

## 名古屋市産バッタ類のDNAバーコーディングと集団遺伝解析

小汐 晃平<sup>(1)</sup> 横山 悠理<sup>(2)</sup> 戸田 尚希<sup>(3)</sup> 熊澤 慶伯<sup>(1)(2)</sup>

<sup>(1)</sup> 名古屋市立大学総合生命理学部 〒467-8501 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町山の畑1

<sup>(2)</sup> 名古屋市立大学大学院理学研究科生物多様性研究センター 〒467-8501 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町山の畑1

<sup>(3)</sup> なごや生物多様性保全活動協議会 〒468-0066 愛知県名古屋市天白区元八事五丁目230番地

### DNA barcoding and population genetic analyses of grasshoppers in Nagoya, Central Japan

Kohei KOSHIO<sup>(1)</sup> Yuri YOKOYAMA<sup>(2)</sup> Naoki TODA<sup>(3)</sup> Yoshinori KUMAZAWA<sup>(1)(2)</sup>

<sup>(1)</sup> School of Biology and Integrated Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan

<sup>(2)</sup> Research Center for Biological Diversity, Graduate School of Science, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan

<sup>(3)</sup> Nagoya Biodiversity Conservation Activity Council, 230 Motoyagoto 5-chome, Tempaku-ku, Nagoya, Aichi 468-0066, Japan

Correspondence:

Yoshinori KUMAZAWA E-mail: kuma@nsc.nagoya-cu.ac.jp

#### 要旨

名古屋市内より得られた9種のバッタ類合計260個体について、ミトコンドリアDNAにコードされるシトクロムオキシダーゼサブユニットI遺伝子の部分塩基配列を決定した。これらの塩基配列は、標本の画像や採取地などの関連情報とともにBarcode of Life Data Systemsデータベースに、プロジェクト名DNA Barcoding of Grasshoppers in Nagoya, Central Japan (DBGN)として登録し、DNAバーコードデータベースを作成した。これら9種のバッタ類に関して、形態的特徴から同定された種と塩基配列から推定される種の範囲が一致し、DNAバーコーディングによりこれらの種を識別できることを確認した。データベース上に登録がある他地域産の個体との配列比較を行ったところ、日本産の個体と東アジア産（主に中国・韓国）の個体との間に、大きな遺伝距離が見られないことが分かった。すなわちこれらのバッタ類の地域固有性は低く、日本とユーラシア大陸東部の間で過去に頻繁に遺伝子流動があったことを示唆した。名古屋市産のマダラバッタとイボバッタにおける遺伝的多様性が比較的高いことが示された一方で、名古屋市産のヒナバッタ、トノサマバッタ、クルマバッタの遺伝的多様性は非常に低いことが分かった。

A part of the mitochondrial DNA-encoded cytochrome oxidase subunit I gene was sequenced for 260 individuals of nine grasshopper species from Nagoya City, Central Japan. The determined nucleotide sequences, together with images of body specimens and relevant information on sampling locality, were registered to the Barcode of Life Data Systems under a project name, DNA Barcoding

受付日：2022年10月14日

受理日：2023年1月18日

of Grasshoppers in Nagoya, Central Japan (DBGN). Morphologically identified species and molecularly inferred species boundary were consistent, which confirmed the applicability of the DNA barcoding for these nine taxa. When compared with homologous gene sequences already registered to public databases with locality information, there was little genetic distance between individuals from Japan and from non-Japanese East Asia (China and Korea). It thus seems that these grasshopper species do not have high endemism in Japan presumably due to frequent gene flow between Japan and Eastern Eurasia in the past. Population genetic analyses revealed that *Aiolopus thalassinus* and *Trilophidia japonica* in Nagoya had relatively high genetic diversity while *Chorthippus biguttulus*, *Locusta migratoria*, and *Gastrimargus marmoratus* in Nagoya may have considerably decreased level of genetic diversity.

## 序文

バッタ類とは、広義には、跳躍するための後脚を持つ有翅の直翅類の通称である。食性は草食性で、植物が生育する場所であれば生息が可能であり、熱帯林や砂漠、高山地帯など様々な地域に生息している (Song et al., 2018)。昆虫綱バッタ目には世界で約1万5千種が知られるが、これらはバッタ亜目とキリギリス亜目に分けられている (日本直翅類学会, 2016)。バッタ亜目にはバッタ上科、クビナガバッタ上科、ヒシバッタ上科、ノミバッタ上科が含まれ、キリギリス亜目にはコオロギ上科、カマドウマ上科、コロギス上科、キリギリス上科などが属している。バッタ上科は世界で5科1364属6766種が知られる大きなグループであり、温帯、暖帯、熱帯にかけて広く分布する (日本直翅類学会, 2016)。その中でもバッタ科とオンブバッタ科には、日本全体でそれぞれ69種と2種が報告されており、市街地などに多く生息するいわゆる普通種も多く含まれている (日本直翅類学会, 2016)。しかし、バッタ上科に属する種の進化や生態は、農業害虫であるサバクトビバッタなど一部の種を除き (田中ほか, 2021)、詳しく解明されていない。また、生物多様性の3要素の一つである遺伝的多様性に関する研究例は世界的に見ても少ない。

DNAバーコーディングは、数百塩基対のDNA塩基配列 (DNAバーコード) における種特異性に基づき、生物標本の簡便な種同定を行うための技術である (Hebert et al., 2003; 熊澤, 2022)。動物のDNAバーコーディングには、ミトコンドリアDNAにコードされるシトクロムオキシダーゼサブユニットI (COI) 遺伝子の一部 (約

650塩基対) が標準DNAバーコード領域として用いられている (Hebert et al., 2003; 熊澤, 2022)。分類学的研究が比較的好く進んでいる様々な欧米産動物群を用いて、DNAバーコード領域における塩基配列を比較したところ、2%以下の配列相違度 (遺伝距離) を示す個体同士は同種に属し、2%以上の遺伝距離を示す個体同士は別種に属することが概ね経験的に知られている (Ratnasingham and Hebert, 2013)。この経験則に基づいて、Barcode of Life Data Systems (BOLD) データベース上では、DNA塩基配列に基づいて認識された種単位にBarcode Index Number (BIN) を与えている。このBIN情報を形態的特徴に基づいて同定された学名と対比させることで、隠蔽種などの存在可能性を検証することもできる (熊澤, 2022)。

バッタ上科に属する種についてDNAバーコーディングを行なった研究は比較的少ない。DNAバーコーディングによって海外産種における種同定が可能であることを示した報告はあるが (例えばHawlotschek et al., 2017; Kundu et al., 2020)、筆者が知る限り、トノサマバッタなど一部の種を除き (Tokuda et al., 2010)、日本産種のDNAバーコード塩基配列もほとんど報告されていない。そこで本研究では、なごや生物多様性保全活動協議会が主催した、なごや生きもの一斉調査2020バッタ編 (水野・戸田, 2021) において採集された個体を用いて、バッタ科・オンブバッタ科の9種を対象種としてDNAバーコーディングと集団遺伝解析を行った。DNAバーコーディングによって、日本産種の個体の中に隠蔽種などが存在する可能性を調べるとともに、海外産の同

種あるいは近縁種との遺伝的関係について考察を試みた。また、一部の種について集団遺伝解析を行うことで、遺伝的多様性に関する指標を求め、名古屋市内の個体群の保全に向けた洞察も試みた。

### 材料および方法

本研究で用いたバッタ類の標本の多くは、2020年10月2日から4日にかけて実施されたなごや生きもの一斉調査2020バッタ編 (水野・戸田, 2021) の際に、多数の市民と専門調査員によって名古屋市内の41地点から採集されたものである。一部の標本については、2021年9月29日に小幡緑地における独自の追加調査を行い採取したものも含まれる。全採集地点を図1に示す。バッタ類の野外サンプリングは、草むらを網で掃くように不特定の昆虫を採集するスウィーピング法、あるいは目視したバッタを網で直接捕獲する方法により行われた。採集された標本は、著者の戸田と水野利彦氏によって形態情報に基

づき種同定され、個体ごとに採集された地域や雌雄の別が記録されている。追加調査で得られた標本については、著者の小汐によって種同定が行われた。これらの採集個体の一部は、本研究を行うために、なごや生物多様性保全活動協議会から名古屋市立大学理学研究科附属標本庫に寄贈され、99.5%エタノール液浸標本として4℃で冷蔵保存されている。DNAバーコーディングには各種から5個体以上を、集団遺伝解析には各種から20個体以上 (可能ならば30-50個体) を目安に、各地点からランダムにピックアップして用いた。ただし、十分な個体数を本研究のために利用できなかった種については、この基準以下の個体数で研究を行った。

採取された各サンプルの脚部の一部を用いて、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) による全DNAの抽出を行った。その抽出DNAと表1に記したプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行い、DNAバーコード領域の増幅を行なった。増幅はまず標

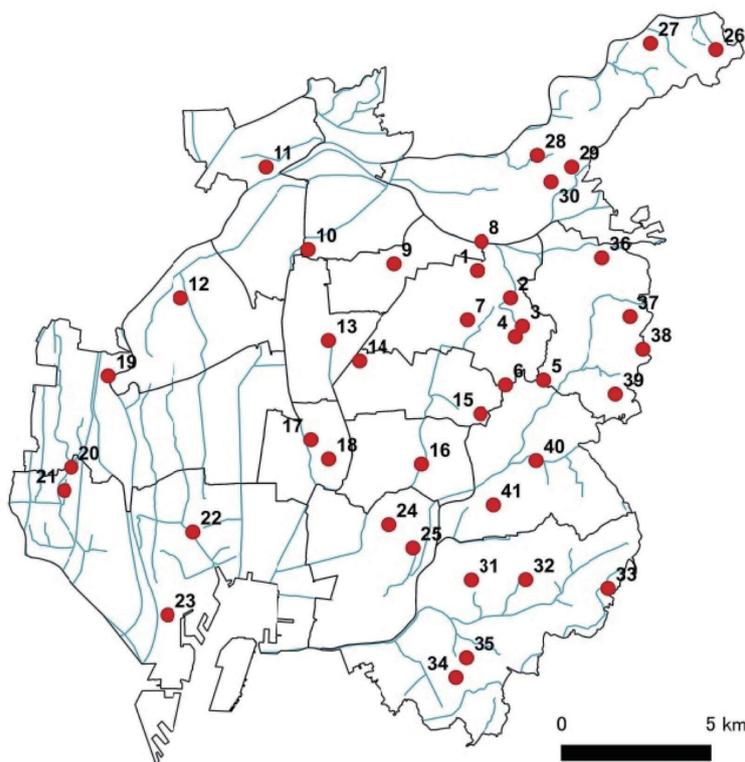


図1. バッタ類サンプルの名古屋市内の採集地点。実線は名古屋市の区境界を、薄線は河川を示す。丸の位置とその番号は採集地点を示し、本論文の表2および水野・戸田 (2021) の表1に対応する。水野・戸田 (2021) の図3より転載

Figure 1. Localities for sampling grasshoppers in Nagoya. Solid and thin lines show ward boundaries and river systems, respectively. Dots with a number indicate sampling localities that correspond to Table 2 in the present study and Table 1 in Mizuno and Toda (2021). Reproduced from Figure 3 in Mizuno and Toda (2021).

準的なプライマーセット (LCO1490/HCO2198) を用いて行った. この組み合わせで増幅できなかったイボバッタの個体はeTyr-1L/HCO2198, クルマバッタモドキの個体はeCOI-1L/eCOI-1H, クルマバッタの個体はLCO1490/eCOI-1Hを用いて増幅した. PCRは, Gflex DNA polymerase (タカラバイオ) とThermal Cycler TP600/650 (タカラバイオ) を用いて, 25  $\mu$ lの液量で行った. タカラバイオが提供する標準的な反応液組成で, 94°C 1分の反応後に, 98°C 10秒, 50°C 15秒, 68°C 60秒のサイクルを35回行った. 一部の個体については, 増幅産物がミトコンドリアDNAに由来するかどうかをより注意深く検証するため, 表1に記したLong PCR用のプライマーとGflex DNA polymerase (タカラバイオ) を用いて, COI遺伝子をまたいだミトコンドリアDNAの約5 kbpの領域を増幅し, 1%アガロースゲル電気泳動により回収した増幅産物を鋳型としたDNAバーコード領域のPCR増幅をさらに行なった.

DNAバーコード領域に対応したPCR産物の生成を1%アガロースゲル電気泳動によって確認した後, ExoSAP-IT試薬 (Affymetrix) によって処理したPCR反応液を用いて, サイクルシーケンシング反応を行った. この反応にはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

(Life Technologies) を用い, 反応産物を3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) に展開して, 塩基配列の解読を行った. 両方向から読んだ塩基配列をSequencher 4.8 (Gene Codes) を用いてアセンブルすることで, 塩基配列をサンプルごとに確定した.

合計260個体について, DNAバーコード領域の塩基配列を決定し, 日本直翅類学会 (2016) などに基づき同定された学名・標本採集地・採集日などの付帯情報, 標本全体の写真画像, 名古屋市立大学理学研究科附属標本庫 (SDNCU) の標本登録番号, DNAシーケンサーで分析されたときのエレクトロフェログラムデータ (ベースコールに用いた波形データ) などを, BOLDデータベース上に, DNA Barcoding of Grasshoppers in Nagoya, Central Japan (DBGN) のプロジェクト名で登録し, DNAバーコードデータベースを作成した. また, 決定した塩基配列をInternational Nucleotide Sequence Database (INSD) に, アクセッション番号OQ213928-OQ214187で登録した. DNAバーコード領域の塩基配列における遺伝距離の算出は, BOLDデータベースのBarcode Gap Analysisを参照して行った. 距離モデルにはKimura's 2-parameter modelを, アラインメントオプションにはMUSCLEを, ギャップサイトの取扱いには

表1. 本研究で用いたプライマー  
Table 1. Primers used in this study

名称 Name	塩基配列 (5'→3') Sequence (5'→3')	方向 Direction	出典 Reference
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Forward	Folmer et al., 1994
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Reverse	Folmer et al., 1994
eTyr-1L	ATCGCCTAAACTCAGCATCTTACT	Forward	Oba et al., 2015
eCOI-1L	AAATGATTATTTTCAAVAAACCATAAA	Forward	Oba et al., 2015
eCOI-1H	ACAATGTGAGAGATTATTCCAAATCC	Reverse	Oba et al., 2015
F_ibo_1 <sup>1</sup>	GCATGAGCCGGAATAGTAGG	Forward	本研究
F_ibo_2 <sup>1</sup>	GGAGCTGGTACAGGATGAAC	Forward	本研究
R_ibo_1 <sup>1</sup>	GTAATTGCTCCTGCTAATACGG	Reverse	本研究
R_ibo_2 <sup>1</sup>	GAAACACCTGCTAAATGTAATG	Reverse	本研究
Fbattal <sup>2</sup>	TTAAGCTAATGGGTTTCATACC	Forward	本研究
Fbatta3 <sup>2</sup>	TAGATTTACARTCTAWCACCTA	Forward	本研究
Rbattal <sup>2</sup>	TTAGTTGATGGATCAAATGTTG	Reverse	本研究
Rbatta3 <sup>2</sup>	ACAAAATGTCAATATCATGCTG	Reverse	本研究

<sup>1</sup> イボバッタ特異的なDNAバーコード領域の内部プライマー

<sup>2</sup> COI遺伝子をまたいだ約5 kbpをLong PCRで増幅するためのプライマー

<sup>1</sup> Internal primers within the DNA barcode region specific to *Trilophidia japonica*

<sup>2</sup> Primers designed to amplify a ~5kbp region that span COI gene by long PCR

Pairwise Deletionのオプションを採用した。

分子系統解析は最尤法を用い、MEGA X (Kumar et al., 2018) を使って行った。距離モデルにはKimura's 2-parameter modelを、ギャップサイトの取扱いにはall use sitesのオプションを、サイト間の分子進化速度の違いを表すモデルにはGamma+Invariantモデル (Gamma補正は5 カテゴリー) を使用した。また、あわせて1000回のリサンプリングによるブートストラップ解析を行い、各内部枝が出現する確率をブートストラップ確率として求めた。バッタ上科の中でバッタ科およびオンブバッタ科の外群に位置することが過去の系統解析 (Zhang et al., 2013; Song et al. 2020) で示唆されているEpisactidae科の*Pielomastax zhengi*を外群に用いた。集団遺伝解析はDnaSP version 6.12.03 (Rozas et al., 2017) を用いて行った。MEGA X で使用したDNA塩基配列をDnaSPで読み込み、塩基多様度、ハプロタイプ多様度、Tajima's  $D$ 、Fu's  $F_s$  などを算出した。ネットワーク解析では、MEGA X のClustalWによってアライメントし、TCS (Clement et al., 2000) 及びtcsBU (Santos

et al., 2016) によりハプロタイプネットワーク図を作成した。

## 結果と考察

### 名古屋市産バッタ類のDNAバーコーディング

なごや生きもの一斉調査2020バッタ編では名古屋市内の41地点で計9種、840個体が採集された (水野・戸田, 2021)。また、2021年9月29日に小幡緑地にて行った調査では計6種41サンプルを採集した。これらのサンプルは、名古屋市から出現記録 (新修名古屋市史資料編編集委員会, 2008) のあるイナゴ亜科以外のバッタ科7種とオンブバッタ科1種を全て網羅し、この文献でまだリストアップされていなかったマダラバッタも含んでいる。本研究では生きもの一斉調査から8種245サンプル、小幡緑地にて行った調査から2種15サンプル、計9種260サンプルを使用した。その詳細は図1と表2に示した。

これらの標本を用いて、DNAバーコード領域の塩基配列を決定した。イボバッタ、ヒナバッタ以外の7種の塩基配列は両方向からのシーケンシングに基づいて正確

表2. DNA解析に用いたサンプルの概要  
Table 2. Samples used for molecular analyses

科 Family	亜科 Subfamily	和名 Japanese Name	学名 Scientific Name	個体数 Number of Individuals	採集地点番号 (複数個体数) Locality Number (Multiple Numbers of Individuals)	BIN番号* BIN*
オンブバッタ科	オンブバッタ亜科	オンブバッタ	<i>Atractomorpha lata</i>	31	9, 10, 11, 12, 13, 15, 22(22), 28, 34, 36	ACB4294
バッタ科	ショウリヨウバッタ亜科	ショウリヨウバッタ	<i>Acrida cinerea</i>	40	10, 11(17), 14, 17, 20, 22(4), 23(11), 28, 35, 36, 40	AAJ1691
		ショウリヨウバッタモドキ	<i>Gonista bicolor</i>	35	5(15), 6, 11, 14, 28, 32(3), 34(2), 35(4), 36(3), 37, 40(3)	ADC3068
	ヒナバッタ亜科	ヒナバッタ	<i>Chorthippus biguttulus</i>	13	8(12), 16	AAC5779
	トノサマバッタ亜科	トノサマバッタ	<i>Locusta migratoria</i>	21	8(5), 19(4), 20, 21, 28(7), 33(3)	AAD9526
		クルマバッタ	<i>Gastrimargus marmoratus</i>	6	28(6)	ADR8227
		クルマバッタモドキ	<i>Oedaleus infernalis</i>	25	3, 8(2), 26(13), 28, 32, 33(5), 40	AAK3012
	イボバッタ	<i>Trilophidia japonica</i>	40	9, 10(9), 11, 15(9), 17, 22(10), 24, 30, 34, 38, 39(5)	ACD8502	
マダラバッタ	<i>Aiolopus thalassinus</i>	49	8, 10, 11, 16, 19, 23(21), 28(10), 34, 38, 40(11)	AAM2556		

\*BIN番号の先頭に付けられた共通表記 (BOLD:) を省略して記す  
\*A common part (BOLD:) that starts for BIN numbers is omitted

に読み取られており、未確定塩基 (N) は一つも含まれなかった。ヒナバッタでは、LCO1490/HCO2198を用いると、2個体の6塩基サイトに混合塩基が確認され (データ未記載)、ヘテロプラズミー (同一個体に塩基配列が異なる複数のミトコンドリアDNAが共存すること) あるいはコンタミネーションが疑われた。そこで、eCOI-1L/eCOI-1Hを用いて再度PCRとシーケンシングを行ったところ、混合塩基は認められなくなった。イボバッタ40個体から得られた塩基配列には、14サイトで混合塩基が存在した (データ未記載)。そのため、すでに決定した塩基配列を参考に、DNAバーコード領域の内部プライマーを4つ設計して (表1)、PCRとシーケンシングを行ったところ、混合塩基は見られなくなった。以上より、LCO1490/HCO2198を用いてヒナバッタ2個体とイボバッタ40個体から得られた混合塩基は、何らかのコンタミネーションが原因と考えられたため、データとして採用しなかった。

ミトコンドリア DNAの一部に相当するDNA断片が、

核DNA中に挿入されたものをNuclear mitochondrial DNA segments (NUMTs) と呼ぶ。DNAバーコーディングにおいてミトコンドリアDNAに由来するDNA断片ではなく、NUMTs由来のDNA断片が増幅・シーケンスされる危険が指摘されており (Gaziev and Shaikhaev, 2010; Kang et al., 2016), 直翅類におけるNUMTsの先行研究も存在する (Song et al. 2008; Moulton et al. 2010)。この点をさらに慎重に検討するために、本研究で用いたバッタ類2科9種のそれぞれ1個体ずつについて、約5 kbpのミトコンドリアDNA領域をLong PCRで増幅し、その増幅産物から出発したDNAバーコード領域の増幅・シーケンシングを行った。その結果、Long PCRを経由しない場合と同一の塩基配列が得られた。核ゲノムの中に挿入されたミトコンドリアDNA断片は基本的に機能を持たないため、いわゆる偽遺伝子の状態となり、進化の過程で容易に変異を受け、短縮され核ゲノム上から欠落すると考えられている。従って、約5 kbpのLong PCR産物がNUMTs由来であることは考えづら

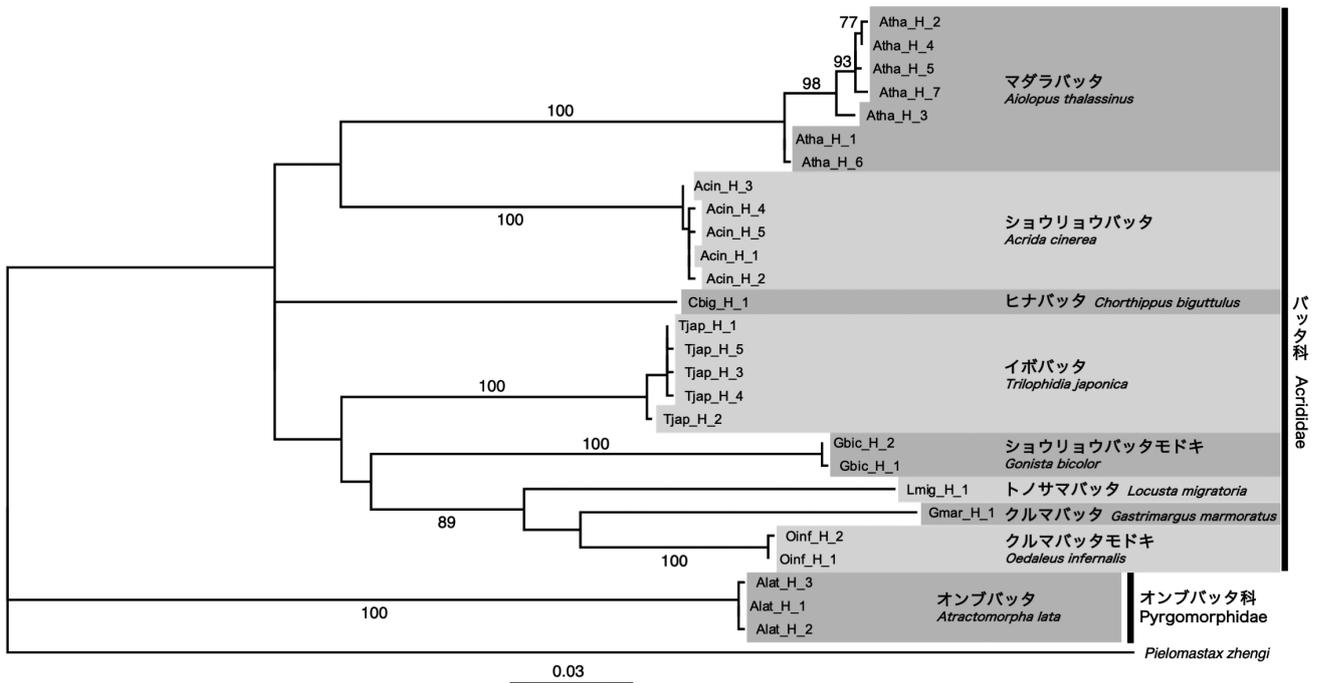


図2. 名古屋市産バッタ類の最尤系統樹。DNAバーコード領域の塩基配列 (658サイト) において同一のハプロタイプを持つものをまとめて解析し、タクソン名には該当するハプロタイプ名を記した。外群には、*Pielomastax zhengi* (INSDアクセッション番号 JF411955) を使用し、各内部枝上には1000回の試行から求められたブートストラップ確率 (70%以上のもの) を示した。

Figure 2. A maximum-likelihood tree of grasshoppers in Nagoya. Each taxon represents a haplotype in the DNA barcode region (658 bp) from each species. *Pielomastax zhengi* (INSD accession No. JF411955) was used as an outgroup. Bootstrap probabilities from 1000 replications (only for values of 70% or higher) are shown on the corresponding branches.

く、本研究で得られたDNAバーコード領域の塩基配列はNUMTs由来のものではないと判断した。決定した塩基配列をアミノ酸配列に翻訳しても、ストップコドンや翻訳フレームシフトなど偽遺伝子化を疑わせるような証拠は見つからなかった。この点もNUMTsの可能性に対して否定的な証拠であった。

本研究でBOLDデータベース上に作成したDBGN名のプロジェクトは、9種と種数が少ないとはいえ、筆者が知る限り、日本産バッタ類のDNAバーコードデータベースとしては初となると思われる。実際、9種のうち、トノサマバッタ、クルマバッタモドキ、マダラバッタを除く6種については、日本産とはっきり分かる個体のDNAバーコード塩基配列がBOLDやINSDなどの公共データベースに登録されておらず、本研究でそれを初めて提供したことになる。トノサマバッタは国内各地の個体についてDNAバーコードの登録があるものの、クルマバッタモドキは茨城県産の1個体、マダラバッタは宮古島産の1個体について登録されているのみであり (Tokuda et al., 2010)、本研究は国産バッタ類のDNAバーコード情報を大きく拡大する意義を持つ。

これら日本産バッタ類9種に属する個体のDNAバーコードには、BOLDデータベース上でそれぞれ単一のBIN番号が与えられた (表2)。このことは、形態的証拠に基づいて同定された9種の種境界が、DNAデータに基づき推定された種境界と一致することを意味する。すなわち、これら9種の日本産個体には、将来的に複数

種に分けられたり、単一の種にまとめられる可能性のある分類群の存在が示唆されなかった。実際、分子系統樹を作成すると、これらの種に属する複数のハプロタイプはそれぞれ単系統群を形成し、それを支持するブートストラップ確率も高かった (図2)。この系統樹では、バッタ科8種とオンブバッタ科1種が分かれるところは分類学的情報と一致したが、トノサマバッタ亜科の5種が単系統群を形成しなかった。ただし、バッタ科内の種間関係におけるブートストラップ確率は概して低くなっており、約650塩基対という短い塩基配列に基づく系統解析には解像度の限界があると思われる。過去の様々なDNA情報に基づくバッタ類の分子系統解析においても (Liu et al., 2008; Zhang et al., 2013; Song et al., 2018, 2020; Igor et al., 2020)、バッタ科の亜科や種の類縁関係に関して、必ずしも一致した見解が得られていない。

BOLDデータベースを用いたバーコードギャップ解析による遺伝距離の解析を行ったところ (表3)、ヒナバッタ、トノサマバッタ、クルマバッタは、それぞれの種内で全個体の塩基配列が同一であった。オンブバッタ、ショウリヨウバッタ、ショウリヨウバッタモドキ、クルマバッタモドキ、イボバッタについても、種内の最大遺伝距離が2%以下 (イボバッタの0.87%が最も高い値) であった。一方マダラバッタでは、種内の平均遺伝距離は0.69%であったが、最大遺伝距離は2.17%となり、2%を超えていた。この結果は、マダラバッタに単一のBINが与えられたこと (表2) と一見矛盾するよう見える

表3. バーコードギャップ解析による種内の遺伝距離  
Table 3. Intra-species genetic distances by the barcode gap analysis

和名 Japanese Name	学名 Scientific Name	平均遺伝距離 (%) Average Genetic Distance (%)	最大遺伝距離 (%) Maximum Genetic Distance (%)
オンブバッタ	<i>Atractomorpha lata</i>	0.04	0.30
ショウリヨウバッタ	<i>Acrida cinerea</i>	0.03	0.30
ショウリヨウバッタモドキ	<i>Gonista bicolor</i>	0.06	0.15
ヒナバッタ	<i>Chorthippus biguttulus</i>	0.00	0.00
トノサマバッタ	<i>Locusta migratoria</i>	0.00	0.00
クルマバッタ	<i>Gastrimargus marmoratus</i>	0.00	0.00
クルマバッタモドキ	<i>Oedaleus infernalis</i>	0.05	0.15
イボバッタ	<i>Trilophidia japonica</i>	0.24	0.87
マダラバッタ	<i>Aiolopus thalassinus</i>	0.69	2.17

が、BINの認識は2%の遺伝距離という閾値に単純に基づくわけではなく、系統解析やクラスター解析の結果等も考慮に入れて行われている (Ratnasingham and Hebert, 2013). 一方、系統解析の結果 (図2) から明らかなように、名古屋市産の9種のバッタ類に関する限り、種間の遺伝距離は種内の遺伝距離を大幅に上回っている。これらの結果は、名古屋市産マダラバッタの個体群内に、遺伝的に少し離れた系統が含まれている可能性が高いものの、これら9種の種同定をDNAバーコーディングによって問題なく行えることを示した。

### ハプロタイプネットワーク解析

本研究では、名古屋市産のマダラバッタから7個のハプロタイプ、ショウリヨウバッタとイボバッタからはそれぞれ5個のハプロタイプ、オンブバッタからは3個のハプロタイプ、ショウリヨウバッタモドキとクルマバッタモドキからは2個のハプロタイプが得られた。一方、ヒナバッタ、トノサマバッタ、クルマバッタからは単一のハプロタイプが得られた (表4)。これらのハプロタイプに、BOLDまたはINSDデータベースに産地情報付きで登録されている他地域産個体のハプロタイプを加えて、ハプロタイプネットワーク図を作成した (図3)。ただし、ショウリヨウバッタモドキ (BINはBOLD:ADC3068) とクルマバッタ (BOLD:ADR8227) では、上記データベース上で参照可能なデータを加えても、数個のハプロタイプしか得られなかったため、ネットワーク図を作成しなかった。

オンブバッタ (BOLD:ACB4294) では、名古屋市産の個体の多くがハプロタイプH\_1を持っていたが、H\_1には東アジア産 (韓国) の2個体も含まれていた (図3A)。名古屋市産の個体の一部は、H\_1と1塩基異なる別のハプロタイプ (H\_2, H\_3) を持っていたが、名古屋市産と韓国産の個体は遺伝的に近いことが示された。一方、地理的に隔たった南アジア産 (バングラデシュ) の1個体とは遺伝的に大きな隔たりがあった。

ショウリヨウバッタ (BOLD:AAJ1691) では、名古屋市産個体が占める主要ハプロタイプH\_1 (配列アライン時のギャップ除去後に同一配列となったH\_5を含む) および近縁ハプロタイプH\_2, H\_3, H\_4が、東アジア産 (韓国) 個体のハプロタイプ (H\_36) と遺伝

的に近いことが示された (図3B)。南アジア産 (パキスタン)、東南アジア産 (マレーシア)、東アジア産 (日本および韓国) のハプロタイプは、明確に3つのグループに分かれたが、これらは全て同一のBINに属しており、同一種であることが示唆された。しかし、日本産及び韓国産の個体の学名は *Acrida cinerea*、マレーシアとパキスタン産の個体の学名は *Acrida willemsei* で登録されており、これらが同一のBINに属し同種ならば、両種は異名であるということになる。名古屋市産の主要ハプロタイプH\_1は、マレーシア産の主要ハプロタイプH\_6およびパキスタン産の主要ハプロタイプH\_15とそれぞれ8塩基異なっており、3つの地域間で明確な遺伝的分化が見られる。これらの中で種分化が進行中と考えられ、分類学上は少なくとも亜種の関係にあると認識すべきかもしれない。

ヒナバッタ (BOLD:AAC5779) では、名古屋市産の個体は全てハプロタイプH\_1を持っていた (図3C)。公共データベースに1個体だけ登録がある中国産の個体はハプロタイプH\_77を持っており、ネットワーク図全体の中ではH\_1と比較的に近い位置にあった。一方、欧州産と南アジア (パキスタン) 産の個体は非常に多様なハプロタイプに分かれており、互いにハプロタイプを共有している部分もあり、地理的なまとまりが明確に見られなかった。また、南アジア産の個体の学名は未同定であったのに対し、欧州産の個体は様々な学名 (*Chorthippus biguttulus* に加え、*Chorthippus binotatus*, *Chorthippus brunneus*, *Chorthippus mollis*, *Gomphocerippus rufus* など) で登録されていた。これらの種はヒナバッタ種群と呼ばれることもあり、欧州に分布の中心を持ちながら分布域を広くアジアまで広げており、広域に分布する個体に対して様々な学名が与えられ系統分類に混乱が見られる (Mason et al., 1995; Hawlitschek et al., 2022)。日本産を含む東アジア産個体群と欧州産個体群との遺伝的關係や分類学的位置づけについては、さらにデータを蓄積して慎重に判断する必要があるだろう。

トノサマバッタ (BOLD:AAD9526) では、本研究でシーケンスした名古屋市産の個体は全てハプロタイプH\_1を持っていた (図3D)。H\_1には日本の他地域産 (本州・北海道などが主体) の個体も含まれており、

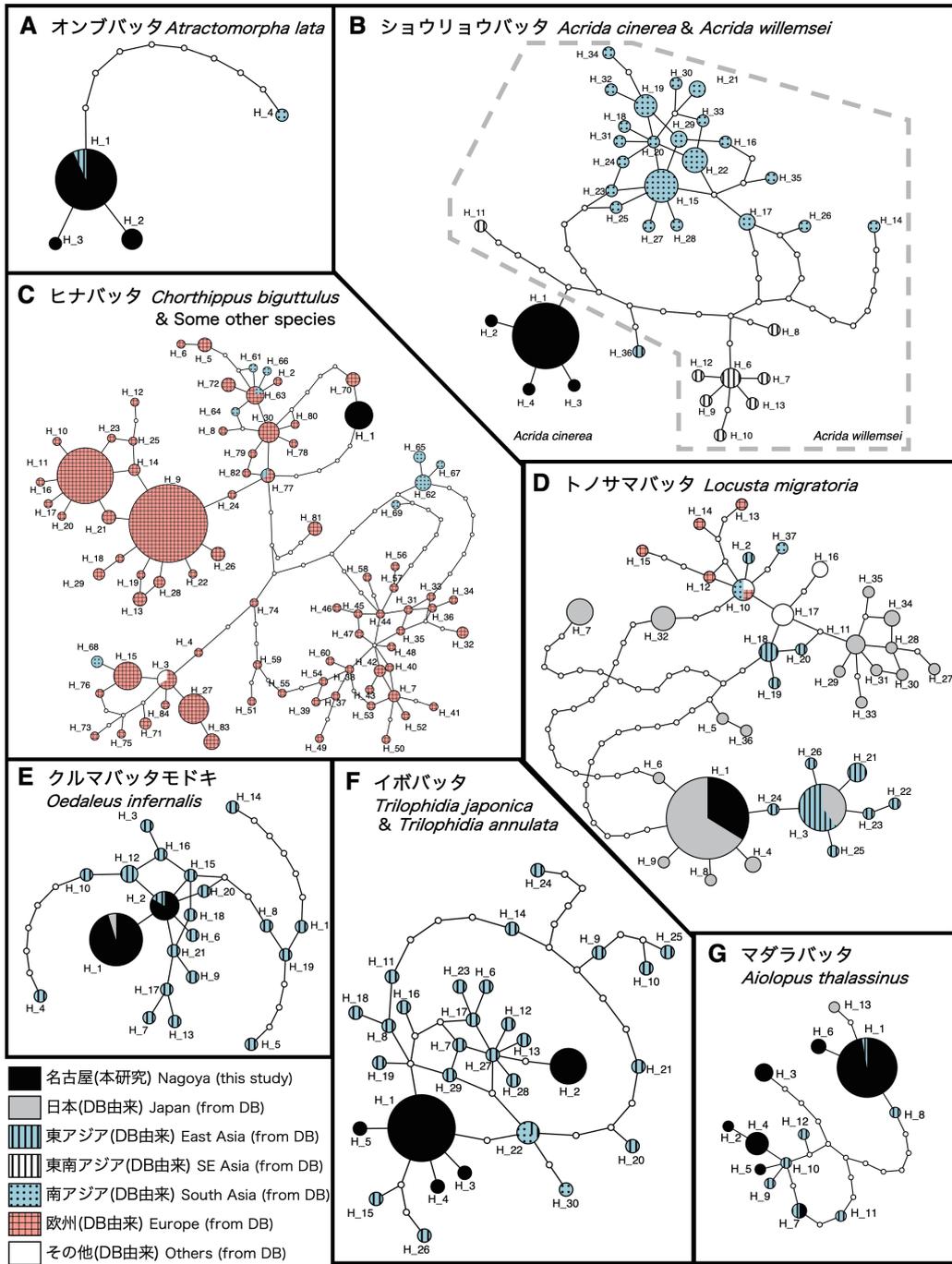


図3. 7種のバッタ類におけるハプロタイプネットワーク図。各ハプロタイプはハプロタイプ番号とともに円で示す。円の大きさはハプロタイプの相対頻度を、各ハプロタイプをつなぐ線上の一区切りは1塩基置換を表す。判例の名古屋(本研究)は本研究でシーケンスした名古屋市産の個体を示し、それ以外はBOLDまたはINSIDデータベース(DB)由来の産地情報付きの個体を表す: 日本(DB由来)は日本国内のサンプル, 東アジア(DB由来)は東アジア(中国・韓国)産のサンプル, 東南アジア(DB由来)は東南アジア(マレーシア)産のサンプル, 南アジア(DB由来)は南アジア(パキスタン・インド・バングラデシュ)産のサンプル, 欧州(DB由来)は欧州(スペイン・ドイツ・フランス・ポーランドなど)産のサンプル, その他(DB由来)はその他(カナダ・オーストラリア・エチオピア)のサンプル。

Figure 3. Haplotype networks for seven grasshopper species. Each haplotype is shown with a circle and a haplotype number. The size of circle stands for relative frequency of the haplotype and a small open circle connecting haplotypes represents one base substitution.

H\_1は東アジア(中国の河南, 山東, 天津, 遼寧)産個体が持つハプロタイプH\_3及びH\_21~26と近縁であった。しかし, これらのハプロタイプ群と大きく隔たった位置に別のハプロタイプ群が認められ, その中には日本(南西諸島が主体: H\_11, H\_27~34), 中国(海南島: H\_18~20, 中国国内の産地不明: H\_2), 欧州(フランス: H\_10, H\_12~15), 南アジア(パキスタン: H\_10, H\_37), その他(エチオピア: H\_10, オーストラリア: H\_16~17)に由来するハプロタイプが含まれていた。この結果は, トノサマバッタの日本産個体群が大きく2つのクレードに分かれることを示したTokuda et al. (2010)の結論と矛盾しない。ただし, BOLDデータベース上では, これら全てのハプロタイプに対して同一のBINが与えられており, 現時点では単一種*Locusta migratoria*に属することが示唆される。また, どちらのハプロタイプ群においても, 日本産個体と中国産個体のハプロタイプは遺伝的に近い関係にあった。従って比較的最近まで日本を含めた東アジア内で遺伝的交流があったか, 最近大陸から日本に個体が流入したと考えられる。

クルマバッタモドキ(BOLD:AAK3012)では, 名古屋市産の個体はハプロタイプH\_1またはH\_2を持っていた(図3E)。H\_2には東アジア産(中国)の個体も一部含まれており, 中国産の他のハプロタイプ(H\_3~20)とも比較的近い関係にあることが示された。イボバッタ(BOLD:ACD8502)では, 名古屋市産の個体は主要ハプロタイプ(H\_1)を持つものが最も多かったが, H\_1と1塩基違いのハプロタイプ(H\_3~5)あるいは6塩基違いのハプロタイプ(H\_2)を持つものも見られた(図3F)。これらのハプロタイプと東アジア産(中国: H\_6~29), 南アジア産(インド: H\_22, H\_30)の個体が持つハプロタイプは遺伝的に近い関係にあった。なお, これら海外産の個体には全て*Trilophidia annulata*の学名が与えられており, 逆にBOLDデータベース上で*T. annulata*の学名をもつ塩基配列は, BOLD:AAP6105とBOLD:ACD8502の2つのBINに分かれていた。後者と日本産の*Trilophidia japonica*は同一種である可能性が高い。

マダラバッタ(BOLD:AAM2556)では, 名古屋市産の個体は7つのハプロタイプ(H\_1~7)を持っていたが, H\_1, H\_6とそれ以外のハプロタイプは, 多数

(少なくとも11塩基)の置換で隔たっていることが示された(図3G)。名古屋市産マダラバッタにおいて, 種内の最大遺伝距離が比較的大きかった(表3)背景には, このようなハプロタイプの分布状況があると考察できる。しかし, 東アジア産(中国)の個体が持つハプロタイプも, これらの7つのハプロタイプと共有されるかあるいは近縁であり, 名古屋市産と中国産の個体が遺伝的に近い関係にあることを示した。ただし, BOLDデータベース上で*Aiolopus thalassinus*の学名をもつ塩基配列は4つのBINに分かれており, BOLD:AAM2556以外の3つのBINには, それぞれオーストラリア, 欧州, アフリカ・パキスタン等の異なる地域に産する個体の塩基配列が属している。これらは将来的に別種として認識される可能性がある。

#### 遺伝的多様性と保全への展望

名古屋市産バッタ類の集団遺伝解析の結果を表4に示す。ハプロタイプ多様度については, マダラバッタ, イボバッタ, ショウリョウバッタモドキの順に大きな値を取った。塩基多様度はマダラバッタが突出して高く, イボバッタがそれに続いた。一方, ハプロタイプ数が1であるヒナバッタ, トノサマバッタ, クルマバッタを含め, ハプロタイプ数が複数あるオンブバッタ, ショウリョウバッタ, ショウリョウバッタモドキ, クルマバッタモドキの塩基多様度は比較的低い値を示した(表4)。一方, Tajima's  $D$ とFu's  $F_s$ の値はオンブバッタ, ショウリョウバッタ, イボバッタはともに負値に, ショウリョウバッタモドキ, クルマバッタモドキはともに正値となった。マダラバッタのTajima's  $D$ は負値に, Fu's  $F_s$ は正値となったが, 絶対値は共に0に近い小さな値であった。ヒナバッタ, トノサマバッタ, クルマバッタに関しては, ハプロタイプ数が1つであったため, 計算ができなかった。これらのTajima's  $D$ とFu's  $F_s$ の値では, ショウリョウバッタの値のみが, 有意に0と異なることが示された(表4)。

オンブバッタでは, Tajima's  $D$ , Fu's  $F_s$ はともに負値となり(表4), 名古屋市産個体は韓国産個体とハプロタイプを共有していた(図3)。これらのことから, 東アジア地域より流入した後, 集団が拡大傾向にあると考えられる(Grant and Bowen, 1998)。オンブバッタは

小規模の草地や花壇、家庭菜園などでも生息できるため (水野・戸田, 2021), 名古屋市に生息に適した場所が多く存在することが推察される. なごや生きもの一斉調査2020バッタ編で採集された840個体のうち, オンブバッタは最も多くの個体数 (249個体) を占めた (水野・戸田, 2021). また, 最も多くの調査地点 (41地点中の34地点) で生息が確認された. 以上より, 名古屋市のオンブバッタの絶滅危険度は比較的低いと考えられる. ショウリョウバッタでも, Tajima's  $D$ , Fu's  $F_S$ はともに負値となり (表4), 集団は拡大傾向にあると考えられる. ショウリョウバッタの生息地は公園の中の日当たりがよく, 人があまり踏み込まない草地で, 膝丈くらいまでイネ科植物が成長している環境に生息するため (水野・戸田, 2021), 名古屋市に多くの生息に適した環境が残っていると考えられる. 一斉調査で比較的多くの個体数 (133個体) と生息地点数 (26地点) が確認されたことも踏まえ, 名古屋市のショウリョウバッタの絶滅危険度は比較的低いと考えられる. ショウリョウバッタモドキでは, Tajima's  $D$ , Fu's  $F_S$ はともに正值となり, 統計的に有意な結論ではないが, 集団が減少傾向にあることが示唆された (表4). ショウリョウバッタモドキの生息地はスキなどの丈の高いイネ科植物がやや密に茂った環境であるが (水野・戸田, 2021), 名古屋市では都市開発が進んでいる影響で, 生息に適した環境が減少していると考えられる. 一斉調査で採集された個体数 (44個体) と

確認された生息地点数 (11地点) があまり多くなかったこととあわせると, 本種の個体群動態に今後注意を払っていく必要があると考えられる.

ヒナバッタでは, 単一のハプロタイプのみしか確認されなかったことから, 遺伝的多様性は非常に低いと考えられる. この原因の一つとして, ヒナバッタの生息環境は低木林や藪との境目にある草原であるが (水野・戸田, 2021), 都市化の進んだ名古屋市においては, このような環境は減少している可能性がある. 生息環境の劣化に伴い個体数が減少し, 遺伝的多様性が減少した可能性が考えられる. トノサマバッタでも単一のハプロタイプしか認められなかったが, 本種は名古屋圏で最大級のバッタであるため, 多くの餌を必要とする. 草丈が膝くらいで草が密に生える広い草地が生息に適した環境であると考えられるが (水野・戸田, 2021), 開発等の影響でそうした環境は名古屋市で減少しており, 名古屋市産トノサマバッタにおける遺伝的多様性の低下と関係している可能性がある. クルマバッタも単一のハプロタイプを示したが, 本種の生息地は周囲を樹林に囲まれた日当たりの良く, 草丈が10 cmくらいの乾いたシバ草地 (半自然草原とも呼ばれる) である (水野・戸田, 2021). 名古屋市にも半自然草原に近い環境はあり, 以前は守山区東谷山や平和公園で生息が確認されていたが (水野・戸田, 2021), 草原の管理や利用により, 環境変化に敏感なクルマバッタは生息域を減らしてしまったと考えられる.

表4. COI遺伝子塩基配列に基づく名古屋市産バッタ類の遺伝的多様性  
Table 4. Genetic diversity of grasshoppers in Nagoya based on COI gene sequences

和名 Japanese Name	個体数 Number of Individuals	ハプロタイプ数 Number of Haplotypes	ハプロタイプ多様度 Haplotype Diversity	塩基多様度 ( $\times 10^3$ ) Nucleotide Diversity ( $\times 10^3$ )	Tajima' $D$ Tajima' $D$	Fu's $F_S$ Fu's $F_S$
オンブバッタ	31	3	0.239	0.37	-1.04	-0.75
ショウリョウバッタ	40	5	0.192	0.30	-1.88*	-3.23*
ショウリョウバッタモドキ	35	2	0.420	0.64	1.08	0.58
ヒナバッタ	13	1	0.000	0.00	—	—
トノサマバッタ	21	1	0.000	0.00	—	—
クルマバッタ	6	1	0.000	0.00	—	—
クルマバッタモドキ	25	2	0.323	0.49	0.38	0.61
イボバッタ	40	5	0.444	1.74	-0.52	-1.28
マダラバッタ	49	7	0.452	6.36	-0.09	0.13

\*は有意性テスト ( $p < 0.05$ ) で0からの有意な差がみられたことを示す  
An asterisk (\*) indicates significant ( $p < 0.05$ ) deviation from zero

現在名古屋市では小幡緑地しか生息が確認されておらず、遺伝的多様性も低く近交弱性などの影響を受けやすくなっており、個体群の存続が非常に難しい状態と言える。実際、一斉調査では、ヒナバッタ、トノサマバッタ、クルマバッタはそれぞれ20個体、39個体、1個体しか採集されておらず、確認された生息地数もそれぞれ5地点、10地点、1地点と少数であった(水野・戸田, 2021)。これらの種が名古屋市内で絶滅する危険度は比較的高いと考えられる。

クルマバッタモドキでは、統計的に有意ではないが、Tajima's  $D$ 、Fu's  $F_S$ ともに集団が減少傾向にあることを示唆した。クルマバッタモドキはトノサマバッタに比べると草丈が低く草の生育密度の低い環境でも生息が可能である(水野・戸田, 2021)。名古屋市に公園が造られ、植物群落の遷移が進行することで生息に適した環境が増えれば、遺伝的多様性を増加させられるものと期待される。イボバッタでは、Tajima's  $D$ とFu's  $F_S$ が負で個体数が増加傾向にあると考えられることに加え、遺伝的多様性を示す指標が比較的高かった(表4)。イボバッタは僅かに草が生える裸地という環境で生育できるため(水野・戸田, 2021)、名古屋市にも多くの生息環境があると思われ、本種の絶滅危険度はそれほど高くないと考えられる。マダラバッタでは、Tajima's  $D$ 、Fu's  $F_S$ はともに0に近い値となっており(表4)、個体群の拡大・縮小に関する傾向は示されなかった。一方で、本種は踏み固められた土が露出し草本類が疎らに生える環境を好むため、そういった生息環境が増加しつつある名古屋圏で、個体数が増加しつつあるのではないかと考察もされている(水野・戸田, 2021)。名古屋市産マダラバッタの遺伝的多様性が、9種の中で最も高かったことを踏まえれば(表4)、本種の絶滅危険度はそれほど高くないと判断できる。実際、一斉調査でイボバッタとマダラバッタは比較的多くの個体数(それぞれ101個体と208個体)が採集され、生息が確認された地点数も比較的多い(ともに26地点)ことが示されている(水野・戸田, 2021)。

本研究では名古屋市内のバッタ類のDNAバーコーディングと遺伝的多様性を中心に研究を行った。日本国内のバッタ類においてこのような試みは過去にほとんどなく、今後の生物保全に関する指標の一助になると思わ

れる。本研究での結果が名古屋市内での生物多様性を守る手がかりの一つになることを期待したい。今後は、名古屋圏以外にも調査地点を拡大し、さらに系統学的・遺伝学的研究を実施することが望まれる。

## 謝辞

バッタ類のサンプル採集では、なごや生きもの一斉調査2020バッタ編を主催したなごや生物多様性保全活動協議会、一斉調査に参加された大勢のリーダー・サブリーダー・一般市民の皆様から広くご協力を頂戴した。とりわけ、水野利彦氏(名和昆虫博物館)には、一斉調査の企画からバッタ類標本の種同定に至るまで多大なご貢献及びご指導を頂いた。また、一斉調査の企画・実施を担ったワーキンググループのメンバーである石原則義氏、なごや生物多様性センターの西部めぐみ氏、曾根啓子氏、星克巳氏、戸崎智文氏には様々なご尽力を頂いた。一斉調査で採集されたサンプルの一部は、なごや生物多様性保全活動協議会のご厚意により、本研究のためにご提供頂いた。野外採集の許可は、なごや生物多様性センターを通じて取得して頂いた。これらご協力頂いた機関および個人に心より感謝申し上げます。本研究は、名古屋市立大学特別研究奨励費(No. 2030008およびNo. 2121201)による助成のもと、名古屋市立大学共用機器センターのDNAシーケンサー(3500 Genetic Analyzer)を用いて行われた。

## 引用文献

- Clement, M., D. Posada, and K.A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1659.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
- Gaziev, A.I., and G.O. Shaikhaev. 2010. Nuclear mitochondrial pseudogenes. *Molecular Biology*, 44: 358-368.
- Grant, W.S., and B.W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine

- fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89: 415-426.
- Hawlitschek, O., J. Morinière, G.U.C. Lehmann, A.W. Lehmann, M. Kropf, A. Dunz, F. Glaw, M. Detcharoen, S. Schmidt, A. Hausmann, N.U. Szucsich, S.A. Caetano-Wyler, and G. Haszprunar. 2017. DNA barcoding of crickets, katydids and grasshoppers (Orthoptera) from Central Europe with focus on Austria, Germany and Switzerland. *Molecular Ecology Resources*, 17: 1037-1053.
- Hawlitschek, O., E.M. Ortiz, S. Noori, K.C. Webster, M. Husemann, and R.J. Pereira. 2022. Transcriptomic data reveals nuclear-mitochondrial discordance in Gomphocerinae grasshoppers (Insecta: Orthoptera: Acrididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 170: 107439.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Igor, C.A., S.M. Adriana, F.S. Alexandre, L.W. Gabriel, and C.M. Rita. 2020. Characterization of the mitogenome of *Rhammatocerus brasiliensis* and phylogenetic analysis of the family Acrididae (Orthoptera). *Gene*, 731: 144362.
- Kang A.R., M.J. Kim, I.A. Park, K.Y. Kim, and I. Kim. 2016. Extent and divergence of heteroplasmy of the DNA barcoding region in *Anapodisma miramae* (Orthoptera: Acrididae). *Mitochondrial DNA Part A, DNA mapping, sequencing and analysis*, 27: 3405-3414.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547-1549.
- 熊澤慶伯. 2022. DNAバーコーディング. 小澤岳昌ほか (編) 先端の分析法 第2版. NTS. 東京. pp. 521-525.
- Kundu, S., H. Kumar, K. Tyagi, K. Chandra, and V. Kumar. 2020. DNA barcoding of selected short-horned grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) from Indian Himalayan region. *Mitochondrial DNA Part B Resources*, 5: 3600-3605.
- Liu, D.-F., Z.-M. Dong, D.-Y. Zhang, Y.-Z. Gu, P.-J. Guo, R.-H. Han, and G.-F. Jiang. 2008. Molecular phylogeny of the higher category of Acrididae (Orthoptera: Acridoidea). *Zoological Research*, 29: 585-591.
- Mason, D.J., R.K. Butlin, and P. Gacesa. 1995. An unusual mitochondrial DNA polymorphism in the *Chorthippus biguttulus* species group (Orthoptera: Acrididae). *Molecular Ecology*, 4: 121-126.
- 水野利彦・戸田尚希. 2021. なごや生きもの一斉調査2020 バッタ編 調査結果報告書. なごや生物多様性保全活動協議会, 名古屋. 23pp.
- Moulton, M.J., H. Song, and M.F. Whiting. 2010. Assessing the effects of primer specificity on eliminating numt coamplification in DNA barcoding: a case study from Orthoptera (Arthropoda: Insecta). *Molecular Ecology Resources*, 10: 615-627.
- 日本直翅類学会. 2016. 日本産直翅類標準図鑑. 学研プラス, 東京. 384pp.
- Oba, Y., H. Ôhira, Y. Murase, A. Moriyama, and Y. Kumazawa. 2015. DNA Barcoding of Japanese click beetles (Coleoptera, Elateridae). *PLoS ONE*, 10: e0124857.
- Ratnasingham, S. and P.D.N. Hebert. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PLoS ONE*, 8: e66213.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J.C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins, and A. Sánchez-Gracia. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34: 3299-3302.
- Santos, A.M., M.P. Cabezas, A.I. Tavares, R. Xavier, and M. Branco. 2016. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*, 32: 627-628.
- 新修名古屋市史資料編編集委員会. 2008. 新修名古屋市史資料編自然. 名古屋市, 名古屋. 525pp.
- Song, H., J.E. Buhay, M.F. Whiting, and K.A. Crandall.

2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 13486-13491.
- Song, H., R. Mariño-Pérez, D.A. Woller, and M.M. Cigliano. 2018. Evolution, diversification, and biogeography of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Insect Systematics and Diversity*, 2: 1-25.
- Song, H., O. Bethoux, S. Shin, A. Donath, H. Letsch, S. Liu, D.D. McKenna, G. Meng, B. Misof, L. Podsiadlowski, X. Zhou, B. Wipfler, and S. Simon. 2020. Phylogenomic analysis sheds light on the evolutionary pathways towards acoustic communication in Orthoptera. *Nature Communications*, 11: 4939.
- 田中誠二・原野健一・西出雄大・菅原亮平・徳田 誠. 2021. バッタの大発生の謎と生態. 北隆館, 東京. 308pp.
- Tokuda, M., S. Tanaka, and D.-H. Zhu. 2010. Multiple origins of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) in the Japanese Archipelago and the presence of two major clades in the world: evidence from a molecular approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 570-581.
- Zhang, H.-L., Y. Huang, L.-L. Lin, X.-Y. Wang, and Z.-M. Zheng. 2013. The phylogeny of the Orthoptera (Insecta) as deduced from mitogenomic gene sequences. *Zoological Studies*, 52: 37.