

名古屋市を中心とした愛知県及び 近隣県産ゾウムシ類のDNAバーコーディング

井上 晶次⁽¹⁾⁽²⁾ 熊澤 慶伯⁽²⁾

⁽¹⁾ 名古屋昆虫同好会

⁽²⁾ 名古屋市立大学大学院システム自然科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

DNA barcoding of weevils from Aichi and neighboring prefectures centering on Nagoya City in Japan

Syoji INOUE⁽¹⁾⁽²⁾ Yoshinori KUMAZAWA⁽²⁾

⁽¹⁾ Nagoya Konchu Dokokai

⁽²⁾ Research Center for Biological Diversity, Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi, 467-8501, Japan

Correspondence:

Syoji INOUE E-mail: inouesyo@hotmail.com

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

要旨

名古屋市を中心とした愛知県や近隣県のゾウムシ類について、ミトコンドリアDNAの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用いたDNAバーコードデータベースを作成した。ゾウムシ科51属79種156個体（うち愛知県産が137個体、名古屋市産が84個体）、チョッキリゾウムシ科4属6種8個体（うち愛知県産が3個体、名古屋市産が2個体）から、合計164個体のDNAバーコードを決定し、Barcode of Life Data Systems (BOLD) データベースにCentral Japan weevils barcoding project (CJWBP) のプロジェクト名で登録した。愛知県（名古屋市）で普通に見られるゾウムシ類の種同定に有用であることに加え、ニセチビヒョウタンゾウムシやイワワキオチバゾウムシといった土壌性ゾウムシにおける隠蔽種の発見に貢献することが期待される。

Abstract

A DNA barcoding database was constructed for weevils found from Nagoya City and Aichi and surrounding prefectures in Japan. The DNA barcodes for 156 individuals from 79 species in 51 genera of Curculionidae, as well as 8 individuals from 6 species in 4 genera of Rhynchitidae were determined and registered to the Barcode of Life Data Systems (BOLD) database under the Central Japan weevils barcoding project (CJWBP). This database is expected to contribute to the species identification of common weevil species in Aichi Prefecture and Nagoya City, and the finding of cryptic species in such earthy taxa as *Myosides pyrus* and *Otibazo morimotoi*.

序文

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、分類専門家による形態的な検証なしに、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). 現在国際的なコンソーシアムによる International Barcode of Life Project (iBOL) が進められ、世界中の全ての記載種をターゲットにした生物標本とDNAバーコードの対応付け作業が進行している. その過程で経験的に分かってきた事実として、昆虫類を含む多くの動物分類群では種の境界がDNAバーコード塩基配列における2%の相違にある (Ratnasingham and Hebert, 2013). すなわち2つの標本からDNAバーコード塩基配列を取得し、それらの相違度 (分子距離) が2%以内であれば両者は同種の可能性が高く、一方2%以上であれば別種の可能性が高いと考えられる (Ratnasingham and Hebert, 2013).

このようにDNAバーコーディングは、分類学専門家の少ない分類群における標本同定支援ツールとして非常に有望であるが、残念ながら日本は国家単位でiBOLプロジェクトに参加していない. その結果として、いくつか個別のプロジェクトは進行中であるものの (Japanese Barcode of Life Initiative: <http://www.jboli.org/>, 2016年11月8日確認), 日本産動植物のDNAバーコーディングは立ち後れていると言わざるを得ない. 名古屋市立大学システム自然科学研究科では、2009年に生物多様性研究センターを設置し、東海地方に分布する動植物を中心にDNAバーコードデータベースの構築を行ってきた (例えばOba et al., 2015). 本研究は、その一環として名古屋市を中心とした愛知県及び近隣県産ゾウムシ類のDNAバーコードデータベース構築を行ったものである.

ゾウムシ類は、広義にはコウチュウ目ゾウムシ上科に属する植物食の昆虫を指す. 成虫の体長は2mmから30mm程度 (口吻を含まない) であり、長く伸びた口吻部が和名の由来となっている. この長い口吻は、植物組織に穿孔して産卵するために進化した器官であると考えられている (森本, 2006). ゾウムシ類の中には重大な農業被害をもたらす害虫も含まれている (日本応用動物昆虫学会, 2006). 標準的な分類 (森本, 2014) におい

て、ゾウムシ上科には12科が立てられているが、本研究ではこのうちのゾウムシ科とチョッキリゾウムシ科を対象とした. ゾウムシ科とチョッキリゾウムシ科には、日本全体でそれぞれ800種と64種が報告されている (小島・森本, 2004). このうち愛知県ではそれぞれ326種 (伊澤ほか, 2009) と37種 (伊澤, 2008) が、名古屋市ではそれぞれ113種と9種が知られている (新修名古屋市史資料編編集委員会, 2008). ただし、これらの報告以降も新種の記載や発見報告があり、例えば名古屋市内のゾウムシ科は現在のところ133種が認められる (井上晶次, 未発表データ).

ゾウムシ類は種数が多く、その分類にも研究者間で異なる見解がある. また、形態的に極めて似た未記載近縁種が存在することも知られている. 例えば、日本において1属1種とされていたツヤツチゾウムシ属 *Asphalmus* において、主に雄交尾器の形態を用いた分類により新たに41種が記載された (森本ほか, 2015). さらに、これまで日本において3種記載されていたツチゾウムシ属 *Trachyphilus* からは、主に雌貯精囊の形態を用いて89種が記載された (森本ほか, 2015).

DNAバーコーディングは、このような未記載近縁種あるいは隠蔽種の存在を高感度に探索・検出し、混乱しているゾウムシ類の分類研究の一助となるデータを提供すると期待される. また、DNAバーコードを用いて、現時点におけるゾウムシの種多様性を記録することは、将来の環境変化に伴う生物多様性の変遷をモニターするうえで貴重なデータを提供するものと考えられる.

材料および方法

著者の一人である井上は、1980年頃から名古屋市内を中心にゾウムシ類の採集を継続的に行ってきた (井上・井上, 2001). 本研究のDNAバーコード作成には、2010年以降に主に井上によって新たにサンプリングされた標本を用いた. 名古屋市を含む愛知県内を中心に、三重県、岐阜県、滋賀県、長野県と埼玉県でも採集を行った. 比較のために長崎県と大阪府でも採集を実施した. これらのサンプルの採集県別個体数と種数を表1に示す. サンプルは叩き網法 (ビーティング法) とツルグレン法 (ふるい出し法) により収集した. 叩き網法とは、約80cm四方の白布の四隅に袋を取り付けその袋に

十字の棒を差し込み、布を広げ植物の枝葉、あるいは枯れ木などの下に置き、上部の枝葉枯れ木をたたき、それらに潜んでいる昆虫を白布の上に落とし採集する方法である。ツルグレン法とは、落ち葉を含む腐葉土を採取してふるいの上に置き、太陽光又は電球などで乾燥させ、落下してくる昆虫類を採集する方法である。土壌性ゾウムシは後者の方法で、それ以外のゾウムシは主に前者の方法で採集した。採集したゾウムシ類は、著者の一人である井上が原記載論文等（例えばMorimoto and Miyakawa, 1995；森本ほか, 2006）を参考にして種同

定を行った後、名古屋市立大学システム自然科学研究科標本庫に、99.5% エタノール液浸標本として登録した。標本の画像は、画像計測ソフト付きマイクロスコープMJ-302 (Cosview) を用いて取得した。

DNAの抽出はAsahida et al. (1996) の方法で行った。サンプルから取り出した基節を含む脚を、高濃度の尿素とSDSを含むTNESU8バッファに入れ十分混合したのち、プロテアーゼKを加えてペッセルですりつぶし、37℃で1昼夜振とうした。その後、フェノール・クロロホルム (1:1)、クロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) で抽出し、エタノール沈殿を行った。これを乾燥後、沈殿したDNAをTEバッファに溶解して保存した。ミトコンドリアDNAのシトクロムオキシダーゼサブユニットI (CO1) 遺伝子の増幅は、標準的なプライマーセット (LCO1490/HCO2198) (Folmer et al., 1994) で行った。この組み合わせで増幅できなかった個体は、eTyr-1L/eCO1-2H, eCO1-1L/eCO1-1HまたはeTyr-1L/eCO1-1H (Oba et al., 2015) を用いて増幅した。使用したプライマーの配列と方向を表2に示す。増幅反応は、PCR Thermal Cycler Dice (タカラ) を用いて、98℃ 5秒、55℃ 15秒、72℃ 20秒 で35サイクル行った。その後アガロースゲル電気泳動を行い、UV光照射下でバンドを確認することにより、増幅の成否を判定した。シーケンシングは、BigDye Terminator, v. 3.1 Cycle Sequencing Kitと3500 Genetic Analyzer (Life technologies) を使用して、常法通り行った。両方向から読んだ塩基配列をアセンブルすることで、DNAバーコード領域の約660塩基対の塩基配列を確定した。

表1. サンプルの採集県別個体数と種数
Table 1. Numbers of individuals and species collected from each prefecture

府県名	個体数	種数
愛知県	140	74
三重県	5	4
岐阜県	7	5
滋賀県	2	1
長野県	3	2
埼玉県	1	1
長崎県	4	1
大阪府	2	1
合計	164	85
うち名古屋市	86	59

表2. 使用したプライマーの配列と方向
Table 2. The sequence and direction of primers used for amplifications

プライマー	配列 (5' 末端から 3' 末端へ)	方向	出典
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Forward	Folmer et al., 1994
HCO2198	TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Reverse	Folmer et al., 1994
eTyr-1L	ATCGCCTAAACTCAGCCATCTTACT	Forward	Oba et al., 2015
eCO1-2H	CCTAGGAGTCCAATTGCTATTATAGC	Reverse	Oba et al., 2015
eCO1-1L	AAATGATTATTTTCAAVAAACCATAAA	Forward	Oba et al., 2015
eCO1-1H	ACAATGTGAGAGATTATTCCAAATCC	Reverse	Oba et al., 2015

DNAバーコード領域の塩基配列を用いた分子距離の算出は、Barcode of Life Data Systems (BOLD) データベース (<http://www.boldsystems.org/>, 2016年8月9日確認) のBarcode Gap Analysisを参照した。距離モデルにはKimura 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Pairwise Deletionのオプションを採用した。近隣結合系統樹は、MEGA6 (Tamura et al., 2013) を用いて作成した。距離モデルにはKimura 2-parameter modelを、ギャップサイトの取扱いにはPairwise Deletionのオプションを採用した。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、各結節点でのブートストラップ確率を求めた。

結果と考察

ゾウムシ科51属79種156個体、チョッキリゾウムシ科4属6種8個体から、CO1遺伝子の部分塩基配列(658-822bp)をDNAバーコードとして決定した。これらの標本に関する画像(背側面及び左側面の2方向から)、現行の分類における学名、標本庫登録番号、採集地・採集日、DNAバーコード塩基配列などは、BOLDデータベースにCentral Japan weevils barcoding project (CJWBP) のプロジェクト名で登録されており、自由に閲覧が可能である。BOLDデータベースからは、DNA塩基配列における相違度に基づいて認識された暫定的な種番号であるBarcode Index Number (BIN; Ratnasingham and Hebert, 2013) に関する情報なども入手することができる。

本研究において、愛知県産ゾウムシ科・チョッキリゾウムシ科の20%、名古屋市産ゾウムシ科・チョッキリゾウムシ科の42%を網羅したDNAバーコードデータベースが構築できた。本研究で取り扱った種の中には、レンゲの害虫アルファルファタコゾウムシ、バラ類の害虫クロケシツブチョッキリ、イチゴハナゾウムシ、クリを含む堅果類の害虫クリシギゾウムシ、クヌギシギゾウムシ、ハイイロチョッキリ、野菜(葉菜類・ニンジン・ダイコン等)の害虫ヤサイゾウムシなどが含まれており(日本応用動物昆虫学会, 2006)、農業的な応用可能性も期待できる。DNAバーコードは、卵・幼虫・成虫などの区別なしに適用可能であるため、野外で発見した害虫

が成熟するのを待たずに正確な種名を同定し、的確な対応策を講じることが可能となるだろう。

今回取得した全てのバーコードは658bp以上であり、その中には未同定の塩基は含まれていなかった。両方向から決定した塩基配列328個に対するBOLDデータベースのTrace Quality Statsでは、高品位が83%、中品位が10%であった。また328個の塩基配列における平均クオリティー値は、全て20(正確度99%以上)を上回っていた。図1に種内の個体間における分子距離の最大値と、登録したデータ内での最も近縁な種間(nearest neighbor)における分子距離の頻度分布を示す。複数個体の塩基配列が存在する39種(種内の個体数が2-17個体、平均3.0個体/種)において、種内の個体間における分子距離の最大値は0-15.0%(平均1.4%)であった。しかし、図1Aに示されるように、ニセチビヒョウタンゾウムシとイワキオチバゾウムシの2種内における分子距離の最大値が、それぞれ14.4%及び15.0%と突出して高かった。これら2種を除くと、種内の分子距離の最大値は0-4.7%(平均0.7%)となり、最も近縁な種間の分子距離10.7-26.3%(図1B; 平均17.4%)を明確に下回っていた。また、BOLDデータベースのBIN Discordance Reportを参照すると、本研究でDNAバーコードを登録したゾウムシ科及びチョッキリゾウムシ科の合計85種のうち、形態情報に基づき判定された種と塩基配列情報によって認識された種(BIN)が1:1で対応するものが81種(95%)であった。これらの結果は、今回サンプリングしたゾウムシ類において、現行の分類とDNA塩基配列との対応関係が概して良好であることを示している。

ただし、現行の分類に基づく種の境界とDNA塩基配列に基づく種の境界が完全に一致した訳ではない。現行の分類に基づく種とBINが1:1で対応していなかった4種(イワキオチバゾウムシ *Otibazo morimotoi*, ニセチビヒョウタンゾウムシ *Myosides pyrus*, チビヒョウタンゾウムシ *Myosides seriehispidus*, カシワクチブトゾウムシ *Nothomylloceris griseus*) では、それぞれの種の中に複数のBINが認識された。この不一致が顕著であった例として、ニセチビヒョウタンゾウムシとイワキオチバゾウムシについて以下に記す。

今回のデータベースには、ニセチビヒョウタンゾウムシと同定された8産地9個体、イワキオチバゾウムシ

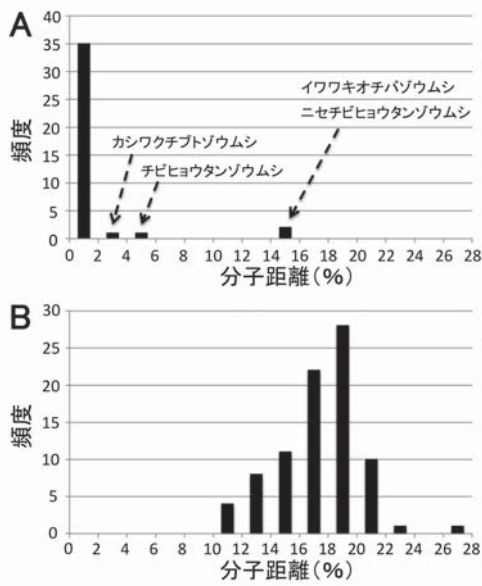


図1. 種内及び種間の分子距離の頻度分布図。(A) 複数個体からDNAバーコードを取得した39種内における、個体間の分子距離の最大値。(B) 本データベースの85種それぞれから見た最も近縁な種 (nearest neighbor: 多くは同属内の姉妹種、一部姉妹属を含む) との分子距離。横軸はKimura 2-parameterによる分子距離を%表示したものを示し、縦軸は横軸の区間に対応する分子距離の頻度を表す。

Fig. 1. Frequency distribution of Kimura 2-parameter distances within species and between nearest neighbor species. Distribution of the maximum within-species distances in 39 species that have multiple individuals (A) and that of between-species nearest neighbor distances from 85 species (B) are shown as histograms for each distance window.

と同定された9産地17個体が含まれていた。前述のように、これらの種内の個体間の分子距離には、極めて高い値を示すものがあった (図1 A): ニセチビヒョウタンゾウムシの愛知県豊橋市石巻山産と愛知県名古屋市守山区東谷山産の個体間で14.4%の分子距離、イワキオチバゾウムシの愛知県新城市鳳来寺山産と大阪府岩湧山産 (本種のタイプ産地) の個体間で15.0%の分子距離。図1の種内及び種間の分子距離の分布を踏まえても、14%を超える高い分子距離が同種内に許容されるとは極めて考えづらい。すなわちこれらのタクソンは複数種を含むものと考えた方が合理的である。実際、BOLDデータベースのBIN Discordance Reportを参照すると、ニセチビヒョウタンゾウムシの9個体は、BOLD:ACS3441, BOLD:ACS3442, BOLD:ACS3972, BOLD:ACS3973, BOLD:ACS5301, BOLD:ACS5302の6つのBINに分割さ

れていた。すなわち単純に分子データのみで立脚すると、6種が包含される可能性があることになる。一方、イワキオチバゾウムシの17個体は、BOLD:ACS4817, BOLD:ACS4818, BOLD:ACS4819, BOLD:ACS6150の4つのBINに分割された。やはりこの種でも、現行の分類で認識された種の中に、実際には複数種が存在することが示唆される。

DNAバーコード塩基配列に基づいて分子系統樹を作成したところ、愛知県内のイワキオチバゾウムシ (8産地15個体) は3つのクレードに分かれた (図2)。一つは瀬戸市定光寺、豊田市十明山、豊田市月ヶ平、新城市鳳来寺山を産地とする7個体からなり、BOLD:ACS4817のBINに対応していた。2番目は豊田市六所山、豊橋市石巻山、豊橋市普門寺を産地とする6個体からなり、BOLD:ACS4818のBINに対応していた。3番目は新城市本宮山のみを産地とする2個体からなり、BOLD:ACS4819のBINに対応していた。系統関係においては、3番目のクレードに対して、1番目と2番目のクレードが近縁な関係にあった。愛知県内には渥美半島北部から豊川に沿った中央構造線、大きな河川として豊川、矢作川、庄内川などがあるが、これらの地理的要因と上記3クレードの構成産地との関連は明確に見られなかった。図3は、イワキオチバゾウムシのタイプ産地である大阪府河内長野市岩湧山の個体と愛知県新城市本宮山の個体との間で、前胸背板の点刻の形態を比較したものである。岩湧山の個体では前胸背板の点刻が小さく、本宮山の個体ではそれが大きいという違いが認められた。数個体を用いたDNAバーコードと前胸背板の点刻の差異からのみでは、これらを別種であると確定することは難しく、今後愛知県内外のさらに多くの個体を含めた調査研究が期待される。

ニセチビヒョウタンゾウムシとイワキオチバゾウムシは土壌性ゾウムシであり、落ち葉とその下の腐葉土中から採集される種である。土壌性ゾウムシは生活のほとんどすべての期間を地中や地表面付近で過ごし、成虫の後翅が退化した種が多い (森本, 1993)。このため短時間で長距離の移動が困難であり、地域での分化が進みやすいと考えられる (大澤ほか, 2002)。最近になって多数の種が認識され記載されたツヤツチゾウムシ属やツチゾウムシ属 (森本ほか, 2015) も、やはり土壌性ゾウ

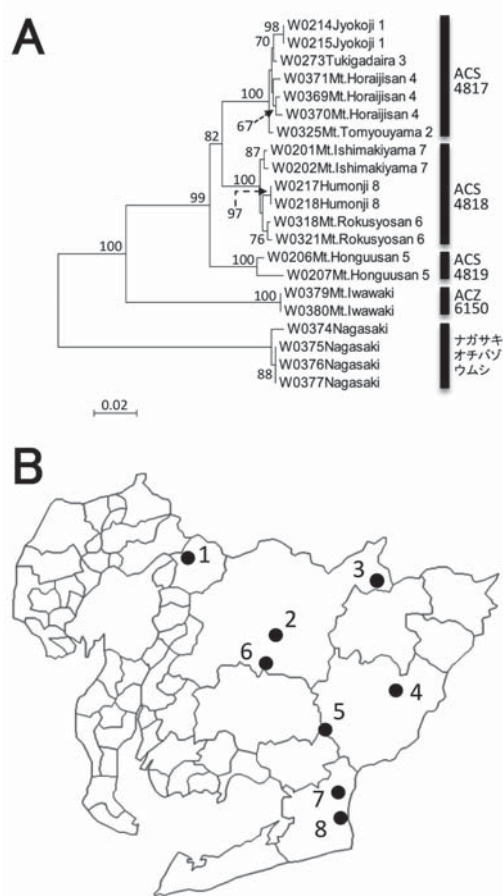


図2. イワキオチバゾウムシの系統関係と採集地。(A) 各産地から得たイワキオチバゾウムシのDNAバーコード塩基配列を用いた近隣結合系統樹。各結節点に付された数字は、ブートストラップ確率(50%を超える値のみ)を示す。愛知県産イワキオチバゾウムシのタクソン名の右側にある番号は、下図における産地番号に対応する。外群には、長崎県長崎市稲佐山産のナガサキオチバゾウムシ4個体(W****Nagasaki)を用いた。大阪府河内長野市岩湧山産のイワキオチバゾウムシ2個体をW****Mt.Iwawakiと表示する。BOLDデータベースから指定されたBIN番号(BOLD:に続く番号)を、対応するクレードに示す。(B) イワキオチバゾウムシの愛知県の採集地。1. 瀬戸市定光寺, 2. 豊田市十明山, 3. 豊田市月ヶ平, 4. 新城市鳳来寺山, 5. 新城市本宮山, 6. 豊田市六所山, 7. 豊橋市石巻山, 8. 豊橋市普門寺。

Fig. 2. Phylogenetic relationships and sampling localities for *Otibazo morimotoi* individuals. (A) A neighbor-joining tree constructed using the DNA barcode nucleotide sequences for *Otibazo morimotoi* individuals collected from various localities. Numbers at nodes show bootstrap probabilities (>50% only) from 1000 replications. Numbers shown in the right side of individuals correspond to locality numbers shown in the map for sampling localities. (B) Sampling localities in Aichi Prefecture for *Otibazo morimotoi* individuals.

ムシである。日本のオチバゾウムシ属には現在3種が記載されているが、各地で採集された個体を丹念に調べれば、相当数の種に分類される可能性も既に指摘されており(森本, 1993), 本研究の結果と整合的である。

日本のゾウムシ類に関して、より幅広い分類群を網羅したDNAバーコード研究(吉武ほか, 2009)や、数個の特定の分類群に絞った分子系統研究(Yamashita et al., 2015)などは既にいくつか行われている。しかし、例えば関東地方である種のDNAバーコードが決定・登録されたとしても、それを愛知県産の個体の種同定に直接利用できることの保証はない。愛知県のゾウムシに対して有効なDNAバーコードデータベースを作成しようとするれば、愛知県産の個体からDNAバーコードを取得して用いるべきであると考えられる。このような地域性を考慮に入れたデータベースが将来いくつか出来上がれば、地域間の比較により、種の境界についてより正確な推定が行えるようになり、DNAバーコーディングの精度もさらに高まると期待される。

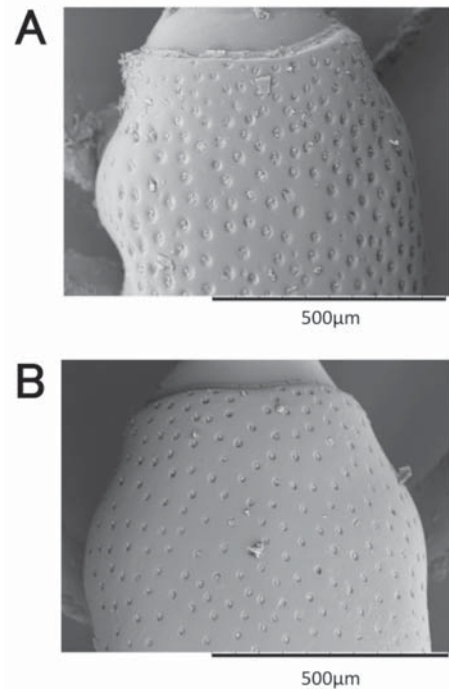


図3. イワキオチバゾウムシの前胸背板の点刻。(A) 愛知県新城市本宮山産の個体(オス)。(B) 大阪府河内長野市岩湧山産の個体(オス)。

Fig. 3. The pronotum punctate of *Otibazo morimotoi*. (A) Male individuals from Honguusan, Shinshiro-shi, Aichi and (B) Iwawaki-san, Kawachinagano-shi, Osaka.

謝辞

名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科生物多様性研究センターの村瀬幸雄氏 (2015年退職) 及び鈴木美恵子氏には、丁寧な実験指導をして頂いた。同センターの森山昭彦センター長には、本研究の実施に様々な便宜を図って頂いた。九州大学農学部の辻尚道氏には、ナガサキオチバゾウムシの採集地情報を提供して頂いた。農業環境技術研究所の吉武啓博士には、ゾウムシDNA解析の意義、研究方法などで貴重な御助言を頂いた。中部大学応用生物学部の大場裕一博士及び伊澤和義博士には、本原稿を読み、様々なアドバイスを頂戴した。伊澤博士には、ゾウムシサンプルの提供もして頂いた。名古屋大学博物館の野崎ますみ氏、蛭薙観順博士には電子顕微鏡による写真撮影の御指導を頂いた。以上の方々を始め、本研究に御協力下さった多くの皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh, and I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Science* 62: 727-730.
- 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.
- 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.
- 伊澤和義. 2008. 愛知県のチョッキリ類 (IV). *佳香蝶* 60: 163-164.
- 伊澤和義・井上品次・白井勝巳. 2009. 愛知県のゾウムシ類. *地域甲虫自然史* 第5号. 日本甲虫学会, 大阪. 70pp.
- 井上品次・井上絹代. 2001. 名古屋大学構内のゾウムシ. *名古屋大学史紀要*. 9: 134-152.
- 小島弘昭・森本桂. 2004. 日本産ゾウムシ上科のオンライン目録とデータベース. *九州大学総合研究博物館研究報告*. No. 2, pp.33-147.
- 森本桂. 1993. 日本産土壤ゾウムシ類概説. *昆虫と自然* 28: 19-24.
- 森本桂. 2006. ゾウムシと吻. *昆虫と自然*. 41: 2-4.
- 森本桂. 2014. 総論 ゾウムシ類の多様性. *昆虫と自然*. 49: 2-4.
- 森本桂・小島弘昭・宮川澄昭. 2006. 日本の昆虫. Vol.3. 権歌書房, 福岡. 406pp.
- 森本桂・中村剛之・官能健次. 2015. 日本の昆虫. Vol.4. 権歌書房, 福岡. 758pp.
- Morimoto, K. and S.Miyakawa, 1995. The family Curculionidae of Japan. VIII. Subfamily Acicnemidinae. *Esakia* (35): 17-62.
- 日本応用動物昆虫学会. 2006. 農林有害動物・昆虫名鑑. 日本応用動物昆虫学会, 東京. 387pp.
- Oba, Y., H. Ôhira, Y. Murase, A. Moriyama, and Y. Kumazawa. 2015. DNA barcoding of Japanese click beetles (Coleoptera, Elateridae). *PLoS ONE* 10: e0116612.
- 大澤省三・蘇智慧・井村有希. 2002. DNAでたどるオサムシの系統と進化. 哲学書房. 東京. 264pp.
- 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.
- 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 目録. 名古屋市, 名古屋. 222pp.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Yamashita, Y., H. Kojima, T. Ishikawa, and N. Kobayashi. 2015. Molecular identification of two flightless weevils of the genus *Scepticus* Roelofs (Coleoptera: Curculionidae) inhabiting seashores in Japan. *Japanese Journal of Systematic Entomology* 21: 199-202.
- 吉武啓・細谷忠嗣・大林延夫・宇津木望・加藤俊英. 2009. 甲虫類のDNAバーコード化へ向けた取り組み. *昆虫と自然* 44: 9-13.