかしながら、この方法は微細な幼若虫または卵を十分に破砕できず DNA が抽出できない可能性がある。植物検疫の検査では、同定の失敗は許されないため、幼若虫または卵を対象とした信頼度の高い代替の DNA サンプル調製法が求められている。Iwahori et al. (2000) は、DNA 調製のために線虫 1 個体をろ紙片で磨砕する方法を開発した。この方法は、PCR 用の線虫の DNA テンプレートを安定して得るために有用である。この方法を *Tetranychus* 属の幼若虫及び卵に適用できれば、DNA 調製における信頼

度はより高まり、検疫における種の識別に寄与できると考えられた。

そこで第1節では、まず初めに非休眠雌成虫のDNA調製法をナミハダニの休眠雌成虫または第2若虫に適用できることを明らかにした。次に、線虫のDNA調製法をナミハダニの幼若虫(第1若虫または幼虫)または卵に適用できることを明らかにした。続いて、第2節において、Osakabe et al. (2008) が *Tetranychus* 属の識別に用いた ITS 領域の PCR-RFLP 法を日本の輸入植物検疫で発見された外国産の *Tetranychus* 属の雌成虫の種の識別に適用可能であるかどうかを検証した。

第1節 休眠雌成虫、幼若虫及び卵のDNA調製法

1. 材料と方法

1) ハダニ

2009年に青森県のリンゴ園から採集した個体群に由来するナミハダニ黄緑型の既交尾雌成虫1個体を、実験室内で24℃、16時間明期/8時間暗期の日長下でシャーレ(直径9cm)内の水で湿らせた綿の上に置いたインゲン葉片(以後「リーフディスク」と呼ぶ)上で飼育し、産卵させた。卵が成虫に成長した後、そのうち雌雄成虫各5個体を1個体ずつホイヤー氏液を使ってスライドグラス上に封入し、Ehara(1999)の検索表に従って種を同定した。すべての証拠標本は、農林水産省横浜植物防疫所に保管した。最初の雌成虫に由来する残りの子孫は実験室において継続して飼育した。その後、DNA調製の実験に用いるため、非休眠雌成虫、第2若虫、第1若虫、幼虫及び卵のサンプルを飼育個体群から得た。さらに、休眠雌成虫のサンプルを得るため、最初の雌成虫の数個体の子孫を温度勾配恒温器(TG-180CCFL-5LE; Nippon Medical & Chemical Instruments Co., Ltd., Osaka, Japan)を用いて12℃、8時間明期/16時間暗期の日長下でリーフディスク上で飼育した。体色が透明な赤橙色または橙色の個体を休眠雌成虫として、DNA調製の実験に用いた。

2) DNA調製法の開発

休眠雌成虫及び第2若虫については、Osakabe et al. (2008)によって示された調製法に基づいてDNAサンプルを調製した。つまり、1個体のハダニを1.5mLのサンプルチューブ内に入れた20µLの溶解バッファー[10mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), 10mM NaCl, and 1mg ml⁻¹ proteinase K (Takara Bio, Shiga, Japan)]の中でプラスチックペッセルを用いて磨砕した。磨砕液は65℃で15分間保温した後、95℃で10分間保温した。保温した

後、磨砕液は 380 μ L の 0.1 \times TE バッファー [1 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA] で希釈し、DNA テンプレートとして PCR に利用するまで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

第 1 若虫、幼虫及び卵の DNA サンプルについては、Iwahori et al. (2000) によって示された DNA 調製法を改変して調製した。つまり、1 個体のハダニ (または卵) を柄付き針で拾い、オートクレーブ済みのスライドガラス上に移し、双眼実体顕微鏡下でピンセットでつまんだオートクレーブ済みの 1.5 \times 1.5 mm のろ紙片 (no. 2; Advantec Co., Ltd., Tokyo, Japan) (図 9 a) を用いて磨砕した。磨砕したハダニ (または卵) の内容物を含んだろ紙片を直ちに 1.5 mL のサンプルチューブ内に入れた 20 μ L の溶解バッファーの中に入れた (図 9 b)。その後、そのサンプルチューブを 65 $^{\circ}$ C で 15 分間、さらに 95 $^{\circ}$ C で 10 分間保温した。その後、サンプルは 380 μ L の 0.1 \times TE バッファーで希釈し、PCR に利用するまでろ紙片を入れたまま -20 $^{\circ}$ C で保存した。卵については、0、6、12、24、48 及び 72 時間齢のものを実験サンプルとして用いた。これは、産卵直後の卵では十分量の PCR 産物が得られない可能性があることから、種の識別に利用可能な産卵後の経過時間を明らかにしておくためである。

5 個体のハダニ (または卵) のサンプルから個別に DNA 調製を行い、反復とした。ポジティブコントロールとして、Osakabe et al. (2008) によって示された DNA 調製法に基づいて 1 個体のナミハダニ黄緑型の非休眠雌成虫の DNA を調製した。ネガティブコントロールとして、上述の溶解バッファーのみを用いた。

3) PCR による増幅

ITS 領域を増幅するためのプライマーとして、rD02 : 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3' (Hinomoto and Takafuji 2001) 及び HC2 : 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3' (Navajas et al. 1994) を用いた。PCR 反応は総容量を 20 μ L とし、バッファー [2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, and 10 mM Tris-HCl

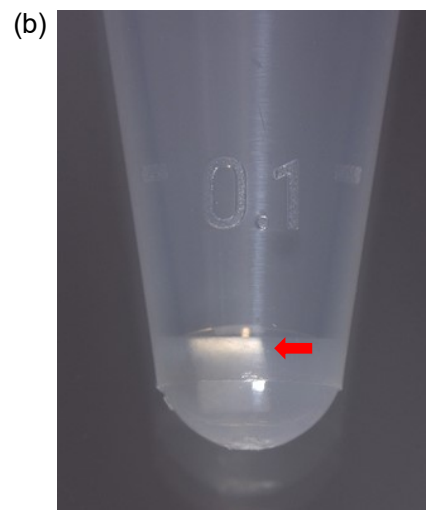
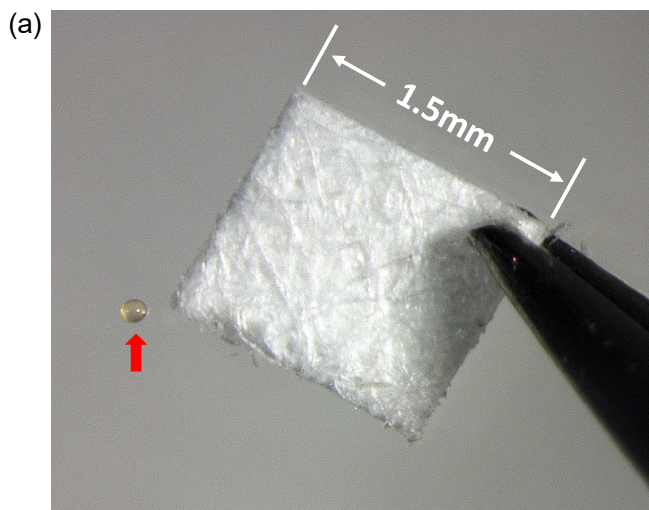


図 9. ろ紙片を用いた DNA 調整法

(a) スライドグラス上のろ紙片及びハダニ卵（矢印）、(b) 溶解バッファーに入れたろ紙片（矢印）

(pH 8.3)] に 1 μ L の各 DNA テンプレート、0.2 mM の dNTPs、10 pmol の各プライマー及び 0.5 U の Ex Taq DNA polymerase (Takara Bio) を加えて行った。PCR 反応条件は最初に 95 °C で 1 分加熱した後、92 °C で 30 秒、50 °C で 30 秒及び 72 °C で 1 分を 30 サイクル繰り返し、最後に 72 °C で 10 分加熱した。なお、本章における以後の PCR 反応も、特に断らない限りこの手順で行なった。PCR 産物は TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA; pH of the solution was adjusted with acetic acid to 8.0) バッファースystemによる 2 %アガロースゲル (Agarose S, Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いた電気泳動により分離し、エチジウムブロマイドにより染色し、紫外線を照射して可視化した。PCR 産物は RFLP 分析にも用いた。

4) PCR-RFLP の検出

休眠雌成虫、第 2 若虫、第 1 若虫、幼虫、48 時間齢の卵及び 72 時間齢の卵の各 1 個体の PCR 産物のうち、10 μ L を新しい 0.5 mL のサンプルチューブに移し、制限酵素処理を次の手順で行なった。すなわち、10 μ L の PCR 産物、10 U の制限酵素 *Dra* I (Toyobo, Osaka, Japan) 及び 1.2 μ L の 10 \times reaction buffer を十分に混ぜ、PCR 産物を完全に切断するために 37 °C で 3 時間保温した。切断した PCR 産物は 3.5 %アガロースゲル (Agarose X, Nippon Gene) を用いた電気泳動により分離し、DNA 断片のバンドパターンを比較するためにエチジウムブロマイドによる染色後に紫外線により可視化した。

2. 結果と考察

休眠雌成虫 1 個体をプラスチックペッスルで磨砕する方法により、PCR 用の DNA テンプレートを
得ることができた。休眠雌成虫の各個体 (n=5) から、想定された長さの PCR 産物のバンド 1 本
が、ポジティブコントロールのナミハダニ非休眠雌成虫と同様に濃い濃度で個体変異もなく得られ
た。(図 10 a)。従って、脂質の含有量が多い休眠雌成虫からも、この簡易な DNA 調製法によって有
効に DNA 抽出が可能であると考えられた。第 2 若虫の各個体 (n=5) からも PCR 産物を得ることが
でき、ポジティブコントロールの非休眠雌成虫と同様に十分な濃度を示した (図 10 b)。従って、
Osakabe et al. (2008) の DNA 調製法は休眠雌成虫と第 2 若虫の両方に対して、手法を改変すること
なく適用可能であることが明らかとなった。

第 1 若虫及び幼虫をろ紙片で磨砕する方法により、第 1 若虫と幼虫の各個体 (n=5) から 1 本の
PCR 産物のバンドを濃い濃度で個体変異もなく得ることができた (図 10 c、d)。さらに、第 1 若虫
及び幼虫の PCR 産物は、体サイズが異なるにも関わらずポジティブコントロールの非休眠雌成虫と
同様に十分な濃度を示した。従って、ろ紙片を用いて 1 個体のハダニ幼若虫を磨砕する方法は、微
小なハダニから PCR 用の DNA テンプレートを調製するために有用な方法であることが分った。

0 時間齢の卵 (n=5) では DNA 断片が増幅されず、バンドを検出できなかったが (図 11 a)、6、
12、24 時間齢の卵 (n=5) では 1 本の薄いバンドが検出できた (図 11 b-d)。これは細胞の数、すな
わち DNA コピー数が胚発生 of 進行に伴って増加したことに起因する可能性がある。48 時間齢及び
72 時間齢の卵 (n=5) では、PCR 産物は非休眠雌成虫と同様に十分な濃度を示した (図 11 e、f)。従
って、ろ紙片を用いる DNA 調製法は胚発生中の卵、特に 24 °C で産卵後 48 時間以上経過した卵に
有用であることが分った。

増幅された DNA 断片のサイズは、非休眠雌成虫を含む发育ステージのすべてのサンプルにおい
て約 1,200 bp であった (図 10、11)。このサイズは、Osakabe et al. (2008) により報告されたナミハ

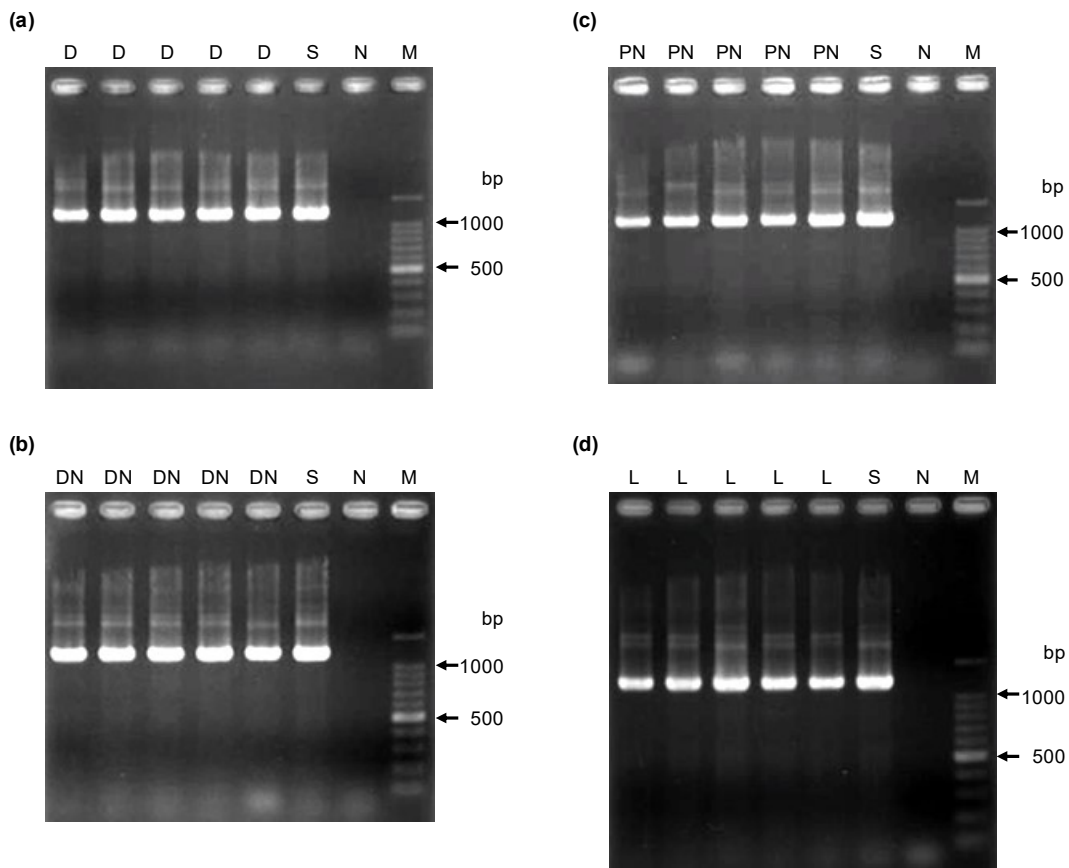


図 10. ナミハダニ (黄緑型) の休眠雌成虫及び幼若虫各 1 個体から得られた ITS 領域の PCR 増幅産物

(a) D: 休眠雌成虫、(b) DN: 第 2 若虫、(c) PN: 第 1 若虫、(d) L: 幼虫、S: 非休眠雌成虫、N: ネガティブコントロール、M: 100-bp ラダー

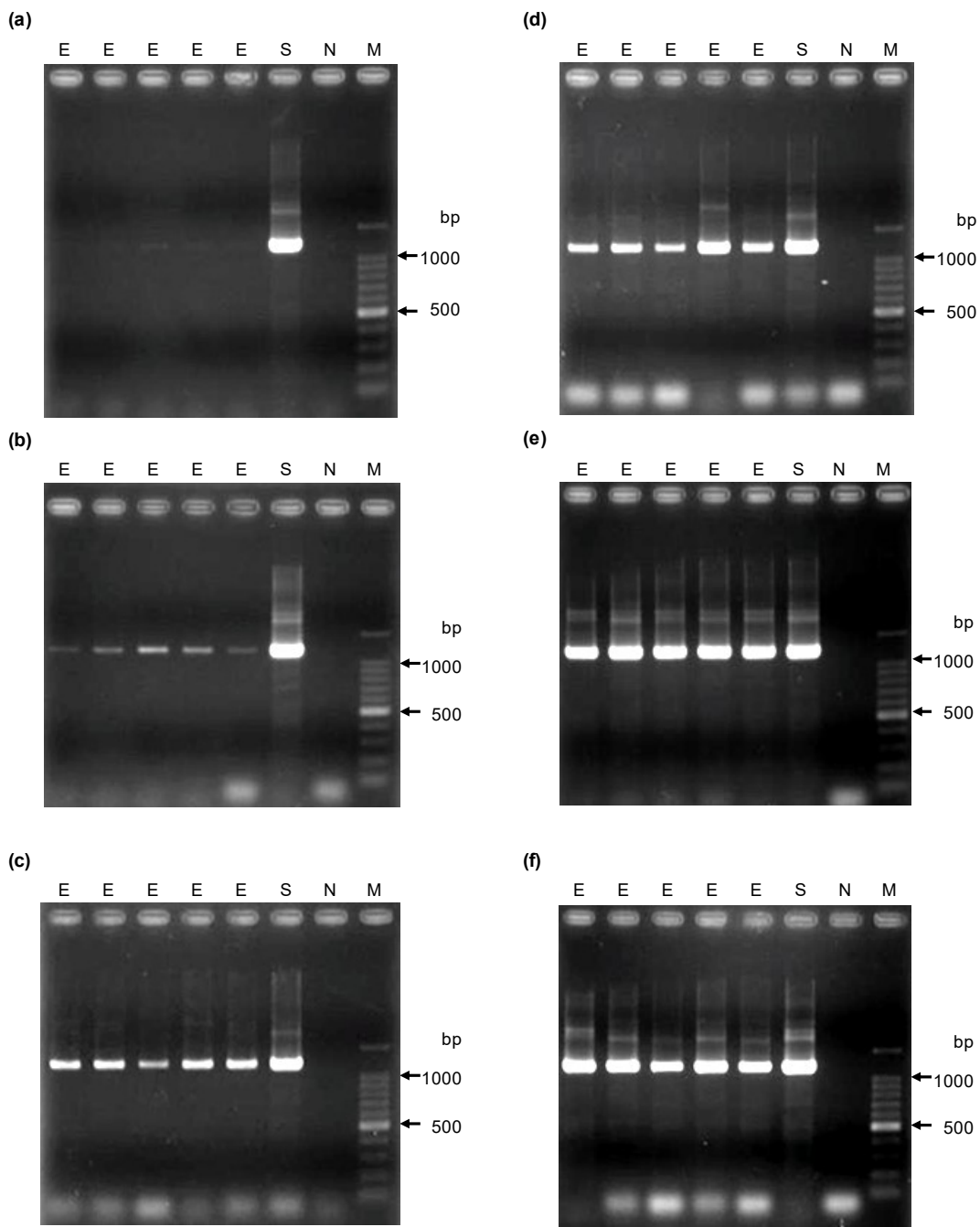


図 11. ナミハダニ (黄緑型) の各発育時間齢の卵 1 個から得られた ITS 領域の PCR 増幅産物

産卵後 (a) 0 時間齢、(b) 6 時間齢、(c) 12 時間齢、(d) 24 時間齢、(e) 48 時間齢、(f) 72 時間齢; E: 卵、S: 非休眠雌成虫、N: ネガティブコントロール、M: 100-bp ラダー

ダニの ITS 領域の塩基配列データである 1,205 bp と一致するものであった。休眠雌成虫、第 2 若虫、第 1 若虫、幼虫及び卵から得られたサンプルを *Dra*I によって切断した PCR 産物は、非休眠雌成虫と同様に約 400 bp と 800 bp の 2 本のバンドとして検出された (図 12)。ITS 領域の配列のうち、*Dra*I は TTTAAA の部位を切断するため、両バンドは Osakabe et al. (2008) において塩基配列解析の結果として示された *Dra*I による断片長である 394 bp と 811 bp に一致するものであった。これらの結果から、検討したいずれの発育ステージの個体も ITS 領域を用いた PCR-RFLP 法によって種の識別が可能であることが分った。

本研究で調査した DNA 調製法は、DNA 抽出段階において技術的熟練を必要とせず、時間を節約でき、その後の PCR 増幅によって十分量の産物を得ることができ、かつ RFLP 分析をスムーズに行うことができた。従って、この手法を用いることによって、輸入植物検疫の検査現場において同定困難な発育ステージ (休眠雌成虫、第 2 若虫、第 1 若虫、幼虫及び卵) で発見される *Tetranychus* 属の種を迅速に識別することが可能であると考えられた。

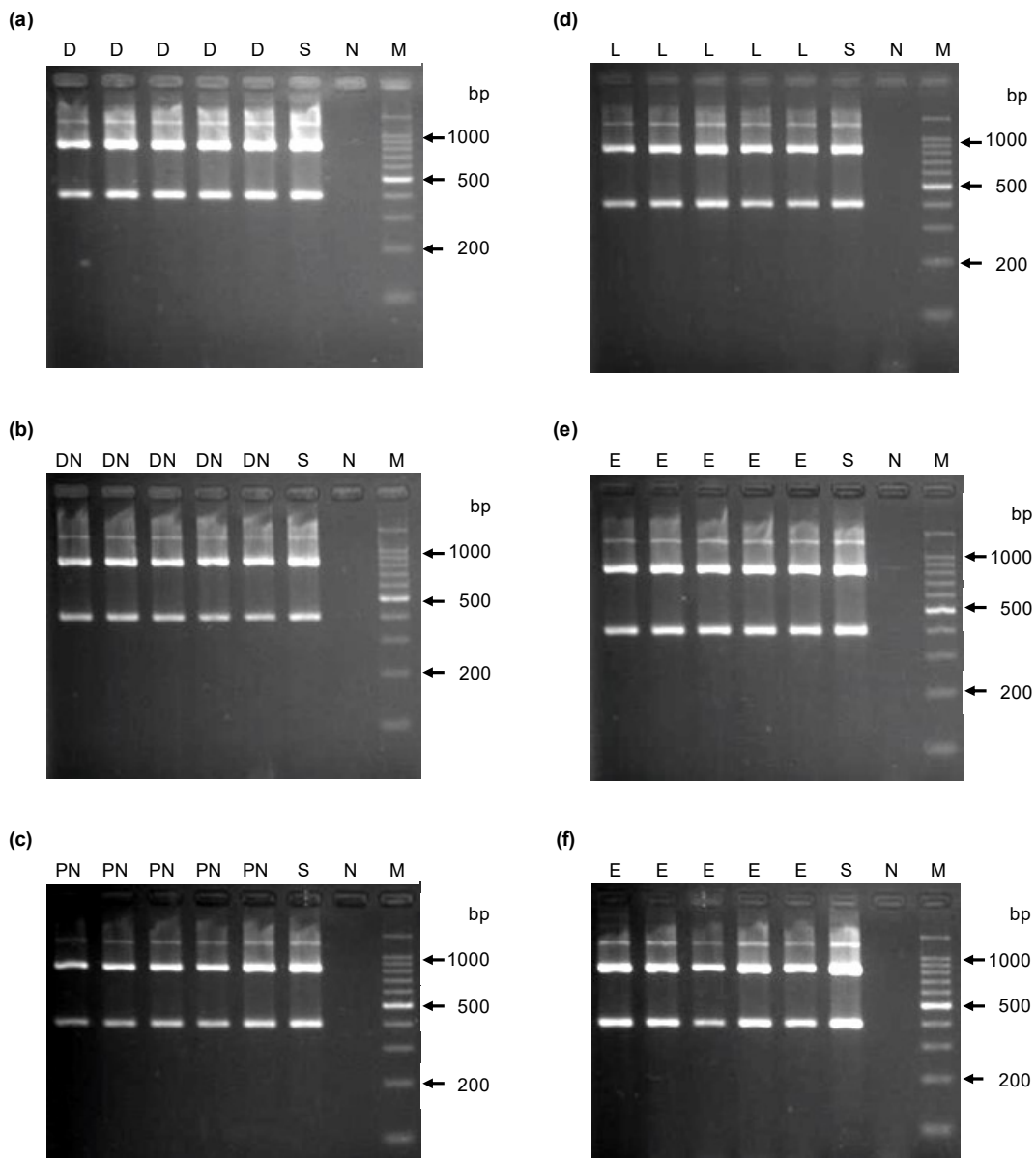


図 12. ナミハダニ (黄緑型) の各発育ステージ 1 個体 (1 卵) の ITS 領域の PCR 増幅産物を *Dra*I により切断して得られたバンドパターン

(a) D: 休眠雌成虫、(b) DN: 第 2 若虫、(c) PN: 第 1 若虫、(d) L: 幼虫、(e) E: 48 時間齢の卵、(f) E: 72 時間齢の卵、S: 非休眠雌成虫、N: ネガティブコントロール、M: 100-bp ラダー

第2節 輸入植物検疫で採集された雌成虫を用いた識別

1. 材料と方法

1) ハダニ

Tetranychus 属 14 種、合計 199 個体群 245 個体の雌成虫を PCR-RFLP 試験に用いた (表 1、図 1~図 4、付表 1)。これらの種のうち、ミツユビナミハダニはこれまでに輸入植物検疫で発見された記録はないが、その他の種は、これまでに日本の輸入植物検疫で発見された *Tetranychus* 属の大部分の種が含まれる (真崎 1991, 2001; 真崎ら 1991; 金田・真崎 1994; 真崎・北村 2004)。従って、本研究で用いた 14 種以外の *Tetranychus* 属の種は頻繁に発見されることはないと考えられる。また、ミツユビナミハダニは世界中のナス科の作物の新発生害虫であり (Boubou et al. 2012)、起源である南アメリカからヨーロッパ及びアフリカに少なくとも 3 回侵入した (Boubou et al. 2012)。本種は、日本には近年定着した可能性がある (Ehara and Ohashi 2002; Gotoh et al. 2009)。

これらのサンプルのうち、10 種 180 個体群は 2008 年から 2010 年の間に輸入植物検疫で採集されたものを用いた (付表 1)。これらの中には、日本未記録の 5 種、すなわち *Tetranychus lambi* Pritchard and Baker (図 3 c、d)、*Tetranychus pacificus* McGregor (図 3 e、f)、*Tetranychus turkestanii* (Ugarov and Nikolskii) (図 3 g、h)、*Tetranychus merganser* Boudreaux (図 4 a、b) 及び *Tetranychus macfarlanei* Baker and Pritchard (図 4 c、d) が含まれている。

本研究の調査期間中に輸入植物検疫では発見されなかった 4 種を含め、8 種 19 個体群の日本産のサンプルを用いた (表 1、付表 1)。それらのうち、ミヤラナミハダニ (個体群 No. Tpi-3)、サガミナミハダニ (No. Tph-1)、ナンセイナミハダニ *Tetranychus neocaledonicus* André (No. Tn-1) (図 4 e、f) 及び ナンゴクナミハダニ (No. To-1) の 4 種の実験室系統は茨城大学から提供された (付表 1)。ナミハダニ (黄緑型) の 1 個体群 (No. Tu-g-68) は、輸出植物検疫において採集された (付表 1)。

表 1. 材料に用いた *Tetranychus* 属の産地、個体群数及び個体数

種名	RFLP			シーケンス		
	個体群数	個体数	産地、個体群数、個体群番号及び個体数 ^{ab}	産地	個体群番号 ^a	個体数
<i>T. lambi</i>	2	3	ニュージーランド [2: Tla-1(2), Tla-2]	ニュージーランド	Tla-1	1
<i>T. pacificus</i>	2	4	米国 [2: Tpa-1(2), Tpa-2(2)]	米国	Tpa-1	1
<i>T. turkestanii</i>	2	5	米国 [1: Ttu-1(2)], スペイン [1: Ttu-2(3)]	米国	Ttu-1	1
ナミハダニ (黄緑型)	116	134	オーストラリア [3: Tu-g-1 - Tu-g-3], ブラジル [3: Tu-g-4 - Tu-g-6], 中国 [11: Tu-g-7 - Tu-g-17], コロンビア [10: Tu-g-18 - Tu-g-27], デンマーク [1: Tu-g-28], エクアドル [7: Tu-g-29 - Tu-g-35], エチオピア [2: Tu-g-36, Tu-g-37], インド [29: Tu-g-38 - Tu-g-66], 日本 [2: Tu-g-67(19), Tu-g-68], ケニア [4: Tu-g-69 - Tu-g-72], 韓国 [4: Tu-g-73 - Tu-g-76], マレーシア [3: Tu-g-77 - Tu-g-79], ネパール [1: Tu-g-80], オランダ [5: Tu-g-81 - Tu-g-85], ニュージーランド [10: Tu-g-86 - Tu-g-95], スリランカ [2: Tu-g-96, Tu-g-97], 台湾 [3: Tu-g-98 - Tu-g-100], 米国 [12: Tu-g-101 - Tu-g-112], ウガンダ [1: Tu-g-113], ベトナム [3: Tu-g-114 - Tu-g-116]	ウガンダ	Tu-g-113	1
ナミハダニ (赤色型)	33	47	中国 [3: Tu-r-1 - Tu-r-3], コロンビア [4: Tu-r-4 - Tu-r-7], エクアドル [4: Tu-r-8 - Tu-r-11], エチオピア [2: Tu-r-12, Tu-r-13], インド [1: Tu-r-14], イスラエル [1: Tu-r-15], 日本 [1: Tu-r-16(15)], ケニア [5: Tu-r-17 - Tu-r-21], メキシコ [1: Tu-r-22], 南アフリカ [4: Tu-r-23 - Tu-r-26], スペイン [2: Tu-r-27, Tu-r-28], 台湾 [1: Tu-r-29], トルコ [4: Tu-r-30 - Tu-r-33]	スペイン	Tu-r-28	1
カンザワハダニ	20	21	日本 [5: Tk-1, Tk-2, Tk-3(2), Tk-4, Tk-5], マレーシア [2: Tk-6, Tk-7], シンガポール [1: Tk-8], 台湾 [10: Tk-9 - Tk-18], タイ [2: Tk-19, Tk-20]	台湾	Tk-16	1

表 1. 続き

種名	RFLP			シーケンス		
	個体群数	個体数	産地、個体群数、個体群番号及び個体数 ^{ab}	産地	個体群番号 ^a	個体数
イシイナミハダニ	2	2	中国 [1: Ttr-1], 台湾 [1: Ttr-2]	中国	Ttr-1	1
ミヤラナミハダニ	5	5	インドネシア [1: Tpi-1], 日本 [2: Tpi-2, Tpi-3], マレーシア [1: Tpi-4], タイ [1: Tpi-5]	マレーシア	Tpi-4	1
サガミナミハダニ	2	2	日本 [2: Tph-1, Tph-2]	日本	Tph-2	1
ナンセイナミハダニ	1	4	日本 [1: Tn-1(4)]	日本	Tn-1	1
<i>T. merganser</i>	3	3	メキシコ [3: Tme-1 - Tme-3]	メキシコ	Tme-2	1
アシノワハダニ	6	6	コロンビア [1: Tlu-1], 日本 [3: Tlu-2 - Tlu-4], ニューゼーランド [1: Tlu-5], 米国 [1: Tlu-6]	コロンビア	Tlu-1	1
ミツユビナミハダニ	1	3	日本 [1: Te-1(3)]	日本	Te-1	1
<i>T. macfarlanei</i>	2	2	フィリピン [2: Tma-1, Tma-2]	フィリピン	Tma-2	1
ナンゴクナミハダニ	2	4	日本 [2: To-1, To-2(3)]	日本	To-2	1

^a 付表 1 参照^b 個体群番号の後の括弧内に個体数を記した個体群を除き、各個体群から 1 個体を PCR-RFLP に用いた

残りの 14 個体群、すなわちなみハダニ (黄緑型) (No. Tu-g-67)、 なみハダニ (赤色型) (No. Tu-r-16)、 カンザワハダニ (Nos. Tk-1、 Tk-2、 Tk-3、 Tk-4 及び Tk-5)、 ミヤラナミハダニ (No. Tpi-2)、 サガミナミハダニ (No. Tph-2)、 アシノウハダニ (Nos. Tlu-2、 Tlu-3 及び Tlu-4)、 ミツユビナミハダニ (No. Te-1) 及び ナンゴクナミハダニ (No. To-2) は、2007 年から 2010 年の間に 6 県の 7 箇所の寄主植物から採集した (付表 1)。

2) 形態による同定及び DNA 分析のための保存

各個体群の既交尾の雌成虫 1 個体を 24 °C、16 時間明期／8 時間暗期の日長の実験室内で、リーフディスクの上で個別に飼育し、産卵させた。卵が成虫に発育した後、雌雄成虫をホイヤー氏液を用いてスライドグラス上に個別に封入した。ハダニの標本は茨城大学の後藤哲雄教授により同定された *T. merganser* を除き、Pritchard and Baker (1955)、 Tuttle et al. (1976)、 Meyer (1987)、 Ehara and Tho (1988)、 Baker and Tuttle (1994) 及び Ehara (1999) の検索表に従って種を同定した。すべての証拠標本は、農林水産省横浜植物防疫所に保管した。同定後、各個体群について、最初の 1 個体の雌成虫に由来する子孫の雌成虫を 100 %エタノールに保存し、DNA 分析まで -20 °C のフリーザーで保管した。

3) DNA 分析のための試料の調製

第 1 節で述べた Osakabe et al. (2008) の調製法に基づいて、雌成虫 1 個体から DNA を調製した。なお、エタノールに保存していた個体は、1.5 mL サンプルチューブ内に移し、室温で 10 分間乾燥させた後に DNA 調製を行った。調製した DNA 溶液は PCR に利用するまで、-20 °C で保存した。

4) PCR による増幅

第 1 節に述べた方法で PCR を行い、ITS 領域を増幅した。得られた PCR 産物は、シーケンス及び RFLP 分析に用いた。

5) シーケンス

Tetranychus 属 14 種 15 個体群の雌成虫各 1 個体: *T. lambi* (個体群 No. Tla-1) 、*T. pacificus* (No. Tpa-1) 、*T. turkestanii* (No. Ttu-1) 、ナミハダニ (黄緑型) (No. Tu-g-113) 、ナミハダニ (赤色型) (No. Tu-r-28) 、カンザワハダニ (No. Tk-16) 、イシイナミハダニ (No. Ttr-1) 、ミヤラナミハダニ (No. Tpi-4) 、サガミナミハダニ (No. Tph-2) 、ナンセイナミハダニ (No. Tn-1) 、*T. merganser* (No. Tme-2) 、アシノワハダニ (No. Tlu-1) 、ミツユビナミハダニ (No. Te-1) 、*T. macfarlanei* (No. Tma-2) 及び ナンゴクナミハダニ (No. To-2) の ITS 領域をシーケンスした (表 1、附表 1)。

ITS 領域を第 1 節で述べた手順を用いた PCR により増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) による反応を行い、Dye Ex 2.0 Spin Kit (QIAGEN) を用いて精製し、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。なお、解析領域の塩基長が 1 回のシーケンスで解読するには長すぎるため、シーケンス用のプライマーとして PCR に用いた rD02 及び HC2 と共に、8 種類の内部プライマーを用いて解析した (表 2)。

表 2. *Tetranychus* 属の ITS 領域のシーケンスに用いた内部プライマー

プライマー名	塩基配列 (5' から 3')	引用文献
ITS1-378 forward	GCTTATGCTGACGGC	Osakabe et al. (2002)
ITS1-512 forward	TAAAAGTCCCACGGT	Osakabe et al. (2002)
ITS2-83 reverse	TGACCTCGGAAAAGACCC	Osakabe et al. (2002)
Tu-ITS-623 forward	GTCTTTTCCGAGGTCACATCTG	本研究で設計
Tu-ITS-912 forward	CGCTAAAGTCGTATTGCAG	本研究で設計
Tu-ITS-584 reverse	GCGTGTCCCTGCAATTCGC	本研究で設計
Tu-ITS-918 reverse	TTTAGCGTCGTCAGATAGGCG	本研究で設計
Tu-ITS-1040 reverse	GCATTA CTCTTAGGTCTGC	本研究で設計

6) 制限酵素の認識部位の解析及び PCR-RFLP の検出

得られた塩基配列における制限酵素の認識部位及び断片長を Genetyx-Win version 9.0 (Genetyx, Tokyo, Japan) を用いて推定し、識別に適切な 4 種類の制限酵素 (*Rsa* I、*Hinf* I、*Dra* I 及び *Mbo* II) を選抜した。*Tetranychus* 属 14 種 15 個体群の ITS 領域の塩基配列を Clustal W version 2.1 (Larkin et al. 2007) を用いて整列し、選抜した制限酵素 4 種類の認識部位を比較した。

1 個体の雌成虫から得られた DNA サンプルを調製し、プライマーとして rD02 及び HC2 を用いて総容量 70 μ L の系で PCR を行い、ITS 領域を増幅した。増幅された PCR 産物 10 μ L を各反応チューブから 4 本の新しい 0.5 mL サンプルチューブに移した。次に、5–10 U の制限酵素、すなわち *Dra* I、*Rsa* I (Toyobo)、*Mbo* II または *Hinf* I (Takara Bio)、及び 1.2 μ L の 10 \times reaction buffer を増幅産物に加え、PCR 産物を完全に切断するために 37 $^{\circ}$ C で 3 時間保温した。切断した PCR 産物を 3.5 % アガロースゲル (Agarose X) を用いた電気泳動により分離し、DNA 断片のバンドパターンを比較するためにエチジウムブロマイドによる染色後に紫外線により可視化した。

2. 結果

本研究で解析した塩基配列はアクセッション番号 AB738743–AB738757 として、国際塩基配列データベース (International Nucleotide Sequence Database; INSD) に登録した。日本未記録の 3 種 (*T. lambi*、*T. merganser* 及び *T. macfarlanei*) の塩基配列は、上記データベースにおける最初の記録である。ITS 領域の PCR 産物長はプライマーを含め、1,196 bp から 1,424 bp であった (表 3)。そのサイズはほとんどの *Tetranychus* 属の種において類似していた (1,196–1,267 bp) が、ナンゴクナミハダニ (1,424 bp) のみの特異的に長かった。従って、ナンゴクナミハダニは制限酵素処理を行わずに、PCR により増幅された PCR 産物長のみにより *Tetranychus* 属の他種から識別できる可能性がある。

付図 1 は、*Tetranychus* 属 14 種 15 個体群の ITS 領域の塩基配列及び選抜した 4 種類の制限酵素 (*Rsa* I、*Hinf* I、*Dra* I 及び *Mbo* II) の認識部位を示す。

表 3 は、*Tetranychus* 属 14 種 15 個体群の ITS 領域の塩基配列を制限酵素 *Rsa* I、*Hinf* I、*Dra* I 及び *Mbo* II によって切断処理した場合の断片長及び本研究で用いたバンドパターンの分類を示している。類似したバンドパターンでは、断片長の違いが 15 bp より大きい場合は識別可能とした。その結果、すべての種を完全に識別できる制限酵素はなかった。しかしながら、複数の制限酵素の結果を組み合わせることによって、すべての種に種特異的なバンドパターンを得ることができた (図 13)。14 種中 8 種 (*T. lambi*、ナミハダニ、サガミナミハダニ、ナンセイナミハダニ、*T. merganser*、アシノワハダニ、*T. macfarlanei* 及びナンゴクナミハダニ) は、*Rsa* I によって得られるバンドパターンが異なるため識別できた。*Rsa* I のバンドパターンが同じ 6 種 (*T. pacificus*、ミヤラナミハダニ、ミツユビナミハダニ、*T. turkestanii*、カンザワハダニ及びイシイナミハダニ) のうち、前者の 3 種は *Hinf* I によって得られるバンドパターンが異なるため識別できた。*Hinf* I のバンドパターンが同じ 3 種 (*T. turkestanii*、カンザワハダニ及びイシイナミハダニ) のうち、*T. turkestanii* は *Dra* I によって得られるバンドパターンが異なるため識別できた。*Dra* I のバンドパターンが同じ 2 種 (カンザワハダ

表 3. *Tetranychus* 属の ITS 領域の PCR 産物、断片長 (bp) 及びバンドパターン^aの型

種名	個体群番号 ^a	Rsa I		Hinf I		Dra I		Mbo II	
		バンドパターン	断片長 ^c	バンドパターン	断片長 ^c	バンドパターン	断片長 ^c	バンドパターン	断片長 ^c
<i>T. lambi</i>	Tla-1	A	622, 291, 114, 111	A	399, 377, 345	A	471, 358, 225, 144	A	637, 334
<i>T. pacificus</i>	Tpa-1	B	502, 353, 347	B	555, 211, 175, 157	B	756, 391	B	629, 356, 116
<i>T. turkestanii</i>	Ttu-1	B	504, 359, 345	C	563, 209, 157	C	700, 398, 110	C	410, 363, 214, 117
ナミハダニ (黄緑型)	Tu-g-113	C	505, 356, 183, 162	C	561, 209, 157	D	811, 395	C	410, 360, 214, 118
ナミハダニ (赤色型)	Tu-r-28	C	505, 356, 183, 162	C	561, 209, 157	D	811, 395	C	410, 360, 214, 118
カンザワハダニ	Tk-16	B	503, 355, 345	C	558, 209, 157	D	809, 394	C	410, 359, 214, 116
イシイナミハダニ	Ttr-1	B	503, 357, 345	C	559, 209, 158	D	809, 396	B	624, 361, 116
ミヤラナミハダニ	Tpi-4	B	511, 359, 350	D	570, 295, 157	D	822, 398	B	629, 363, 124
サガミナミハダニ	Tph-2	D	512, 353, 175, 173	E	621, 293, 157	D	821, 392	B	628, 357, 124
ナンセイナミハダニ	Tn-1	E	834, 350	F	533, 300, 159	E	757, 209, 180	D	630, 236, 118, 117
<i>T. merganser</i>	Tme-2	F	463, 325, 207, 152	G	630, 292, 208	F	575, 398, 188	D	636, 239, 124, 120
アシノワハダニ	Tlu-1	G	501, 344, 308	H	359, 195, 192, 148	B	756, 383	C	409, 348, 220, 118
ミツユビナミハダニ	Te-1	B	515, 351, 338	I	563, 215, 147	B	767, 379	E	420, 344, 220, 119
<i>T. macfarlanei</i>	Tma-2	H	460, 381, 360	D	579, 306, 162	G	847, 420	F	647, 385, 134
ナンゴクナミハダニ	To-2	I	488, 280, 235, 210, 173	J	630, 217, 191, 168	H	808, 369, 115	G	721, 499, 148

^a 表 1 及び付表 1 参照

^b PCR 産物長はフォワード及びリバースプライマーを含む

^c 100bp より短い断片は無視した

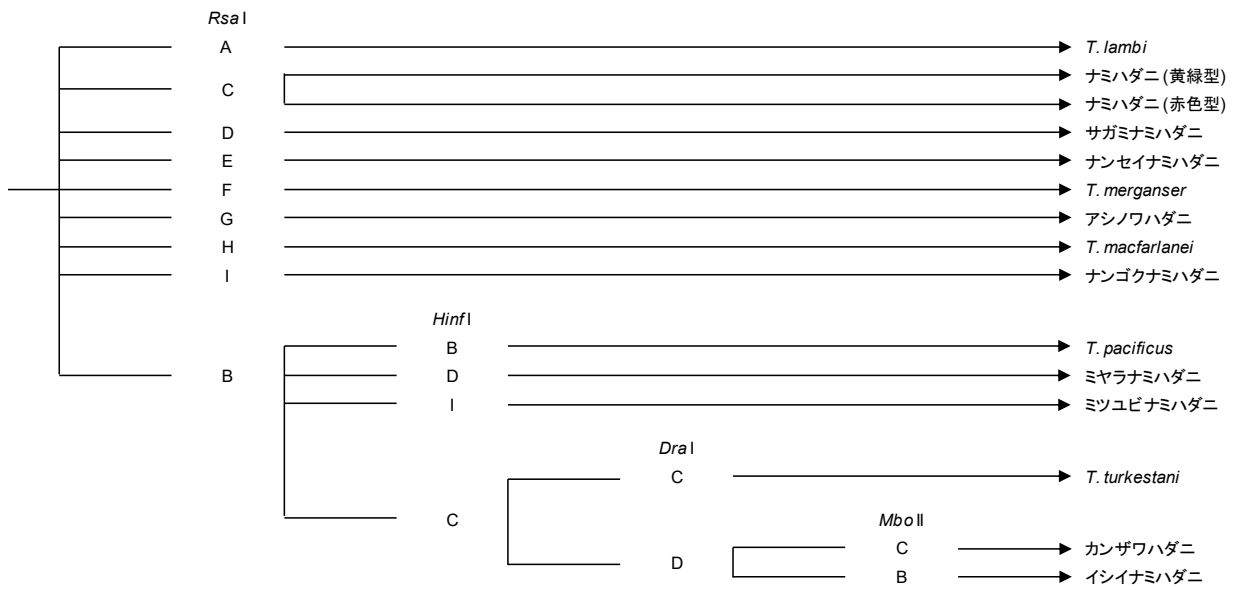


図 13. ITS 領域の塩基配列から推定された PCR-RFLP パターンに基づく *Tetranychus* 属の種の識別のためのフローチャート

A-I は表 3 で定義したバンドパターンを参照

ニ及びイシイナミハダニ) は、*Mbo* II によって得られるバンドパターンにより識別できた。

図 14 は、*Tetranychus* 属 14 種 15 個体群の各雌成虫 1 個体の ITS 領域の PCR 産物を、図 13 に示した 4 種類の制限酵素で処理して得られたバンドパターンを示している。本研究では、199 個体群の 245 個体のバンドパターンを比較した結果、*T. pacificus* の 2 個体群が *Rsa* I による切断後にわずかに異なるバンドパターンを示した事例を除き、種内変異は観察されなかった。従って、図 13 で提案したフローチャートが本研究で検証したほとんどの種に適用できることが確認できた。

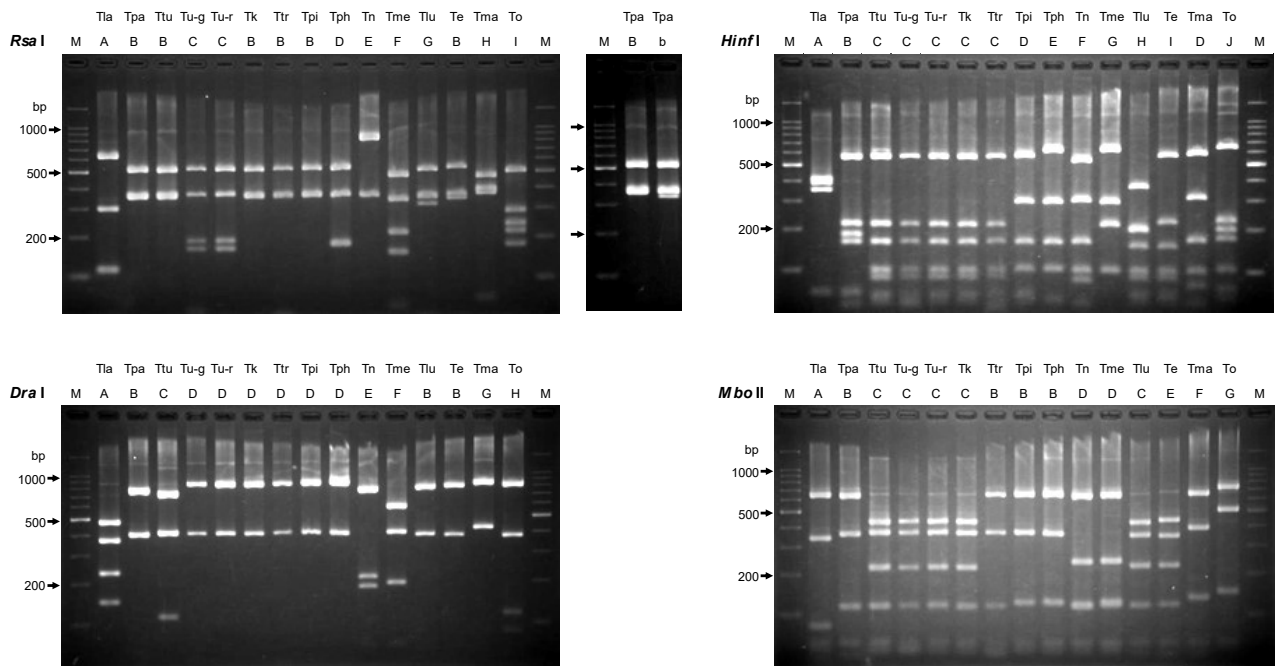


図 14. *Tetranychus* 属の ITS 領域の PCR-RFLP バンドパターン

Tla: *T. lambi*、Tpa: *T. pacificus*、Ttu: *T. turkestanii*、Tu-g: ナミハダニ (黄緑型)、Tu-r: ナミハダニ (赤色型)、Tk: カンザワハダニ、Ttr: イシイナミハダニ、Tpi: ミヤラナミハダニ、Tph: サガミナミハダニ、Tn: ナンセイナミハダニ、Tme: *T. merganser*、Tlu: アシノワハダニ、Te: ミツユビナミハダニ、Tma: *T. macfarlanei*、To: ナンゴクナミハダニ

M: 100-bp ラダー

A-J は表 3 で定義したバンドパターンを参照

Rsa I の断片画像の右にある図中の文字 b は種内変異を示す

断片長は次のように推定された: b; 502, 353, 326 (bp)

100bp より短い断片は無視した

3. 考察

本研究では、日本未記録の5種 (*T. lambi*、*T. pacificus*、*T. turkestanii*、*T. merganser* 及び *T. macfarlanei*) 及び Osakabe et al. (2008) が検討していなかった日本産の1種 (ナンセイナミハダニ) を含む *Tetranychus* 属 14 種を、雌成虫 1 個体を用いた ITS 領域の RFLP パターンに基づいて識別することに成功した。*T. merganser* はカンザワハダニに近似しているが、これらの2種もまた、ITS 領域の PCR-RFLP 法によって明確に識別できた。

T. turkestanii とナミハダニは非常に近似した種である。両種は雌成虫の外部形態に基づいて識別することはできないが、雄成虫の挿入器の形態の顕微鏡観察により、明確に識別できる (Tuttle et al. 1976; Meyer 1987; Baker and Tuttle 1994)。PCR-RFLP 分析では、ITS 領域を *Rsa* I によって切断することにより、これらの2種を識別できる (Navajas and Boursot 2003; Hurtad et al. 2008)。本研究では、これらの2種を *Rsa* I の他、*Dra* I によっても識別できることを示した。

ナミハダニは世界各地に分布するため、日本の輸入植物検疫において最も一般的に発見される *Tetranychus* 属の種である (真崎・北村 2004)。Navajas and Boursot (2003) は、ヨーロッパ産のナミハダニサンプルにおける ITS2 領域の塩基配列の多様性が非常に低いことを示した。さらに、Navajas et al. (1998) は、本種の世界各地のサンプルにおいても同様であることを明らかにしている。このことは、異なる地域のナミハダニ個体群において ITS 領域を用いた PCR-RFLP のバンドパターンに変異が検出される可能性が低いことを示唆している。本研究では、ナミハダニの世界各地から採集した 149 個体群において種内変異は検出されなかった。

しかしながら、Osakabe et al. (2008) は、*Rsa* I による切断後のナミハダニとサガミナミハダニのバンドパターンに、それぞれ種内変異があることを報告した。本研究ではこの変異は検出されなかったが、*Rsa* I による切断後のバンドパターンが、*T. pacificus* の2個体群間で異なっていた。そこで *T. pacificus* の両個体群の塩基配列を再解析した結果、*Rsa* I の認識部位において1塩基の置換が発見

された。本研究で用いた *Tetranychus* 属 14 種、199 個体群のバンドパターンにおいて検出された種内変異は、これが唯一であった。

Osakabe et al. (2008) によって *Tetranychus* 属の識別に用いられた PCR-RFLP 法は国内産の種のみを対象としていたが、本研究によって日本の輸入植物検疫で発見された *Tetranychus* 属の種を識別する上でも有用であることが確認できた。未検討の種の ITS 領域の塩基配列が得られた場合、制限酵素の認識部位と断片長を解析することにより、PCR-RFLP のバンドパターンを推定することができる。そのため、本識別法は本研究で調査できなかった種についても、ITS 領域の塩基配列が得られれば、バンドパターンを推定することにより、識別対象種として追加できる。今後、輸入植物検疫において本研究で調査できなかった種が発見された場合、ITS 領域の塩基配列を解析し、バンドパターンを推定した上で雌成虫を用いた PCR-RFLP を行ってデータを蓄積していくことにより、本識別法の有用性をさらに高めることができると考えられる。

第 III 章 アジア型マイマイガを含むドクガ科 *Lymantria* 属の PCR-RFLP 法による識別

はじめに

ドクガ科 *Lymantria* 属の多くの種は重要な森林害虫であり、広義のマイマイガ、*Lymantria dispar* (Linnaeus) が含まれる。Schintlmeister (2004) は初めて *Lymantria* 属の世界的な分類学的再検討を行い、合計で 167 種を報告した。同属の種は日本から 13 種が記録されている (Pogue and Schaefer 2007; 岸田・真鍋 2012)。

Pogue and Schaefer (2007) は、ヨーロッパ型マイマイガ (European gypsy moth, EGM) とアジア型マイマイガ (Asian gypsy moth, AGM) の 2 型を定義した。Pogue and Schaefer (2007) によれば、ヨーロッパ型マイマイガはウラル山脈より西のヨーロッパ全域及び北アフリカに分布する 1 亜種 *Lymantria dispar dispar* (Linnaeus) である。本亜種は、北米に交配実験のために導入された。アジア型マイマイガは、日本を含む温帯のアジアに発生している *L. dispar* の 2 亜種とその他の 3 種からなる。2 亜種のうち、*Lymantria dispar asiatica* Vnukovskij はアジア大陸に広く分布している (中国、韓国、極東ロシア等)。日本には、*L. dispar* のもう一つの亜種である狭義のマイマイガ *Lymantria dispar japonica* (Motschulsky) (図 6 a-d) が本州、四国、九州及び北海道南西部に分布する。その他の 3 種、エゾマイマイ *Lymantria umbrosa* (Butler) (図 6 e, f) が北海道の特に東部に、シロシタマイマイ *Lymantria albescens* Hori and Umeno (図 6 g, h) が琉球諸島南部に、そしてコシロシタマイマイ *Lymantria postalba* Inoue (図 6 i) が九州南部、対馬、屋久島及び琉球諸島北部に分布している。

岸田 (2011) は、これら 4 種のアジア型マイマイガの種を 2 種 (*L. dispar* と *L. albescens*) に分類した (表 4)。彼はまた、*L. dispar* を 2 亜種、つまり、北海道南部、本州、四国及び九州の個体群を *L. dispar japonica* に、北海道北部及び東部の個体群を *Lymantria dispar hokkaidoensis* Goldschmidt に分類した。さらに、彼は *L. albescens* を 3 亜種、つまり、奄美大島以南の個体群を *Lymantria albescens*

表 4. Pogue and Schaefer (2007) によりアジア型マイマイガと定義された *Lymantria* 属とそれらの岸田 (2011) による分類との対応表

Pogue and Schaefer (2007)		岸田 (2011)	
学名 (和名)	分布	学名 (和名)	分布
<i>L. dispar japonica</i> (Motschulsky) (マイマイガ)	北海道南西部、本州、四国、九州	→ <i>L. dispar japonica</i> (Motschulsky) (マイマイガ)	北海道南部、本州、四国、九州、対馬
<i>L. umbrosa</i> (Butler) (エゾマイマイ)	北海道の特に東部	→ <i>L. dispar hokkaidoensis</i> Goldschmidt (マイマイガ)	北海道の東部及び北部
<i>L. albescens</i> Hori and Umeno (シロシタマイマイ)	琉球諸島南部	→ <i>L. albescens albescens</i> Hori and Umeno (シロシタマイマイ)	奄美大島、徳之島、沖永良部島、沖縄島、石垣島、西表島
<i>L. postalba</i> Inoue (コシロシタマイマイ)	紀伊半島南部、高知県沖ノ島、男女群島、九州南部、対馬、種子島、屋久島、琉球諸島北部	→ <i>L. albescens postalba</i> Inoue (シロシタマイマイ)	紀伊半島南部、高知県沖ノ島、五島列島、男女群島、九州南部、種子島、屋久島
		→ <i>L. albescens tsushimensis</i> Inoue (シロシタマイマイ)	対馬

albescens Hori and Umeno に、九州南部、種子島及び屋久島の個体群を *Lymantria albescens postalba* Inoue に、対馬の個体群を *Lymantria albescens tsushimensis* Inoue に分類した。なお、和名は分類学者によって対応する学名が異なるため (表 4)、本論文の以下の記述では初出で併記する場合を除いて、学名を用いた。

アジア型マイマイガは、ヨーロッパ型マイマイガとは異なる生物学的特徴を持っている。例えば、アジア型マイマイガの卵はヨーロッパ型マイマイガの北米の系統よりも、休眠消去に必要とする低温への暴露の期間がより短い (Keena 1996)。アジア型マイマイガの幼虫は、針葉樹を含むヨーロッパ型マイマイガより広い寄主範囲をもっている (Baranchikov 1989)。抱卵したアジア型マイマイガの雌成虫は持続した飛翔が可能であるのに対し (Schaefer et al. 1984)、米国のヨーロッパ型マイマイガの雌成虫は飛翔できない (Keena et al. 2008)。これらの生物学的特徴から、アジア型マイマイガが北米に侵入した場合、北米の森林に対して、ヨーロッパ型マイマイガよりもより深刻な脅威をもたらす可能性がある。そのため、米国及びカナダ政府は、自国へのアジア型マイマイガの侵入を非常に警戒している (Myers et al. 2000)。

抱卵したアジア型マイマイガの雌成虫は港湾の照明に誘引され、船舶や貨物に卵塊 (図 7 a) を産み付ける (Wallner et al. 1995)。従って、船舶に産卵された卵塊は、アジア型マイマイガの北米への侵入をもたらす可能性がある (NAPPO 2015)。そのため、米国及びカナダ政府は、両国向けの船舶にアジア型マイマイガが付着していないという証明を我が国に求めている (CFIA 2013; USDA APHIS PPQ 2016)。近年、チリ及びニュージーランド政府もまた、船舶上の卵塊がアジア型マイマイガの侵入リスクをもたらすと考え、両国向けの船舶にアジア型マイマイガが付着していないという証明を我が国に求めてきている (SAG 2015; MPI 2017)。オーストラリア政府もまた、船舶に産卵された卵塊によるアジア型マイマイガの侵入を懸念している (DAWR 2016)。これらの国々に向かう船舶へのアジア型マイマイガの産卵リスクを下げるために、日本のいくつかの港湾の管理者が 2007 年

からアジア型マイマイガ个体群の防除を開始した (横地 2007)。

アジア型マイマイガに指定されている 4 種 (*L. dispar japonica*、*L. umbrosa*、*L. albescens* 及び *L. postalba*) に加えて、日本からは他に *Lymantria* 属の 9 種が記録されている (Pogue and Schaefer 2007; 岸田・真鍋 2012)。これらの種の生物学的特徴は、種間で異なる。例えば、これらの種の幼虫の寄主植物は互いに異なり、*L. albescens* はスタジイ及びホルトノキ、*L. postalba* はビロウ、*L. lucescens* はクヌギ、アベマキ、コナラ及びアラカシを寄主植物とする (Pogue and Schaefer 2007)。また、雌成虫の産卵場所選好性が *L. dispar japonica*、*L. umbrosa* 及び *L. albescens* の間で異なり、*L. dispar japonica* はアラカシの葉裏に、*L. umbrosa* はシラカンバの幹に、*L. albescens* はビロウの葉裏に産卵することが報告されている (Jikumaru 2013)。雌成虫の飛翔能力は *L. dispar japonica* と *L. umbrosa* の間で異なり、*L. dispar japonica* よりも *L. umbrosa* の飛翔能力が高いことが明らかにされている (Keena et al. 2008; Iwaizumi and Arakawa 2010)。従って、適切な防除法及び防除範囲を決定するためには、港湾地域に発生している *Lymantria* 属の種を正確に同定する必要がある。

これまで、*Lymantria* 属の種は成虫の形態学的特徴に基づいて同定されてきた (井上 1982; Schintlmeister 2004; Pogue and Schaefer 2007; 岸田 2011)。しかしながら、これらの種は年 1 化で長期間を卵塊で過ごすため、野外で最も目に触れる発育ステージは卵塊である。卵塊の形状はこれらの種間で非常に類似しているため (図 7)、形態学的に種を同定することはできない。従って、種を同定するためには、野外で採集した卵塊を成虫が羽化するまで個別に飼育しなければならない。この方法は同定結果を得るために長い時間 (少なくとも 3-4 ヶ月) を必要とするため、適時に適切な防除方法と防除範囲を決定することが困難である。この状況は、*Lymantria* 属の種を迅速かつ正確に同定するための他の方法の開発が必要であることを示している。

ミトコンドリア DNA (mtDNA) を用いた PCR-RFLP 法が、ハダニ (Lee and Lee 1997)、ミバエ (Muraji and Nakahara 2002)、シロアリ (Szalanski et al. 2003)、ハモグリバエ (Kox et al. 2005)、スカシ

バガ (McKern and Szalanski 2007) などの経済的に重要な分類群の種の識別に有用であることが明らかにされている。Harrison and ODell (1989) は、mtDNA の RFLP を調査した結果、中国及び日本の北海道の *L. dispar* が、北米及びフランスのものとは制限酵素の認識部位が異なり、さらに中国と北海道の間でも異なることを明らかにした。Bogdanowicz et al. (1993) もまた、北米とフランス個体群のハプロタイプが、アジアのハプロタイプのいくつかとは異なることを示した。Keena et al. (2008) は mtDNA の COI 領域の RFLP 分析により、ハプロタイプによって *L. dispar* の系統を大きく 3 つのグループ、つまり、北米、ヨーロッパとシベリア、及びアジアに分けられることを示した。これらの結果は、*L. dispar* の亜種を識別するための mtDNA の RFLP 分析の有用性を示唆している。しかしながら、*Lymantria* 属の種を識別するための mtDNA の PCR-RFLP 分析の有用性ははまだ検討されておらず、不明なままである。

一方、rDNA の ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法が、アザミウマ (Toda and Komazaki 2002)、ハダニ (Gotoh et al. 1998; Knapp et al. 2003) 及びヒシウンカ (Bertin et al. 2010) などの経済的に重要な分類群の種の識別に有用であることが明らかにされている。*Lymantria* 属の種では、Pfeifer et al. (1995) が *L. dispar* のアジア系統とヨーロッパ系統、カシワマイマイ *Lymantria mathura* Moore (図 8 a、b) 及びノンネマイマイ *Lymantria monacha* (Linnaeus) (図 8 c、d) の識別には、ITS2 領域の PCR-RFLP が有効であることを示した。従って、ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法は、日本に分布している他の *Lymantria* 属の種の識別にも適している可能性がある。

本章の第 1 節では、日本の港湾で発見される可能性が高いアジア型マイマイガ 4 種を含む日本産 *Lymantria* 属 7 種を識別するために、mtDNA (COI 領域の一部、tRNA leucine [tRNA-Leu]、COII 領域、及び tRNA lysine [tRNA-Lys] の一部) を用いた PCR-RFLP 法を開発し、主として実際に港湾で採集されたサンプルを用いて有用性を検討した。植物検疫では、種の識別結果には高い信頼性が求められるため、異なる遺伝子領域を用いて識別結果を二重に点検することが望ましい。そこで第

2 節では、第 1 節で用いた 7 種に日本の港湾でも発見される可能性をもつ 1 種 (*L. lucescens*) を加えた 8 種を識別するための ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法の有用性を検討した。

第1節 ミトコンドリア DNA を用いた識別

1. 材料と方法

1) 標本

日本産 *Lymantria* 属 7 種、合計 45 個体群 291 個体を PCR-RFLP の検出に用いた (表 5、図 6、図 8 a-f、附表 2)。つまり、アジア型マイマイガ 4 種 (*L. dispar japonica*、*L. umbrosa*、*L. albescens* 及び *L. postalba*) 及び *Lymantria* 属 3 種 [マエグロマイマイ *Lymantria xyliana* Swinhoe (図 8 e、f)、*L. mathura* 及び *L. monacha*] である。後者の 3 種は広い分布域と寄主範囲をもつため (Pogue and Schaefer 2007)、日本の港湾で発見される可能性があることから本研究のサンプルに加えた。

供試した種と個体群は 1994 年から 2012 年の間に野外で成虫、蛹、幼虫または卵塊として採集した (附表 2)。蛹、幼虫及び卵塊で採集したサンプルは、成虫が羽化するまで実験室で飼育した。すべての成虫は DNA 抽出まで乾燥標本として 20 °C、または冷凍標本として -20 °C で保存した。これらの標本は北海道で採集した *L. dispar japonica* と *L. umbrosa* を除き、Pogue and Schaefer (2007) による種の再記載に従って形態学的に同定した。北海道で採集した両種は、雌雄成虫共に形態的特徴が類似していたため (図 6 c-f)、形態学的に種を識別することができなかった。そのため、以下に述べる遺伝子診断法で同定した。すべての証拠標本は、連続的な証拠標本番号の下に農林水産省横浜植物防疫所に保管した。

Bogdanowicz et al. (2000) は、北海道産の *L. dispar* 6 個体について mtDNA の COI、COII 及び NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) 領域の塩基配列を系統的に解析した。彼らは、北海道産 *L. dispar* 6 個体のうち、5 個体は北海道クレードに属する mtDNA の塩基配列をもち、これらのハプロタイプは日本国内の他の地域またはアジアの個体群からは発見されないことを示した。しかしなが

表 5. mtDNA による識別に用いた *Lymantria* 属の産地と検討した個体数

種名	産地 (日本)	RFLP		シーケンス		
		個体数	証拠標本番号 ^a	個体数	証拠標本番号 ^a	
<i>L. dispar japonica</i>	北海道小樽市	12	9, 58, 60, 62, 178, 179, 183–185, 187, 188, 190	1	58	
	北海道札幌市	13	14, 15, 63–67, 212–214, 217, 219, 220	1	15	
	北海道苫小牧市	2	199, 241	1	241	
	北海道室蘭市	26	49–54, 163–175, 201–207	1	54	
	北海道函館市	5	68–72	1	68	
	宮城県石巻市	6	343–348			
	宮城県利府町	3	33–35			
	宮城県塩竈市	5	24, 144–147			
	宮城県多賀城市	4	140–143			
	秋田県秋田市	14	256–260, 354–362			
	山形県酒田市	2	285, 286			
	千葉県成田市	1	238			
	千葉県千葉市	3	91–93			
	神奈川県横浜市	9	22, 23, 94–96, 161, 162, 176, 177			
	神奈川県逗子市	5	11, 152–155			
	神奈川県横須賀市	6	25, 156–160			
	新潟県新潟市	2	292, 293			
	新潟県上越市	4	287–290			
	富山県射水市	3	106–108			
	富山県高岡市	6	10, 83–87			
	愛知県名古屋市	10	17, 18, 97–99, 223–227	1	17	
	愛知県岡崎市	7	19, 109–114			
	兵庫県神戸市	6	36–38, 100–102			
	奈良県奈良市	13	324–336			
	広島県広島市	11	12, 20, 21, 130–132, 228–232			
	徳島県徳島市	1	323			
	愛媛県松山市	1	301			
	福岡県北九州市	10	7, 73–77, 233, 234, 236, 237			
	大分県大分市	5	28–32			
	<i>L. umbrosa</i>	北海道小樽市	8	59, 61, 180–182, 186, 191, 192	1	59
		北海道札幌市	5	13, 215, 216, 218, 221	1	13
		北海道苫小牧市	10	43–48, 194, 196–198	1	43
<i>L. albescens</i>	沖縄県那覇市	18	137–139, 262–265, 268, 275–284	1	137	
<i>L. postalba</i>	長崎県対馬市	4	78–81	1	80	
<i>L. xylina</i>	千葉県富山町	2	365, 366			
	大分県大分市	4	208–211			
	沖縄県那覇市	13	115–123, 133–136	1	118	
<i>L. mathura</i>	北海道小樽市	6	124–129			
	北海道苫小牧市	16	1–3, 55–57, 243–252	1	55	
	岩手県盛岡市	1	350			

表 5. 続き

種名	産地 (日本)	RFLP		シーケンス	
		個体数	証拠標本番号 ^a	個体数	証拠標本番号 ^a
<i>L. mathura</i>	神奈川県横浜市	1	349		
	神奈川県横須賀市	2	254, 255		
	山梨県小淵沢町	2	368, 369		
<i>L. monacha</i>	北海道苫小牧市	3	150, 239, 240	1	150
	山梨県小淵沢町	1	367		

^a 付表 2 参照

すべての証拠標本は一連の証拠標本番号の下に農林水産省横浜植物防疫所に保管した

ら、北海道産の 1 個体は本州、九州及びアジア大陸において発見される最も一般的な mtDNA のハプロタイプであった。Higashiura et al. (2011) もまた、北海道の *L. dispar* の個体群において、mtDNA の塩基配列に 2 つのハプロタイプがあることを示した。北海道の *L. dispar* の個体群におけるこれら 2 つの mtDNA のハプロタイプは、Pogue and Schaefer (2007) による分類では恐らくそれぞれ、*L. umbrosa* と *L. dispar japonica* に一致するものと考えられる。

本研究では、北海道で採集した *L. dispar japonica* と *L. umbrosa* の標本を識別するため、一部の個体の COII 領域の塩基配列を Bogdanowicz et al. (2000) と Higashiura et al. (2011) において解析された塩基配列と比較し、同定した。北海道個体群の両種については、各個体の PCR-RFLP のバンドパターンを、上述の COII 領域の塩基配列の比較によって *L. dispar japonica* または *L. umbrosa* と同定した個体のバンドパターンと比較することによって識別した。

2) DNA 抽出及び PCR 増幅

成虫 1 個体から任意に選んだ脚 1 本を切り外し、1.5 mL サンプルチューブ内に入れた 80 μ L の PBS バッファー (Phosphate Buffered Saline, Takara Bio) の中でプラスチックペッスルを用いて磨砕した。次に、QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) を増幅するためのプライマーとして、S2994 : 5'-GAACATTCITATAATGAACT(C/T)CCT-3' 及び A3772 : 5'-GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT-3' (Bogdanowicz et al. 2000) を用いた。PCR 反応は Ex Taq DNA polymerase を用いて総容量 50 μ L の系で行った。各反応には、5.0 μ L の DNA テンプレート、5.0 μ L の Ex Taq buffer、4.0 μ L の dNTPs (2.5 mM each)、1.25 μ L (10 pmol/ μ L) の各プライマー及び 2.0 U のポリメラーゼを用いた。PCR 反応条件は最初に 94 $^{\circ}$ C で 2 分加熱した後、94 $^{\circ}$ C で 1 分、43 $^{\circ}$ C で 1 分、72 $^{\circ}$ C で 2 分を 35 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分加熱した。PCR 産物は 1 \times TBE バッファー (Tris-Borate-EDTA, Takara Bio)

を用いて 2 %アガロースゲル (Agarose S) で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線を照射することにより可視化した。PCR 産物はシーケンス及び RFLP 分析に用いた。

3) シーケンス

日本産 *Lymantria* 属 7 種、つまり *L. dispar japonica* (証拠標本 No. 17)、*L. umbrosa* (No. 13)、*L. albescens* (No. 137)、*L. postalba* (No. 80)、*L. xyliana* (No. 118)、*L. mathura* (No. 55) 及び *L. monacha* (No. 150) の各 1 個体 (表 5、表 6、付表 2) を用いて、mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) を上述の PCR によって増幅し、得られた DNA 溶液を第 2 章第 2 節に述べた手法でシーケンスした。

さらに、北海道で採集した *L. dispar japonica* 及び *L. umbrosa* を識別するために、*L. dispar japonica* の 5 個体群の各 1 個体 (証拠標本 Nos. 58、15、241、54 及び 68) 及び *L. umbrosa* の 2 個体群の各 1 個体 (No. 59 及び No. 43) (表 5、付表 2) を用いて、mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) を上述の PCR によって増幅し、得られた DNA 溶液を第 2 章第 2 節に述べた手法でシーケンスした。

4) 制限酵素の認識部位の解析及び PCR-RFLP の検出

得られた塩基配列における制限酵素の認識部位及び断片長を Genetyx-Win version 11.0 を用いて推定し、識別に適していると考えられる 3 種類の制限酵素 (*Dra* I、*Alu* I 及び *Ssp* I) を選抜した。*Lymantria* 属 7 種の mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) の塩基配列を Clustal W version 2.1 (Larkin et al. 2007) を用いて整列し、選抜した 3 種類の制限酵素の認識部位を比較した。

それぞれの成虫 1 個体の PCR 産物を新しい 0.5 mL のサンプルチューブ 3 本に 5 μ L ずつ分注し

表 6. 日本産 *Lymantria* 属の mtDNA の PCR 産物、断片長 (bp) 及びバンドパターン^aの型

種名	証拠標本 番号 ^a	産地	PCR 産物 ^b	Dra I		Alu I		Ssp I	
				バンド パターン	断片長	バンド パターン	断片長	バンド パターン	断片長
<i>L. dispar japonica</i>	17	名古屋市	817	A	749, 68	A	495, 214, 108	A	432, 368, 17
<i>L. umbrosa</i>	13	札幌市	817	B	423, 326, 68	A	495, 214, 108	A	432, 368, 17
<i>L. albescens</i>	137	那覇市	817	C	375, 374, 68	B	393, 316, 108	B	449, 368
<i>L. postalba</i>	80	対馬市	817	C	375, 374, 68	B	393, 316, 108	C	817
<i>L. xyliana</i>	118	那覇市	817	D	374, 326, 68, 49	C	709, 108	A	432, 368, 17
<i>L. mathura</i>	55	苫小牧市	817	E	593, 156, 68	D	505, 312	D	588, 229
<i>L. monacha</i>	150	苫小牧市	818	A	750, 68	D	505, 313	E	368, 242, 208

^a 表 5 及び付表 2 参照

^b PCR 産物長はフォワード及びリバースプライマーを含む

た。続いて、3 U の制限酵素 *Dra* I または 2 U の制限酵素 *Alu* I か *Ssp* I (Takara Bio) を加えたのち、1.0 μ L の 10 \times reaction buffer を加えて総反応容量を 10 μ L とし、PCR 産物を完全に切断するために 37°C で 3 時間 (*Ssp* I では 6 時間) 保温した。切断した PCR 産物は DNA 断片のバンドパターンを比較するために 3.5 %アガロースゲル (Agarose X) を用いた電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した後に紫外線を照射することにより可視化した。

2. 結果

本研究で解析した塩基配列はアクセッション番号 AB839867-AB839880 として、国際塩基配列データベース (INSD) に登録した。mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) の PCR 産物長は、*L. monacha* で 818 bp、他種で 817 bp であった (表 6)。

図 15 は、北海道で採集した *L. dispar japonica* 5 個体及び *L. umbrosa* 3 個体の COII 領域 345 bp の塩基配列を示す。これら 8 個体の塩基配列では、Bogdanowicz et al. (2000) 及び Higashiura et al. (2011) により解析されたハプロタイプと同様に、2 つのハプロタイプが認められた。

図 16 は、*Lymantria* 属 7 種の mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) の塩基配列及び選抜した 3 種類の制限酵素 (*Dra* I、*Alu* I 及び *Ssp* I) の認識部位を示す。

表 6 は、*Lymantria* 属 7 種の mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) の塩基配列を制限酵素 *Dra* I、*Alu* I 及び *Ssp* I で別々に処理した時に得られると予想される断片長及びバンドパターンの型を示す。すべての種を識別できる制限酵素はなかったが (表 6)、異なる制限酵素の結果を組み合わせると、すべての種において種特異的なパターンが得られた。これらの結果に基づき、*Lymantria* 属の種の識別法を示した (図 17)。7 種中 3 種 (*L. umbrosa*、*L. xyliana* 及び *L. mathura*) は、*Dra* I によって得られるバンドパターンが異なるため識別できた。*Dra* I により同じバンドパターン A を示した 2 種 (*L. dispar japonica* 及び *L. monacha*) は、*Alu* I によって得られるバンドパターンが異なるため識別できた。*Dra* I により同じバンドパターン C を示した 2 種 (*L. albescens* 及び *L. postalba*) は、*Ssp* I によって得られるバンドパターンが異なるため識別できた。

図 18 は、7 種の mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) 塩基配列を図 17 に示した制限酵素で処理した場合に得られたバンドパターンを示す。本研究では、7 種 45 個体群 291 個体のバンドパターンを比較した結果、種内変異は検出されなかった。

Species	Accession	Position	Sequence	Position
<i>L. dispar japonica</i> No.17 (Nagoya)	1	3433	TGAAGTTATGAATATTCAGATTTCAAAAATATTGATTTGATTCCTTATATAGTGAATCTGATAATATAAAATTAGATAA	80
<i>L. dispar</i> AF075278	1	C.....G...	80
<i>L. dispar</i> A1 AB244648	1		80
<i>L. dispar japonica</i> No.58 (Otaru)	1		80
<i>L. dispar japonica</i> No.15 (Sapporo)	1	A.....	80
<i>L. dispar japonica</i> No.241 (Tomakomai)	1		80
<i>L. dispar japonica</i> No.54 (Muroran)	1		80
<i>L. dispar japonica</i> No.68 (Hakodate)	1		80
<i>L. dispar hokkaidoensis</i> AF075279	1	G.....C.....	80
<i>L. dispar</i> H6 AB244665	1	G.....C.....A.....	80
<i>L. umbrosa</i> No.59 (Otaru)	1	G.....C.....	80
<i>L. umbrosa</i> No.13 (Sapporo)	1	G.....C.....	80
<i>L. umbrosa</i> No.43 (Tomakomai)	1	G.....C.....	80
<i>L. dispar japonica</i> No.17 (Nagoya)	81		TTTTTCGCTTATTAGATGTTGATAATCGAATTGTCCTACCAATAAAATCAATCAAATTCGAATTATAGTTACTGCAACTGATG	160
<i>L. dispar</i> AF075278	81	T.....	160
<i>L. dispar</i> A1 AB244648	81		160
<i>L. dispar japonica</i> No.58 (Otaru)	81		160
<i>L. dispar japonica</i> No.15 (Sapporo)	81		160
<i>L. dispar japonica</i> No.241 (Tomakomai)	81		160
<i>L. dispar japonica</i> No.54 (Muroran)	81		160
<i>L. dispar japonica</i> No.68 (Hakodate)	81		160
<i>L. dispar hokkaidoensis</i> AF075279	81	C.....	160
<i>L. dispar</i> H6 AB244665	81	C.....	160
<i>L. umbrosa</i> No.59 (Otaru)	81	C.....	160
<i>L. umbrosa</i> No.13 (Sapporo)	81	C.....	160
<i>L. umbrosa</i> No.43 (Tomakomai)	81	C.....	160
<i>L. dispar japonica</i> No.17 (Nagoya)	161		TAATCCACTCTTGAACAATTCACGCTTTAGGTGTTAAAAATTGATGCTAACCCAGGACGATTAAATCAAACCTAATTTTTTT	240
<i>L. dispar</i> AF075278	161		240
<i>L. dispar</i> A1 AB244648	161		240
<i>L. dispar japonica</i> No.58 (Otaru)	161		240
<i>L. dispar japonica</i> No.15 (Sapporo)	161	G.....	240
<i>L. dispar japonica</i> No.241 (Tomakomai)	161		240
<i>L. dispar japonica</i> No.54 (Muroran)	161		240
<i>L. dispar japonica</i> No.68 (Hakodate)	161		240
<i>L. dispar hokkaidoensis</i> AF075279	161		240
<i>L. dispar</i> H6 AB244665	161		240
<i>L. umbrosa</i> No.59 (Otaru)	161		240
<i>L. umbrosa</i> No.13 (Sapporo)	161		240
<i>L. umbrosa</i> No.43 (Tomakomai)	161		240
<i>L. dispar japonica</i> No.17 (Nagoya)	241		ATCAGACGACCTGGAATTTTTTTTGGTCAATGTTTCAGAAATTTGCGGAACCTAACCCACAGATTATACCAATTATAAATTGA	320
<i>L. dispar</i> AF075278	241		320
<i>L. dispar</i> A1 AB244648	241		320
<i>L. dispar japonica</i> No.58 (Otaru)	241		320
<i>L. dispar japonica</i> No.15 (Sapporo)	241		320
<i>L. dispar japonica</i> No.241 (Tomakomai)	241		320
<i>L. dispar japonica</i> No.54 (Muroran)	241		320
<i>L. dispar japonica</i> No.68 (Hakodate)	241		320
<i>L. dispar hokkaidoensis</i> AF075279	241		320
<i>L. dispar</i> H6 AB244665	241		320
<i>L. umbrosa</i> No.59 (Otaru)	241		320
<i>L. umbrosa</i> No.13 (Sapporo)	241		320
<i>L. umbrosa</i> No.43 (Tomakomai)	241		320
<i>L. dispar japonica</i> No.17 (Nagoya)	321	3724	AAGAAATCCCAATTAATAAACTTTATT	345
<i>L. dispar</i> AF075278	321		345
<i>L. dispar</i> A1 AB244648	321		345
<i>L. dispar japonica</i> No.58 (Otaru)	321		345
<i>L. dispar japonica</i> No.15 (Sapporo)	321		345
<i>L. dispar japonica</i> No.241 (Tomakomai)	321		345
<i>L. dispar japonica</i> No.54 (Muroran)	321		345
<i>L. dispar japonica</i> No.68 (Hakodate)	321		345
<i>L. dispar hokkaidoensis</i> AF075279	321	C.....C.....	345
<i>L. dispar</i> H6 AB244665	321	C.....C.....	345
<i>L. umbrosa</i> No.59 (Otaru)	321	C.....C.....	345
<i>L. umbrosa</i> No.13 (Sapporo)	321	C.....C.....	345
<i>L. umbrosa</i> No.43 (Tomakomai)	321	C.....C.....	345

図 15. 北海道産の *L. dispar japonica* (上) 及び *L. umbrosa* (下) の mtDNA COII 領域の塩基配列の可変サイト

L. dispar japonica No. 17 (Nagoya) と同じ塩基はドットで示した

L. dispar japonica 及び *L. umbrosa* の間に 5 箇所固定した相違がある

四角の上の 4 桁の数字は *Drosophila yakuba* (X03240: Clary and Wolstenholme, 1985) の対応する塩基の位置を示す

L. dispar AF075278 及び *L. dispar hokkaidoensis* AF075279 は Bogdanowicz et al. (2000) から引用した

L. dispar A1 AB244648 及び *L. dispar* H6 AB244665 は Higashiura et al. (2011) から引用した

	COI →	→ tRNA-Leu	Dra I		
L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	1	ATTCTAAGAAATTTCTAATATGGCAGATTATATGTAATGGTTTAAACCCCATTCATAAAGGATT-ATCCITTTTTTAGA	79		
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	1T.....	79		
L. albescens No.137 (Naha)	1T.....	79		
L. postalba No.80 (Tsushima)	1T.....	79		
L. xylina No.118 (Naha)	1A.....	79		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	1T.....	79		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	1T.....	80		
		Alu I	COII		
L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	80	PATAGCTACATGATCTAATTTTAATCTTCAAATAGAGCATCACCTCTAATAGAACAATTTATTTTTTCCATGACCACA	159		
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	80T.....	159		
L. albescens No.137 (Naha)	80C.....	159		
L. postalba No.80 (Tsushima)	80C.....	159		
L. xylina No.118 (Naha)	80A.....	159		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	80T.....	159		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	81C.....	160		
		Ssp I	Ssp I		
L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	160	CTTTAATTATTTAATCATAATTACTATTTTAGTAGGTTATTTAATAATTAGATTATTATTCATAAATATATTAATCGT	239		
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	160G.....	239		
L. albescens No.137 (Naha)	160C.....	239		
L. postalba No.80 (Tsushima)	160C.....	239		
L. xylina No.118 (Naha)	160G.....	239		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	160T.....	239		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	161G.....	240		
		Alu I			
L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	240	TTTCTTTTAGAAGGACAAATAATGAAGTAATTTGAACAATCTTACCTGCTATTACTTTAATTTTTATTGCCCTCCCTC	319		
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	240C.....	319		
L. albescens No.137 (Naha)	240C.....	319		
L. postalba No.80 (Tsushima)	240C.....	319		
L. xylina No.118 (Naha)	240T.....	319		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	240T.....	319		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	241G.....	320		
		Dra I	Alu I		
L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	320	TCTCCGACTTCTATATTTATTAGTAGAAGTAAATCCATTAATTAATTAATCAAAATCAATGGACATCAATGATATTGAA	399		
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	320T.....	399		
L. albescens No.137 (Naha)	320C.....	399		
L. postalba No.80 (Tsushima)	320C.....	399		
L. xylina No.118 (Naha)	320T.....	399		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	320C.....	399		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	321T.....	400		
		Alu I	Ssp I	Dra I	Ssp I
L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	400	GTTATCAATATTCAGATTTCAAAATATTTGAATTTGATTCTTATATAGTGAAATCTGATAATATAAAATAGATAATTTT	479		
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	400G.....	479		
L. albescens No.137 (Naha)	400C.....	479		
L. postalba No.80 (Tsushima)	400C.....	479		
L. xylina No.118 (Naha)	400A.....	479		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	400C.....	479		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	401A.....	480		
		L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	480	CGCTTATTAGATGTTGATAATCGAATTTGCTTACCAATAAATAATCAAATTCGAATTTAGTTACTGCAACTGATGTAAT	559
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	480C.....	559		
L. albescens No.137 (Naha)	480T.....	559		
L. postalba No.80 (Tsushima)	480C.....	559		
L. xylina No.118 (Naha)	480A.....	559		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	480A.....	559		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	481A.....	560		
		Alu I	Dra I		
L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	560	CCACTCTTGAACAATTCAGCTTTAGGTGTTAAAATTTGATGCTAACCCAGGACGATTAAATCAAACATAATTTTTTATCA	639		
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	560A.....	639		
L. albescens No.137 (Naha)	560T.....	639		
L. postalba No.80 (Tsushima)	560A.....	639		
L. xylina No.118 (Naha)	560A.....	639		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	560T.....	639		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	561A.....	640		
		Dra I			
L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	640	GACGACCTGGAATTTTTTTTGGTCAATGTTTCAGAAAATTTGCGGAACATAACCACAGATTATACCATTATAAATGAAAGA	719		
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	640T.....	719		
L. albescens No.137 (Naha)	640A.....	719		
L. postalba No.80 (Tsushima)	640A.....	719		
L. xylina No.118 (Naha)	640C.....	719		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	640C.....	719		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	641A.....	720		
		COII →	→ tRNA-Lys		
L. dispar japonica No.17 (Nagoya)	720	ATCCAATTAATACTTTTATAATTAATTAATAATTAATTTCTTCATT	766		
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	720C.....	766		
L. albescens No.137 (Naha)	720T.....	766		
L. postalba No.80 (Tsushima)	720C.....	766		
L. xylina No.118 (Naha)	720T.....	766		
L. mathura No.55 (Tomakomai)	720A.....	766		
L. monacha No.150 (Tomakomai)	721AT.....	767		

図 16. *Lymantria* 属 7 種の mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) の塩基配列

L. dispar japonica と同じ塩基はドットで示し、ダッシュはギャップを示す
3 種類の選択した制限酵素の認識部位を四角で囲んだ

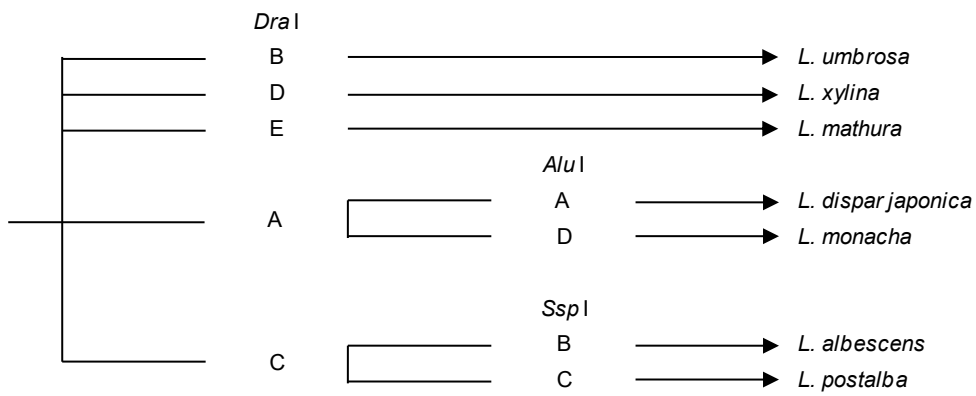


図 17. mtDNA の塩基配列から推定された PCR-RFLP パターンに基づく *Lymantria* 属の種の識別のためのフローチャート

A-E は表 6 で定義したバンドパターンを参照

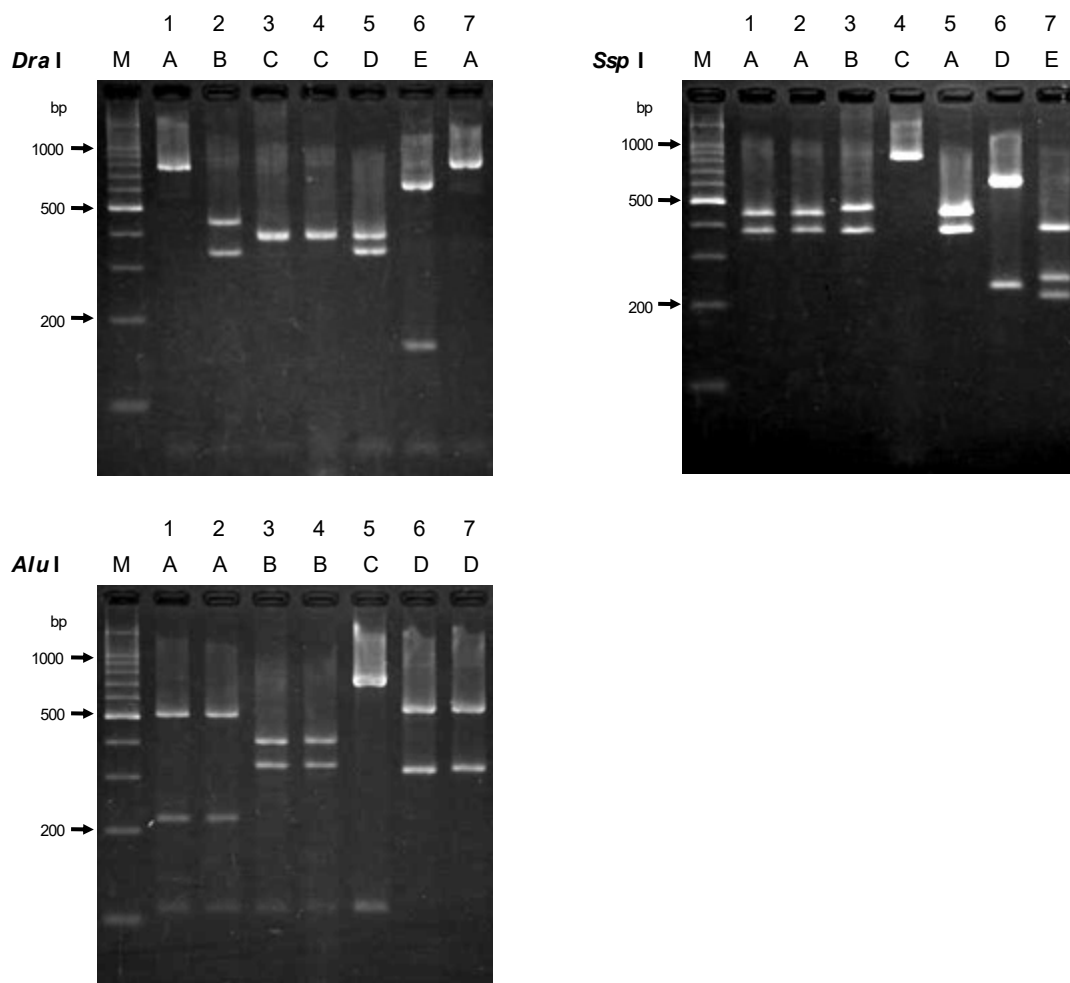


図 18. *Lymantria* 属の mtDNA の PCR-RFLP バンドパターン

1: *L. dispar japonica*、2: *L. umbrosa*、3: *L. albescens*、4: *L. postalba*、5: *L. xyliana*、6: *L. mathura*、7: *L. monacha*

M: 100-bp ラダー

A-E は表 6 で定義したバンドパターンを参照

3. 考察

本研究では、mtDNA (COI 領域の一部、tRNA-Leu、COII 領域、及び tRNA-Lys の一部) の PCR-RFLP パターンに基づき、アジア型マイマイガ 4 種 (*L. dispar japonica*、*L. umbrosa*、*L. albescens* 及び *L. postalba*) を含む日本産 *Lymantria* 属 7 種の識別に成功した (表 6、図 17、18)。これらの結果は、mtDNA を用いた PCR-RFLP 法が日本の港湾で発見される可能性がある日本産 *Lymantria* 属の種の識別に有用であることを示すものである。

Bogdanowicz et al. (2000) は、mtDNA の塩基配列の 3 つの遺伝子領域 (COI、COII 及び NDI) を解析し、*L. dispar* の世界中の個体群間における mtDNA の変異を記載し、ハプロタイプを 4 つのグループ、つまり (1) 日本の沖縄、(2) 日本の北海道、(3) 日本の本州、九州及びアジア大陸、そして (4) ヨーロッパ、チュニジア及び北米に分けた。Pogue and Schaefer (2007) による近年の分類では、これらのハプロタイプは恐らく (1) *L. albescens*、(2) *L. umbrosa*、(3) *L. dispar japonica* と *L. dispar asiatica*、そして (4) *L. dispar dsipar* に相当すると考えられている。従って、Bogdanowicz et al. (2000) によって解析された mtDNA の変異は、種の識別に有用である可能性が高い。実際、本研究では *L. albescens*、*L. umbrosa* 及び *L. dispar japonica* を含む日本産 *Lymantria* 属 7 種を mtDNA を用いた PCR-RFLP 法により識別できることを確認した。

本研究では、日本産 *Lymantria* 属 7 種 45 個体群 291 個体のバンドパターンについて、種内変異が検出されなかった。従って、本研究で開発された PCR-RFLP 法が日本に分布する *Lymantria* 属の種を識別するために有用であることが改めて確認された。

Pogue and Schaefer (2007) は、北米に誤って導入された場合に、天然林に深刻な被害と経済的損失を及ぼす恐れのある *Lymantria* 属の 31 種と 3 亜種を再検討した。彼らは、*L. dispar* の 2 亜種 (*L. dispar asiatica* 及び *L. dispar japonica*) 及び *Lymantria* 属の 3 種 (*L. umbrosa*、*L. albescens* 及び *L. postalba*) をアジア型マイマイガとして指定した。日本にはアジア型マイマイガ 4 種 (*L. dispar*

japonica、*L. umbrosa*、*L. albescens* 及び *L. postalba*) が分布するのに対し、韓国及び中国には 1 種 (*L. dispar asiatica*)、ロシアには 2 種 (*L. dispar asiatica* 及び *L. umbrosa*) が分布している (Pogue and Schaefer 2007)。Pogue and Schaefer (2007) によれば、これらの国々の間で、日本においてアジア型マイマイガとして指定された種の多様性が最も高いことは注目に値する。一方、アジア型マイマイガに指定されていない *Lymantria* 属の種数は、日本は 9 種 (Pogue and Schaefer 2007; 岸田・真鍋 2012)、韓国は 5 種、中国は 18 種、ロシアは 2 種である (Pogue and Schaefer 2007)。台湾にはアジア型マイマイガ指定種は分布していないが、その他の *Lymantria* 属が 10 種分布している (Pogue and Schaefer 2007)。従って、船舶がこれらの近隣諸国から日本の港湾を經由して米国やカナダに向かう場合、日本の港湾における船舶検査でこれらの国々に分布する *Lymantria* 属の種の卵塊が発見される可能性がある。将来的には、本研究で開発された mtDNA を用いた PCR-RFLP 法が、これらの近隣諸国に分布する一方、日本には分布しない *Lymantria* 属の種の識別にも適用可能であるかどうかを確認しておくことが望まれる。

第2節 核リボソーム RNA を用いた識別

1. 材料と方法

1) 標本

日本産 *Lymantria* 属 8 種 54 個体群 330 個体を PCR-RFLP の検出のために用いた (表 7、図 6、図 8、付表 3)。これらのサンプルはアジア型マイマイガ 4 種 (*L. dispar japonica*、*L. umbrosa*、*L. albescens* 及び *L. postalba*) 及び *Lymantria* 属 4 種 (*L. xyliana*、*L. mathura*、*L. monacha* 及び *L. lucescens*) である。*L. lucescens* の分布域と寄主植物は限られているが、雌成虫が相当な距離を飛翔する (Pogue and Schaefer 2007) ため、本種は日本の港湾で発見される可能性があることから、本研究の材料に加えた。

すべてのサンプルは 1994 年から 2013 年の間に野外で成虫、蛹、幼虫または卵塊として採集した (付表 3)。蛹、幼虫及び卵塊で採集したサンプルは成虫が羽化するまでの間、実験室で飼育した。すべての成虫は DNA 抽出までの間、乾燥標本として 20 °C、または冷凍標本として -20 °C で保存した。これらのサンプルは、形態学的に識別できなかった北海道で採集した *L. dispar japonica* と *L. umbrosa* を除き、Pogue and Schaefer (2007) の種の再記載に従って形態学的に同定した。北海道で採集した両種の標本は、本章の第 1 節に述べた mtDNA を用いた PCR-RFLP 法によって識別した。すべての証拠標本は、連続的な証拠標本番号の下に農林水産省横浜植物防疫所に保管した。

2) DNA 抽出及び PCR 増幅

成虫各 1 個体から任意に選んだ脚 1 本を切り外し、1.5 mL サンプルチューブ内に入れた 80 µL の PBS バッファーの中でプラスチックペッスルを用いて磨砕した。続いて、QIAamp DNA mini Kit を用いて DNA を抽出した。ITS2 領域の一部を増幅するプライマーとして、HITS1 : 5'-

表 7. ITS2 領域による識別に用いた *Lymantria* 属の産地と検討した個体数

種名	RFLP	シーケンス		
	産地 (日本) 及び個体数	産地 (日本)	個体数	証拠標本番号 ^a
<i>L. dispar japonica</i>	北海道小樽市 (12); 北海道札幌市 (13); 北海道苫小牧市 (2); 北海道室蘭市 (26); 北海道函館市 (5); 宮城県石巻市 (6); 宮城県利府町 (4); 宮城県塩竈市 (5); 宮城県多賀城市 (4); 秋田県秋田市 (14); 山形県酒田市 (2); 千葉県成田市 (1); 千葉県千葉市 (3); 神奈川県横浜市 (9); 神奈川県逗子市 (5); 神奈川県横須賀市 (6); 新潟県新潟市 (2); 新潟県上越市 (5); 富山県射水市 (6); 富山県高岡市 (7); 福井県敦賀市 (4); 岐阜県瑞浪市 (1); 岐阜県土岐市 (4); 愛知県名古屋市 (10); 愛知県岡崎市 (7); 大阪府岸和田市 (3); 兵庫県神戸市 (6); 奈良県奈良市 (13); 広島県福山市 (1); 広島県広島市 (11); 山口県宇部市 (1); 徳島県徳島市 (1); 愛媛県松山市 (2); 福岡県北九州市 (13); 大分県大分市 (5)	神奈川県横浜市	1	23
<i>L. umbrosa</i>	北海道小樽市 (8); 北海道札幌市 (5); 北海道苫小牧市 (9)	北海道札幌市	1	13
<i>L. albescens</i>	沖縄県那覇市 (17)	沖縄県那覇市	1	139
<i>L. postalba</i>	長崎県対馬市 (4)	長崎県対馬市	1	80
<i>L. xyliana</i>	千葉県富山町 (2); 大分県大分市 (4); 沖縄県那覇市 (13)	沖縄県那覇市	1	118
<i>L. mathura</i>	北海道小樽市 (6); 北海道苫小牧市 (17); 岩手県盛岡市 (4); 神奈川県横浜市 (1); 神奈川県横須賀市 (2); 山梨県小淵沢町 (1); 広島県広島市 (3)	北海道苫小牧市	1	55
<i>L. monacha</i>	北海道苫小牧市 (3); 山梨県小淵沢町 (1)	北海道苫小牧市	1	150
<i>L. lucescens</i>	岐阜県瑞浪市 (5); 岐阜県土岐市 (6)	岐阜県瑞浪市	1	372

^a 付表 3 参照

すべての証拠標本は一連の証拠標本番号の下に農林水産省横浜植物防疫所に保管した

CATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGG-3' 及び LITS2 (reverse) : 5'-ATGAGGCAGACGCGATATCCGTCAGCG-3' (Pfeifer et al. 1995) を用いた。PCR は Ex Taq DNA polymerase を用いて総容量 40 μ L の系で実施した。各反応には、2.0 μ L の DNA テンプレート、4.0 μ L の 10 \times Ex Taq buffer、3.2 μ L の dNTPs (2.5 mM each)、1.0 μ L (10 pmol/ μ L) の各プライマー及び 1.5 U のポリメラーゼを用いた。PCR 反応条件は最初に 92 $^{\circ}$ C で 2 分加熱した後、92 $^{\circ}$ C で 30 秒、50 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 2 分を 32 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分加熱した。PCR 産物は 1 \times TBE バッファーを用いて 2 %アガロースゲル (Agarose S) で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線を照射することにより可視化した。PCR 産物は、シーケンス及び RFLP 解析に用いた。

3) シーケンス

日本産 *Lymantria* 属 8 種、つまり *L. dispar japonica* (証拠標本 No. 23)、*L. umbrosa* (No. 13)、*L. albescens* (No. 139)、*L. postalba* (No. 80)、*L. xyliana* (No. 118)、*L. mathura* (No. 55)、*L. monacha* (No. 150) 及び *L. lucescens* (No. 372) の各 1 個体 (表 7、表 8、附表 3) を用いて、ITS2 領域を上述の PCR によって増幅し、得られた DNA 溶液を第 2 章第 2 節に述べた手法でシーケンスした。

4) 制限酵素の認識部位の解析及び PCR-RFLP の検出

得られた塩基配列における制限酵素の認識部位及び断片長を Genetyx-Win version 11.0 を用いて推定し、識別に適していると考えられる *Mnl* I を選抜した。*Lymantria* 属 8 種の塩基配列を Clustal W version 2.1 (Larkin et al. 2007) を用いて整列し、*Mnl* I の認識部位を比較した。

それぞれの成虫 1 個体の PCR 産物を新しい 0.5 mL のサンプルチューブ 1 本に 5 μ L ずつ分注した。続いて、5 μ L の増幅産物に 1 U の制限酵素 *Mnl* I (New England Biolabs, MA, USA)、1.0 μ L の 10

表 8. *Lymantria* 属の ITS2 領域の PCR 産物、断片長とバンドパターンの型

種名	証拠標本 番号 ^a	産地	PCR 産物 ^b	<i>Mnl</i> I	
				バンドパターン	断片長
<i>L. dispar japonica</i>	23	横浜市	560	A	388, 118, 54
<i>L. umbrosa</i>	13	札幌市	560	A	388, 118, 54
<i>L. albescens</i>	139	那覇市	559	B	387, 92, 54, 26
<i>L. postalba</i>	80	対馬市	559	B	387, 92, 54, 26
<i>L. xyliana</i>	118	那覇市	570	C	265, 251, 54
<i>L. mathura</i>	55	苫小牧市	529	D	395, 80, 54
<i>L. monacha</i>	150	苫小牧市	527	E	213, 132, 70, 58, 54
<i>L. lucescens</i>	372	瑞浪市	577	F	261, 132, 125, 54, 3, 2

^a 表 7 及び付表 3 参照

^b PCR 産物長はフォワード及びリバースプライマーを含む

× reaction buffer 及び 0.1 μL の 100 × BSA を加えて総反応量を 10 μL とし、PCR 産物を完全に切断するために 37 °C で 3 時間保温した。切断した PCR 産物は、DNA 断片のバンドパターンを比較するために、3.5 %アガロースゲル (Agarose X) を用いた電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した後に紫外線を照射することにより可視化した。

2. 結果

本研究で解析された塩基配列はアクセッション番号 LC021517-LC021524 として、国際塩基配列データベース (INSD) に登録した。ITS2 領域の PCR 産物長は 527 bp から 577 bp であった (表 8)。

図 19 は *Lymantria* 属 8 種の ITS2 領域の塩基配列及び制限酵素 *Mnl* I の認識部位を示す。*L. dispar japonica* と *L. umbrosa* では、ITS2 領域の塩基配列が共に 506 bp であり、両種を識別できなかった。同様に、*L. albescens* と *L. postalba* でも、ITS2 領域の塩基配列が共に 505 bp であり、識別できなかった。

表 8 は *Lymantria* 属 8 種の ITS2 領域の塩基配列を制限酵素 *Mnl* I で処理した場合に得られると予想される断片長及びバンドパターンの型を示す。

図 20 は、8 種の ITS2 領域の塩基配列を制限酵素 *Mnl* I で処理した場合に得られたバンドパターンを示す。本研究では、8 種 54 個体群 330 個体のバンドパターンを比較した結果、*L. albescens* の 17 個体中 8 個体が異なるバンドパターンを示した事例を除き、種内変異は検出されなかった。

L. dispar japonica No.23 (Yokohama)	1	TCCGTGGAGATACATCCAGGACCACTCCTGTCTGAGG	Mnl I	BCCGGCTGTATAAAAATTAACATGCCACATTGCTGCAC-ATCAC	79	
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	1	79	
L. albescens No.139 (Naha)	1	79	
L. postalba No.80 (Tsushima)	1	79	
L. xylina No.118 (Naha)	1G.....	80	
L. mathura No.55 (Tomakomai)	1C.....	TAT.....	80	
L. monacha No.150 (Tomakomai)	1C.....	T.....G.CG..T.	80	
L. lucescens No.372 (Mizunami)	1TC.-.A.T	79	
L. dispar japonica No.23 (Yokohama)	80	CTACGC-GGTGTC-----GT---AAGCATCTGAT-CGTTCTGCG-CGGACCCACCGAAAGGTGAATCCTCGCGGTCGG	Mnl I	Mnl I	Mnl I	146
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	80		146
L. albescens No.139 (Naha)	80	..T..-.....		..T.....G.....GG.....		146
L. postalba No.80 (Tsushima)	80	..T..-.....		..T.....G.....GG.....		146
L. xylina No.118 (Naha)	81	..T..-.....TC-TAGT.....		..T.....G.....C.....GG.....A..T.....		152
L. mathura No.55 (Tomakomai)	81	A.TT.TA.CATATGACTGTCTCTGTG.TA.T.C..GG..C...CTAT..TGAGAGTGCCTC.AA..-T.....A				158
L. monacha No.150 (Tomakomai)	81	G.G..T-.CGTA.....		..T.....T.C...CGA.G.---GA..CG-C.AG.....		140
L. lucescens No.372 (Mizunami)	80	A.T.A.-.T.C.TCGTGAT..TGTG.....T.....C.....G.....C---.A..GG.....				153
L. dispar japonica No.23 (Yokohama)	147	TCCAAATAT--TGTITGTACAC-----GCAATAGTGATTGTGATGCTCGCGATATTGTATCGATGCGACC				209
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	147		209
L. albescens No.139 (Naha)	147		209
L. postalba No.80 (Tsushima)	147		209
L. xylina No.118 (Naha)	153AT.....G.....	A.....C.....		217
L. mathura No.55 (Tomakomai)	159	.T.....AACTCACAG...ACGCACGGCGTTCAA..GCCT...C.....	C.....T..T		236
L. monacha No.150 (Tomakomai)	141	.T.....A.....A.....	C.A.CC.....A.....		192
L. lucescens No.372 (Mizunami)	154	.AT.....TA.....A..AG.....	AC.....		217
L. dispar japonica No.23 (Yokohama)	210	GCGCTG--CGCGTCTGCGTCCG-CTGTATCGTCTGACTCTTCGCGTGTGTT-GTTCGACGGCG--TTTACGCGCC--	Mnl I			278
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	210		278
L. albescens No.139 (Naha)	210G.....			278
L. postalba No.80 (Tsushima)	210G.....			278
L. xylina No.118 (Naha)	218TG.....C.....	A.A.....		285
L. mathura No.55 (Tomakomai)	237	..T.A-TT..T.....G.C.....A.....C.....GT---A...C.T--G				303
L. monacha No.150 (Tomakomai)	193	.T..C-GA...T.....A..C.....	A..T..C.C..G.....C-T.CACA...CAGG		269
L. lucescens No.372 (Mizunami)	218--A.....	CGT.ACG.....		288
L. dispar japonica No.23 (Yokohama)	279	GAGCGATCACAGTGGAGAGTTGACATTTCG-TGTACGGCGG-GCGCGTTGACGCGT-TAAAAACGCGGTGCGGTCGCGTGT	Mnl I	Mnl I		355
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	279		355
L. albescens No.139 (Naha)	279T..C.....	T.....		355
L. postalba No.80 (Tsushima)	279T..C.....	T.....		355
L. xylina No.118 (Naha)	286G.....	T.T.A...C...CG.C.T.T.....T..AGT		363
L. mathura No.55 (Tomakomai)	304	CTTG..G.....A.....	C..T..T.A.....AC.T.C.TA...T		351
L. monacha No.150 (Tomakomai)	270T.....CGAG...GT...A.....C.....TG-----AG..G.....T.....				334
L. lucescens No.372 (Mizunami)	289C.....A.TT.....T.....T.....	C-GCG.TA.....C..		362
L. dispar japonica No.23 (Yokohama)	356	----ATCGTTCGTCTAAATCTGTTAACGAGTA-----TTGCACGTCGCTATA---A-CGCGCCTAGGTAGCGCGAC	Mnl I	Mnl I	Mnl I	418
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	356		418
L. albescens No.139 (Naha)	356A.....			417
L. postalba No.80 (Tsushima)	356A.....			417
L. xylina No.118 (Naha)	364	TTATT..G.A.....C---.TT.....	GG.....		428
L. mathura No.55 (Tomakomai)	352AG.GACG..G-----ATT.A.CA.TA.....T.GCA.....				391
L. monacha No.150 (Tomakomai)	335	A-----A.....C-----CAA..A.ACA-----TAGG.....				387
L. lucescens No.372 (Mizunami)	363	----G...A..A.....C.CGCG.ATTG.ACAAACGC...G..C.T]CC..CCT.GG]A.G]G.....				437
L. dispar japonica No.23 (Yokohama)	419	TCGACGTCGGAAGAGCGCATCGACGCGCCGCGCTTCTCGTCTTATCGTTGTGAAACAATAACTTCGTAGCGGTTGCGT				498
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	419		498
L. albescens No.139 (Naha)	418T.....G.....			497
L. postalba No.80 (Tsushima)	418T.....G.....			497
L. xylina No.118 (Naha)	429AA.....			508
L. mathura No.55 (Tomakomai)	392TT.....T---AA.T.TT.....G.....T...				467
L. monacha No.150 (Tomakomai)	388T.....T.....-A.CT.....G.....				465
L. lucescens No.372 (Mizunami)	438AA.....			515
L. dispar japonica No.23 (Yokohama)	499	CGTCGTAA				506
L. umbrosa No.13 (Sapporo)	499				506
L. albescens No.139 (Naha)	498				505
L. postalba No.80 (Tsushima)	498				505
L. xylina No.118 (Naha)	509				516
L. mathura No.55 (Tomakomai)	468				475
L. monacha No.150 (Tomakomai)	466				473
L. lucescens No.372 (Mizunami)	516				523

図 19. *Lymantria* 属 8 種の ITS2 領域の塩基配列

L. dispar japonica と同じ塩基はドットで示し、ダッシュはギャップを示す
 選択した制限酵素の認識部位を四角で囲んだ

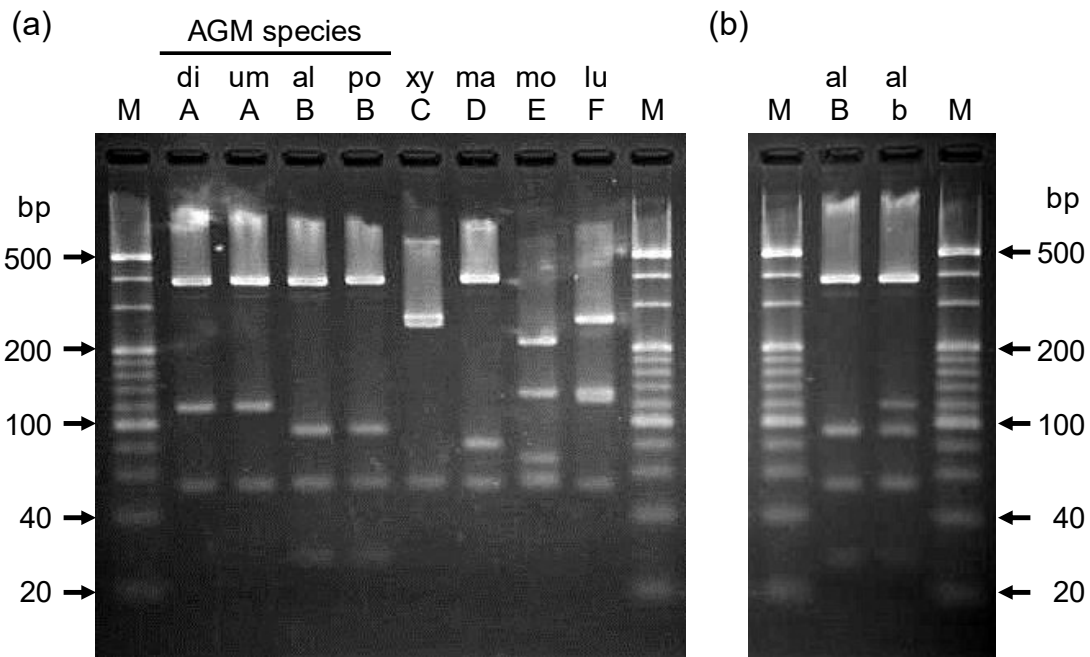


図 20. *Lymantria* 属の ITS2 領域の PCR-RFLP バンドパターン

(a) 8 種の通常のパンドパターン

(b) *L. albescens* の種内変異

断片長は次のように推定された: b; 387, 118, 92, 54, 26 (bp)

di: *L. dispar japonica*、um: *L. umbrosa*、al: *L. albescens*、po: *L. postalba*、xy: *L. xyliana*、ma: *L. mathura*、mo: *L. monacha*、lu, *L. lucescens*

M: 20-bp ラダー

A-F は表 8 で定義したバンドパターンを参照

3. 考察

本研究では、ITS2 領域の PCR-RFLP パターンに基づいて、アジア型マイマイガ 4 種を含む日本産 *Lymantria* 属 8 種を 2 組 4 種 (*L. dispar japonica* と *L. umbrosa*、*L. albescens* と *L. postalba*) を除いて正確に識別することができた。これらの結果は、ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法が日本の港湾で発見される可能性がある *Lymantria* 属の種の識別に有用であることを示唆する。

Pogue and Schaefer (2007) は、日本に分布するアジア型マイマイガを 4 種 (*L. dispar japonica*、*L. umbrosa*、*L. albescens* 及び *L. postalba*) に分類した。本章の第 1 節では、これらのアジア型マイマイガ 4 種を mtDNA を用いた PCR-RFLP 法によって識別できることを示した。一方、本節において ITS2 領域の塩基配列を解析した結果、*L. dispar japonica* と *L. umbrosa* の間、及び *L. albescens* と *L. postalba* の間では同一の塩基配列を示したため (図 19)、これら 2 組の種を ITS2 領域の PCR-RFLP 法によって識別することはできなかった (表 8、図 20)。岸田 (2011) による近年の分類では、これらのアジア型マイマイガ 4 種は 2 種 (*L. dispar* 及び *L. albescens*) に分類されており (表 4)、本節の結果もこの分類を支持する。しかしながら、アジア型マイマイガの種の分類は未だ未確定であるため、将来、これらの種の間を分子系統解析によって解明することは重要な課題である。

本研究では、ITS2 領域の塩基配列を *Mnl*I によって制限酵素処理した後、*L. albescens* の 17 個体中 8 個体において種内変異を検出した (図 20; パターン b、証拠標本 Nos. 262、263、276、279–282 及び 284)。種内変異を示した 8 個体の ITS2 領域をシーケンスして解析した結果、8 個体すべてにおいて、*Mnl*I の認識部位におけるリボソーム RNA に点突然変異が認められ、これが種内変異の原因であると考えられた。*L. albescens* において検出された種内変異のバンドパターンは、他の種の各バンドパターンとは異なっていた (図 20) ので、*L. albescens* の種内変異は、本研究で用いた *Lymantria* 属 8 種を識別するための ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法の有用性には影響を及ぼさないことが分かった。

Pfeifer et al. (1995) も、3種類の制限酵素 (*Cla* I、*Pvu* I 及び *Taq* I) を用いた ITS2 領域の RFLP により、*L. dispar* (*L. dispar dispar* 及び *L. dispar asiatica*)、*L. mathura* 及び *L. monacha* を識別している。本研究では、これら3種の制限酵素の認識部位及び制限酵素処理の結果から得られた断片長を Genetyx-Win version 11 を用いて推定した。その結果、これらの酵素を用いた場合、本研究で用いた *Lymantria* 属 8 種のうち、いくつかの種が種間におけるバンドパターンの類似により識別できないことが分った。そのため、本研究では *Lymantria* 属 8 種を識別するために、制限酵素 *Mnl* I を使用した。その結果、2組4種 (*L. dispar japonica* と *L. umbrosa*、*L. albescens* と *L. postalba*) を除き、*Lymantria* 属 8 種を識別することができた (表 8、図 20)。

本研究で識別できなかった2組4種 (*L. dispar japonica* と *L. umbrosa*、*L. albescens* と *L. postalba*) のうち、バンドパターンが同じであった *L. dispar japonica* と *L. umbrosa* (図 20; パターン A) の分布は、北海道の一部のみで重なっているにすぎなかった (Pogue and Schaefer 2007)。また、バンドパターンが同じであった *L. albescens* と *L. postalba* (図 20; パターン B) の分布も、琉球諸島の一部のみで重なっていた (Pogue and Schaefer 2007)。そのため、本識別技術は日本の港湾で発見される *Lymantria* 属の種の識別において、大きな支障はないと考えられる。

日本では、*L. lucescens* は局地的な希少種であると考えられてきた (井上 1982; 岸田 2011) が、2000年に中部日本において *L. lucescens* の大発生が記録された (Pogue and Schaefer 2007; Schaefer 2012)。日本の港湾周辺において本種の大発生が起こった場合、本種は港湾で発見される可能性が高い。本研究では、本種が ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法により識別できることを明らかにした。

本節では、日本の港湾で発見される可能性があるアジア型マイマイガ指定4種を含む *Lymantria* 属 8 種について、2組4種 (*L. dispar japonica* と *L. umbrosa*、*L. albescens* と *L. postalba*) を除き、ITS2 領域の PCR-RFLP 法による識別が可能であることを明らかにした。本識別技術を本章の第1節で開発した mtDNA の PCR-RFLP 法と併せて用いることにより、日本の港湾で発見される *Lymantria*

属の識別結果の信頼性を高めることが可能になると考えられる。

第 IV 章 総合考察

植物検疫において発見される害虫の種を迅速かつ正確に同定することは、極めて重要である。第 II 章では、第 1 節においてハダニ科 *Tetranychus* 属の休眠雌成虫、若虫、幼虫及び卵の各 1 個体からの PCR-RFLP 法に利用可能な DNA テンプレートの調製法を開発した。その上で、これらのいずれの発育ステージについても、PCR-RFLP によって個体ごとに種を識別できるようにした。輸入植物検疫では、*Tetranychus* 属が実際にこれらの発育ステージで発見されることが多いため、飼育後の成虫による形態同定よりも迅速に種を識別できる本技術の有用性は非常に高い。なお、他属のハダニが発見されることは極めて稀であるため、本研究において *Tetranychus* 属に限って検討しているが、実用上の問題はほとんどないと考えられる。

第 2 節では、輸入植物検疫で発見される可能性が高い *Tetranychus* 属 14 種について、主に輸入植物検疫で採集された 199 個体群 245 個体の非休眠雌成虫を用いて、形態分類による結果と共に、PCR-RFLP 法の有用性を検証した。その結果、日本未記録の 5 種 (*T. lambi*、*T. pacificus*、*T. turkestanii*、*T. merganser* 及び *T. macfarlanei*) を含めて、すべての種を正確に識別することができた。これらの種は、これまでに輸入植物検疫で発見された種の大部分を占めていることから (真崎 1991, 2001; 真崎ら 1991; 金田・真崎 1994; 真崎・北村 2004)、本識別技術は日本の輸入植物検疫で発見される外国産 *Tetranychus* 属の種の迅速かつ正確な識別に有用であると考えられる。

一方、輸入植物検疫では、本研究で用いなかった *Tetranychus* 属 5 種 [*Tetranychus desertorum* Banks、*Tetranychus fijiensis* Hirst、*Tetranychus gigas* Pritchard and Baker、*Tetranychus marianae* McGregor 及び *Tetranychus mexicanus* (McGregor)] が過去に発見されている (真崎 1991; 真崎ら 1991; 金田・真崎 1994; 真崎・北村 2004)。これらの種は本研究の調査期間中に発見されなかったため、発見頻度は低いと考えられる。しかしながら、今後発見された場合には、プレパラート標本による形態同定を行

った上で、塩基配列を解析してバンドパターンを推定し、雌成虫を用いた検証を行ってデータを蓄積することにより、PCR-RFLP法の適用対象種を拡大することが重要である。

近年、ITS領域のDNA塩基配列をハダニ科 *Tetranychus* 属の種の識別に用いることの有用性が明らかにされている (Ben-David et al. 2007; Matsuda et al. 2013)。迅速な種の同定が求められる輸入植物検疫の検査現場では、発見されたハダニをシーケンスにより識別して、種の判定を行うことは時間と労力を要するため困難である。しかしながら、本研究では用いていない日本未記録種のITS領域の塩基配列を解析し、バンドパターンを推定してデータを蓄積しておくことによって、輸入植物検疫で発見される可能性のある種の識別に備えることができることから、DNA塩基配列の情報は有用である。今後、日本未記録種のITS領域のDNA塩基配列が国際塩基配列データベースに登録されることが望まれる。

日本では近年、ミツユビナミハダニが新たに発見され、国内で分布を拡大している (Ehara and Ohashi 2002; Gotoh et al. 2009)。本種は海外から侵入したと考えられるが、これまでに日本の輸入植物検疫で発見された記録がないため (真崎 1991, 2001; 真崎ら 1991; 金田・真崎 1994; 真崎・北村 2004)、侵入経路は不明である。一方、本研究で用いた *Tetranychus* 属 14 種の中には、輸入植物検疫で発見された日本未記録種 5 種 (*T. lambi*、*T. pacificus*、*T. turkestanii*、*T. merganser* 及び *T. macfarlanei*) が含まれている。今後、日本国内の農業生産現場において、これらの種が発見される可能性は否定できない。その場合、初動防除を的確に行うためには、迅速かつ正確な種の識別が重要である。本研究で検証した PCR-RFLP 法は、このような国内植物検疫における新規発生種の迅速な識別にも利用可能であり、有用性は高い。

近年、我が国は農産物の輸出を促進しており (農林水産省 2017)、輸出品目の中には、*Tetranychus* 属が寄生する切り花や青果物が含まれている。輸出植物検疫では、検査で害虫が発見された場合、輸出相手国が指定する検疫対象種害虫種であるかどうかを同定しなければならない。例として、日

本産リング生果実を米国やニュージーランドに輸出する場合、カンザワハダニが両国により検疫対象害虫種に指定されている（農林水産省植物防疫所 輸出入条件詳細情報 <http://www.maff.go.jp/pps/j/search/detail.html>）。輸出植物検疫も輸入植物検疫と同様に、検査対象植物の品質保持のために発見害虫の迅速な種同定が求められる。本研究で検討した PCR-RFLP 法は、カンザワハダニ等の国内の主要な農業害虫種を含んでいることから、このような輸出植物検疫における *Tetranychus* 属の迅速な種同定においても、利用できると考えられる。実際、本研究では佐賀県産イチゴ生果実の輸出検査で発見されたナミハダニ黄緑型を材料に用いて、識別技術の有用性を確認している（付表 1: 個体群 No. Tu-g-68）。

日本の輸入植物検疫で発見される *Tetranychus* 属の中で、最も発見頻度が高い種はナミハダニである（真崎・北村 2004）。ナミハダニは世界各地に分布しており（Migeon and Dorkeld 2006-2017）、本研究ではアジア、ヨーロッパ、アフリカ、北米、南米、オセアニア産の様々な植物から発見された 149 個体群 181 個体のサンプルを ITS 領域を用いた PCR-RFLP 法の検証に用いた。その結果、バンドパターンに種内変異がまったく検出されなかったことから、本識別技術の世界的規模での安定性を確認することができた。世界各国の輸入植物検疫においても、ナミハダニは発見される事例が多いと考えられるため、本識別技術は世界各国の輸入植物検疫でも利用できる有用な技術といえる。

Li et al. (2015) は、ナミハダニを Real-time PCR によって種特異的に検出する識別技術を開発した。本技術は PCR 後の電気泳動を必要としないため、PCR-RFLP 法よりも迅速に識別結果を得ることができる。しかしながら、ナミハダニのみを対象種としているため、サンプルがその他の種であった場合に識別結果を得ることができない。本研究で検証した PCR-RFLP 法では、ナミハダニを含む *Tetranychus* 属 14 種を対象としており、サンプルがナミハダニではなかった場合でも種名を明らかにできることから、Li et al. (2015) の識別技術よりも有用性が高い。

第 III 章では、第 1 節においてアジア型マイマイガを含む日本産ドクガ科 *Lymantria* 属 7 種を識別するために、ミトコンドリア DNA を用いた PCR-RFLP 法を開発した。主として全国の港湾で採集された 7 種 45 個体群 291 個体を材料に用いて識別技術の有効性を検証した結果、すべての種を正確に識別することができた。また、第 2 節では、核リボソーム RNA の ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法により、アジア型マイマイガを含む日本産 *Lymantria* 属 8 種を識別できるかどうかについて検討した。8 種 54 個体群 330 個体を材料に用いて有効性を検証した結果、2 組 4 種 (*L. dispar japonica* と *L. umbrosa*、*L. albescens* と *L. postalba*) を除き、種を正確に識別することができた。識別ができなかった 2 組については、Pogue and Schaefer (2007) は別種とし、岸田 (2011) は同種としており、分類が未確定の現状にあることから、極めて近縁な種群であると考えられる。また、これらの種の分布はごく一部の地域を除き、重なっていないため、日本の港湾で発見される種を識別する上で、現状では大きな支障はないと考えられる。しかしながら、今後これら 2 組 4 種を識別するプライマーの開発が必要である。以上の結果から、ミトコンドリア DNA と核リボソーム RNA の両方の領域を用いた PCR-RFLP 法が共に種の識別に有用であることが分ったため、日本の港湾で *Lymantria* 属が発見された際には、種の識別結果を二重に点検することによって、より正確に種の判定が可能である。

本研究では、ミトコンドリア DNA と核リボソーム RNA の両領域のいずれも、成虫の脚 1 本から DNA を抽出し、PCR-RFLP による種の識別が可能であることを明らかにした。実際に港湾で最も発見される可能性が高い発育ステージである卵塊についても、*L. dispar japonica*、*L. xyliana* 及び *L. mathura* の卵 1 個を用いて、成虫の脚 1 本を用いた場合と同様に識別できることを確認している (有本 未発表)。港湾における船舶検査においても、卵塊のみが発見される可能性があり、本識別技術の実用性は高い。

日本の港湾では、海外から日本を経由して北米、チリ及びニュージーランドに向かう船舶も、アジア型マイマイガを対象とした船舶検査を受ける必要がある (NAPPO 2015; SAG 2015; MPI 2017)。その際、海外の港湾で船舶に付着したまま日本に到着した *Lymantria* 属が日本に分布していない種である可能性もある。船舶検査で発見されたサンプルから本研究の結果とは異なるバンドパターンが検出された場合、PCR-RFLP に用いた遺伝子領域をシーケンスして、国際塩基配列データベースにおける相同性検索等により種を明らかにしなければならない。近年、ミトコンドリア DNA の COI 領域の塩基配列を種の識別に用いる DNA バーコーディングが提唱され (Hebert et al. 2003)、*Lymantria* 属においても有用性が明らかにされている (Armstrong and Ball 2005; Ball and Armstrong 2006; deWaard et al. 2010; Kang et al. 2015)。日本未記録種のサンプルの種を調査する際には、今後 COI 領域の塩基配列を解析することも有用であると考えられる。

本研究で検証した PCR-RFLP 法は、アジア型マイマイガの侵入を警戒する米国、カナダ、チリ、ニュージーランド及びオーストラリアにおいて、日本を経由した船舶等から *Lymantria* 属が発見された際にも、種の識別に利用可能であると考えられる。Armstrong et al. (2003) は、日本からニュージーランドに輸入された中古車から発見されたドクガ科の種について、ITS 領域を用いた PCR-RFLP 法による識別を試みた結果、*Lymantria* 属では *L. dispar*、*L. mathura* 及び *L. monacha* の 3 種を識別したと報告している。本研究で検討した識別法を用いれば、ミトコンドリア DNA ではこれら 3 種を含む合計 7 種を、核リボソーム RNA の ITS2 領域ではこれら 3 種を含む合計 8 種を識別できることを明らかにしており、Armstrong et al. (2003) の識別技術よりも有用性は高い。

アジア型マイマイガは、日本に 4 種 (*L. dispar japonica*、*L. umbrosa*、*L. albescens* 及び *L. postalba*) が分布しており、近隣の国々では韓国及び中国に *L. dispar asiatica* が、ロシアに *L. dispar asiatica* と *L. umbrosa* が分布している (Pogue and Schaefer 2007)。これらの国々も、米国、カナダ、チリ及びニュージーランド向け船舶について、アジア型マイマイガを対象とした船舶検査及び不在証明書の発

給を求められている (NAPPO 2015; SAG 2015; MPI 2017)。本研究では *L. dispar asiatica* を用いていないが、本亜種のみトコンドリア DNA 及び核リボソーム RNA の ITS2 領域の塩基配列解析によるバンドパターンの推定では、本亜種と *L. dispar japonica* のバンドパターンが同じであることが分っている (有本 未発表)。本研究では、*L. dispar japonica* と *Lymantria* 属の他種をバンドパターンの違いにより識別できることを明らかにした。この結果は、*L. dispar asiatica* と *Lymantria* 属の他種をバンドパターンの違いにより識別できることを示唆している。そのため、これら近隣の国々の港湾において船舶検査等で発見された *L. dispar asiatica* と *Lymantria* 属の他種の識別に、本研究で検証した識別技術を利用できる可能性が高いと考えられる。

本研究で検証した PCR-RFLP 法以外の *Lymantria* 属の遺伝子診断法として、Stewart et al. (2016) は Real-time PCR により、本研究で用いた 8 種に *L. dispar dispar*、*L. dispar asiatica* 及びハラアカマイ *Lymantria fumida* Butler を加えた各種を識別する技術を開発した。本研究では、日本の港湾で発見される可能性のある *Lymantria* 属の種を対象としているため、日本に分布していない *L. dispar dispar* と *L. dispar asiatica* は用いなかった。また、本研究では *L. fumida* も用いていないが、本種の核リボソーム RNA の ITS2 領域の塩基配列解析によるバンドパターンの推定では、本研究で用いた 8 種とはバンドパターンが異なり、識別できることが分っている (有本 未発表)。さらに、Stewart et al. (2016) の識別技術では *L. albescens* と *L. postalba* を識別できないが、本研究で検証したミトコンドリア DNA を用いた PCR-RFLP 法では両種を識別できる。これらの結果から、日本の港湾で発見される可能性がある *Lymantria* 属の識別においては、Stewart et al. (2016) の識別技術よりも本研究で検証したミトコンドリア DNA 及び核リボソーム RNA の両方の領域を用いた PCR-RFLP 法の方が有用性は高い。

植物検疫では、本研究で識別に用いた分類群以外にも、ヤガ科やコナカイガラムシ科など、同定困難な発育ステージで発見される害虫があり、遺伝子診断による識別技術の開発が必要とされてい

る。本研究では、*Tetranychus* 属と *Lymantria* 属の 2 属について、1) 識別対象種の選定、2) 種の識別に有用な遺伝子領域の選定及び識別技術の開発、3) 検疫の現場で採集されるサンプルを用いた識別技術の検証という一連の手順を踏むことにより、植物検疫の現場で利用可能な識別技術を確立した。農林水産省植物防疫所では、植物検疫で発見された害虫の同定結果を植物検疫統計として、ホームページで公開している (<http://www.pps.go.jp/TokeiWWW/Pages/report/>)。本研究で対象としなかった分類群についても、この情報を分析することにより、上記 1) の識別対象種を選定することができる。その後、上記の 2) 及び 3) の手順を踏むことにより、遺伝子診断による識別技術の開発・検証を行い、植物検疫の現場で利用可能な識別技術を確立できると考えられる。

遺伝子診断法の中には、本研究で検証した PCR-RFLP 法や上述の DNA バーコーディング及び Real-time PCR の他にも、迅速に種の識別が可能な様々な手法がある。例えば Multiplex PCR は、制限酵素処理を必要としないため、PCR-RFLP 法よりも短時間で識別結果を得ることができる。Hada and Sekine (2011) は、Multiplex PCR によるシンクイガ科のモモシンクイガ *Carposina sasakii* (Matsumura)、ハマキガ科のナシヒメシンクイ *Grapholita molesta* (Busck) 及びスモモヒメシンクイ *Grapholita dimorpha* Komai の 3 種を対象とした識別法を開発した。モモシンクイガは台湾向けリンゴ生果実等の輸出植物検疫における検疫対象害虫種であることから、本識別技術は有用と考えられる。PCR 以外の遺伝子診断法として、loop-mediated isothermal amplification (LAMP 法) が挙げられる。Huang et al. (2009) は、ミバエ科のチチュウカイミバエ *Ceratitis capitata* (Wiedemann) をクインスランドミバエ *Bactrocera tryoni* (Froggatt)、オリーブミバエ *Bactrocera oleae* (Gmelin) 及びミカンコミバエ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) から LAMP 法により識別する手法を開発した。チチュウカイミバエは、我が国の植物防疫法では輸入禁止対象害虫に指定され、発生国からの寄主植物の輸入が禁止されており、最も侵入を警戒する害虫である。LAMP 法は PCR よりも短時間で結果を得ることができるため、植物検疫の検査現場での有用性は高いと考えられる。今後、植物検疫における害虫

の遺伝子診断技術を開発する際には、これらの識別法についても選択肢の一つとして検討するべきであろう。

摘 要

日本の植物検疫では、害虫が形態による種の同定が困難な卵や幼虫等の発育ステージで発見され、迅速な検疫措置の決定ができないことが問題となっている。本研究では、輸入植物検疫及び輸出植物検疫で種の同定が問題となっている代表的な分類群を対象として遺伝子診断による種の識別の有用性を検討した。

輸入植物検疫で種の同定が問題になっている分類群の一つとして、ハダニ科 *Tetranychus* 属を研究対象とした。同属の種を同定するためには雄成虫の挿入器の形態を観察する必要があるが、輸入植物検疫では非休眠雌成虫、休眠雌成虫、幼若虫または卵のみが発見されることが多い。そこで、核リボソーム RNA の ITS 領域を用いた PCR-RFLP 法による種の識別が可能かどうかを検討した。最初に休眠雌成虫、幼若虫及び卵の DNA 調製法を *Tetranychus* 属の代表的な種であるナミハダニ *Tetranychus urticae* Koch を用いて開発した。その結果、休眠雌成虫及び第 2 若虫では、1 個体のハダニをプラスチックペッスルで磨砕する方法が、第 1 若虫、幼虫及び産卵後 24 °C で 48 時間以上経過した卵では、線虫 1 個体からの DNA 調製法として開発されたる紙片で磨砕する方法が PCR-RFLP に利用可能な DNA テンプレートの調製に有効であることを明らかにした。次に、日本の輸入植物検疫で発見された主要な種である *Tetranychus* 属ハダニ 14 種について、PCR-RFLP 法の適用の可否を検討した。主として輸入植物検疫で発見された 14 種 199 個体群 245 個体について検討した結果、14 種すべてを正確に識別できた。これらの結果から、ITS 領域を用いた PCR-RFLP 法は輸入植物検疫で発見される *Tetranychus* 属の種の識別に有用であると考えられた。

輸出植物検疫で種の同定が問題となっているもう一つの分類群として、ドクガ科 *Lymantria* 属を研究対象とした。日本から記録されている *Lymantria* 属 13 種の中で、4 種 [マイマイガ *Lymantria dispar japonica* (Motschulsky)、エゾマイマイ *Lymantria umbrosa* (Butler)、シロシタマイマ

イ *Lymantria albescens* Hori and Umeno 及びコシロシタマイマイ *Lymantria postalba* Inoue] がアジア型マイマイガに指定されている。近年、米国、カナダ、チリ、ニュージーランド及びオーストラリア政府が船舶に産卵された卵塊によるアジア型マイマイガの侵入を警戒している。*Lymantria* 属の卵塊は種間で形態が非常に類似しているため、形態学的に種を識別することができない。そこで本研究では、まず日本の港湾で発見される可能性が高いアジア型マイマイガ 4 種を含む 7 種を対象として、ミトコンドリア DNA を用いた PCR-RFLP 法による識別技術を開発した。主に日本の港湾で採集された 45 個体群 291 個体で検定した結果、7 種すべてを正確に識別できた。植物検疫では、種の識別結果に高い信頼性が求められるため、異なる遺伝子領域を用いた識別法によって識別結果を二重に点検することが望ましい。そこで、上記の 7 種に分布域と寄主植物が限られているものの飛翔に優れている 1 種 [オオヤママイマイ *Lymantria lucescens* (Butler)] を加えた 8 種を対象として、核リボソーム RNA の ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法による種の識別の有効性を検討した。主に日本の港湾で採集された 8 種 54 個体群 330 個体で検定した結果、2 組 4 種 (*L. dispar japonica* と *L. umbrosa*、*L. albescens* と *L. postalba*) を除いて、正確に種を識別できた。これらの結果から、ITS2 領域を用いた識別手法は日本の港湾で発見される可能性が高い *Lymantria* 属の種の識別に有用であると考えられた。検討対象である *Lymantria* 属 8 種の識別は、ミトコンドリア DNA と ITS2 領域の 2 つの PCR-RFLP 法を同時に検討することで確実となることを示した。

本研究では、*Tetranychus* 属及び *Lymantria* 属の遺伝子診断技術を 1) 識別対象種の選定、2) 種の識別に有用な遺伝子領域の選定及び識別技術の開発、3) 検疫の現場で採集されるサンプルを用いた識別技術の検証という 3 段階の手順により確立した。この手順を踏むことにより、植物検疫で問題となる他の分類群についても、遺伝子診断による識別技術を確立できると考えられる。

Summary

Japanese plant quarantine intercepts potential pests in a variety of stages, such as eggs, larvae etc., which cannot be identified based on morphological characteristics. This causes a problem: adequate quarantine measures cannot be taken instantly. In this study, I examined the usefulness of a molecular identification method to identify representative taxa which are problematic in import and export plant quarantine.

As a typical example of problematic pests in import plant quarantine, I selected *Tetranychus* spider mite species. Traditionally, the morphological identification of *Tetranychus* species is based on the size and shape of the male aedeagus. However, often only summer females, diapausing females, immature stages (i.e., deutonymphs, protonymphs, or larvae) or eggs are intercepted. Therefore, a PCR-RFLP analysis of the ITS region of the nucleic ribosomal RNA was examined. First, a DNA preparation method for diapausing females, immature stages, and eggs of spider mites was developed using *Tetranychus urticae* Koch as a model for tetranychid mites. For the larger stages (diapausing females and deutonymphs), the crushing of an individual mite with a plastic pestle proved a useful method to obtain the DNA template for PCR-RFLP. For protonymphs, larvae, and eggs, the DNA preparation method developed for a single nematode, crushing a tiny sample with a filter paper chip, was also useful to obtain the DNA template from an individual mite specimen for PCR-RFLP. The PCR-RFLP-based method was applied to, in total, 245 individuals from 199 samplings of the 14 *Tetranychus* species most often intercepted at Japanese import plant quarantine. As a result, all 14 species could be identified correctly. These results demonstrate the usefulness of the PCR-RFLP method for identification of *Tetranychus* species intercepted at import plant quarantine.

As a typical example of problematic pests in export plant quarantine, I selected *Lymantria tussock* moth species for examination of molecular identification. Of the 13 *Lymantria* species recorded from Japan, four species [*Lymantria dispar japonica* (Motschulsky), *Lymantria umbrosa* (Butler), *Lymantria albescens* Hori and Umeno, and *Lymantria postalba* Inoue] are designated as Asian gypsy moth. In recent years, the governments of the USA, Canada, Chile, New Zealand, and Australia have become anxious about Asian gypsy moth invasion via egg masses deposited on vessels. The egg masses of *Lymantria* species cannot be identified morphologically to the species level because they are very similar. First, I developed a PCR-RFLP method using mitochondrial DNA to identify seven Japanese *Lymantria* species – the four Asian gypsy moth species and three additional species, which may be detected at Japanese ports. I applied the method to 291 individuals from 45 populations of the seven species, most of them collected at Japanese ports. All seven species could be identified correctly. In plant quarantine, identification must be reliable. Therefore, it is desired that the identification is double-checked by using another identification method, based on another gene region. For this, I examined the usefulness of PCR-RFLP using the ITS2 region of nucleic ribosomal RNA to identify the same seven and one additional species. I applied the method to 330 individuals from 54 populations, most of them collected at Japanese ports. The species could again be identified correctly, although two species pairs could not be differentiated: *L. dispar japonica* and *L. umbrosa* had identical ITS2 sequences, as had *L. albescens* and *L. postalba*. These results revealed the usefulness of the PCR-RFLP method to identify Japanese *Lymantria* species, which may be detected at Japanese ports.

In this study, I established a molecular identification method for *Tetranychus* and *Lymantria* species by a three-step procedure: (1) selection of target species, (2) selection of gene regions which are suitable for species identification and development of identification method, and (3) confirmation of the identification

method by using samples collected at sites of plant quarantine. By following this procedure, it is suggested that molecular identification of other problematic taxa may be established in plant quarantine.

謝 辞

本論文の取りまとめには、茨城大学農学部後藤哲雄教授に多大なるご指導を頂いた。また、後藤教授には、実験室系統のハダニの提供と *T. merganser* の同定をして頂いた。ここに厚く御礼申し上げます。本論文作成にあたり、ご助言を頂いた後藤千枝博士、長坂幸吉博士及び日本典秀博士（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター）に深く感謝申し上げます。ハダニ科の遺伝子診断法及び論文の作成についてご指導を頂いた刑部正博准教授（京都大学大学院農学研究科）及び上杉龍士博士（京都大学大学院農学研究科、現所属：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター）に心より御礼申し上げます。ハダニ科の同定についてご指導を頂いた真崎 誠氏（元農林水産省植物防疫所）、本研究の遂行にあたり終始ご指導を頂いた岩泉 連氏及び佐藤 雅氏（農林水産省横浜植物防疫所）に感謝申し上げます。ろ紙法についてご助言を頂いた岩堀英晶博士（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター、現在：龍谷大学教授）、*Lymantria* 属の分類についてご助言を頂いた東浦康友博士（元東京薬科大学教授）及び吉松慎一博士（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）に感謝申し上げます。岩手県盛岡市で採集された *L. mathura* の標本をご提供頂いた松本和馬博士（元国立研究開発法人 森林総合研究所東北支所）に御礼申し上げます。全国の各植物防疫所の植物防疫官の方々には、輸入植物検疫で発見された *Tetranychus* 属及び港湾で発生した *Lymantria* 属の採集にご協力頂いた。記して深謝申し上げます。

引用文献

- Abd-Rabou, S., H. Shalaby, J.-F. Germain, N. Ris, P. Kreiter, T. Malausa (2012) Identification of mealybug pest species (Hemiptera: Pseudococcidae) in Egypt and France, using a DNA barcoding approach. *Bull Entomol Res* 102, 515-523
- Armstrong, K.F., S.L. Ball (2005) DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Phil Trans R Soc B* 360, 1813-1823
- Armstrong, K.F., C.M. Cameron, E.R. Frampton (1997) Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: a rapid molecular diagnostic technique for quarantine application. *Bull Entomol Res* 87, 111-118
- Armstrong, K.F., P. McHugh, W. Chinn, E.R. Frampton, P.J. Walsh (2003) Tussock moth species arriving on imported used vehicles determined by DNA analysis. *NZ Plant Prot* 56, 16-20
- Baker, E.W., D.M. Tuttle (1994) A guide to the spider mites (Tetranychidae) of the United States. *Indiana Publishing House, West Bloomfield, Michigan*. 347 pp.
- Ball, S.L., K.F. Armstrong (2006) DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Can J For Res* 36, 337-350
- Baranchikov, Y.N. (1989) Ecological basis of the evolution of host relationships in Eurasian gypsy moth populations. In *Proceedings, Lymantriidae: a comparison of features of new and old world tussock moths* (W.E. Wallner, K.A. McManus eds.). United States Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station, Broomall, Pennsylvania, pp. 319-338
- Ben-David, T., S. Melamed, U. Gerson, S. Morin (2007) ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol* 41, 169-181
- Bertin, S., L. Picciau, Z. Acs, A. Alma, D. Bosco (2010) Molecular differentiation of four *Reptalus* species

(Hemiptera: Cixiidae). Bull Entomol Res 100, 551-558

Bogdanowicz, S.M., W.E. Wallner, J. Bell, T.M. Odell, R.G. Harrison (1993) Asian gypsy moths (Lepidoptera:

Lymantriidae) in North America: evidence from molecular data. Ann Entomol Soc Am 86, 710-715

Bogdanowicz, S.M., P.W. Schaefer, R.G. Harrison (2000) Mitochondrial DNA variation among worldwide populations of gypsy moths, *Lymantria dispar*. Mol Phylogenet Evol 15, 487-495

Boubou, A., A. Migeon, G. K. Roderick, P. Auger, J.-M. Cornuet, S. Magalhães, M. Navajas (2012) Test of colonisation scenarios reveals complex invasion history of the red tomato spider mite *Tetranychus evansi*.

PLoS ONE 7, e35601

Canadian Food Inspection Agency (CFIA) (2013) D-95-03: Plant protection policy for marine vessels arriving

in Canada from areas regulated for Asian gypsy moth (*Lymantria dispar*, *Lymantria albescens*, *Lymantria postalba*, *Lymantria umbrosa*). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario, Canada.

<http://www.inspection.gc.ca/plants/plant-protection/directives/forestry/d-95->

[03/eng/1321945111492/1321945247982](http://www.inspection.gc.ca/plants/plant-protection/directives/forestry/d-95-03/eng/1321945111492/1321945247982).

Clary, D.O., D.R. Wolstenholme (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J Mol Evol 22, 252-271

Department of Agriculture and Water Resources (DAWR) (2016) Asian gypsy moth biosecurity. Australian

Government Department of Agriculture and Water Resources, Canberra, Australia.

<http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/asian-moth.pdf>.

deWaard, J.R., A. Mitchell, M.A. Keena, D. Gopurenko, L.M. Boykin, K.F. Armstrong, M.G. Pogue, J. Lima,

R. Floyd, R.H. Hanner, L.M. Humble (2010) Towards a global barcode library for *Lymantria*

(Lepidoptera: Lymantriinae) tussock moths of biosecurity concern. PLoS ONE 5, e14280

Ehara, S. (1999) Revision of the spider mite family Tetranychidae of Japan (Acari, Prostigmata). Species

Divers 4, 63-141

Ehara, S., T. Gotoh (2007) Five species of spider mites (Acari: Prostigmata: Tetranychidae) from Japan with description of two new species. *Zootaxa* 1646, 51-58

江原昭三・後藤哲雄 (2009) ハダニ科の概説と同定. 原色植物ダニ検索図鑑 (江原昭三・後藤哲雄編). 全国農村教育協会, 東京, pp. 204-220

Ehara, S., K. Ohashi (2002) A new species of *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae) from the Kinki District, Japan. *Acta Arachnol* 51, 19-22

Ehara, S., Y. P. Tho (1988) Spider mites of the Malay Peninsula (Acarina: Tetranychidae). *J Fac Ed Tottori Univ (Nat Sci)* 37, 1-24

江原昭三・山口卓宏 (2001) 日本未記録の広食性ハダニ *Tetranychus neocaledonicus* の奄美大島からの発見. *植物防疫* 55, 268-272

Elfékih, S., D.S. Haymer (2010) Molecular taxonomic identification of *Dacus* and *Ceratitidis* species from Sub-Saharan Africa using mitochondrial haplotypes. *J Econ Entomol* 103, 1842-1847

Farris, R.E., R. Ruiz-Arce, M. Ciomperlik, J.D. Vasquez, R. DeLeón (2010) Development of a ribosomal DNA ITS2 marker for the identification of the thrips, *Scirtothrips dorsalis*. *J Insect Sci* 10, 1-15

Gotoh, T., J. Gutierrez, M. Navajas (1998) Molecular comparison of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara et Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomol Sci* 1, 55-57

Gotoh, T., R. Araki, A. Boubou, A. Migeon, F. Ferragut, M. Navajas (2009) Evidence of co-specificity between *Tetranychus evansi* and *Tetranychus takafujii* (Acari: Prostigmata, Tetranychidae): comments on taxonomic and agricultural aspects. *Int J Acarol* 35, 485-501

Hada, H., K.-T. Sekine (2011) A diagnostic multiplex polymerase chain reaction method to identify Japanese internal apple-feeding Lepidopteran pests: *Grapholita molesta*, *Grapholita dimorpha* (Lepidoptera:

- Tortricidae), and *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae). *Appl Entomol Zool* 46, 287-291
- Harrison, R.G., T.M. Odell (1989) Mitochondrial DNA as a tracer of gypsy moth origins. In *Proceedings, Lymantriidae: a comparison of features of new and old world tussock moths* (W.E. Wallner, K.A. McManus eds.). United States Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station, Broomall, Pennsylvania, pp. 265-273
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, J.R. deWaard (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270, 313-321
- Higashiura, Y., H. Yamaguchi, M. Ishihara, N. Ono, H. Tsukagoshi, S. Yokobori, S. Tokishita, H. Yamagata, T. Fukatsu (2011) Male death resulting from hybridization between subspecies of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Heredity* 106, 603-613
- Hinomoto, N., A. Takafuji (2001) Genetic diversity and phylogeny of the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai*, in Japan. *Exp Appl Acarol* 25, 355-370
- Huang, C.-G., J.-C. Hsu, D.S. Haymer, G.-C. Lin, W.-J. Wu (2009) Rapid identification of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) by loop-mediated isothermal amplification. *J Econ Entomol* 102, 1239-1246
- Hulme P.E. (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *J Appl Ecol* 46, 10-18
- Hurtado, M.A., T. Ansaloni, S. Cros-Arteil, J.A. Jacas, M. Navajas (2008) Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Ann Appl Biol* 153, 167-174
- 井上 寛 (1982) ドクガ科. 日本産蛾類大図鑑 第1巻: 解説編 (井上 寛・杉 繁郎・黒子 浩・森内 茂・川辺 湛 編). 講談社, 東京, pp. 628-638

- Iwahori, H., N. Kanzaki, K. Futai (2000) A simple, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-aided diagnosis method for pine wilt disease. *For Path* 30, 157-164
- Iwaizumi, R., K. Arakawa (2010) Report on female flight activity of the Asian gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and flight suppression with a yellow light source in Japan. *Res Bull Pl Prot Japan* 46, 9-15
- Jikumaru, S. (2013) Oviposition preferences of the Japanese gypsy moth, *Lymantria dispar japonica* (Motschulsky, 1860) (Insecta: Lepidoptera: Erebidae: Lymantriinae), on evergreen broad-leafed tree leaves in Hiroshima Prefecture, Japan. *Life: The Excit Biol* 1, 225-240
- 金田昌士・真崎 誠 (1994) 輸入植物から発見されたダニ類・追補. *植防研報* 30, 125-126
- Kang, T.H., K.-S. Lee, H.-S. Lee (2015) DNA barcoding of the Korean *Lymantria* Hübner, 1819 (Lepidoptera: Erebidae: Lymantriinae) for quarantine inspection. *J Econ Entomol* 108, 1596-1611
- Keena, M.A. (1996) Comparison of the hatch of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) eggs from Russia and the United States after exposure to different temperatures and durations of low temperature. *Ann Entomol Soc Am* 89, 564-572
- Keena, M.A., M.-J. Côté, P.S. Grinberg, W.E. Wallner (2008) World distribution of female flight and genetic variation in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) *Environ Entomol* 37, 636-649
- 岸田泰則 (2011) ドクガ科. 日本産蛾類標準図鑑 2 (岸田泰則 編). 学研教育出版, 東京, pp. 139-147
- 岸田泰則・真鍋泰彦 (2012) 与那国島で採集された日本未記録のマイマイガの 1 種. *蛾類通信* 265, 369
- Knapp, M., B. Wagener, M. Navajas (2003) Molecular discrimination between the spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Afr Entomol* 11, 300-304

- Kox, L.F.F., H.E. van den Beld, B.I. Lindhout, L.J.W. de Goffau (2005) Identification of economically important *Liriomyza* species by PCR-RFLP analysis. EPPO Bull 35, 79-85
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947-2948
- Lee, M.-L., M.-H. Lee (1997) Amplified mitochondrial DNA identify four species of *Tetranychus* mites (Acarina: Tetranychidae) in Korea. Korean J Appl Entomol 36, 30-36
- Li, Z.-X., L. Zheng, Z.-R. Shen (2004) Using internally transcribed spacer 2 sequences to re-examine the taxonomic status of several cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Eur J Entomol 101, 347-358
- Li, D., Q.-H. Fan, D.W. Waite, D. Gunawardana, S. George, L. Kumarasinghe (2015) Development and validation of a Real-Time PCR assay for rapid detection of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). PLoS ONE 10, e0131887
- 真崎 誠 (1991) 輸入植物から発見されたダニ類. 植防研報 27, 87-92
- 真崎 誠 (2001) 輸入タイ野菜から発見されたハダニ科の数種. 植防研報 37, 111-116
- 真崎 誠・北村 寿 (2004) 成田空港で輸入植物から発見されたハダニ上科 (Acari; Tetranychoidae). 植防研報, 40: 119-125
- 真崎 誠・早瀬 猛・宮島 智 (1991) 輸入カボチャから捕捉された数種ハダニおよび捕食性アザミウマについて. 植防研報 27, 107-114
- 榊本雅身・高原伸一・白井洋一 (2001) 日本の植物検疫において発見された害虫相の 10 年間の推移. 応動昆 45, 195-201
- Matsuda, T., N. Hinomoto, R.N. Singh, T. Gotoh (2012) Molecular-based identification and phylogeny of

- Oligonychus* species (Acari: Tetranychidae). J Econ Entomol 105, 1043-1050
- Matsuda, T., C. Fukumoto, N. Hinomoto, T. Gotoh (2013) DNA-based identification of spider mites: molecular evidence for cryptic species of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). J Econ Entomol 106, 463-472
- McKern, J.A., A.L. Szalanski (2007) Molecular diagnostics of economically important clearwing moths (Lepidoptera: Sesiidae). Florida Entomol 90, 475-479
- Meyer, M.K.P.S. (1987) African Tetranychidae (Acari: Prostigmata) - with reference to the world genera. Entomol Mem Dep Agric Wat Supply Repub S Afr 69, 1-175
- Migeon, A., F. Dorkeld (2006-2017) Spider mites web: a comprehensive database for the Tetranychidae. <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>.
- Ministry for Primary Industries (MPI) (2017) Craft Risk Management Standard: Vessels. Ministry for Primary Industries (MPI) Regulation & Assurance Branch Plants, Food and Environment Directorate, Wellington. 12 pp.
- Muraji, M., S. Nakahara (2002) Discrimination among pest species of *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) based on PCR-RFLP of the mitochondrial DNA. Appl Entomol Zool 37, 437-446
- Myers, J.H., D. Simberloff, A.M. Kuris, J.R. Carey (2000) Eradication revisited: dealing with exotic species. Trends Ecol Evol 15, 316-320
- Navajas, M., P. Boursot (2003) Nuclear ribosomal DNA monophyly versus mitochondrial DNA polyphyly in two closely related mite species: the influence of life history and molecular drive. Proc R Soc Lond B (Suppl) 270, S124-S127
- Navajas, M., J. Gutierrez, O. Bonato, H.R. Bolland, S. Mapangou-Divassa (1994) Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of

- mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp Appl Acarol* 18, 351-360
- Navajas, M., J. Lagnel, J. Gutierrez, P. Boursot (1998) Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80, 742-752
- North American Plant Protection Organization (NAPPO) (2015) NAPPO Regional Standards for Phytosanitary Measures (RSPM) No. 33, Guidelines for regulating the movement of vessels from areas infested with the Asian gypsy moth. The Secretariat of the North American Plant Protection Organization, Ottawa, Ontario. 12 pp.
- 農 林 水 産 省 (2017) 平 成 28 年 度 食 料 ・ 農 業 ・ 農 村 白 書 .
http://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/h28/index.html.
- Orui, Y. (1996) Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Appl Entomol Zool* 31, 505-514
- Orui, Y., T. Mizukubo (1999) Discrimination of seven *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Appl Entomol Zool* 34, 205-211
- Osakabe, Mh., T. Hirose, M. Sato (2002) Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Appl Entomol Zool* 37, 399-407
- Osakabe, Mh., Y. Kotsubo, R. Tajima, N. Hinomoto (2008) Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae). *J Econ Entomol* 101, 1167-1175
- Pfeifer, T.A., L.M. Humble, M. Ring, T.A. Grigliatti (1995) Characterization of gypsy moth populations and related species using a nuclear DNA marker. *Can Entomol* 127, 49-58

- Pogue, M.G., P.W. Schaefer (2007) A review of selected species of *Lymantria* Hübner [1819] including three new species (Lepidoptera: Noctuidae: Lymantriinae) from subtropical and temperate regions of Asia, some potentially invasive to North America. United States Department of Agriculture Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team, Morgantown, West Virginia. 223 pp.
- Pritchard, A.E., E.W. Baker (1955) A revision of the spider mite family Tetranychidae. Pacif Coast Entomol Soc Mem Ser 2, 1-472
- Sabelis, M.W. (1991) Life-history evolution of spider mites. In *The Acari: Reproduction, development and life-history strategies* (R. Schuster, P.W. Murphy eds.). Chapman & Hall, London, pp. 23-49
- Schaefer, P.W. (2012) Behavior of *Lymantria lucescens* (Butler) (Erebidae: Lymantriinae); especially during an outbreak near Toyota city, Honshu, Japan. J Lepid Soc 66, 133-136
- Schaefer, P.W., R.M. Weseloh, X. Sun, W.E. Wallner, J. Yan (1984) Gypsy moth, *Lymantria* (= *Ocneria*) *dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae), in the People's Republic of China. Environ Entomol 13, 1535-1541
- Schintlmeister, A. (2004) The taxonomy of the genus *Lymantria* Hübner, [1989] (Lepidoptera: Lymantriidae). Quadrifina 7, 1-248
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) (2015) Establece requisitos fitosanitarios para el ingreso de naves provenientes de áreas con presencia de Polilla Gitana Raza Asiática (PGRA) *Lymantria dispar asiática* Vnukovskij y *Lymantria dispar japónica* (Motschulsky) (Lepidoptera, Lymantriidae). Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero, Dirección Nacional, Chile. <http://normativa.sag.gob.cl/Publico/Normas/DetalleNorma.aspx?id=1053556>. (in Spanish)
- Stewart, D., R. Zahiri, A. Djoumad, L. Freschi, J. Lamarche, D. Holden, S. Cervantes, D.I. Ojeda, A. Potvin, A. Nisole, C. Béliveau, A. Capron, T. Kimoto, B. Day, H. Yueh, C. Duff, R.C. Levesque, R.C. Hamelin, M. Cusson (2016) A multi-species TaqMan PCR assay for the identification of Asian gypsy moths

(*Lymantria* spp.) and other invasive Lymantriines of biosecurity concern to North America. PLoS ONE 11, e0160878

Su, N.-Y., W. Ye, R. Ripa, R.H. Scheffrahn, R.M. Giblin-Davis (2006) Identification of Chilean *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) inferred from three mitochondrial gene DNA sequences and soldier morphology. Ann Entomol Soc Am 99, 352-363

Szalanski, A.L., J.W. Austin, C.B. Owens (2003) Identification of *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Reticulitermatidae) from south central United States by PCR-RFLP. J Econ Entomol 96, 1514-1519

Toda, S., S. Komazaki (2002) Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS2 region. Bull Entomol Res 92, 359-363

Tuttle, D.M., E.W. Baker, M.J. Abbatiello (1976) Spider mites of Mexico (Acari: Tetranychidae). Int J Acarol 2, 1-102

United States Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Plant Protection and Quarantine (PPQ) (2016) Pest alert: Asian gypsy moth. United States Department of Agriculture. Washington, District of Columbia, USA. https://www.aphis.usda.gov/publications/plant_health/content/printable_version/fs_phasiangm.pdf.

Veerman, A. (1974) Carotenoid metabolism in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Comp Biochem Physiol 47B, 101-116

Wallner, W.E., L.M. Humble, R.E. Levin, Y.N. Baranchikov, R.T. Cardé (1995) Response of adult Lymantriid moths to illumination devices in the Russian Far East. J Econ Entomol 88, 337-342

横地 洋 (2007) 輸出検疫協議の現状と課題について. 植物防疫 61, 451-456

付表 1. 材料に用いた *Tetranychus* 属の採集データの詳細

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
<i>T. lambi</i>	Tla-1*	18 Mar. 2008	ニュージーランド	<i>Cucurbita</i> sp.	2(1)	AB738743
	Tla-2	23 Feb. 2009	ニュージーランド	<i>Cucurbita</i> sp.	1	
<i>T. pacificus</i>	Tpa-1*	30 Oct. 2008	米国	<i>Cucurbita pepo</i> L.	2(1)	AB738744
	Tpa-2	6 Nov. 2008	米国	<i>Cucurbita pepo</i> L.	2	
<i>T. turkestanii</i>	Ttu-1*	23 Oct. 2008	米国	<i>Cucurbita pepo</i> L.	2(1)	AB738745
	Ttu-2	20 Dec. 2009	スペイン	<i>Cynara scolymus</i> L.	3	
ナミハダニ (黄緑型)	Tu-g-1	9 May 2009	オーストラリア 南オーストラリア州	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> de Candolle	1	
	Tu-g-2	25 April 2009	オーストラリア ビクトリア州	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> de Candolle	1	
	Tu-g-3	30 April 2009	オーストラリア ビクトリア州	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> de Candolle	1	
	Tu-g-4	3 Feb. 2009	ブラジル	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-5	15 Sept. 2009	ブラジル	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-6	9 Feb. 2010	ブラジル	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-7	7 Jan. 2009	中国 海南省	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-8	16 Mar. 2009	中国 海南省	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-9	11 Mar. 2009	中国 海南省	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-10	12 Mar. 2009	中国 海南省	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-11	14 Mar. 2009	中国 海南省	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-12	3 Mar. 2009	中国 浙江省 杭州市	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-13	30 Oct. 2009	中国 香港	<i>Rosa</i> sp.	1	

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
ナミハダニ (黄緑型)	Tu-g-14	16 Nov. 2009	中国 山東省 煙台市	<i>Scaevola</i> sp.	1	
	Tu-g-15	24 Feb. 2009	中国 雲南省	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-16	24 Feb. 2009	中国 雲南省	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-17	16 July 2009	中国 福建省 漳州市	<i>Hedera helix</i> L.	1	
	Tu-g-18	26 Nov. 2008	コロンビア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-19	4 Feb. 2009	コロンビア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-20	25 Mar. 2009	コロンビア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-21	31 May 2009	コロンビア	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-22	10 Aug. 2009	コロンビア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-23	9 Oct. 2009	コロンビア	<i>Hydrangea</i> sp.	1	
	Tu-g-24	15 Nov. 2009	コロンビア	<i>Hydrangea</i> sp.	1	
	Tu-g-25	14 Oct. 2009	コロンビア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-26	27 Oct. 2009	コロンビア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-27	6 Jan. 2010	コロンビア	<i>Alstroemeria</i> sp.	1	
	Tu-g-28	4 Oct. 2009	デンマーク	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-29	25 May 2009	エクアドル	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-30	18 July 2009	エクアドル	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-31	12 June 2009	エクアドル	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-32	6 Aug. 2009	エクアドル	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-33	15 Oct. 2009	エクアドル	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-34	1 Oct. 2009	エクアドル	<i>Rosa</i> sp.	1	

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
ナミハダニ (黄緑型)	Tu-g-35	21 Aug. 2009	エクアドル	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-36	10 Aug. 2009	エチオピア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-37	16 Dec. 2009	エチオピア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-38	14 Oct. 2008	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-39	3 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-40	23 Feb. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-41	30 Jan. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-42	28 Jan. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-43	17 Jan. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-44	19 Jan. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-45	23 Jan. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-46	25 Feb. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-47	3 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-48	10 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-49	24 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-50	24 Jan. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-51	1 Feb. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-52	21 Feb. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-53	6 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-54	20 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-55	9 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
ナミハダニ (黄緑型)	Tu-g-56	6 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-57	26 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-58	16 Feb. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-59	6 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-60	20 Feb. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-61	6 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-62	21 Mar. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-63	4 May 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-64	17 April 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-65	1 Sept. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-66	25 Nov. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-67	18 June 2009	日本 青森県 弘前市	<i>Malus domestica</i> Borkhausen	19	
	Tu-g-68	23 Jan. 2009	日本 佐賀県	<i>Fragaria</i> sp.	1	
	Tu-g-69	16 Jan. 2009	ケニア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-70	19 Feb. 2009	ケニア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-71	23 July 2009	ケニア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-72	20 Aug. 2009	ケニア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-73	17 Jan. 2009	韓国	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-74	18 Mar. 2009	韓国	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-75	6 Aug. 2009	韓国	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
ナミハダニ (黄緑型)	Tu-g-76	17 Aug. 2009	韓国	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-77	4 Nov. 2008	マレーシア	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-78	17 Oct. 2009	マレーシア	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-79	15 Feb. 2010	マレーシア	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-80	14 Nov. 2008	ネパール	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-81	6 Nov. 2008	オランダ	<i>Capsicum</i> sp.	1	
	Tu-g-82	6 Mar. 2009	オランダ	<i>Hedera</i> sp.	1	
	Tu-g-83	15 May 2009	オランダ	<i>Hedera</i> sp.	1	
	Tu-g-84	30 Nov. 2009	オランダ	<i>Helleborus</i> sp.	1	
	Tu-g-85	9 Oct. 2009	オランダ	<i>Hedera</i> sp.	1	
	Tu-g-86	15 Oct. 2008	ニュージーランド	<i>Cymbidium</i> sp.	1	
	Tu-g-87	4 Feb. 2009	ニュージーランド	<i>Hydrangea</i> sp.	1	
	Tu-g-88	20 Dec. 2008	ニュージーランド	<i>Hydrangea</i> sp.	1	
	Tu-g-89	21 Feb. 2009	ニュージーランド	<i>Hydrangea</i> sp.	1	
	Tu-g-90	8 May 2009	ニュージーランド	<i>Hydrangea</i> sp.	1	
	Tu-g-91	4 Aug. 2009	ニュージーランド	<i>Cymbidium</i> sp.	1	
	Tu-g-92	20 May 2009	ニュージーランド	<i>Cymbidium</i> sp.	1	
	Tu-g-93	11 July 2009	ニュージーランド	<i>Cymbidium</i> sp.	1	
	Tu-g-94	12 Aug. 2009	ニュージーランド	<i>Cymbidium</i> sp.	1	
	Tu-g-95	28 July 2009	ニュージーランド	<i>Cymbidium</i> sp.	1	
	Tu-g-96	1 Dec. 2008	スリランカ	<i>Hedera</i> sp.	1	

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
ナミハダニ (黄緑型)	Tu-g-97	1 Feb. 2010	スリランカ	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-98	3 Mar. 2009	台湾	<i>Chrysanthemum</i> × <i>morifolium</i> Ramatuelle	1	
	Tu-g-99	9 Mar. 2009	台湾	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	
	Tu-g-100	12 May 2009	台湾	<i>Carica papaya</i> L.	1	
	Tu-g-101	2 Oct. 2008	米国	<i>Cucurbita</i> sp.	1	
	Tu-g-102	6 Aug. 2009	米国	<i>Cucurbita pepo</i> L.	1	
	Tu-g-103	1 Oct. 2009	米国	<i>Cucurbita</i> sp.	1	
	Tu-g-104	1 Oct. 2009	米国	<i>Cucurbita pepo</i> L.	1	
	Tu-g-105	15 Oct. 2009	米国	<i>Cucurbita</i> sp.	1	
	Tu-g-106	13 Nov. 2008	米国	<i>Fragaria</i> sp.	1	
	Tu-g-107	13 Aug. 2009	米国 カリフォルニア州	<i>Cucurbita pepo</i> L.	1	
	Tu-g-108	3 Sept. 2009	米国 カリフォルニア州	<i>Cucurbita pepo</i> L.	1	
	Tu-g-109	12 Oct. 2009	米国 カリフォルニア州	<i>Cucurbita</i> sp.	1	
	Tu-g-110	5 Nov. 2009	米国 カリフォルニア州	<i>Cucurbita</i> sp.	1	
	Tu-g-111	24 May 2009	米国 フロリダ州	<i>Amaranthus</i> sp.	1	
	Tu-g-112	8 Mar. 2009	米国 ワシントン州	<i>Hydrangea</i> sp.	1	
	Tu-g-113*	1 Feb. 2010	ウガンダ	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1(1)	AB738746
	Tu-g-114	11 Mar. 2009	ベトナム	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-g-115	11 Mar. 2009	ベトナム	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-g-116	15 June 2009	ベトナム	<i>Chrysanthemum</i> sp.	1	

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
ナミハダニ (赤色型)	Tu-r-1	1 Mar. 2010	中国 浙江省 杭州市	<i>Dianthus</i> <i>caryophyllus</i> L.	1	
	Tu-r-2	22 Mar. 2009	中国 雲南省	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-3	12 Sept. 2009	中国 雲南省	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-4	4 Mar. 2009	コロンビア	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-5	31 July 2009	コロンビア	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-6	2 Oct. 2009	コロンビア	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-7	22 Aug. 2009	コロンビア	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-8	23 July 2009	エクアドル	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-9	1 Aug. 2009	エクアドル	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-10	16 Aug. 2009	エクアドル	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-11	14 Oct. 2009	エクアドル	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-12	11 May 2009	エチオピア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-13	9 Dec. 2009	エチオピア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-14	6 Feb. 2009	インド	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-15	11 Nov. 2009	イスラエル	<i>Fuchsia</i> sp.	1	
	Tu-r-16	27 Mar. 2009	日本 神奈川県 川崎市	<i>Oenothera tetraptera</i> Cavanilles	15	
	Tu-r-17	15 Jan. 2009	ケニア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-18	24 April 2009	ケニア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-19	3 April 2009	ケニア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-20	15 Aug. 2009	ケニア	<i>Rosa</i> sp.	1	

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
ナミハダニ (赤色型)	Tu-r-21	17 Dec. 2009	ケニア	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-22	11 Feb. 2009	メキシコ モレロス州	<i>Ficus carica</i> L.	1	
	Tu-r-23	22 Oct. 2008	南アフリカ	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-24	29 Jan. 2009	南アフリカ	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-25	22 Dec. 2009	南アフリカ	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-26	4 Dec. 2009	南アフリカ	<i>Rosa</i> sp.	1	
	Tu-r-27	11 Jan. 2009	スペイン	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-28*	3 Aug. 2009	スペイン	<i>Dianthus</i> sp.	1(1)	AB738747
	Tu-r-29	30 June 2009	台湾	<i>Anthurium</i> sp.	1	
	Tu-r-30	23 Jan. 2009	トルコ	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-31	3 May 2009	トルコ	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-32	2 May 2009	トルコ	<i>Dianthus</i> sp.	1	
	Tu-r-33	1 May 2009	トルコ	<i>Dianthus</i> sp.	1	
カンザワハダニ	Tk-1	23 Oct. 2008	日本 千葉県 成田市	<i>Nerium oleander</i> L. var. <i>indicum</i> (Miller) Degener et Greenwell	1	
	Tk-2	10 Oct. 2008	日本 千葉県 成田市	<i>Gladiolus</i> sp.	1	
	Tk-3	3 May 2007	日本 神奈川県 横浜市	<i>Hydrangea</i> <i>macrophylla</i> (Thunberg ex Murray) Seringe	2	
	Tk-4	9 Nov. 2010	日本 宮崎県 宮崎市	<i>Bougainvillea</i> <i>spectabilis</i> Willdenow	1	

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号	
カンザワハダニ	Tk-5	10 Nov. 2010	日本 宮崎県 宮崎市	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunberg ex Murray) Seringe	1		
	Tk-6	15 April 2009	マレーシア	<i>Cordyline</i> sp.	1		
	Tk-7	19 Aug. 2009	マレーシア	<i>Cordyline</i> sp.	1		
	Tk-8	18 Mar. 2009	シンガポール	<i>Cordyline</i> sp.	1		
	Tk-9	18 Sept. 2008	台湾	<i>Cordyline</i> sp.	1		
	Tk-10	2 Dec. 2008	台湾	<i>Cordyline</i> sp.	1		
	Tk-11	18 Nov. 2008	台湾	<i>Cordyline</i> sp.	1		
	Tk-12	27 Feb. 2009	台湾	<i>Cordyline</i> sp.	1		
	Tk-13	6 May 2009	台湾	<i>Cordyline</i> sp.	1		
	Tk-14	12 May 2009	台湾	<i>Carica papaya</i> L.	1		
	Tk-15	12 May 2009	台湾	<i>Carica papaya</i> L.	1		
	Tk-16*	25 Aug. 2009	台湾	<i>Cordyline</i> sp.	1(1)	AB738748	
	Tk-17	27 Nov. 2009	台湾	<i>Gladiolus</i> sp.	1		
	Tk-18	4 Dec. 2009	台湾	<i>Gladiolus</i> sp.	1		
	Tk-19	16 Oct. 2008	タイ	<i>Rosa</i> sp.	1		
	Tk-20	9 May 2009	タイ	<i>Cordyline</i> sp.	1		
	イシイナミハダニ	Ttr-1*	21 Sept. 2009	中国 上海市	<i>Perilla</i> sp.	1(1)	AB738749
		Ttr-2	2 Dec. 2009	台湾	<i>Gladiolus</i> sp.	1	
	ミヤラナミハダニ	Tpi-1	12 Nov. 2008	インドネシア	<i>Cordyline</i> sp.	1	
		Tpi-2	13 May 2010	日本 鹿児島県 喜界島	<i>Pueraria lobata</i> (Willdenow) Ohwi	1	

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
ミヤラナミハダニ	Tpi-3	11 Dec. 2007	日本 沖縄県 今帰仁村	<i>Dolichos lablab</i> L.	1	
	Tpi-4*	8 July 2009	マレーシア	<i>Chrysalidocarpus</i> sp.	1(1)	AB738750
	Tpi-5	8 Aug. 2009	タイ	<i>Cordyline</i> sp.	1	
サガミナミハダニ	Tph-1	29 June 2000	日本	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	1	
	Tph-2*	9 Oct. 2007	日本 神奈川県 横浜市	<i>Fatoua villosa</i> (Thunberg ex Murray) Nakai	1(1)	AB738751
ナンセイナミハダニ	Tn-1*	27 May 1998	日本 東京都 父島	<i>Morus australis</i> Poiret	4(1)	AB738752
<i>T. merganser</i>	Tme-1	2 Dec. 2008	メキシコ	<i>Cucurbita</i> sp.	1	
	Tme-2*	15 Dec. 2009	メキシコ	<i>Cucurbita</i> sp.	1(1)	AB738753
	Tme-3	29 Dec. 2009	メキシコ	<i>Cucurbita</i> sp.	1	
アシノワハダニ	Tlu-1*	27 Nov. 2009	コロンビア	<i>Rosa</i> sp.	1(1)	AB738754
	Tlu-2	12 Oct. 2008	日本 神奈川県 川崎市	<i>Bidens</i> sp.	1	
	Tlu-3	29 Aug. 2008	日本 神奈川県 横浜市	<i>Bidens</i> sp.	1	
	Tlu-4	17 Sept. 2008	日本 富山県 富山市	<i>Paederia scandens</i> (Loureiro) Merrill	1	
	Tlu-5	20 May 2009	ニュージーランド	<i>Cymbidium</i> sp.	1	
	Tlu-6	15 Jan. 2009	米国 カリフォルニア州	<i>Fragaria</i> sp.	1	
ミツユビナミハダニ	Te-1*	5 Nov. 2009	日本 千葉県 成田市	<i>Solanum nigrum</i> L.	3(1)	AB738755
<i>T. macfarlanei</i>	Tma-1	4 Feb. 2010	フィリピン ルソン島	<i>Abelmoschus</i> <i>esculentus</i> (L.) Moench	1	
	Tma-2*	18 Jan. 2010	フィリピン ルソン島	<i>Abelmoschus</i> <i>esculentus</i> (L.) Moench	1(1)	AB738756

付表 1. 続き

種名	個体群 番号 ^a	採集年月日	産地	寄主植物	個体数 ^b	アクセッション 番号
ナンゴクナミハダニ	To-1	19 June 2003	日本 沖縄県 那覇市	—	1	
	To-2*	13 May 2010	日本 鹿児島県 喜界島	<i>Bidens</i> sp.	3(1)	AB738757

^a アステリスクは本研究で ITS 領域のシーケンスに用いた個体群を示す

^b 数字は PCR-RFLP の検出に用いた個体数を示すが、括弧内の数字はシーケンスに用いた個体数を示す

付表 2. mtDNA による識別に用いた *Lymantria* 属の採集データの詳細

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	9	雄	25 Jul. 2004	成虫	北海道小樽市	
	58*	雄	26 Jul. 2004	成虫	北海道小樽市	AB839867
	60	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	62	雄	9 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	178	雄	21 Jul. 2004	成虫	北海道小樽市	
	179	雄	26 Jul. 2004	成虫	北海道小樽市	
	183	雄	9 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	184	雄	12 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	185	雄	13 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	187	雄	24 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	188	雄	26 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	190	雄	28 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	14	雄	2 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	15*	雄	17 Aug. 2005	成虫	北海道札幌市	AB839868
	63	雄	3 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	64	雄	5 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	65	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	66	雄	2 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	67	雄	14 Aug. 2005	成虫	北海道札幌市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	212	雄	28 Jul. 2004	成虫	北海道札幌市	
	213	雄	30 Jul. 2004	成虫	北海道札幌市	
	214	雄	3 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	217	雄	4 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	219	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	220	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	199	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	241*	雄	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	AB839869
	49	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	50	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	51	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	52	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	53	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	54*	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	AB839870
	163	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	164	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	165	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	166	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	167	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	168	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	169	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	170	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	171	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	172	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	173	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	174	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	175	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	201	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	202	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	203	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	204	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	205	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	206	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	207	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	68*	雄	2007	成虫	北海道函館市	AB839871
	69	雄	2007	成虫	北海道函館市	
	70	雄	2007	成虫	北海道函館市	
	71	雄	2007	成虫	北海道函館市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	72	雄	2007	成虫	北海道函館市	
	343	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	344	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	345	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	346	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	347	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	348	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	33	雄	20 Aug. 2004	成虫	宮城県利府町	
	34	雄	19 Aug. 2004	成虫	宮城県利府町	
	35	雄	15 Aug. 2004	成虫	宮城県利府町	
	24	雄	22 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	144	雄	5 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	145	雄	8 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	146	雄	11 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	147	雄	18 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	140	雄	28 Jul. 2005	成虫	宮城県多賀城市	
	141	雄	31 Jul. 2005	成虫	宮城県多賀城市	
	142	雄	1 Aug. 2005	成虫	宮城県多賀城市	
	143	雄	3 Aug. 2005	成虫	宮城県多賀城市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	256	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	257	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	258	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	259	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	260	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	354	雄	18 Jul. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	355	雄	18 Jul. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	356	雄	1 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	357	雄	1 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	358	雄	15 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	359	雄	23 Jul. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	360	雄	23 Jul. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	361	雄	1 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	362	雄	7 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	285	雌	9 Aug. 2011	成虫	山形県酒田市	
	286	雄	23 Aug. 2011	成虫	山形県酒田市	
	238	雌	29 Jul. 2011	成虫	千葉県成田市	
	91	雄	30 Nov. 2006	卵塊	千葉県千葉市	
	92	雄	30 Nov. 2006	卵塊	千葉県千葉市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	93	雄	30 Nov. 2006	卵塊	千葉県千葉市	
	22	雄	24 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	23	雄	6 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	94	雄	2 Jul. 2007	成虫	神奈川県横浜市	
	95	雄	5 Jul. 2007	成虫	神奈川県横浜市	
	96	雄	17 Jul. 2007	成虫	神奈川県横浜市	
	161	雄	16 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	162	雄	7 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	176	雄	10 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	177	雄	3 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	11	雄	1 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	152	雄	3 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	153	雄	2 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	154	雄	1 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	155	雄	1 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	25	雄	2 Jul. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	156	雄	19 Jun. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	157	雄	29 Jun. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	158	雄	1 Jul. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	159	雄	2 Jul. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	160	雄	6 Jul. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	292	雄	21 May 2010	幼虫	新潟県新潟市	
	293	雌	27 May 2009	幼虫	新潟県新潟市	
	287	雄	2010	成虫	新潟県上越市	
	288	雄	2010	成虫	新潟県上越市	
	289	雄	2010	成虫	新潟県上越市	
	290	雄	2010	成虫	新潟県上越市	
	106	雄	9 Jul. 2004	成虫	富山県射水市	
	107	雄	23 Jul. 2004	成虫	富山県射水市	
	108	雄	9 Jul. 2004	成虫	富山県射水市	
	10	雄	29 Jul. 2004	成虫	富山県高岡市	
	83	雄	6 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	
	84	雄	6 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	
	85	雄	6 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	
	86	雄	13 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	
	87	雄	6 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	
	17*	雄	8 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋	AB839872
	18	雄	30 Jun. 2005	成虫	愛知県名古屋	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	97	雄	10 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	98	雄	13 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	99	雄	17 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	223	雄	5 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	224	雄	25 Jun. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	225	雄	8 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	226	雄	30 Jun. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	227	雄	2 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	19	雄	3 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎市	
	109	雄	27 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎市	
	110	雄	2 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎市	
	111	雄	3 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎市	
	112	雄	3 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎市	
	113	雄	2 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎市	
	114	雄	2 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎市	
	36	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸市	
	37	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸市	
	38	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸市	
	100	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	101	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸市	
	102	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸市	
	324	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	325	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	326	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	327	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	328	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	329	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	330	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	331	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	332	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	333	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	334	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	335	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	336	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	12	雄	5 Jul. 2004	成虫	広島県広島市	
20	雄	9 Jun. 2005	成虫	広島県広島市		
21	雄	6 Jul. 2005	成虫	広島県広島市		
130	雄	13 Jun. 2005	成虫	広島県広島市		

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	131	雄	5 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	132	雄	6 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	228	雄	6 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	229	雄	6 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	230	雄	7 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	231	雄	7 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	232	雄	7 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	323	雄	9 Jul. 1999	成虫	徳島県徳島市	
	301	雄	27 Jun. 2004	成虫	愛媛県松山市	
	7	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	73	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	74	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	75	雄	14 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	76	雄	21 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	77	雄	21 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	233	雄	14 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	234	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	236	雄	21 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	237	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	28	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
	29	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
	30	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
	31	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
	32	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
<i>L. umbrosa</i>	59*	雄	16 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	AB839873
	61	雄	10 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	180	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	181	雄	7 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	182	雄	22 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	186	雄	15 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	191	雄	2 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	192	雄	10 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	13*	雄	30 Jul. 2004	成虫	北海道札幌市	AB839874
	215	雄	3 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	216	雄	4 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	218	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	221	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
43*	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	AB839875	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. umbrosa</i>	44	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	45	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	46	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	47	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	48	雄	19 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	194	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	196	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	197	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	198	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	<i>L. albescens</i>	137*	雌	20 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市
138		雌	20 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市	
139		雌	20 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市	
262		雄	3 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
263		雄	6 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
264		雄	23 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
265		雄	27 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
268		雄	9 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
275		雄	23 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
276		雄	27 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. albescens</i>	277	雄	27 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
	278	雄	30 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
	279	雄	6 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
	280	雄	6 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
	281	雄	9 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
	282	雄	7 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
	283	雄	6 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
	284	雄	9 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
<i>L. postalba</i>	78	雄	30 Jul. 2004	成虫	長崎県対馬市	
	79	雄	30 Jul. 2004	成虫	長崎県対馬市	
	80*	雄	30 Jul. 2004	成虫	長崎県対馬市	AB839877
	81	雄	6 Aug. 2004	成虫	長崎県対馬市	
<i>L. xyliina</i>	365	雄	9 Jul. 1994	成虫	千葉県富山町	
	366	雄	9 Jul. 1994	成虫	千葉県富山町	
	208	雌	28 Jun. 2007	成虫	大分県大分市	
	209	雌	28 Jun. 2007	成虫	大分県大分市	
	210	雄	28 Jun. 2007	成虫	大分県大分市	
	211	雄	28 Jun. 2007	成虫	大分県大分市	
	115	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. xylyna</i>	116	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	117	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	118*	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	AB839878
	119	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	120	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	121	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	122	雌	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	123	雌	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	133	雌	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	134	雌	18 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市	
	135	雌	20 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市	
	136	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	<i>L. mathura</i>	124	雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市
125		雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
126		雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
127		雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
128		雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
129		雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
1		雌	19 Aug. 2009	卵塊	北海道苫小牧市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. mathura</i>	2	雌	19 Aug. 2009	卵塊	北海道苫小牧市	
	3	雌	19 Aug. 2009	卵塊	北海道苫小牧市	
	55*	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	AB839879
	56	雌	19 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	57	雌	19 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	243	雄	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	244	雄	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	245	雌	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	246	雌	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	247	雌	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	248	雌	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	249	雄	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	250	雄	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	251	雄	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	252	雄	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	350	雄	8 Aug. 2008	成虫	岩手県盛岡市	
	349	雌	23 Jun. 2012	6 齢幼虫	神奈川県横浜市	
	254	雄	22 Jul. 2005	成虫	神奈川県横須賀市	
	255	雄	22 Jul. 2005	成虫	神奈川県横須賀市	

付表 2. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. mathura</i>	368	雄	1 Aug. 2001	成虫	山梨県小淵沢町	
	369	雄	1 Aug. 2001	成虫	山梨県小淵沢町	
<i>L. monacha</i>	150*	雄	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	AB839880
	239	雌	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	240	雄	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	367	雄	1 Aug. 2001	成虫	山梨県小淵沢町	

^a アステリスクは本研究で mtDNA のシーケンスに用いた標本を示す

すべての証拠標本は一連の証拠標本番号の下に農林水産省横浜植物防疫所に保管した

付表 3. ITS2 領域による識別に用いた *Lymantria* 属の採集データの詳細

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	9	雄	25 Jul. 2004	成虫	北海道小樽市	
	58	雄	26 Jul. 2004	成虫	北海道小樽市	
	60	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	62	雄	9 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	178	雄	21 Jul. 2004	成虫	北海道小樽市	
	179	雄	26 Jul. 2004	成虫	北海道小樽市	
	183	雄	9 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	184	雄	12 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	185	雄	13 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	187	雄	24 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	188	雄	26 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	190	雄	28 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	14	雄	2 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	15	雄	17 Aug. 2005	成虫	北海道札幌市	
	63	雄	3 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	64	雄	5 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	65	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	66	雄	2 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	67	雄	14 Aug. 2005	成虫	北海道札幌市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	212	雄	28 Jul. 2004	成虫	北海道札幌市	
	213	雄	30 Jul. 2004	成虫	北海道札幌市	
	214	雄	3 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	217	雄	4 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	219	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	220	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	199	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	241	雄	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	49	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	50	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	51	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	52	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	53	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	54	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	163	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	164	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	165	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	166	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	167	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	168	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	169	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	170	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	171	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	172	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	173	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	174	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	175	雌	2010	卵塊	北海道室蘭市	
	201	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	202	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	203	雄	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	204	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	205	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	206	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	207	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道室蘭市	
	68	雄	2007	成虫	北海道函館市	
	69	雄	2007	成虫	北海道函館市	
	70	雄	2007	成虫	北海道函館市	
	71	雄	2007	成虫	北海道函館市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	72	雄	2007	成虫	北海道函館市	
	343	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	344	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	345	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	346	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	347	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	348	雄	27 Jul. 2012	成虫	宮城県石巻市	
	16	雄	27 Jul. 2004	成虫	宮城県利府町	
	33	雄	20 Aug. 2004	成虫	宮城県利府町	
	34	雄	19 Aug. 2004	成虫	宮城県利府町	
	35	雄	15 Aug. 2004	成虫	宮城県利府町	
	24	雄	22 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	144	雄	5 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	145	雄	8 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	146	雄	11 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	147	雄	18 Aug. 2005	成虫	宮城県塩竈市	
	140	雄	28 Jul. 2005	成虫	宮城県多賀城市	
	141	雄	31 Jul. 2005	成虫	宮城県多賀城市	
	142	雄	1 Aug. 2005	成虫	宮城県多賀城市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	143	雄	3 Aug. 2005	成虫	宮城県多賀城市	
	256	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	257	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	258	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	259	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	260	雄	29 Jul. 2011	成虫	秋田県秋田市	
	354	雄	18 Jul. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	355	雄	18 Jul. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	356	雄	1 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	357	雄	1 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	358	雄	15 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	359	雄	23 Jul. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	360	雄	23 Jul. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	361	雄	1 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	362	雄	7 Aug. 2012	成虫	秋田県秋田市	
	285	雌	9 Aug. 2011	成虫	山形県酒田市	
	286	雄	23 Aug. 2011	成虫	山形県酒田市	
	238	雌	29 Jul. 2011	成虫	千葉県成田市	
	91	雄	30 Nov. 2006	卵塊	千葉県千葉市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	92	雄	30 Nov. 2006	卵塊	千葉県千葉市	
	93	雄	30 Nov. 2006	卵塊	千葉県千葉市	
	22	雄	24 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	23*	雄	6 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	LC021517
	94	雄	2 Jul. 2007	成虫	神奈川県横浜市	
	95	雄	5 Jul. 2007	成虫	神奈川県横浜市	
	96	雄	12 Jul. 2007	成虫	神奈川県横浜市	
	161	雄	16 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	162	雄	7 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	176	雄	10 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	177	雄	3 Jul. 2005	成虫	神奈川県横浜市	
	11	雄	1 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	152	雄	3 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	153	雄	2 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	154	雄	1 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	155	雄	1 Jul. 2004	成虫	神奈川県逗子市	
	25	雄	2 Jul. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	156	雄	19 Jun. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	157	雄	29 Jun. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	158	雄	1 Jul. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	159	雄	2 Jul. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	160	雄	6 Jul. 2004	成虫	神奈川県横須賀市	
	292	雄	21 May 2010	幼虫	新潟県新潟市	
	293	雌	27 May 2009	幼虫	新潟県新潟市	
	287	雄	2010	成虫	新潟県上越市	
	288	雄	2010	成虫	新潟県上越市	
	289	雄	2010	成虫	新潟県上越市	
	290	雄	2010	成虫	新潟県上越市	
	291	雄	2010	成虫	新潟県上越市	
	103	雄	23 Jul. 2004	成虫	富山県射水市	
	104	雄	9 Jul. 2004	成虫	富山県射水市	
	105	雄	9 Jul. 2004	成虫	富山県射水市	
	106	雄	9 Jul. 2004	成虫	富山県射水市	
	107	雄	23 Jul. 2004	成虫	富山県射水市	
	108	雄	9 Jul. 2004	成虫	富山県射水市	
	10	雄	29 Jul. 2004	成虫	富山県高岡市	
	83	雄	6 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	
	84	雄	6 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	85	雄	6 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	
	86	雄	13 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	
	87	雄	6 Aug. 2004	成虫	富山県高岡市	
	309	雄	30 Jul. 2005	成虫	富山県高岡市	
	294	雄	28 Jun. 2004	成虫	福井県敦賀市	
	295	雄	28 Jun. 2004	成虫	福井県敦賀市	
	296	雄	28 Jun. 2004	成虫	福井県敦賀市	
	297	雄	28 Jun. 2004	成虫	福井県敦賀市	
	377	雌	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県瑞浪市	
	384	雌	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	
	385	雌	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	
	386	雌	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	
	387	雌	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	
	17	雄	8 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	18	雄	30 Jun. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	97	雄	10 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	98	雄	13 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	99	雄	17 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	
	223	雄	5 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	224	雄	25 Jun. 2005	成虫	愛知県名古屋	
	225	雄	8 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋	
	226	雄	30 Jun. 2005	成虫	愛知県名古屋	
	227	雄	2 Jul. 2005	成虫	愛知県名古屋	
	19	雄	3 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎	
	109	雄	27 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎	
	110	雄	2 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎	
	111	雄	3 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎	
	112	雄	3 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎	
	113	雄	2 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎	
	114	雄	2 Jul. 2005	成虫	愛知県岡崎	
	298	雄	22 Jun. 2004	成虫	大阪府岸和田	
	299	雄	22 Jun. 2004	成虫	大阪府岸和田	
	300	雄	22 Jun. 2004	成虫	大阪府岸和田	
	36	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸	
	37	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸	
	38	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸	
	100	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸	
	101	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	102	雄	17 Sep. 2007	卵塊	兵庫県神戸市	
	324	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	325	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	326	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	327	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	328	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	329	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	330	雌	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	331	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	332	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	333	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	334	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	335	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	336	雄	28 Mar. 2012	卵塊	奈良県奈良市	
	304	雄	2 Jul. 2004	成虫	広島県福山市	
	12	雄	5 Jul. 2004	成虫	広島県広島市	
	20	雄	9 Jun. 2005	成虫	広島県広島市	
	21	雄	6 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	130	雄	13 Jun. 2005	成虫	広島県広島市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	131	雄	5 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	132	雄	6 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	228	雄	6 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	229	雄	6 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	230	雄	7 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	231	雄	7 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	232	雄	7 Jul. 2005	成虫	広島県広島市	
	303	雄	5 Jul. 2004	成虫	山口県宇部市	
	323	雄	9 Jul. 1999	成虫	徳島県徳島市	
	301	雄	27 Jun. 2004	成虫	愛媛県松山市	
	302	雄	24 Jun. 2004	成虫	愛媛県松山市	
	7	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	73	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	74	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	75	雄	14 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	76	雄	21 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	77	雄	21 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	233	雄	14 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	234	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. dispar japonica</i>	235	雄	21 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	236	雄	21 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	237	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	399	雄	12 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	400	雄	21 Jul. 2004	成虫	福岡県北九州市	
	28	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
	29	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
	30	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
	31	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
	32	雄	10 Jul. 2006	成虫	大分県大分市	
<i>L. umbrosa</i>	59	雄	16 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	61	雄	10 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	180	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	181	雄	7 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	182	雄	22 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	186	雄	15 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	191	雄	2 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	192	雄	10 Aug. 2004	成虫	北海道小樽市	
	13*	雄	30 Jul. 2004	成虫	北海道札幌市	LC021518

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. umbrosa</i>	215	雄	3 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	216	雄	4 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	218	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	221	雄	6 Aug. 2004	成虫	北海道札幌市	
	43	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	44	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	45	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	46	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	47	雄	10 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	48	雄	19 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	196	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	197	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	198	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
<i>L. albescens</i>	137	雌	20 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市	
	138	雌	20 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市	
	139*	雌	20 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市	LC021519
	262	雄	3 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
	263	雄	6 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	
	265	雄	27 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号	
<i>L. albescens</i>	268	雄	9 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	275	雄	23 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	276	雄	27 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	277	雄	27 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	278	雄	30 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	279	雄	6 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	280	雄	6 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	281	雄	9 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	282	雄	7 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	283	雄	6 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	284	雄	9 Jun. 2005	成虫	沖縄県那覇市		
	<i>L. postalba</i>	78	雄	30 Jul. 2004	成虫	長崎県対馬市	
		79	雄	30 Jul. 2004	成虫	長崎県対馬市	
80*		雄	30 Jul. 2004	成虫	長崎県対馬市	LC021520	
81		雄	6 Aug. 2004	成虫	長崎県対馬市		
<i>L. xylina</i>	365	雄	9 Jul. 1994	成虫	千葉県富山町		
	366	雄	9 Jul. 1994	成虫	千葉県富山町		
	208	雌	28 Jun. 2007	成虫	大分県大分市		
	209	雌	28 Jun. 2007	成虫	大分県大分市		

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. xylina</i>	210	雄	28 Jun. 2007	成虫	大分県大分市	
	211	雄	28 Jun. 2007	成虫	大分県大分市	
	115	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	116	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	117	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	118*	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	LC021521
	119	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	120	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	121	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	122	雌	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	123	雌	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	133	雌	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
	134	雌	18 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市	
	135	雌	20 May 2011	6 齢幼虫	沖縄県那覇市	
	136	雄	20 May 2011	蛹	沖縄県那覇市	
<i>L. mathura</i>	124	雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
	125	雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
	126	雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
	127	雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. mathura</i>	128	雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
	129	雄	20 Aug. 2009	卵塊	北海道小樽市	
	1	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	2	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	3	雌	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	55*	雌	18 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	LC021522
	56	雌	19 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	57	雌	19 Aug. 2010	成虫	北海道苫小牧市	
	242	雄	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	243	雄	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	244	雄	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	245	雌	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	246	雌	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	247	雌	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	248	雌	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	249	雄	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	250	雄	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	251	雄	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	252	雄	6 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. mathura</i>	350	雄	8 Aug. 2008	成虫	岩手県盛岡市	
	351	雄	8 Aug. 2008	成虫	岩手県盛岡市	
	352	雌	7 Aug. 2008	成虫	岩手県盛岡市	
	353	雌	7 Aug. 2008	成虫	岩手県盛岡市	
	349	雌	23 Jun. 2012	6 齢幼虫	神奈川県横浜市	
	254	雄	22 Jul. 2005	成虫	神奈川県横須賀市	
	255	雄	22 Jul. 2005	成虫	神奈川県横須賀市	
	369	雄	1 Aug. 2001	成虫	山梨県小淵沢町	
	148	雌	14 Jul. 2004	成虫	広島県広島市	
	149	雌	20 Jun. 2004	幼虫	広島県広島市	
	253	雄	13 Jul. 2004	成虫	広島県広島市	
<i>L. monacha</i>	150*	雄	19 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	LC021523
	239	雌	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	240	雄	5 Aug. 2009	成虫	北海道苫小牧市	
	367	雄	1 Aug. 2001	成虫	山梨県小淵沢町	
<i>L. lucescens</i>	372*	雌	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県瑞浪市	LC021524
	373	雄	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県瑞浪市	
	374	雄	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県瑞浪市	
	375	雌	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県瑞浪市	

付表 3. 続き

種名	証拠標本番号 ^a	性	採集年月日	採集時の発育 ステージ	産地 (日本)	アクセッション 番号
<i>L. lucescens</i>	376	雌	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県瑞浪市	
	378	雄	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	
	379	雄	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	
	380	雄	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	
	381	雄	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	
	382	雌	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	
	383	雄	2 Aug. 2013	成虫	岐阜県土岐市	

^a アステリスクは本研究で ITS2 領域のシーケンスに用いた標本を示す

すべての証拠標本は一連の証拠標本番号の下に農林水産省横浜植物防疫所に保管した

	18S →	ITS1	
T. lambi (Tla-1)	1	TGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGTATTACCCCTCTTATT-----	40
T. pacificus (Tpa-1)	1	40
T. turkestanii (Ttu-1)	1	40
T. urticae G (Tu-g-113)	1	40
T. urticae R (Tu-r-28)	1	40
T. kanzawai (Tk-16)	1	40
T. truncatus (Ttr-1)	1	40
T. piercei (Tpi-4)	1	40
T. phaselus (Tph-2)	1C-----	40
T. neocaledonicus (Tn-1)	1C-----	41
T. merganser (Tme-2)	1	40
T. ludeni (Tlu-1)	1A-----	40
T. evansi (Te-1)	1A-----	40
T. macfarlanei (Tma-2)	1AT-----	41
T. okinawanus (To-2)	1C.ATTATATTATTAATATATAT	60
<i>Dra</i> I			
T. lambi (Tla-1)	41	-----ATAAGAGAAATACAACC-----TTCAAATATATTCAAACACTCTGCA--ATCGT	87
T. pacificus (Tpa-1)	41	-----C.T-C.A-C.A..T.....A..	83
T. turkestanii (Ttu-1)	41	-----C.T-C.A-C.A..T.....A..	83
T. urticae G (Tu-g-113)	41	-----C.T-C.A.C.A.....A..	84
T. urticae R (Tu-r-28)	41	-----C.T-C.A.C.A.....A..	84
T. kanzawai (Tk-16)	41	-----C.T-C.A.C.A.....A..	84
T. truncatus (Ttr-1)	41	-----C.T-C.A.C.A.....G..	84
T. piercei (Tpi-4)	41	-----C.T-C.A.C.A.....A..	84
T. phaselus (Tph-2)	41	-----C.T-C.A.CTA.....G..	84
T. neocaledonicus (Tn-1)	42	-----C.T-C.A.C.A..T.....A..	85
T. merganser (Tme-2)	41	-----C.T-C.A.C.A..T.....A..	84
T. ludeni (Tlu-1)	41	-----C.T-C.A.C.A.....A..	84
T. evansi (Te-1)	41	-----C.T-C.A.C.A.....A..	84
T. macfarlanei (Tma-2)	42	-----A-----CA..C.A.CC...T.....CTC..A.	89
T. okinawanus (To-2)	61	ATATAT..G.....AAACCAA.CTT.A.C.A.T.....T..	117
T. lambi (Tla-1)	88	GGGTATTGTAAGTGCAAATATGGTGGAT-----	115
T. pacificus (Tpa-1)	84	.A-.....GA...T.....A..-GCAAT-----TG	117
T. turkestanii (Ttu-1)	84	.A-.....GA...T.....A..-GCAAT-----TG	117
T. urticae G (Tu-g-113)	85	.A-.....GA...T.....A..-GCAAT-----TG	118
T. urticae R (Tu-r-28)	85	.A-.....GA...T.....A..-GCAAT-----TG	118
T. kanzawai (Tk-16)	85	.A-.....GA...T.....A..-GCTAT-----TG	118
T. truncatus (Ttr-1)	85	.A-.....GA...T.....A..-GCAAT-----TG	118
T. piercei (Tpi-4)	85	.A-.....GA...T..AT...A..-GCAAT-----TG	118
T. phaselus (Tph-2)	85	.A-.....GA...T.....A..-GCAAT-----TG	118
T. neocaledonicus (Tn-1)	86	.A-.....TG...TT.....AT..-GCAAT-----TG	119
T. merganser (Tme-2)	85	.A-.....TGA...TT...A..-GCAAT-----TG	118
T. ludeni (Tlu-1)	85	.A-.....CGA...T.....A..-----	111
T. evansi (Te-1)	85	.A-.....CGA...TT.....A..-----	111
T. macfarlanei (Tma-2)	90	.A-.....T...TT.....-GTATT-----GC	120
T. okinawanus (To-2)	118	.A-.....T.....TT.....GAA..TGTGATGATGAATAATGATGGTATATAGTATG	176
<i>Rsa</i> I <i>Dra</i> I <i>Hinf</i> I <i>Dra</i> I ITS1→			
T. lambi (Tla-1)	116	-----CGCA ^{TTTAAAG} GTAGCAATTGGAATGTTTCATT-----GCAAACATTG	159
T. pacificus (Tpa-1)	118	AATTGCTTTT-T...G...C...G...TC-----T...CA	166
T. turkestanii (Ttu-1)	118	AATTGTAT-T-T...AG.CG...C...A...-----A	169
T. urticae G (Tu-g-113)	119	AATTGTAT-T-T...G...C...AT-----A	169
T. urticae R (Tu-r-28)	119	AATTGTAT-T-T...G...C...A...-----A	169
T. kanzawai (Tk-16)	119	AATTGTAT-T-T...G...C...A...-----A	169
T. truncatus (Ttr-1)	119	AACTGTAAAT-T...G...C...AT-----A	170
T. piercei (Tpi-4)	119	AATTGCAT-T-T...G...C...AT-----CCA	169
T. phaselus (Tph-2)	119	AATTGCAG-T-T...A...G...C...A...-----T...CCA	169
T. neocaledonicus (Tn-1)	120	AATTGTCAAT--TAG...G...C...-----T...CCA	167
T. merganser (Tme-2)	119	AATTGTCAGT ^{ETA} .A...GG...C...AT-----CT	172
T. ludeni (Tlu-1)	112	---TGTTAAT-T...G...C...AT-----A	160
T. evansi (Te-1)	112	---TGT-AAT-T...G...C...A...AT-----A	159
T. macfarlanei (Tma-2)	121	ATATATATATATATTGCA.G...C...G...G.TCA-----C...CA	173
T. okinawanus (To-2)	177	TAATATATAT ^{ETA} .A...G...C...A.TT..ATTAAAG...CCA	235

付図 1. *Tetranychus* 属 14 種 15 個体群の ITS 領域の塩基配列

T. lambi と同じ塩基はドットで示し、ダッシュはギャップを示す
 4 種類の選択した制限酵素の認識部位を四角で囲んだ
 リバースプライマーにかかる *Rsa* I の認識部位は示していない

	ITS1→	HinfI	
T. lambi (Tla-1)	160	GCCATTGCAGTATTACTTCATT-----G-----CATC	186
T. pacificus (Tpa-1)	167T...G.T.CT.-.----TTGCATTT-----GCATTCGTT...T	208
T. turkestanii (Ttu-1)	170AC.G.T.CT.AC---TTGCATTAT-----TACATTCGTT...T	214
T. urticae G (Tu-g-113)	170AC.G.T.CT.A.----TTGCATTAT-----CATTCGTT...T	211
T. urticae R (Tu-r-28)	170AC.G.T.CT.AC---TTGCATTAT-----CATTCGTT...T	211
T. kanzawai (Tk-16)	170AC.G.T.CT.-.----TTGT.ATA-----CATTCGTT...T	210
T. truncatus (Ttr-1)	171AC.G.T.CT.-.----TTGCATTG-----CATTCGTT...T	211
T. piercei (Tpi-4)	170C.G.T.CT.-.----TTGCATTG-----CATTCGTT...T	210
T. phaselus (Tph-2)	170A.G.T.CT.-.----TTGCATTG-----TATTCATT...T	210
T. neocaledonicus (Tn-1)	168G.T.CT.-.GC--AAACATTG-----CATTCATT...T	210
T. merganser (Tme-2)	173T...G.T.CT.-.----TGCATTG-----CATTCATT...T	213
T. ludeni (Tlu-1)	161C...G.T.CT...AA--TTGCAT-----ATTATAA...T	201
T. evansi (Te-1)	160T...G.T.CTT.-.----TTGCA-----TTA-AT...T	195
T. macfarlanei (Tma-2)	174T...G.T.CTGA.----TGCATTG-----ATATT-GTG...T	214
T. okinawanus (To-2)	236T.C...G.T.CT...TACATTACATATTATCCAATAAAATTTATTCATTT...T	295
		MboII	
T. lambi (Tla-1)	187	CATTTCATCCACTTTTTCATTATCAACAT-TGCAACAAAGGGTGCCGGTTATCTAACGATAG	245
T. pacificus (Tpa-1)	209TC.....C.A---.....AG.....C.....	265
T. turkestanii (Ttu-1)	215	...A.....TC.....C.A---.....AG.....	271
T. urticae G (Tu-g-113)	212	...A.....TC.....C.A---.....A...AG.....	268
T. urticae R (Tu-r-28)	212	...A.....TC.....C.A---.....A...AG.....	268
T. kanzawai (Tk-16)	211	...A.....TC.....C.A---.....A...AG.....	267
T. truncatus (Ttr-1)	212	...A.....TC.....C.A---.....A...AG.....	268
T. piercei (Tpi-4)	211	...A.....TC.....C.A---.....T.A...AG.....	267
T. phaselus (Tph-2)	211	...C.....TC.....C.T---.....A...AG.....C.....	267
T. neocaledonicus (Tn-1)	211T...C.....C.A---.....C...A...AG.....	267
T. merganser (Tme-2)	214T...C.....C.A---.....C...A...AG.....	270
T. ludeni (Tlu-1)	202T.G.....C.A---.....A...AG.....C.....	257
T. evansi (Te-1)	196T...TCG.....C.T---.....A...AG.....	251
T. macfarlanei (Tma-2)	215C.AG.G...T...A...A.....C.....	274
T. okinawanus (To-2)	296	...C.....C.A---.....AC.....T.....	352
		RsaI	
T. lambi (Tla-1)	246	CC--AAATTTTTTTTT---GAACAATTGCTACAGTTTA-----TACTGTAAAAAGCCT	292
T. pacificus (Tpa-1)	266	..-AT.T...CA...-ACAA.....--.....T.--C...A... 312	
T. turkestanii (Ttu-1)	272	..-AT....C....-GCAA.....-T.....A.--..... 318	
T. urticae G (Tu-g-113)	269	..CAT....C....-GCAA.....-T.....A.--..... 315	
T. urticae R (Tu-r-28)	269	..-AT....C....-GCAA.....-T.....A.--..... 315	
T. kanzawai (Tk-16)	268	..-AT....C....-GCAA.....-T.....A.--..... 314	
T. truncatus (Ttr-1)	269	..-AT....C....-GCAA...G...-T.....A.-C-..... 316	
T. piercei (Tpi-4)	268	..-AT....A....-ACAA.....-GT.--C...A... 314	
T. phaselus (Tph-2)	268	..-AT.--...A....-ACAA.....-GT.--C...A... 312	
T. neocaledonicus (Tn-1)	268	..-AT....CA...-ACAA.....-T.--C...A... 314	
T. merganser (Tme-2)	271	..-AT....CA...-ACAA.....-T.--T...A... 317	
T. ludeni (Tlu-1)	258	..-AT....A....-ACAA.....-T.--TG.A... 303	
T. evansi (Te-1)	252	..-AT....A....-ACAA.....-T.--T... 297	
T. macfarlanei (Tma-2)	275	..-AT....CA...TACAA.....CACACTG..AA...A... 330	
T. okinawanus (To-2)	353	..AA..GA.....GC--CAA.....-T...A... 400	
		RsaI MboII ITS1→	
T. lambi (Tla-1)	293	GTCTTGCT-----ATTATGCTACCTA--TTCAAGTCTTCAGTTTATGCTGAC	337
T. pacificus (Tpa-1)	313-AACTAC-----G-C.T.-.....C..... 359	
T. turkestanii (Ttu-1)	319-ACATAC-----G--T.....C..... 366	
T. urticae G (Tu-g-113)	316-ACATAC-----G-A.....C..... 363	
T. urticae R (Tu-r-28)	316-ACATAC-----G-A.....C..... 363	
T. kanzawai (Tk-16)	315-ACATAC-----G-.....C..... 362	
T. truncatus (Ttr-1)	317-ACAAAC-----G-.....C...A... 364	
T. piercei (Tpi-4)	315ATA----ACAAAG..T.....G-G.....C..... 366	
T. phaselus (Tph-2)	313-ACATAG-----G-.....CAC...A... 360	
T. neocaledonicus (Tn-1)	315-AC-----.....C..... 357	
T. merganser (Tme-2)	318-ACATACAAT-----.....C..T..... 366	
T. ludeni (Tlu-1)	304-ATAC.....G-A.....C..... 351	
T. evansi (Te-1)	298-ATAC..C.....CTACT.....A... 347	
T. macfarlanei (Tma-2)	331ATCTGTATGTATA.A.....-.....C..... 388	
T. okinawanus (To-2)	401AATA----AAATA..AT-----GCTT.....C...G...AT... 452	

付図 1. 続き

	ITS1→	<i>DraI</i>	<i>HinfI</i>	<i>MboII</i>	<i>MboII</i>	<i>RsaI</i>	
T. lambi (Tla-1)	338	GGCAAGGTTTAAAGAAA	GAATC	TCGTTTGCTT	CCTTGCCTAC	-----CTTT	383
T. pacificus (Tpa-1)	360	A--CTT	---T.	T-----C.A	401
T. turkestanii (Ttu-1)	367	G..G--TT.ACA	-----A	410
T. urticae G (Tu-g-113)	364	G..G--TT.ACA	-----A	407
T. urticae R (Tu-r-28)	364	G..G--TT.ACA	A-----A	407
T. kanzawai (Tk-16)	363	G..G--TT.A.A	-----A	406
T. truncatus (Ttr-1)	365	G--TT.ACC	T-----A	408
T. piercei (Tpi-4)	367	G--TT.ACAC	T-----TACACTCT	415
T. phaselus (Tph-2)	361	G--TT.A.A	T-----A.ACTAT	409
T. neocaledonicus (Tn-1)	358	A--CTT.AC.TC	-----T.C.A	403
T. merganser (Tme-2)	367	A--CAT.AC.TC	-----A.G	411
T. ludeni (Tlu-1)	352--C	TT--AAGT-----A	392
T. evansi (Te-1)	348	G--TT--AA.T-----A.CG	389
T. macfarlanei (Tma-2)	389	GC--ATGC	T...GC	TAC	T-----T...ACTA	437
T. okinawanus (To-2)	453	A.A.TT...TC	TATTTATTTAT..ATTTA	512
		<i>MboII</i>	<i>DraI</i>				
T. lambi (Tla-1)	384	-CTTAGT--GAAGACAA	CTATGGTTTGGTATGCAACTGT	-----ATACAATTGTTTC			432
T. pacificus (Tpa-1)	402	-----A	TT--T.A	...C-----G			444
T. turkestanii (Ttu-1)	411	-----A	TT--A	...C-----TC			455
T. urticae G (Tu-g-113)	408	-----A	TT--A	...C-----TC			452
T. urticae R (Tu-r-28)	408	-----A	TT--A	...C-----TC			452
T. kanzawai (Tk-16)	407	-----A	TT--A	...C-----T			450
T. truncatus (Ttr-1)	409	-----A	TT--A	...CA-----C			452
T. piercei (Tpi-4)	416	TTAC...--A	T--A	...C-----T			462
T. phaselus (Tph-2)	410	T.AC...--A	T--A	...C-----T			456
T. neocaledonicus (Tn-1)	404	-----A	TT--T.A	...C-----T			446
T. merganser (Tme-2)	412	TAAC...--A	TT--T.A	...C-----T			458
T. ludeni (Tlu-1)	393	T...--A	T--A	...C-----T			438
T. evansi (Te-1)	390	T...--A	T--A	...C-----T			435
T. macfarlanei (Tma-2)	438	CAAA...GTA	T--T.A	...C-----CT			488
T. okinawanus (To-2)	513	TTAA...GTT	A.T.A	...CTTGAT.A.A			571
		<i>DraI</i>					
T. lambi (Tla-1)	433	--AAC-CCTCTCATTGCAGATTTAGGATACTTATAAAAAGTCCCACGGTGGCAAAGATAC					489
T. pacificus (Tpa-1)	445	-----A					501
T. turkestanii (Ttu-1)	456	A-.-.-.-A.A.T					512
T. urticae G (Tu-g-113)	453	A-.-.-.-A					510
T. urticae R (Tu-r-28)	453	A-.-.-.-A					510
T. kanzawai (Tk-16)	451	-----A					507
T. truncatus (Ttr-1)	453	-----A					509
T. piercei (Tpi-4)	463	-----A					519
T. phaselus (Tph-2)	457	-----AA					513
T. neocaledonicus (Tn-1)	447	-----A					503
T. merganser (Tme-2)	459	-----AC					515
T. ludeni (Tlu-1)	439	--C-.-.-A.A					495
T. evansi (Te-1)	436	-----A.A					492
T. macfarlanei (Tma-2)	489	TT..A..A					548
T. okinawanus (To-2)	572	CAT.AC.T	...AA				631
		<i>MboII</i>	5.8S	<i>MboII</i>	5.8S		
T. lambi (Tla-1)	490	ATCTTCAAGCGGTGGATCACTCGAATTACCAATCGATGAAGAACGCTAGCTAGCTACGATA					549
T. pacificus (Tpa-1)	502					561
T. turkestanii (Ttu-1)	513					572
T. urticae G (Tu-g-113)	511					570
T. urticae R (Tu-r-28)	511					570
T. kanzawai (Tk-16)	508					567
T. truncatus (Ttr-1)	510					569
T. piercei (Tpi-4)	520					579
T. phaselus (Tph-2)	514					573
T. neocaledonicus (Tn-1)	504					563
T. merganser (Tme-2)	516					575
T. ludeni (Tlu-1)	496					555
T. evansi (Te-1)	493					552
T. macfarlanei (Tma-2)	549					608
T. okinawanus (To-2)	632					691

付図 1. 続き

		5.8S→		
T. lambi (Tla-1)	550	ATCGGTGCGAATTGCAGGACACGCCGAGCACTTGAGCTTCCAACGCACATTGCGGCTTTC	609	
T. pacificus (Tpa-1)	562T.....	621	
T. turkestanian (Ttu-1)	573	632	
T. urticae G (Tu-g-113)	571	630	
T. urticae R (Tu-r-28)	571	630	
T. kanzawai (Tk-16)	568	627	
T. truncatus (Ttr-1)	570	629	
T. piercei (Tpi-4)	580T.....	639	
T. phaselus (Tph-2)	574	633	
T. neocaledonicus (Tn-1)	564T.....	623	
T. merganser (Tme-2)	576T.....	635	
T. ludeni (Tlu-1)	556T.....	615	
T. evansi (Te-1)	553T.....	612	
T. macfarlanei (Tma-2)	609	668	
T. okinawanus (To-2)	692	751	
↓				
T. lambi (Tla-1)	610	GGGTCTTTTCCGAGGTCACATCTGTCTGAGAGTTGAGATGTAAAATAATCAACAAACAA	669	
T. pacificus (Tpa-1)	622C	681	
T. turkestanian (Ttu-1)	633C	692	
T. urticae G (Tu-g-113)	631C	690	
T. urticae R (Tu-r-28)	631C	690	
T. kanzawai (Tk-16)	628C	687	
T. truncatus (Ttr-1)	630C	689	
T. piercei (Tpi-4)	640C	699	
T. phaselus (Tph-2)	634C	693	
T. neocaledonicus (Tn-1)	624C	683	
T. merganser (Tme-2)	636C	695	
T. ludeni (Tlu-1)	616C	675	
T. evansi (Te-1)	613C	672	
T. macfarlanei (Tma-2)	669T.C	728	
T. okinawanus (To-2)	752C	811	
↓				
T. lambi (Tla-1)	670	TTGCA-----TACTACC---ATATATGCATTGTTTTGAGATTCTGTTTAT---	712	
T. pacificus (Tpa-1)	682	...T-----TTC.....GAT..CA...TTA	727	
T. turkestanian (Ttu-1)	693GGAT...A...TTA	738	
T. urticae G (Tu-g-113)	691GGAT...A...TTA	736	
T. urticae R (Tu-r-28)	691GGAT...A...TTA	736	
T. kanzawai (Tk-16)	688GGAT...A...TTA	733	
T. truncatus (Ttr-1)	690GGAT...CA...TTA	735	
T. piercei (Tpi-4)	700GAT...A...TTA	745	
T. phaselus (Tph-2)	694	...T-----GGAT...CA...TTA	739	
T. neocaledonicus (Tn-1)	684	...T-----TC...CG.G--A	725	
T. merganser (Tme-2)	696TC.....GAT...A...ACC	741	
T. ludeni (Tlu-1)	676	...T-----GAT...A.GCATA	721	
T. evansi (Te-1)	673GAT...GC..ATA	718	
T. macfarlanei (Tma-2)	729	...T-----T---C...CCAG.A...GCAGT...TTG.GA.TC---	770	
T. okinawanus (To-2)	812	...T.AAACTTGTAA..T...TTAT.G.C....G.....A.AA..A.TCATA	871	
↓				
T. lambi (Tla-1)	713	-----ACATGAATCTTGATGTTTTATTCTTTCTTAACT-----TGCACTC	754	
T. pacificus (Tpa-1)	728	T-----ATG.....C-----ACT	772	
T. turkestanian (Ttu-1)	739	T-----ATG.....T-----A.T	782	
T. urticae G (Tu-g-113)	737	T-----ATG.....T-----A.T	780	
T. urticae R (Tu-r-28)	737	T-----ATG.....T-----A.T	780	
T. kanzawai (Tk-16)	734	T-----AT.....T-----A.T	777	
T. truncatus (Ttr-1)	736	T-----ATG.....T-----A.T	779	
T. piercei (Tpi-4)	746	T-----ATG.....T-----A.T	789	
T. phaselus (Tph-2)	740	T-----ATG.....C.....T-----AAT	783	
T. neocaledonicus (Tn-1)	726	T-----G.T.....T-----AT	767	
T. merganser (Tme-2)	742	T---ACGTATAT..G.C.....G.T-----A...T	791	
T. ludeni (Tlu-1)	722	-----AT.....T-----TAT	764	
T. evansi (Te-1)	719	TTTATATATGTAT.....G.T-----TAT	772	
T. macfarlanei (Tma-2)	771	-----GT.....GGGTT...TTGT	817	
T. okinawanus (To-2)	872	C-----AT.....T...A.....T.G-----A.TT.T	917	

付図 1. 続き

		ITS2→	<i>Rsa</i> I	<i>Hinf</i> I				
T. lambi (Tla-1)	755	CCAG-----TGCTATGTTTAGTAAGGA	GAAATC	TCAAATCTACCTGT-TTCACA-TAATA-	806			
T. pacificus (Tpa-1)	773	TGT-----AG.			823			
T. turkestanii (Ttu-1)	783	.GT-----GCAA.			831			
T. urticae G (Tu-g-113)	781	.GT-----GCAA.			829			
T. urticae R (Tu-r-28)	781	.GT-----GCAA.			829			
T. kanzawai (Tk-16)	778	.GT-----GCAA.			826			
T. truncatus (Ttr-1)	780	.GT-----GCAA.			828			
T. piercei (Tpi-4)	790	.GT-----GCA.			838			
T. phaselus (Tph-2)	784	TAT-----T-GC.T.			833			
T. neocaledonicus (Tn-1)	768	TTTC-----TGCA.			819			
T. merganser (Tme-2)	792	.TT.TA---TACAA.C.			845			
T. ludeni (Tlu-1)	765	.TT-----GCA.			813			
T. evansi (Te-1)	773	.TT-----GCAA.			821			
T. macfarlanei (Tma-2)	818	TACCAAGAACT.CCA.			875			
T. okinawanus (To-2)	918	TGTTCAATTGTAC.AC.			976			
		<i>Rsa</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Rsa</i> I				
T. lambi (Tla-1)	807	-CATCTTGTCTTTAA-AGCGTATTTTCATCTCTGCAAACAGTATATATGA--ATAGATACT			862			
T. pacificus (Tpa-1)	824	-A..T...AC..-T..T.....-T.....			879			
T. turkestanii (Ttu-1)	832	-A..T...AC..-T..A.....T.....			887			
T. urticae G (Tu-g-113)	830	-A..T...AC..-T..A.....G.....			885			
T. urticae R (Tu-r-28)	830	-A..T...AC..-T..A.....G.....			885			
T. kanzawai (Tk-16)	827	-A..T...AC..-T..A.....G.....			882			
T. truncatus (Ttr-1)	829	-A..T...AC..-T..A.....G.....			884			
T. piercei (Tpi-4)	839	-A..T...AC..AT..A.....G.....			895			
T. phaselus (Tph-2)	834	-A..T...AC..AT..A.....G.....			890			
T. neocaledonicus (Tn-1)	820	-AG.T...C..-T..A.....T.....			875			
T. merganser (Tme-2)	846	-A..T...AC..-T..A.....-T.....			901			
T. ludeni (Tlu-1)	814	-A..T...AC..-T..A.....G..G..			869			
T. evansi (Te-1)	822	-A..T...AC..-T..A.....-T.....			877			
T. macfarlanei (Tma-2)	876	-A..T...AC..-T..A.....G.....			931			
T. okinawanus (To-2)	977	TG..T...C..-A.....CTGT.A.AC.G...CT.TA.....			1035			
		<i>Hinf</i> I						
T. lambi (Tla-1)	863	AGCATGAGATTTTAAAGGTTAGTCGCCTATCTGACGACGCTAAAGTCGTATTGCGATAAT			922			
T. pacificus (Tpa-1)	880G..C.....A.....C			939			
T. turkestanii (Ttu-1)	888C.....C			947			
T. urticae G (Tu-g-113)	886C.....C			945			
T. urticae R (Tu-r-28)	886C.....C			945			
T. kanzawai (Tk-16)	883C.....C			942			
T. truncatus (Ttr-1)	885C.....C			944			
T. piercei (Tpi-4)	896C.....A.....C			955			
T. phaselus (Tph-2)	891C.....A.....C			950			
T. neocaledonicus (Tn-1)	876C.....C			935			
T. merganser (Tme-2)	902C.....C			961			
T. ludeni (Tlu-1)	870C.....C			929			
T. evansi (Te-1)	878C.....A.....C			937			
T. macfarlanei (Tma-2)	932C.T.....TC.....A.....C			991			
T. okinawanus (To-2)	1036C.....A.....C			1095			
		<i>Rsa</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Mbo</i> II	<i>Dra</i> I	<i>Hinf</i> I	ITS2→
T. lambi (Tla-1)	923	TATGGTGTACG-ACCTAACCT-ACTCTGGTATGAGTTATCCATGCATTGTATGATTTTA						980
T. pacificus (Tpa-1)	940	A.....AT.T-C.....-G..AAAT..A.CC.AC...C.....GT.AA--					993	
T. turkestanii (Ttu-1)	948AT.A--.....-GT.AACTG..A.CT..-T..C.....AA--					1000	
T. urticae G (Tu-g-113)	946AT.A--.....-GT.AACTG..A.CT..-T..C.....AA--					998	
T. urticae R (Tu-r-28)	946AT.A--.....-GT.AACTG..A.CT..-T..C.....AA--					998	
T. kanzawai (Tk-16)	943AT.A--.....-GT.AAATG..A.CT..-T..C.....AA--					995	
T. truncatus (Ttr-1)	945AT.A--.....-G..AAATA..A.CT.A-T..C.....AAG--					997	
T. piercei (Tpi-4)	956AT.A--.....G..-G..AAAA..A.C..AT..C.....TGAC--					1010	
T. phaselus (Tph-2)	951AT.A--.....G..-GTATAATG..A.C..AT..C.....TGAA--					1004	
T. neocaledonicus (Tn-1)	936AT.A--G.....-T...AT.GA..T.C.A...C...G...A.AC					992	
T. merganser (Tme-2)	962A..A--.....-AAAAGTA..A.C..ATC..C.....TTAAA--					1016	
T. ludeni (Tlu-1)	930ATAA--.....-GT.TATTG..A.CT..-T..C.....G...GA--					983	
T. evansi (Te-1)	938AT.A--.....-T.AAATG..A.CT..AT..C.....G...AA--					991	
T. macfarlanei (Tma-2)	992	C.....ATAA--G.....-GT..AAA..A..A.C..T...C.....C.A--					1046	
T. okinawanus (To-2)	1096ACTAT.....TG..TAAT..A..A..T.TTG...C.....A					1155	

付図 1. 続き

	ITS2→	<i>HinfI</i>	<i>RsaI</i>	<i>RsaI</i>	
T. lambi (Tla-1)	981	T-----ATACATACAAAATGGTATCTA-----TATCATTGTGTTTT--GAGCAGAGTT-			1025
T. pacificus (Tpa-1)	994	-----A.....A.....T.....CTG...--AA.....CC.-			1033
T. turkestanii (Ttu-1)	1001	-----A...G.....T.T...CTG...--AA.....CC.-			1040
T. urticae G (Tu-g-113)	999	-----G.....A...G.....T.....CTG...--AA.....CC.-			1038
T. urticae R (Tu-r-28)	999	-----G.....A...G.....T...KCTG...--AA.....CC.-			1038
T. kanzawai (Tk-16)	996	-----A.....A...G.....T.....CTG...--AA.....CC.-			1035
T. truncatus (Ttr-1)	998	-----A.....A...G.....T.....CTG...--AA.....CC.-			1037
T. piercei (Tpi-4)	1011	-----A.....A.....T.....CTG...--AA.....CC.-			1050
T. phaselus (Tph-2)	1005	-----A.....C.....T.....CTG...--AA.....CC.-			1044
T. neocaledonicus (Tn-1)	993	-----T.....A.....T.....CTG...--GA.....CC.-			1038
T. merganser (Tme-2)	1017	-----A.....TA.....T.....CTG...--AA.....A.CC.-			1056
T. ludeni (Tlu-1)	984	-----ATC.....A.....T.....CTG...--AA.....CC.-			1023
T. evansi (Te-1)	992	-----ACC.....A...T.....T.....CTG...--AA.....CC.-			1031
T. macfarlanei (Tma-2)	1047	-----T.....A.....AT.....CTG.C.TGA.....T			1093
T. okinawanus (To-2)	1156	.TTTGT.A.....A...CTATA.T.....CTG...--A.....C.-			1213
T. lambi (Tla-1)	1026	---AAGAA-ATATTGCTG	<i>RsaI</i> GTAC	<i>HinfI</i> CAAGATTTTGTGATA-----ACACAAGGGTAGATTTTT	1075
T. pacificus (Tpa-1)	1034	---G.....AAT.GG...A.....CA-----GTT.AA.....AC			1082
T. turkestanii (Ttu-1)	1041	---G...A...AAA-GG...A.....CA-----TTT.AA.....AC			1089
T. urticae G (Tu-g-113)	1039	---G...A...AAA-GG...A.....CA-----TT.AA.....AC			1087
T. urticae R (Tu-r-28)	1039	---G...A...AAA-GG...A.....CA-----TT.AA.....AC			1087
T. kanzawai (Tk-16)	1036	---G...A...AAA-GG...A.....TA-----GTT.AA.....AC			1084
T. truncatus (Ttr-1)	1038	---G...A...AAA-GG...A.....CA-----GTT.AA.....AC			1086
T. piercei (Tpi-4)	1051	---AG.....AAA.GG...A.....CA-----TT.AA.....AC			1101
T. phaselus (Tph-2)	1045	---G.....AAA.GG...A.....CA-----TT.AA.....AC			1094
T. neocaledonicus (Tn-1)	1039	---G...C.....A.....A.....CA-----T.TAA.....AC			1088
T. merganser (Tme-2)	1057	---G.....A.AA...A.....CA-----GT.TAA.....AC			1106
T. ludeni (Tlu-1)	1024	---G...TATA.GT.C.A.A.G...CA-----TT.AA.....AA			1073
T. evansi (Te-1)	1032	---G...AAA...C.A.A.....TA-----TT.AA.....AC			1080
T. macfarlanei (Tma-2)	1094	AAC.AG.G...AAA...T.A.....T.....G.TAA.....AC			1147
T. okinawanus (To-2)	1214	AAA...T.TTGC...TGAA.GAATCA...CAA.A.C.CATAAC.T.A.AA.....A			1273
T. lambi (Tla-1)	1076	---GTTGCTTTGCTTTT-----GTGCAAACAACCTCCA-ATATACAAC-T			1114
T. pacificus (Tpa-1)	1083	-----T.....AA.....TTAA			1118
T. turkestanii (Ttu-1)	1090	-----T.....A.A.....TTAA			1124
T. urticae G (Tu-g-113)	1088	-----T.....A.A.....TTAA			1122
T. urticae R (Tu-r-28)	1088	-----T.....A.A.....TTAA			1122
T. kanzawai (Tk-16)	1085	-----T.....A.A.....TTAA			1119
T. truncatus (Ttr-1)	1087	-----T.....A.A.....TTAA			1121
T. piercei (Tpi-4)	1102	-----T.....A.....TTAA			1136
T. phaselus (Tph-2)	1095	-----T.....A.....TTAA			1129
T. neocaledonicus (Tn-1)	1089	-----A.....T.....A.....TTAA			1121
T. merganser (Tme-2)	1107	-----T.....T.....A.....TTAA			1139
T. ludeni (Tlu-1)	1074	-----T.....AA.....AT...TT...A.....TTAA			1113
T. evansi (Te-1)	1081	-----AAC...A.....AT...TT...AA.....TTAA			1121
T. macfarlanei (Tma-2)	1148	A--T...A.....CA.C.AAT.C.....TTAA			1182
T. okinawanus (To-2)	1274	TGTT...C...T.G..CCTAACCACACACAAA.AT.....AGACA...AC..CATA			1333
T. lambi (Tla-1)	1115	CCAAC-----TTA-ATCAATATTTTT	<i>HinfI</i> GATCTCAGATCAGGTGAGGGTA		1156
T. pacificus (Tpa-1)	1119	T.....T.....			1160
T. turkestanii (Ttu-1)	1125	T.....T.....			1166
T. urticae G (Tu-g-113)	1123	T.....T.....			1164
T. urticae R (Tu-r-28)	1123	T.....T.....			1164
T. kanzawai (Tk-16)	1120	T.....T.....			1161
T. truncatus (Ttr-1)	1122	T.....T.....			1163
T. piercei (Tpi-4)	1137	T.....T.....			1178
T. phaselus (Tph-2)	1130	T.....T.....			1171
T. neocaledonicus (Tn-1)	1122	T.....T.....			1163
T. merganser (Tme-2)	1140	T.....T.....			1181
T. ludeni (Tlu-1)	1114	T.....AA...T.....T.....			1154
T. evansi (Te-1)	1122	T.....A.....T.....			1162
T. macfarlanei (Tma-2)	1183	T.....TT.....T.....			1225
T. okinawanus (To-2)	1334	T...AATCAAC..A.....			1382

付図 1. 続き