



シルビアシジミの生活史と遺伝的多様性に関する保全生態学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2014-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 坂本, 佳子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00000580

大阪府立大学博士（緑地環境科学）学位論文

シルビアシジミの生活史と
遺伝的多様性に関する保全生態学的研究

坂 本 佳 子

2013年

目 次

緒 言	1
第1章	5
緒 言	6
第1節 野外季節消長と温度・日長反応	8
第2節 人工条件下における交配の試み	12
第3節 複数の寄主植物に対する幼虫の発育	15
第4節 複数の寄主植物に対する雌成虫の産卵選好性	19
考 察	23
第2章	31
緒 言	32
第1節 配偶行動の観察	34
第2節 雌探索におけるヤマトシジミとの配偶行動の比較	35
第3節 近縁種ヒメシルビアシジミとの交雑可能性	37
考 察	39
第3章	43
緒 言	44
第1節 性比異常と <i>Wolbachia</i> 感染	45
第2節 性モザイク個体	50
第3節 <i>Wolbachia</i> 系統間の交配実験	52
第4節 羽化後の日数と <i>Wolbachia</i> 密度	54
考 察	56
第4章	61
緒 言	62
方 法	63
結 果	66
考 察	68
総合考察	70
摘 要	81
謝 辞	86
引用文献	87
Summary	112

緒 言

緒言

産業革命以来、人間の活動は次第に増大してきたが、とくにここ数十年間で自然環境に及ぼす影響が急激に変化し、生物多様性の低下が世界的な問題となっている (Begon *et al.*, 1996)。地球上では、生命の誕生以来、生物の種分化と絶滅の歴史を繰り返してきたとされるが (Wilson, 1989; Raup, 1992; Benton and Twitchett, 2003)、現在の生物の絶滅の速度は、種形成の速度をはるかに上回っているため、先例がないほど急速である (Primack, 2004; プリマック・小堀, 2008)。生物多様性は、遺伝子、種、生態系などの異なるレベルからなる機能的階層性を備えた概念とされ、それらからもたらされる酸素生産、気候調節、栄養循環などの生態系サービスは、人間を含めた地球上の生物や生物群集が存続していくために不可欠である (鷲谷・矢原, 1996; Daily, 1999; Purvis and Hector, 2000)。このような生物多様性の重要性への関心の高まりは、1992年の国連環境開発会議 (地球サミット) からは世界的な潮流となった。同会議で採択され、翌年日本も批准した生物多様性条約には、国家戦略の策定、保全上重要な種や生態系の特定と監視、生息域内保全と生息域外保全の推進、外来生物対策、環境影響評価の実施、環境教育の促進などが謳われ、世界レベルでの生物多様性の保全と持続可能な利用に向けた流れは確実なものとなっている。

チョウ類 (狭義) は、世界的に研究者や愛好家が多いため、生息状況がよく把握されている生物群であり、2004年に国際自然保護連合 (IUCN) が発行したレッドリストには、240種 (亜種を含む) 以上が掲載されている (Baillie *et al.*, 2004)。日本では、1991年に最初のレッドデータブックが発行された後 (環境庁, 1991)、定期的に改訂作業が行われ、2012年には第4次レッドリストが発表されたが、チョウ類の絶滅危惧種は増加の一途をたどっている。チョウ類の多くは幼虫期に特定の植物を食草とし、多様な陸上生態系に生息する (Kudrna, 1986; 石井, 1993; New, 1997) が、ヨーロッパでは、とくに植生遷移の初期段階に生息する種が多く絶滅の危機に瀕しているとされている (Thomas and Lewington, 1991; Thomas and Morris, 1994)。日本においても、シバ型の草地に生息するチョウ類の多くが危機に瀕しており、野焼きの減少や牧業の衰退などによる遷移の進行、さらに植林や開発による生息地の消失が衰亡の原因となっている (石井, 2001a)。

シルビアシジミ *Zizina emelina emelina* (シジミチョウ科) (以下、本種) は、

日本の関東地方以西から種子島以北と韓国における海浜や河川敷、畦畔などの丈の低い草地に生息し、幼虫は主としてミヤコグサ *Lotus japonicus* (マメ科) を利用することが知られている (福田他, 1984)。Fig. I は、日本における過去に本種の記録があった地点について、文献等の情報から推定した現在の生息状況を示したものであるが、全国的に衰退が著しく、絶滅の危機に瀕していることがわかる。本種が衰退した要因は、河川のコンクリート護岸化や水田の基盤整備、草地の維持・管理方法の変化などにより、寄主植物や生息地自体が減少したためであると考えられている (巢瀬・枝, 2003; 間野・藤井, 2009)。このようなことから、本種は、環境省レッドリスト (環境省, 2012)、および大阪府レッドデータブック (大阪府, 2000) ではともに絶滅危惧 I 類として掲載されており、埼玉県、岐阜県、愛知県、和歌山県、高知県、愛媛県ではすでに絶滅したと考えられている (埼玉県, 2008; 岐阜県, 2009; 愛知県, 2009; 高知県, 2002; 愛媛県, 2003)。栃木県さくら市では、本種を天然記念物に指定し、採集を規制するとともに生息環境を管理するなどの保全活動が行われている (栃木県林務部・栃木県立博物館, 2005; 加藤他, 2007; 葛谷, 2007)。

これまで、絶滅危惧種の保全方法としてさまざまな試みがなされてきたが、チョウ類の生態は種によって大きく異なることから、実際の保全方法を検討するためには、個々の種を対象とした個生態学的な研究が必要である (New, 1997)。保全方法には、大きく分けて、本来の生息地において生物群集や個体群を保全する「生息域内保全」と、飼育などの人工的手法を用いて施設内で増殖、保護を行う「生息域外保全」に分けられる (プリマック・小堀, 2008)。本種は現在、環境省の生息域外保全モデル事業および野生復帰モデル事業の対象種になっている (自然環境研究センター, 2011; Ishii and Nakamura, 2012)。生息域外保全を含む、本種の保全方法を検討するためには、生態学的な基礎情報の収集と繁殖における技術確立が欠かせない。たとえば、野外における発生経過や移動性の推定、飼育繁殖のための生活史の解明などが不可欠であるが、これまでに断片的な記録はあるものの、詳細は知られていない。また、分子遺伝学的アプローチは、保全単位を識別する上で、効果的であると考えられているが (Moritz, 1994; Meffe and Carroll, 1997; Primack, 2004)、本種における集団内、集団間の遺伝的多様性に関する研究はほとんど行われてこなかった。さらに、さまざまな動植物において、近縁種との相互作用や交雑が絶滅の危機要因のひとつとして報告されており (Levin *et al.*, 1996; Allendorf *et al.*, 2001)、本種の配

偶行動における近縁種の影響を明らかにする必要がある。

しかし、日本各地の生息地が減少していく中で、近年、大阪府豊中市にある大阪国際空港とその周辺で本種が高密度で生息していることが確認された (Minohara *et al.*, 2007; Ishii. *et al.*, 2008)。この地域にはミヤコグサはまったく見られず、本種はシロツメクサ *Trifolium repens* (マメ科) やヤハズソウ *Kummerowia striata* (マメ科) に産卵し、幼虫が発育することが確認されている (Minohara *et al.*, 2007)。さらに、大阪府吹田市の市街地にあるシロツメクサとセイヨウミヤコグサ *Lotus corniculatus* (マメ科) が群生している緑地でも本種の発生が確認されているが、ここでもミヤコグサは見られない (Minohara *et al.*, 2007)。同様に、千葉県鴨川市でも、牧草地のシロツメクサを利用して本種が繁殖している生息地がある (岩坂, 2004; 鈴木, 2007)。一方、兵庫県南部の水田やため池の畦畔にはミヤコグサ群落が点在し、その周辺で本種が生息しているが (竹井, 2005)、シロツメクサの利用が報告されたことはない。これらのことは、生息地によって本種雌成虫や幼虫の寄主植物選好性が異なる可能性を示唆しており、詳細な調査が必要と考えられる。また、大阪国際空港周辺で採集された雌成虫の中には子世代が全て雌になるブルードが確認されており、*Wolbachia* 属の細胞内共生細菌 (以下、*Wolbachia*) の感染が関与している可能性がある (Minohara *et al.*, 2007)。*Wolbachia* は主に昆虫やその他の無脊椎動物に感染し、宿主の繁殖操作を行うことで知られているが (たとえば O'Neill *et al.*, 1997; Werren, 1997; Bourtzis and O'Neill, 1998 など)、本種に対してどのような影響を及ぼすのかは明らかではない。

本研究では、本種の生態学的な基礎情報を収集するために、日本国内の千葉県から佐賀県にかけての計14ヶ所と韓国において野外調査を行い、第1章では、得られた個体を用いて室内飼育実験を行うことにより、本種の生活史の解明と寄主植物利用について調査した。第2章では、本種の配偶行動を生息地で観察するとともに、近縁種の影響を考察した。第3章では、遺伝子解析により共生細菌 *Wolbachia* の感染状況と本種への影響について調査した。第4章では、ミトコンドリア DNA (以下、mtDNA) と核 DNA を用いた遺伝子解析により、各個体群の遺伝的多様性と集団分化の程度を推定した。そして、これらの結果に基づき、本種における保全のあり方について考察を行った。

第1章

生活史と寄主植物利用

第1章の緒言

生息域外保全は、生息域内保全の補完として実施するものであるため、まず実際の生息地における現状を把握することが重要である。季節生活環の解明は、発生時期や移動性を推定するために必要不可欠である。昆虫類は、変温動物であり、適温の範囲内においては、温度に比例して発育速度が増加し、発育の完了に要する期間は短くなる (Honěk, 1996; 桐谷, 1991, 1997)。発育速度がゼロになる温度を発育零点と呼び、その種の発育が完了するために必要な期間と温度の総量 (有効積算温度) を推定することが可能である。また、温度が高すぎても、低すぎても発育が抑制されることが知られており、昆虫類において、このような不適な環境に対する適応戦略が進化を遂げてきた。たとえば、温帯域に生息する多くの昆虫では、さまざまなタイプの休眠の存在が季節変化に適応した生活史の維持に役立っている (Tauber *et al.*, 1986; Danks, 1987)。不適な季節を予知するための主な環境刺激は、日長であることが知られており、これまでに、光周期に反応して休眠が誘導される現象 (光周性) が多くの昆虫で報告されている (Danilevsky *et al.*, 1961)。このように発育零点、有効積算温度、および光周反応をしらべ、光温図表を作成することで、ある土地における昆虫の周年経過を推定することができる。そこで本章第1節では、本種の野外の季節消長を明らかにするとともに、卵、幼虫、蛹の発育速度、有効積算温度、日長反応を調査し、周年経過を推定した。

また、生息域外での繁殖には、累代飼育技術の確立が必要である。しかし、本種における飼育・繁殖技術は未確立で、とくに屋内での安定した交配には至っていない。そこで、第2節では、屋内での交配方法を確立するために、さまざまな条件下で本種の交配を試みた。

さらに、生息環境を明らかにするために、本種の寄主利用能力の調査が必要である。チョウ類の99%が幼生期に植物を食べる「植食性」であることが知られている。たとえば、モンシロチョウ属はアブラナ科、キシタアゲハ族はウマノスズクサ科というように、そのほとんどが狭食性または単食性で寄主の範囲が限定されることが多いが、このようなチョウ類 (植食者) とその寄主植物 (植物) の関係は、長い相互作用による共進化の歴史により形成されてきたと考えられている (たとえば Hougén-Entzman and Rausher, 1994; Menken and Roessingh, 1998 など)。寄主範囲を規定する至近要因については、さまざまな

生理的要因の関与が考えられるが (Miller and Strickler, 1984)、主に植物が生産する多様な 2 次代謝産物の代謝能力や感覚器から得た情報の処理能力に対して、種ごとに限界があるためと考えられている (Bernays, 2001; 本田, 2005)。したがって、寄主植物の選択は、雌成虫による産卵と幼虫の摂食能力によって決定される (本田, 2005)。そこで、本種の複数の寄主植物を用いて、本章第 3 節では幼虫の発育を、第 4 節では雌成虫の産卵選好性を調査した。

第1節 野外季節消長と温度・日長反応

方法

野外季節消長

野外における本種の季節消長を明らかにするために、大阪国際空港周辺の緑地（以下、近畿-1）（Fig. 1-1-1）において2009年4月中旬～11月下旬に原則として月に1回、約1時間本種を採集し個体数を記録した。個体群は、大阪国際空港に隣接する約2,000 m²緑地で、シロツメクサ、ヤハズソウなどのマメ科植物のほか、メヒシバ *Digitaria ciliaris*、スズメノヒエ類などの丈の低い草本が見られた。調査はこの緑地内を一様に歩き、目視により発見した本種成虫を昆虫網で採集した。

温度・日長反応

第1節で採集した個体を生かしたまますみやかに研究室に持ち帰り、雌から採卵した。飼育用プラスチックケース（志賀昆虫普及社製；直径90 mm、高さ33 mm）に本種雌成虫を1個体ずつ入れ、25°Cの長日条件（16L-8D、明期16時間、暗期8時間、以下同様）下で寄主植物を提示した。寄主植物には、シロツメクサを使用し、乾燥を防ぐために切り口を湿らせたロール紙片とアルミホイルで包んで固定した。雌成虫の餌として3%ショ糖液を与えた。得られた卵は産みつけられた寄主植物とともに、産卵日ごとに小型透明プラスチックシャーレ（Becton Dickinson社製；直径50 mm、高さ9 mm）に分けて、20、23、25、30°Cの16L-8D（明期16時間、暗期8時間、以下同様）、20°Cの15L-9D、14L-10D、13L-11D、12L-12D、および25°C12L-12Dでそれぞれ飼育し、発育期間や休眠性の有無を調査した。温度と日長の制御にはインキュベータ（日本医化器械製作所）を用いた。ウイルスや細菌による感染症を軽減させるために、実験前に紫外線灯（波長253.7nm, GL20, パナソニック製）を約1時間照射した。さらに、20°C12L-12D条件で2ヶ月間飼育した個体は、引き続き20°C12L-12D条件で飼育するグループ、25°C16L-8D条件に切り替えるグループ、または10°C0L-24D条件に2ヶ月間置いたあと25°C16L-8D条件で飼育するグループに分けて飼育した。

ふ化した幼虫は同様のプラスチックシャーレに1個体ずつに分けて飼育した。若齢幼虫の体長は約1 mmであるため、シャーレに移し変える際には面相筆を

使い、死亡させないように注意を払った。幼虫に接触する筆は、個体ごとに99%アルコールで消毒し、十分乾燥させたものを使用した。幼虫の餌は、2齢まではシロツメクサの生葉を与え、3齢以降は、インセクタ F-II（日本農産工業社製）にシロツメクサの乾燥粉末を重量比で30%配合し、調整した人工飼料を与えて飼育した。生葉は腐敗しやすいため、適宜新しいものに取り替えた。観察は毎日行い、ふ化、脱皮、蛹化、羽化がみられた場合はその日付を記録した。観察は毎日行った。統計解析には、SPSS for Windows ver. 15.0Jを用いた。また16L-8Dで得られた発育期間（ D ）を下記の「積算温度の法則」（式1）に適用し、各発育ステージにおける発育零点（ t_0 ）および有効積算温度（ K ）を算出した。

$$D(T-t_0)=K \quad (\text{式1})$$

ここで、 D は発育に要した日数、 T は飼育温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）、 t_0 は発育零点（ $^{\circ}\text{C}$ ）、 K は有効積算温度（日度）である。発育零点および有効積算温度は、発育速度（ $1/D$ ）と飼育温度の回帰直線（式2）の係数から算出した。

$$1/D=(1/K)T-t_0/K \quad (\text{式2})$$

光温図表の作成

前述で得られた各発育ステージの発育零点、有効積算温度および休眠誘起の臨界日長から、大阪府豊中市における生活史を推定した。本研究では、有効温度を算出するために、気象庁（2009）に基づく2009年の日平均気温を用いた。日長および薄明薄暮期にはBeck（1980）の値を使用した。産卵から羽化までの発育零点と有効積算温度を用いて、年間世代数を推定した。

結 果

野外季節消長

本種成虫は、4月30日に雄が2個体確認されたあと、5月にはまったく確認されなかった。6～8月にかけて個体数は増加してピークを示したが、9、10月には減少し、11月にはまったく確認されなかった（Fig. 1-1-2）。このように、本種は確認される個体数に変動はあるものの、春から秋にかけて継続的に発生

することが明らかになった。

温度・日長反応

16L-8D 条件では、温度条件に関わらず、すべての個体が 4 齢の幼虫期を経て蛹化し成虫になった。16L-8D における卵、幼虫、蛹の平均発育期間を Table. 1-1-1 に示した。卵、幼虫、蛹の平均発育期間は 20°C でそれぞれ 6.7、28.3、13.2 日、23°C で 5.0、21.4、10.1 日、25°C で 3.8、18.5、8.1 日、30°C で 2.7、11.8、5.6 日であった。温度が高いほど発育期間が短く、すべての飼育温度において有意な差が認められた ($p < 0.05$, Tukey-Kramer's test)。

得られた卵、幼虫、蛹の発育期間から、各発育ステージから発育速度を求め、その直線回帰式を算出した (Table. 1-1-2)。この直線回帰式から算出した卵、幼虫、蛹の発育零点はそれぞれ 14.0、12.4、12.7°C、有効積算温度は 41.2、217.4、98.0 日度であった。

次に、卵から飼育した個体についての累積脱皮曲線を示す。25°C では 16L-8D 条件のすべての個体と 12L-12D の 99% の個体において、卵、幼虫、蛹の平均発育日数は、それぞれ約 4、19、8 日で、発育遅延は認められなかった (Fig. 1-1-3)。25°C 12L-12D 条件の 1% の個体に発育遅延が認められた (Fig. 1-1-4)。20°C では、16L-8D、15L-9D、14L-10D では幼虫は休眠することなく発育し、4 齢を経て蛹化した (Fig. 1-1-5)。13L-11D では、70% の個体は発育が遅延せず、4 齢を経て蛹化した。残り 30% の個体で 4 齢期間が遅延し、過剰脱皮が見られた。12L-12D では約 95% の個体で 3、4 齢期間が遅延し、5 または 6 齢になった。ふ化後 20°C 12L-12D で飼育を継続したところ、180 日後も生存していた個体が 16%、180 日以内に死亡した個体、羽化した個体がそれぞれ 65、18% ($n=72$) で、最大 8 齢になる個体を確認された。ふ化後 60 日を過ぎても、蛹化せず幼虫である個体を休眠個体とすると、13L-11D で 30% の個体、12L-12D で約 100% の個体が休眠に入ったため、50% の個体が休眠に入る休眠誘起の臨界日長は、約 12 時間 40 分であると考えられた (Fig. 1-1-4)。

20°C 12L-12D 条件で休眠に入った個体を 10°C で低温処理した後に 25°C 16L-8D 条件に移し替えて飼育した場合 (以下、低温処理区) と、低温処理を行わなかった場合 (非処理区) で比較したところ、低温処理区が約 2 日早く羽化にいたった (Fig. 1-1-6)。雌雄を区別して解析すると、低温処理区すると雄が 21.6 ± 0.3 日、雌が 24.3 ± 0.6 日 (平均 \pm S.E.) で羽化し、低温処理を行わな

った場合では、雄が 23.9 ± 0.4 、雌が 24.6 ± 0.5 日で羽化し、低温処理を行った雄のみが 2.7 日、発育期間が短いことが明らかになった ($p < 0.05$, ANOVA)。

第2節 人工条件下における交配の試み

方 法

以下の方法を用いて、交尾を記録した。

吹流し法

円筒型ネット（クラーク株式会社製；直径約 25 cm、高さ約 25 cm）に、人工条件下で羽化させた雌雄を入れ、日の当たる場所で交配を試みた（Fig. 1-2-1a）。

ドーム法

昆虫飼育ドーム（博視科学会社製 BugDorm Store；幅 60 cm、奥行 60 cm、高さ 60 cm）に、人工条件下で羽化させた雌雄を入れ、日の当たる場所で交配を試みた。吸蜜植物として、ムラサキツメクサ *Trifolium pratense*（マメ科）、ヒメジョオン *Erigeron annuus*（キク科）などを設置した（Fig. 1-2-1b）。

温室における放蝶

橿原市昆虫館の食草栽培温室（床面積 180 m²）において 2009 年 8 月、9 月 10 日～23 日、2010 年 9 月 13 日、9 月 17 日に放蝶した（Fig. 1-2-1c）。いずれも近畿-1 で採集した子世代成虫であった。吸蜜植物としてメキシコハナヤナギ *Cuphea hyssopifolia*（ミソハギ科）などを設置した。温室内にはプランター植えのシロツメクサを配置し、卵が確認された場合は回収してシロツメクサの生葉を与えて飼育を行った。また、交尾が確認された場合は既交尾雌を回収し、容器内で採卵した。

大型ネットケージにおける放蝶

2010 年 9 月 14 日、17 日に、大阪府立大学圃場のガラスハウス内に大型ネットケージ（床面積 9 m²、高さ 2 m）を設置し放蝶した（Fig. 1-2-1d）。いずれも近畿-1 で採集した子世代成虫であった。吸蜜植物として、メキシコハナヤナギなどを設置した。

生息地吹流し法

2011 年 6 月 24 日、6 月 25 日、7 月 26 日、8 月 9 日に近畿-1 で 18 個体、8

月 9 日に兵庫県山間部の農業用ため池周辺（以下、近畿-2）で 13 個体の雌成虫を採集し、雌 352 個体、雄 328 個体の子世代成虫を得た（Fig. 1-1-1）。前述の子世代成虫のうち、羽化後の日齢が浅い個体を中心に用いて、雌 77 個体を 2011 年 7 月 26 日、8 月 26 日、9 月 8 日、9 月 11 日、9 月 13 日、9 月 14 日、9 月 28 日、10 月 4 日、10 月 12 日、10 月 13 日、10 月 16 日、10 月 18 日に近畿-1 で、雌 11 個体を 8 月 29 日、9 月 12 日に近畿-2 で、野外で採集したばかりの雄（以下、野外雄）と円筒型ネットに 1 個体ずつ入れ、現地で交配を試みた。

ハンドペアリング法

2007 年 10 月 11 日にハンドペアリング法を試みた。ハンドペアリングとは、雄の腹部末端の外部生殖器を、細い面相筆の先で刺激し valva（把握器）を開かせ、人為的に雌の生殖器と結合させる技術である。

結 果

吹流し法

約 100 ペアを供試した結果、雄は、他個体が近づくと雌雄に関係なく、翅を震わせて追い払う行動が見られた。雌に対してほとんど関心がなく、交尾が成立したのは 1 ペアのみであった。

ドーム法

1 回の試行で雄と雌を約 5 個体ずつ入れ、10 回の試行を行ったが、雄は雌に対してほとんど関心がなく、交尾は成立しなかった。

温室における放蝶

2009 年 8 月、9 月 10 日～23 日、2010 年 9 月 13 日に雌 121 個体、雄 25 個体、9 月 17 日に雌 68 個体、雄 21 個体を放蝶した。2009 年の放蝶では、2 日後から個体数が激減したが、5 ペアの交尾を確認した。既交尾雌 1 個体を回収し、シロツメクサを提示して採卵したところ、20 卵が得られ、4 個体がふ化し、雌 1 個体と雄 1 個体が成虫となった。また、温室内に設置したプランター植えのシロツメクサに雌成虫が産卵する行動が見られた。産み付けられた卵は約 60 個で、そのうち 3 個体がふ化し、雄 1 個体が羽化に至った。少なくとも 2 卵から卵寄生蜂が羽化した。

2010 年の放蝶では、吸蜜する個体が見られたものの、雄が雌に関心を示さず、配偶行動は見られなかった。放蝶して 4 日後に生き残った雌を回収して大阪府立大学昆虫学研究室に持ち帰り採卵を試みたが、ほとんど産卵しなかった。

大型ネットケージにおける放蝶

2010 年 9 月 14 日に雌 38 個体、雄 20 個体を放蝶したところ、放蝶直後、約 10 分間は飛翔する雄が見られたが、雌に関心を示す個体は見られず、配偶行動は確認されなかった。9 月 18 日に、雌雄約 20 個体ずつを放蝶し再試行したが、9 月 14 日と同様に配偶行動は観察されなかった。

生息地吹流し法

近畿-1 で 149 個体、近畿-2 で 38 個体の野外雄を雌に提示した結果、雌に関心を示した雄個体が多く、合計 32 ペアの交尾が成立した。そのうち、近畿-1 の雌と近畿-2 の雄の組合せが 3 ペア、近畿-2 の雌と近畿-1 の雄の組合せが 3 ペア成立し、異なる個体群間の交配にも成功した。雄の進行方向に雌がいるように円筒型ネットを回転させることで、交尾成功率を高めた。既交尾雌を飼育用プラスチックケース（志賀昆虫普及社製；直径 90 mm、高さ 33 mm）に入れ、ミヤコグサ、セイヨウミヤコグサ、シロツメクサのいずれかの寄主植物を提示し死亡するまで採卵したところ、平均 174 卵、最大 334 卵が得られ、ほとんどの個体が死亡日まで受精卵を産卵した。平均交尾時間は約 50 分であった。

ハンドペアリング法

2007 年 10 月 11 日に雌雄各約 20 個体を用いてハンドペアリングを試みたところ、一部の雄で、valva の開閉が見られたが、結合は成功しなかった。

第3節 複数の寄主植物に対する幼虫の発育

採集地と採集日

採集地と採集日は以下の通り (Table 1-3-1)。2007年9月9日、9月28日、10月20日、10月21日、11月3日、11月4日に関東地方 (3ヶ所、関東-1~3)、2011年10月23日に中部地方 (1ヶ所、中部)、2007年4月28日、7月5日、2011年6月24日、7月26日、8月9日、8月26日、9月8日、9月28日、10月4日、10月12日、2012年5月12日、5月20日、6月24日、7月28日に近畿地方 (4ヶ所、近畿-1~4)、2012年7月31日に四国地方 (1ヶ所、四国)、2011年11月12日に九州地方 (1ヶ所、九州-1) 計10ヶ所と、2012年8月20日、8月23日に韓国 (2ヶ所、韓国-1,2) で本種雌雄成虫を採集した (Fig. 1-1-1)。採集した雌成虫は生かしたまますみやかに持ち帰り、以下の実験に用いた。生息地吹流し法で交配させた野外雄も持ち帰り、のちに遺伝子解析を行うために冷凍保存した。

生息環境

生息地の特徴を以下に示した。

関東地方南部では、やや低密度ではあるが、広い範囲で本種が確認されたため、河川の流域で3つの個体群 (関東-1~3) に分けた。主なマメ科植物としてミヤコグサ、シロツメクサなどが見られた。関東-1 と関東-2 は棚田の畦畔や牧草地、グラウンドといったシバ型の草地を中心に、関東-3 は、海岸の砂浜とその周辺の草地で本種の生息が確認された。

中部地方 (中部) では、ミヤコグサやシロツメクサが生育する一級河川の堤防で生息しているが、個体数は少なかった。

近畿-1 では、空港周辺の緩衝緑地と公園内のシバ型草地に高密度に生息しており、シロツメクサ、ヤハズソウ、コマツナギ *Indigofera pseudotinctoria*、コマツブツメクサ *Trifolium dubium* などのマメ科植物が確認された。2011年より、ミヤコグサに特徴的な萼片と通常セイヨウミヤコグサに見られる4~8の花数を持つミヤコグサ属の一種 *Lotus sp.* の個体群が確認された。

近畿-2、近畿-4 では、ミヤコグサ、シロツメクサ、コマツナギが生育するため池の畦畔のシバ型草地で、本種の生息が確認された。

近畿-3 の生息地はセイヨウミヤコグサ、シロツメクサなどが繁茂し、近畿-1

の近隣に位置するが、周辺に同様の緑地がなく孤立しているため、独立した個体群とみなした。この生息地では、2009、2010 年の調査において本種は一度も確認されず、絶滅したと考えられる。

四国地方（四国）では、本種は一級河川の堤防などのシバ型の草地に広く生息し、マメ科植物は、ミヤコグサ、シロツメクサ、コマツナギがみられた。

九州-1 では、ミヤコグサ、シロツメクサ、ヤハズソウなどが生育する一級河川の堤防の刈り込まれたシバ型の草地に本種が生息していた。

野外でシロツメクサの利用が知られているのは、関東-1～3（鈴木，2007）、近畿-1、近畿-3（Minohara *et al.*, 2007）のみである。また、いずれの生息地も年に数回の草刈り管理が行われていたと考えられる。

方 法

まず、各個体群から採集した雌成虫の子世代の幼虫の発育を調査した。次に、異なる個体群間における交雑個体の発育明らかにするために、野外吹流し法を用いて近畿-1 と近畿-2 間の交配実験を行った。卵から成虫に至るまで 25～26°C16L-8D 条件下で飼育した。幼虫の餌として、2 齢までは、ミヤコグサ、セイヨウミヤコグサ、シロツメクサのいずれかの生葉を与え、3 齢以降は、そのまま生葉を与えるか、インセクタ F-II（日本農産工業社製）に各寄主植物の乾燥粉末を重量比で 30% 配合し、調整した人工飼料を与えて飼育し、蛹体重と発育日数を記録した。蛹体重は蛹化後 4 日目に電子天秤（A&D 社製、HR-60、最低目盛 0.1 mg）を用いて秤量した。蛹体重と発育期間に関するデータは、羽化にいたった個体のみを用いた。その他の飼育方法は第 1 章、第 1 節と同様に行った。なお、雌 1 個体から得られたすべての子どもを「ブルード」と称する。

結 果

野外雌の子世代

まず、人工飼料を用いて飼育した結果を示す。日本国内の個体群における幼虫の生存率は、ほぼすべての条件で 90% 以上を示し、幼虫期に与えた寄主植物や個体群間で差がなかった（Table 1-3-2）。25°C16L-8D 条件下で飼育した中部、近畿-1、近畿-2、四国、九州-1 の平均幼虫期間は 16～20 日を示し、近畿-1、四国、九州-1 ではミヤコグサで飼育した個体（ミヤコ区、以下同様）よりシロツメ区の方が有意に短かったが、中部、近畿-2 では差がなかった（Table 1-3-3）。

最短幼虫期間を比較すると各個体群においてミヤコ区がシロツメ区より幼虫期間が短いものはなかった。近畿-2、九州-1 では、ミヤコ、シロツメ区ともに、近畿-1、四国では、シロツメ区のみで、雌よりも雄の方が、幼虫期間が短かった (Table 1-3-3)。蛹体重は、いずれの個体群においても各摂食区の雌雄の差はほとんどなく、シロツメ区よりミヤコ区のほうが有意に重かった (Table 1-3-4)。近畿-1、近畿-2、四国、九州-1 の各個体群の比較では、幼虫期間にほとんど差はなかった (Fig. 1-3-1)。

蛹体重はミヤコ区、シロツメ区ともに、近畿-1 と四国は近畿-2 と九州-1 よりも有意に重かった (Fig. 1-3-2)。近畿-1 のシロツメ区と近畿-2 のミヤコ区では有意差はなかった (Mann-Whitney U test, $p>0.05$)。また、関東-1、関東-2、近畿-3、近畿-4 では比較実験を行わなかったが、26°C16L-8Dにおけるシロツメ区の蛹体重を、前述の近畿-1、近畿-2、四国、九州 1 の蛹体重と合わせて比較したところ、関東-1、関東-2、近畿-3 は近畿-1、四国と、近畿 4 は近畿-2 と九州-1 とほぼ有意差がなかった (Fig. 1-3-3)。1 個体の幼虫期間と蛹体重を 1 プロットとし、各個体群、各区の相関を見てみると、ミヤコ区では、近畿-1 の雄、九州-1 の雌で、シロツメ区では、近畿-1 の雌雄、近畿-2 の雌、四国雌、九州-1 雄で負の相関が見られ、正の相関が見られたものはなかった (Fig 1-3-4, 1-3-5, 1-3-6 and 1-3-7)。また、近畿-1 個体群内の蛹体重をブルードごとに比較したところ有意差があった (Table 1-3-5)。韓国個体群においてもシロツメクサの人工飼料を用いて、正常に発育することが明らかになった。

次に、近畿-1、近畿-2 から得られた雌の子世代に生葉のみを与えて飼育した結果を示す。幼虫の生存率は個体群、寄主植物にかかわらず、90%以上で差がなかった (Table 1-3-6)。幼虫の発育期間については、人工飼料を与えた場合と比較するとほとんど差はなかった (Table 1-3-7)。蛹体重は、人工飼料を与えた場合と比較すると、有意に軽かったが (Table 1-3-8)、近畿-1 と近畿-2 間における相対的な関係性は変わらなかった。また、供試数は少ないが、近畿-1 の個体をセイヨウミヤコグサで飼育したところ、4 個体中 3 個体が羽化し、幼虫期間が 14~17 日、蛹体重が 35.8~43.7 mg であった。

近畿-1 と近畿-2 間の交雑個体

幼虫期間は、近畿-1 純系と近畿-2 純系で差がなく、交雑個体においても差がなかった (Fig. 1-3-8)。蛹体重については、上述でミヤコ区、シロツメ区とも

に近畿-1 純系は近畿-2 純系よりも重いことが明らかになっており、ミヤコ区、シロツメ区における近畿-1 の雌と近畿-2 の雄の子世代（近畿-1×近畿-2、以下同様）と近畿-2×近畿-1 では、それぞれ各純系のほぼ中間の値を示した（Fig. 1-3-9）。

第 4 節 複数の寄主植物に対する雌成虫の産卵選好性

採集地と採集日

採集地と採集日は以下の通り (Table 1-4-1)。2007 年 9 月 9 日、9 月 28 日、10 月 20 日、10 月 21 日、11 月 3 日、11 月 4 日に関東地方 (3 ヶ所、関東-1~3)、2007 年 7 月 5 日、10 月 22 日、2010 年 8 月 11 日、2011 年 8 月 9 日、8 月 29 日、9 月 12 日、9 月 28 日、10 月 4 日、10 月 16 日、2012 年 5 月 12 日、7 月 28 日、9 月 1 日に近畿地方 (4 ヶ所、近畿-1~4)、2012 年 7 月 31 日に四国地方 (1 ヶ所、四国)、2010 年 9 月 8 日、2011 年 11 月 12 日に九州地方 (2 ヶ所、九州-1、九州-2) 計 10 ヶ所と、2012 年 8 月 20 日、8 月 23 日に韓国 (2 ヶ所、韓国-1、2) で本種雌雄成虫を採集した (Fig. 1-1-1)。採集した雌成虫は生かしたまますみやかに持ち帰り、以下の実験に用いた。生息地吹流し法で交配させた野外雄も持ち帰り、冷凍保存した。

生息環境

関東-1~3、中部、近畿-1~4、四国、九州-1 については、第 3 章を参照。

九州-2 では、ミヤコグサ、シロツメクサ、ヤハズソウ、コマツナギなどが生育するキャンプ場や牧場などのシバ型の草地に本種が生息していた。

方 法

実験には、各個体群から採集した雌成虫とその子世代を利用した。産卵選好性の遺伝様式を調べるために、第 2 節で述べた生息地吹流し法を用いて交配実験を行った。また、産卵選好性に対する幼虫期の摂食経験の影響を調べた。

各個体の寄主植物に対する選好性を調べるために、上述の飼育用プラスチックケースに本種雌成虫を 1 個体ずつ入れ、25°C の長日条件 (16L-8D) 下で寄主植物を提示した。寄主植物には、ミヤコグサ、セイヨウミヤコグサ、シロツメクサを使用し、1 回の実験で、2 種類の植物の組合せを変えて同時に提示した実験区 (二者択一区) と、2 種類の植物の組合せを変えて交互に提示した実験区 (二者交互区) を設定した。二者択一区では、各寄主植物の重さが 0.15-0.25 g になるように長さを調節した。二者交互区では、各寄主植物の重さが、0.35-0.55 g になるように調節した。乾燥を防ぐために切り口を湿らせたロール紙片とアルミホイルで包んで固定した (Fig. 1-4-1)。寄主植物が互いに接触し

ないように茎部をテープで固定し、左右ランダムに配置した。雌成虫の餌として3%ショ糖液を与えた。寄主植物に産付された卵の数を成虫が死亡するまで毎日記録し、寄主植物は毎日新鮮なものを取り替えた。

結 果

野外雌におけるミヤコグサとシロツメクサの二者択一区

関東-1、中部、近畿-1、近畿-2、近畿-4、四国、九州-1、九州-2で採集した雌に、ミヤコグサとシロツメクサを同時に提示した。両種植物への産卵数を同じと仮定し、個体別に二項検定 ($p<0.05$) を用いて解析したところ、近畿-2の野外雌では、シロツメクサに産卵した割合はほとんどの個体で5%以下であり、15個体すべてがミヤコグサを選好した(ミヤコグサを選好:有意差なし:シロツメクサを選好=15:0:0個体、以下同様)(Table 1-4-2)。九州-1でも3:0:0個体ですべての雌がミヤコグサを選好した。関東-1では2:1:0、近畿-4では1:1:0、四国では11:1:0で、ミヤコグサを選好した雌と選好性なしの雌が混在した。一方、近畿-1の野外雌では、7:1:5個体で、ミヤコグサを選好した雌とシロツメクサを選好した雌が混在した。シロツメクサに産卵の割合を個体群別に合計すると、近畿-1がもっとも多くシロツメクサに産卵し、続いて九州-2、近畿-4、関東-1、四国、九州-1、中部、近畿-2で、個体群間で有意差があった(Table 1-4-3)。近畿-1と近畿-2では各個体がシロツメクサに産卵した割合を比較しても、近畿-1と近畿-2で有意差があった(Fig. 1-4-2)。韓国(2ヶ所)では、7個体中5個体がシロツメクサに産卵した。

野外雌におけるミヤコグサとシロツメクサの二者交互区

近畿-1と近畿-2で採集した雌にミヤコグサとシロツメクサを1日ごとに交互に提示した。両種植物への産卵数を同じと仮定し、個体別に二項検定 ($p<0.05$) を用いて解析したところ、近畿-1では4:1:0個体、近畿-2では3:0:0個体であった(Table 1-4-4)。近畿-1と近畿-2のシロツメクサに産卵した割合は、それぞれ33.2%と0.0%で有意差が認められた ($p<0.05$, χ^2 検定)(Table 1-4-5)。

野外雌におけるセイヨウミヤコグサとシロツメクサの二者択一区

関東-1、関東-2、近畿-1、近畿-2、近畿-3、近畿-4で採集した雌にセイヨウミヤコグサとシロツメクサを同時に提示した。両種植物への産卵数を同じと仮定

し、個体別に二項検定 ($p < 0.05$) を用いて解析したところ、近畿-2 では、5 個体すべてがセイヨウミヤコグサを選好した (セイヨウミヤコグサを選好 : 有意差なし : シロツメクサを選好 = 5 : 0 : 0 個体、以下同様) (Table 1-4-6)。近畿-4 でも同様に 3 : 0 : 0 個体で、すべてがセイヨウミヤコグサを選好した。近畿-1 では 3 : 3 : 7 個体とシロツメクサを選好した個体が多かったものの、セイヨウミヤコグサを選好した個体も認められた。関東-2、関東-1 では、それぞれ 4 : 0 : 1、4 : 2 : 1 個体とセイヨウミヤコグサを選好した個体が多かったもののシロツメクサを選好した個体が見られ、選好性に個体差がみられた。

野外で採集した雌成虫がシロツメクサに産卵の割合を個体群別に合計すると、近畿-2 では 1% ($n=146$)、近畿-4 では 0% ($n=92$) であったが、関東-1 では 25% ($n=252$)、関東-2 では 14% ($n=132$)、近畿-2 では 40% ($n=86$)、近畿-1 では 56% ($n=365$) と生息地によって有意差があった ($p < 0.05$) (Table 1-4-7)。ミヤコグサとシロツメクサの二者択一実験の結果と比較すると、近畿-1 と近畿-4 では異なる結果となったが、関東-1、近畿-2 では同様の結果を示した (Table 1-4-8)。

未交尾雌と既交尾雌における産卵数の比較

飼育個体から採卵した結果、生涯産卵数 (中央値) は未交尾雌では 2 個、既交尾雌では 132.5 個と明らかな差があった (Table 1-4-9)。また、未交尾雌から得られた卵は、葉面に固着せず、脱落するものが多数見られた。本種雌成虫は、交尾を経験しないとほとんど産卵行動をとらないことが明らかになったので、以下の産卵選好性の実験に用いるすべての飼育雌において、産卵行動を促すために、野外雄と交尾させたものを使用している。

飼育個体におけるミヤコグサとシロツメクサの二者択一区

近畿-1 と近畿-2 における子世代の交配実験を行った結果、近畿-1 純系ではどの個体もシロツメクサに産卵し、ミヤコ区では 4 : 0 : 0 個体、シロツメ区では 2 : 2 : 1 個体であった。近畿-1 個体群で合計したシロツメクサに産卵した割合は、それぞれ、30.7% ($n=840$)、42.1% ($n=742$) であった。近畿-2 純系では、ミヤコ区で 3 : 0 : 0 個体、シロツメ区で 1 : 0 : 0 個体、近畿-2 個体群で合計したシロツメクサに産卵した割合は、0.8% ($n=358$)、0% ($n=86$) で、シロツメクサにはほとんど産卵しなかった。近畿-1 純系と近畿-2 純系のシロツメクサに産卵した割合は、幼虫期の寄主植物にかかわらず、有意に異なった (Tukey-type

multiple comparison test for proportion、 $p<0.05$)。交雑個体におけるシロツメクサに産卵した割合は、近畿-1 純系と近畿-2 純系の中間の値をとった (Table 1-4-10)。また、近畿-1 純系では摂食区による差が見られたが、近畿-2 純系と交雑個体では、差は見られなかった。

第1章の考察

温帯、熱帯・亜熱帯、広域（温帯から熱帯）に分布する3グループに分けて、チョウ目とコウチュウ目について、発育零点 T_0 、有効積算温度 K の値を比較すると、熱帯・亜熱帯に分布する種は、温帯や広域分布種にくらべ高い T_0 を示す傾向がある（桐谷, 2012）。本種における卵、幼虫、蛹の発育零点は、 $12.4\sim 14.0^{\circ}\text{C}$ を示し、桐谷（2012）に示されたチョウ目温帯種の発育零点の平均値より 3°C 以上上回り、熱帯・亜熱帯種のものとはほとんど差がなかった。本種は温帯に分布するが、熱帯・亜熱帯に分布する近縁種のヒメシルビアシジミ *Z. otis* から派生したとされ（Yago *et al.*, 2008）、本種の起源が南方であることと矛盾しなかった。

これまでに知られている幼虫休眠はすべて光周期と温度の影響を受ける外因性の休眠であると言われている（正木・矢田, 1988）。幼虫休眠には、脱皮せずに幼虫の状態でとどまるものと、蛹への脱皮ではなく幼虫脱皮を繰り返すものがあり（Yin and Chippendale, 1979; 竹田, 2007）、 20°C 短日条件では、最大8回の幼虫脱皮が観察され、本種は後者のタイプの休眠であると考えられた。過剰脱皮では、アラタ体活性が高く、幼若ホルモンレベルが高いことにより制御されることに起因すると考えられており（Saunders 1980; 石井, 2000; 加藤・遠藤, 2005）、本種における幼虫休眠もホルモンにより制御されていると考えられる。これらのことから、本種は冬季に発育が遅延し休眠に入ることが明らかになり、不適な環境を回避する戦略として、適応的であると考えられた。一方、 25°C 短日条件では、ほとんど休眠に入らなかった。ジャコウアゲハ *Atrophaneura alcinous* では、幼虫期の温度が 20°C の臨界日長より、 25°C の臨界日長の方が長くなることが知られている（Kato, 2000）。また、幼虫休眠を行うベニシジミ *Lycaena phlaeas* においても、 20°C では休眠に入る日長でも 25°C ではほとんど休眠に入らないことがわかっている（Sakai and Masaki, 1965）。このように温度が光周反応を変更することは温帯種では普通にみられ、本種においても、温度が休眠誘起に影響していると考えられた。

休眠後の発育については、低温処理を行った雄が早く羽化することが明らかになった。有意差があるものの、その差は約2.5日で無処理区でも正常に羽化することから、他のチョウ目であるアメリカシロヒトリ *Hyphantria cunea*（Masaki, 1977）やイチジクヒトリモドキ *Asota ficus*（Hirai *et al.*, 2011）など

と同様に、休眠消去に低温は必要ないと考えられた。低温を経験した休眠個体のうち、雄は25°Cで2.7日羽化が早く、非休眠時の発育零点から計算すると、約32日度早く羽化することになる。このことは、2009年4月後半～5月前半の気温を考慮すると、雄が約7日早く羽化することを示す結果となった。雄が雌よりも先に羽化を始める現象を雄性先熟といい、チョウ類ではモンシロチョウ（鈴木, 1980）や、ヤマキチョウ（Wiklund *et al.*, 1996）などの多くの種で報告されている。生物学的意義がさまざま議論されているが、一般的には、未交尾雌と出会う雄の戦略と考えられている。第1節の本種の野外調査でも、4月下旬に雄のみが確認されたことや、Minohara *et al.* (2007) においても、春季に雄が先に羽化することなどの観察と一致し、本種において春季に雄性先熟が見られることが明らかになった。

2009年の近畿-1の季節消長調査では、本種は春から秋にかけて継続的に発生することが明らかになった。2009年のAMeDASの気温データ（気象庁, 2009）と、本研究で得られた発育零点、有効積算温度、臨界日長を用いて光温図表を作成し、大阪府豊中市における最大年間世代数を推定した（Fig. 1-D-1）。野外で最初に成虫が確認された4月30日を越冬成虫の発生日とした。その結果、第1～第5世代では、幼虫期に臨界日長より長い日長条件下で発育するため、休眠には入らず、各世代はそれぞれ最短で、6月17日、7月14日、8月7日、8月31日、10月1日に羽化すると考えられた。臨界日長に達するのは10月5日と推定され、第6世代の幼虫期の日長は臨界日長より短くなり、日平均気温が20°Cを下回るため、休眠に入り越冬すると考えられた。このことから最大年間世代数は6世代と推定された。

しかし、実際の発生では、休眠個体の羽化日はばらつき、成虫は数日生存すると考えられる。そこで、各世代の発生時期を重複させ、年間世代数と成虫の発生時期を推定した（Fig 1-D-2）。Fig. 1-D-1と同様に4月30日を越冬成虫の発生日とし、Minohara *et al.* (2007)の結果から5月10日まで産卵が連続と仮定した。飼育実験においては、羽化後1日以内に交尾し産卵可能であること、また平均生存日数が9.1日であることが明らかになったため（坂本ら, 未発表）、産卵前期間は0日、成虫の生存日数は9日とした。各世代間の交配は仮定しなかった。また臨界日長より日長が短い日に幼虫であった個体はすべて休眠すると仮定した。その結果、第1～第4世代はFig 1-D-1と同様に羽化すると考えられた。第5世代前半の幼虫期の日長は臨界日長より長い、第5世代後半では

臨界日長より短くなるため、休眠に入り、越冬すると考えられた。第5世代前半から得られた第6世代も、幼虫期の日長が臨界日長より短くなるため、休眠に入ると考えられた。このことから、本種は大阪府豊中市で1年に5~6世代を経過することがわかった。成虫の発生時期については、5月11日~6月16日と7月2日~13日の2回の密度低下期を除くと11月1日まで連続して発生すると予想された。成虫の発生予想は、野外の季節消長と Minohara *et al.* (2007) にほぼ一致した。しかし、Minohara *et al.* (2007) では2004年は11月下旬まで本種成虫が確認されたため、その年の気温によっては、11月1日以降も発生が続くと予想された。このように、本種では、野外の季節消長に対して温度・日長反応から推定した周年経過が一致したため、移動性は低く、同じ生息地で繁殖を繰り返していると考えられた。

さまざまな条件下で交配を試みた結果、交尾の成立にもっとも優れていたのは生息地吹流し法であった。生息地吹流し法は本実験の中で唯一野外雄を用いた方法であり、雄の雌への関心が高かったことが交尾成立に結びついたと考えられた。本種の飼育雄を用いた通常の吹流し法では雄の雌への関心が低く、野外雄と飼育雄では雌への関心の程度が異なることが示唆された。また、既交尾雌から採卵しふ化率を調査したところ、雌が生涯に産む卵数を受精させるのに、1回の交尾で十分であることがわかった。

本種の既交尾雌の産卵数は未交尾雌よりも顕著に多く、未交尾雌は葉面に卵を固着することが困難であった。チョウ類の雌は卵に与える栄養の一部を相手の雄から得ていることが知られている（たとえば Thornhill, 1976）。精包には、ショ糖やアミノ酸をはじめとするさまざまな栄養素が含有されており、雌の体の維持に用いられたり（Gilbert, 1976; Boggs and Gilbert, 1979）、雌の寿命を延ばし、産下卵数を増加させたりする働きがあるとしている（Watanabe, 1988 ; Svärd and Wiklund, 1991 ; Oberhauser, 1992）。このことから、本種雌も、雄の精包から産卵や固着に必要な成分を交尾雄から得ていると考えられた。未交尾雌に寄主植物を提示してもほとんど産卵しなかったことから、産卵には交尾経験が必要と考えられた。

ガラス温室を用いた交配は、成功数は少なかったものの、雌雄ともに飼育個体の交配が成立したことから、累代飼育を行う上では有用であると考えられた。しかし、温室に設置した寄主植物に産み付けられた卵の一部からは、卵寄生蜂の羽化が確認された。平林他（2009）と江田他（2009）は、卵寄生蜂であるメ

アカタマゴバチ *Trichogramma chilonis* がオオルリシジミ *Shijimiaeoides divinus barine* の卵期におけるもっとも高い死亡要因としており、本種の場合も、卵寄生によるふ化率の低下が累代飼育の問題点として挙げられた。卵寄生蜂は体サイズが 1 mm 未満で、温室内への侵入防止が困難であるため、温室内で産卵させるのではなく、既交尾雌を回収し、密閉したプラスチック容器内で産卵させるのが望ましいと考えられた。また、放飼後、数日中に個体数が急激に減少したことから、ハエトリグモなど温室内で生活する捕食者による死亡要因が考えられ、捕食者の侵入防止や駆除も必要と考えられた。

しかし、異なる個体群間の形質の遺伝様式や共生細菌の性操作の解明には、任意の組合せで交配することが必要である。温室や大型ケージでの放飼は、一度に交配できる組合せに限られる。雌に標識して複数の系統を識別することは可能であるが、雌が複数回交尾を行う可能性があるため、相手の雄を特定出来ないことが問題点として挙げられる。このため、放飼できる雄は 1 系統に限られる。また、回収しきれなかった既交尾雌や寄主植物上に産み付けられた卵などから、次回の実験にコンタミネーションを起こす可能性がある。一方、生息地吹流し法は、任意の雌を交配させることが可能である。任意の雄を交配させることは出来ないが、交尾後、研究室に持ち帰り、遺伝的背景を明らかにすることが可能である。また、一度に複数対の交配を成立させることが出来るため、生息地吹き流し法は交配実験に有用であると考えられた。

チョウ類の幼虫の摂食能力と雌の産卵選好には、少なからず個体差があり、同一種内でも個体群間で顕著に差がある場合も珍しくない（たとえば、Bowers, 1986; Nitao *et al.*, 1991 など）。しかし、野外でよく利用されている植物種が個体群間で異なっても、実験的に調べてみると選好性に差が見られない場合もある（たとえば、Wehling and Thompson, 1997; Bossart and Scriber, 1999 など）。本種のシロツメクサの摂食能力については、さまざまな報告がなされてきた。中邨・田西（1988）は、兵庫県伊丹市で採集した本種の卵を持ち帰り、1 齢幼虫から終齢幼虫になるまでシロツメクサを与えて飼育したところ、羽化にたったと報告したが、福田ら（1984）によると、静岡県産の本種 1 齢幼虫にシロツメクサを与えたところ、利用できずに死亡したとされ、個体群によって生存率が異なる可能性が考えられていた。静岡県の個体はおそらく絶滅していると考えられたため、調査を行うことはできなかったが、本研究の結果、いずれの個体群においても生存率に差はなく、生葉や人工飼料を用いて約 90%以上の個

体が羽化に至ったため、シロツメクサを利用可能であることが明らかになった。

しかし、発育日数と蛹体重においては、寄主植物間で有意な差があった。幼虫の発育日数は、1~2日程度ではあるが、ミヤコ区よりシロツメ区の方が有意に短くなった。蛹体重は、ミヤコ区よりもシロツメ区の方が有意に軽かった。一般的に、寄主植物に対する利用能力が高い場合は、幼虫期間が短く、蛹体重は重くなると考えられており（たとえば Hsiao, 1978）、各摂食区内では幼虫期間と蛹体重の関係において、同様の傾向が見られたため、利用能力に個体差がある可能性が考えられた。各摂食区間では、蛹体重はミヤコ区が重くなるものの、幼虫期間はシロツメ区が短く、シロツメクサの利用は必ずしも不利ではない可能性が考えられた。また、個体群間の蛹体重が異なることから、個体群間で各寄主植物に対する発育能力に差があると考えられた。

京大蝶類研究会（2004）は、野外において、猪名川河川敷の個体は兵庫県南部の個体よりも体サイズが大きいことを指摘している。猪名川河川敷は空港を隔てて西側に位置し、近畿-1と同一の個体群と考えられるため、猪名川河川敷と兵庫県南部は、近畿-1と近畿-2の関係と見なすことができる。本研究では、近畿-1のシロツメ区と近畿-2のミヤコ区の蛹体重には差がなく、京大蝶類研究会（2004）の結果と一致しなかった。考えられる可能性として、夏場の土壌の水分不足により、近畿-2における野外のミヤコグサの状態はあまり良好ではなく、より体サイズが小さくなること、また、猪名川河川敷にはセイヨウミヤコグサが繁茂する場所があり（Minohara *et al.*, 2007）、それを利用した個体の体サイズが大きくなることなどが挙げられる。

本種に人工飼料と生葉を与えた結果、生存率と幼虫期間にほとんど有意差はなかったが、蛹体重は生葉よりも人工飼料を与えた方が顕著に重くなった。他の昆虫においても、人工飼料を与えた方が、タンパク質などの栄養を多量に摂取できるため、体サイズが大きくなる例が報告されている（たとえば Bucher and Bracken, 1976 ; Cohen and Smith, 1998）。しかし、人工飼料を与えた場合の個体群や摂食区による差は、生葉を与えた場合と相対的には変わらないと判断された。本種の大量飼育や実験において、人工飼料は有用であると考えられた。

産卵選好性については、一部の個体群ではシロツメクサに産卵することが明らかになり、個体群間で産卵選好性が異なることが明らかになった。シロツメクサに産卵する個体群内でも、産卵選好性は個体によってばらつきがあること

も明らかになった。とくに近畿-2では、ミヤコグサとシロツメクサを交互に提示した場合でも、シロツメクサにはほとんど産卵しなかったことから、シロツメクサに対する産卵能力はないと考えられる。チョウ類のいくつかの種では産卵選好性は少なくともZ染色体上にある1つ以上の遺伝子によって決定されており (Thompson *et al.*, 1988; Thompson *et al.*, 1990; Scriber *et al.*, 1991; Scriber 1994)、幼虫の摂食選好性や能力は、雌の産卵選好性と直接関係しない別の遺伝子によって制御されていることも明らかになっている (Wiklund, 1975; Thompson *et al.*, 1990)。一方、幼虫期に利用した植物に雌が産卵選好を持つ傾向が見られる昆虫種が報告されているが (Hopkins host selection principle) (Hopkins, 1916)、チョウ目ではそのような例は確認されていない。本研究の結果から、近畿-1の合計卵数を比較すると、シロツメ区の方がシロツメクサに多く産卵することを示したが、選好性には個体間でばらつきが見られたため、幼虫期の餌による選好性の変化は認められなかった。このことから、産卵選好性は遺伝的に決定されていると考えられた。

ミヤコグサとシロツメクサ、セイヨウミヤコグサとシロツメクサの二者択一実験の結果は、ほとんど差がなかったことから、本種はセイヨウミヤコグサに対して、ミヤコグサとほぼ同様に産卵可能であることが明らかになった。セイヨウミヤコグサはミヤコグサの一倍体または二倍体の同属種であることを考慮すると (清水, 2003)、植物体に含まれる化学物質はほとんど差がないと考えられた。しかし、近畿-4では異なる結果となった。近畿-4では、1個体のみが、シロツメクサに多く産卵し、その他の個体は、シロツメクサにほとんど産卵しなかったことから、シロツメクサに産卵可能な雌が個体群内に低頻度で存在すると考えられた。

本種におけるシロツメ区の蛹体重と総産卵数には正の相関があり、シロツメ区よりもミヤコ区の方が、総産卵数が多かった (Fig. 1-D-3)。他の昆虫類においても蛹体重とその子の数に相関があり、蛹体重を雌の繁殖力を測る指標としている (たとえば Armbruster and Hutchinson, 2002; Zhang *et al.* 2012 など)。すなわち、体サイズが大きい雌ほど、高い繁殖力を持つと言える。また、産卵数の増加は、種内の競争だけでなく、第2節で見られたような寄生圧に対しても有利に働くと考えられる。これらのことから、いずれの個体群においてもシロツメクサよりもミヤコグサを利用する方が、適応度が高いことが明らかになり、野外においては、シロツメクサを利用する近畿-1個体群は、ミヤコグサを

利用する近畿-2 個体群と同等かそれ以上の適応度を持つと考えられた。

関東-1、関東-2、近畿-1 では、産卵選好と幼虫の発育の両結果から、シロツメクサを利用することが明らかになり、野外の寄主植物利用状況と一致した。また、中部、近畿-2、近畿-4、九州-1 では産卵選好性が制限要因となり、シロツメクサを利用できないと考えられ、これも野外の観察と一致した。四国の個体群では、体サイズも大きく、シロツメクサを利用して十分に発育することが明らかになったが、シロツメクサへはほとんど産卵せず、野外での利用は困難と考えられた。九州-2 では、野外でシロツメクサを利用しているという報告はないが、産卵選好実験の結果から、野外で利用している可能性は否定できなかった。以上のように、成虫と幼虫の寄主植物に対する利用能力は、必ずしも対応しないことが明らかになった。また、野外でシロツメクサの利用が報告されている個体群では、シロツメクサへの産卵能力を有していることと体サイズが大きいことが示され、シロツメクサの野外での利用にはどちらの形質も必要である可能性が考えられた。他のチョウ類でも、植物に対する親と子の感覚応答、選好性に差があり、幼虫が前適応しているにも関わらず、母親の過剰防衛によって寄主範囲が限定されている例が知られている (Smiley, 1985; Honda and Hayashi, 1995a 1995b)。雌の産卵能力が寄主範囲を制限するのは、幼虫の移動性には限界があり、適した植物にまで移動することが困難であるからである (Thompson and Pellmyr 1991; Zalucki *et al.* 2002; Rhainds *et al.* 2008)。

本種では、いずれの個体群でもシロツメ区よりミヤコ区の体サイズが大きく、ミヤコグサに対する発育と繁殖力は高いと考えられたが、近畿-1、関東-1、関東-2、関東-3 では、シロツメクサに産卵していた。幼虫が利用できる寄主植物が複数ある場合でも、理論的には、母親は、子の生存率、繁殖率がもっとも高くなる植物に産卵するはずである (Awmack and Leather, 2002)。しかし、幼虫の発育に適さない植物に産卵選好を持つ種も知られており、幼虫が寄主植物に対して生理学的な利益をもっていないなくても、植物に関連する天敵を対処するのに適している可能性があることや、幼虫の進化が成虫よりも遅れていることなどから説明されている (Ohsaki and Sato, 1994; Forister, 2004)。本種では、シロツメクサに産卵選好を持つ個体群では、ミヤコグサがほとんど生育しない環境であることから、ミヤコグサの有無とシロツメクサへの産卵能力は関連していると考えられる。

以上のような第1章の結果から、本種は、1年に5、6世代発生し、冬季に幼

虫で休眠に入り、移動性が低いことがあきらかになった。また、人工条件下による繁殖では、野外で採集した雄個体が有用であることが判明した。さらに、いずれの個体群でもミヤコグサの利用能力は高かったが、シロツメクサも利用が可能であるのは一部の個体群のみで、その程度は個体群によって異なると考えられた。

第2章

配偶行動と近縁種の影響

第2章の緒言

有性生殖を行う動物では、雌雄が会うことは子孫を残すために不可欠であり、異性を発見し、互いに同種と認識したあと、交尾にいたる一連の行動を配偶行動と呼ぶ(本田, 2005a)。チョウ類の配偶行動のメカニズムについての研究は、ミドリヒョウモン *Argynnis paphia* (Magnus, 1950) などでも先駆し、その後さまざまな種で明らかになってきた。保全における累代飼育技術の確立では、配偶行動が空間や環境の制限を受けるため、人工産卵や交配が困難である場合が多く、本種をはじめ(第1章第2節参照)、オガサワラシジミ *Celastrina ogasawaraensis* (中村, 2009) などでも交配が大きな課題となっている。配偶行動は、同属間や近縁種間では、おおまかに類似性が見られることも少なくないが、種によって異なっていると考えられているため(本田, 2005a)、種ごとの行動解析が必要である。本種の配偶行動を解析する上で、比較対象としてヤマトシジミ *Pseudozizeeria maha* を用いた。

ヤマトシジミは本種と同じヒメシジミ族に属しており、同様に草地環境に生息している(白水, 2006)。本種とヤマトシジミは後翅裏第6室の黒斑の位置の違いで区別することができるが、翅の斑紋パターンは酷似している(白水, 2006)。この両種が同所的に存在する中で、どのように同種を認識しているかを調査することは、本種の雌探索の鍵刺激だけでなく、種間の相互作用を明らかにする重要な観点である。

また、本種は、2008年にヒメシルビアシジミ *Zizina otis* から独立した種で(Yago *et al.*, 2008)、本種は温帯に、ヒメシルビアシジミは熱帯から亜熱帯に広く分布し、国内においての分布域は隔離しているようであったが、1995年および2008、2009年にシルビアの分布の南限である鹿児島県種子島にごく近い屋久島でヒメシルビアシジミが記録され、北上にともなう分布拡大が指摘されている(久保田, 2009; 河添, 2012)。シルビアシジミ属 *Zizina* のニュージーランド固有の *Z. oxleyi* が、人為的に移入された *Z. otis labradus* によって分布を徐々に侵食され、絶滅の危機に瀕している例がある(Yago *et al.*, 2008)。北上しているチョウ類の例は、ナガサキアゲハ *Papilio memnon* (Yoshio and Ishii, 1998; 吉尾, 2002) やツマグロヒョウモン *Argyreus hyperbius* (白水, 2006) がよく知られており、とくに南西諸島を北上し、九州本島に上陸したものでは、タイワンクロボシシジミ *Megisba malaya*、ナミエシロチョウ *Appias paulina*、ベニモンアゲハ

Pachiliopta aristolociae (白水, 1989 ; 福田, 2012) などが報告されている。このことから、ヒメシルビアシジミが今後、分布を拡大し、本種と同所的に生息する可能性が考えられる。

本章第1節では、本種の配偶行動を観察し、雄の日齢との関係を合わせて考察した。第2章では、斑紋が酷似するヤマトシジミと比較して、雌探索の鍵刺激や種間の相互作用を調査した。第3章では、遺伝的に極めて近縁な種ヒメシルビアシジミ *Z. otis* との雑種形成の可能性と F1 個体の発育について調査した。

第1節 配偶行動の観察

方 法

近畿-1で採集した個体の子世代の雌8個体を2012年6月22日に、近畿-2で採集した個体の子世代の雌8個体と近畿-1と近畿-2の交雑個体の雌5個体を7月28日に、同様の交雑個体の雌7個体を8月31日に、近畿-1において、生息地吹流し法（第1章第2節参照）を用いて、雄の行動を記録した。つまり、雄はすべて近畿-1の個体である。提示した雌は、ミヤコグサまたはシロツメクサを与え、25°C16L-8D条件で飼育したものである。

野外雄の雌に対する関心度を、「まったく交尾試行しなかった」「1度交尾試行した」「2度以上交尾試行した」の3段階に区別し、記録した。雄の翅の新鮮度については、翅に損傷が見られないものをA、一部で鱗粉の脱落が見られるものをB、全体で鱗粉の脱落が見られるものをCとした。また、野外雄に雌を提示したときに、まったく交尾試行しなかった個体に、別の雌を提示する実験も行った。

結 果

2012年6月22日に生息地で雄14個体を採集し、雌8個体に提示したところ、3ペアの交尾が成立した（Fig. 2-1-1）。7月28日は、雄31個体を採集し、雌13個体に提示して、3ペアの交尾が成立した（Fig. 2-1-2）。8月31日は、雄14個体を採集し、雌7個体に提示して4ペアの交尾が成立した（Fig. 2-1-3）。翅の新鮮度に区分して行動を比較すると、新鮮度Aの個体は、新鮮度B、Cと比べて、交尾試行をほとんど行わないことが明らかになり、Fig. 2-1-1とFig. 2-1-3では、雌への関心度と翅の新鮮度には関連があった。また、成立した10ペアの交尾について、雄の翅の新鮮度で分類すると、雄はすべて新鮮度BまたはCの個体であった（Fig. 2-1-4, 2-1-5, 2-1-6）。交尾を受け入れた雌の日齢は、1日目5個体、2日目5個体、3日目が1個体であった。雌の入れ替えを行った実験では、近畿-2の個体を交雑個体に入れ替えた区で、8回中3回交尾試行を行う個体が見られたが、交雑個体を近畿-2の個体と入れ替えた区では2回中2回とも交尾試行は見られなかった。

第2節 雌探索におけるヤマトシジミとの配偶行動の比較

方 法

2010年9月26日、10月6日に近畿-1で、10月11日に堺市にある大阪府立大学の圃場（以下、大阪府大）で実験を行った。地上部が約20 cmとなるように地面に刺した棒か、または地上部が約20 cmになる葉面の先に、3号針の虫ピンでモデルを設置した（Fig. 2-2-1）。モデルには、死亡して1週間以内の個体の標本を用いた。翅を閉じた状態のものを「翅裏モデル」、翅を開いた状態のものを「翅表モデル」、後翅裏の第6室の斑紋を油性マーカー（黒、細、ゼブラ株式会社製）で塗りつぶしたものを「マークモデル」、透明粘着テープで封入したものを「封入モデル」とした。設置したモデルと実験日時は以下の通り。野外における照度は照度計（TR-74Ui、最高照度120,000 lx、株式会社ティアンドデイ製）を用いて測定した。

9月26日、10月11日は、シルビアシジミの翅裏雄、翅表雄、翅裏マーク雄、翅裏封入雄、翅裏雌、翅表雌、翅裏マーク雌、翅裏封入雌と、ヤマトシジミの翅裏雄、翅表雄、翅裏雌、翅表雌のモデルを提示した。10月6日は、シルビアシジミの翅裏雄、翅表雄、翅裏雌、翅表雌、ヤマトシジミの翅裏雄、翅表雄、翅裏雌、翅表雌、ツバメシジミの翅裏雄、翅裏雌のモデルを提示した。

各モデルの設置間隔は40cm以上開けた。野外で飛翔する個体が各モデルに対してどのような反応を示すかを観察し、記録した。飛来数は同一個体の重複カウントを含んでいる。なお、実験方法や配偶行動の分類はヤマトシジミの配偶行動に関するWago *et al.* (1976)を参考にした。

結 果

近畿-1で飛翔が確認されたシジミチョウ科は、本種、ヤマトシジミ、ツバメシジミ *Everes argiades*、ウラナミシジミの4種、府大では、ヤマトシジミ1種のみであった。飛翔する個体は、各モデルに対して、接近し、求愛ポーズを取るなどした後、交尾を試みようとして腹部を曲げる個体があった。求愛行動が見られたのはすべて雄で、雌は行わなかった。観察された配偶行動を以下のように分類した。モデルを中心とした半径20 cm以内に飛翔個体が入ることを「接近」、モデルの周囲でポーズをとることを「求愛」、モデルに体の一部が触れることを「接触」、モデルに対して腹部を曲げることを「交尾試行」とした。

近畿-1における9月26日の合計飛来雄数は本種が48回、ヤマトシジミが10回であった。本種飛翔雄は本種雄の翅裏モデルに対して「接近」「接触」「交尾試行」が見られ、他のモデルに対しては、「接近」はしたものの、「接触」に至ることはなかった (Fig. 2-2-2)。ヤマトシジミ飛翔雄は、本種雄の翅裏モデルに対して「交尾試行」が1回、ヤマトシジミ雄の翅裏モデルに対して「接触」が1回見られた。

近畿-1における10月6日の合計飛来雄数は、本種が71回、ヤマトシジミが6回であった (Fig. 2-2-3)。本種飛翔雄は、本種雄雌の翅裏モデルに対して強い関心を示し、「交尾試行」が見られたが、ヤマトシジミに対しては「接近」すらしなかった。雌の翅裏マークモデルに対して交尾試行を行ったが、封入モデルに対しては関心を示さなかった。ヤマトシジミ飛翔雄は、本種とヤマトシジミの翅裏モデルに1回ずつ接近したのみであった。

府大における10月11日の合計飛来雄数はヤマトシジミが66回であった (Fig. 2-2-4)。ヤマトシジミ飛翔雄は、本種雄とヤマトシジミ雌雄の翅裏モデルに対して、「求愛」や「接触」が確認され、ヤマトシジミ雌の翅裏モデルに対してのみ、交尾試行が見られた。

配偶行動の順序については、両種間で異なった。ヤマトシジミは、「接近」し、10~30秒間の「求愛」を行いながら「接触」し、「交尾試行」に至ったが、本種は「接近」した後、瞬時に「接触」、「交尾試行」に至ることが明らかになった。

本種雌雄とヤマトシジミの雄の飛来が観察された回数を30分ごとにまとめ、照度のデータと比較した (Fig. 2-2-5)。本種の飛来は9:00~15:30まで継続して観察され、雄の飛来数は雌よりも多かった。交尾時の照度を解析すると、平均約60,000 lx (n=8)、最低照度は45,000 lxであった。

照度は11~13時をピークに大きく山型となり、本種の野外雄が本種の雄と雌のモデルに対して行った交尾試行の継続時間(中央値)は、それぞれ20 (n=14)、5秒 (n=8) であった (Fig. 2-2-6)。

第3節 近縁種ヒメシルビアシジミとの交雑可能性

方法

近畿-1 で採集した雌から採卵した子世代を 25°C16L-8D 条件で飼育した。羽化した雌と沖縄県石垣市で採集したヒメシルビアシジミの雄を円筒型ネット（第1章第2節参照）に入れて交配を試みた。交尾後、ミヤコグサとシロツメクサを提示し、採卵した。得られた卵は2齢まではシロツメクサの生葉で飼育し、3齢以降はシロツメクサの人工飼料を用いて飼育した。比較のため、ヒメシルビアシジミをコメツブウマゴヤシ、ヤハズソウ、ミヤコグサ、シロツメクサのいずれかで飼育した。ヒメシルビアシジミは、ふ化から蛹化まですべて生葉で飼育した。その他の飼育法については第1章第1節と同様である。

結果

合計で、2ペアの交配が成立した。一度交尾が成立したように見えたが、生殖器が離れた例もあった。成立した交配のそれぞれのブルードの名称を T298-1、T298-2 とした。ふ化率は、T298-1 が 78% (n=251)、T298-2 が 100% (n=120) で、ブルード間で有意差があった (χ^2 検定)。ふ化した幼虫を、それぞれ 60 個体ずつ飼育し、卵からの累積脱皮率を示した (Fig. 2-3-1)。T298-1、T298-2 とともに約半数の個体が 40 日以内に羽化にいたったが、残りは過剰脱皮を繰り返し、60 日を過ぎてから羽化個体が出現し始めた。40 日以内に羽化した個体はすべて雄で、それ以降に羽化したものはすべて雌であった。F1 個体の雌雄の幼虫期間を比較すると、雄が 15.4 日、雌が 58.8 日で雄に比べて雌が約 4 倍近く長いことが明らかになった (Student's *t*-test)。蛹体重は雄が 39.3 mg、雌が 48.9 mg で、雄よりも雌の方が有意に重かった。羽化した雌の腹部を解剖したところ、成熟卵が見られた。

ヒメシルビアシジミの幼虫期間はコメツブ区がもっとも短く、16.1 日で、続いてヤハズ区が 23.2 日、シロツメ区が 19.3 日でそれぞれ有意差があった (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。蛹体重は、シロツメ区でもっとも重く 24.3 mg で、続いてコメツブ区 21.4 mg、ヤハズ区で 19.8 mg であった (検定)。シロツメ区における本種、ヒメシルビアシジミ、F1 雄個体における平均幼虫期間を比較したところ、本種 (18.1 日) とヒメシルビア (19.3 日) で差はなかったが、F1 雄個体 (16 日) は両種よりも短かった (Fig. 2-3-2)。平均蛹体重は、シルビ

ア、ヒメシルビア、F1 個体でそれぞれ 46、24、39 mg であった (Fig. 2-3-3)。

F1 個体の翅の斑紋パターンを本種とヒメシルビアシジミと比較したところ、本種はヒメシルビアシジミよりも裏面各室の小黒斑が大きく、前後翅亜外縁の黒斑列が各室の小黒斑と同等に発達しているなどの点で異なるが、F1 個体では、各室の小黒斑はヒメシルビアシジミよりも大きく、亜外縁の黒斑列は個体によって程度は異なるものの本種よりも発達が弱い傾向が見られた (Fig. 2-3-4)。後翅表面外縁の黒斑列は本種では波状に、ヒメシルビアシジミでは線状となる傾向が強いが、F1 個体では両方のパターンが見られた (Fig. 2-3-5)。

第2章の考察

本種の配偶行動においては、雄は、翅の新鮮度が低いほど雌に対する関心が高く、同様に、交尾成功率も翅の新鮮度が低い雄で高く、日齢の依存性が認められた。一方、雌は羽化直後から雄を受け入れることが明らかになった。雄に対する受容性は、卵成熟と密接に関係しているため、日齢に依存すると考えられている（本田，2005）。たとえばキタキチョウ *Eurema mandarina* では羽化1日後で受け入れ率が低く、4日目以降でかなり高くなることや（Hiroki and Kato, 1996）やマダラチョウ類では、生殖休眠のため羽化後数か月、雄を受け入れない種がいることが知られているが（本田，2005）、本種の場合は、これとは対照的に羽化後すぐに交尾、産卵可能で、ホソオチョウ *Sericinus montela* などと同様であった。

チョウ類の異性の発見と認知にはあらゆる感覚器官を通して行われるが、主に視覚と化学感覚が重要な働きをなしている（Rutowski, 1991; Vane-Wright and Boppré, 1993）。一般的に、チョウ類の配偶行動では、遠距離では視覚信号で、近距離では嗅覚などの化学信号が重要な役割を果たしているとされている（本田，2005a）。雄の探雌行動は、巡回型と呼ばれる一定の範囲を飛行しながら見回っていくタイプと、待ち伏せ型と呼ばれる一定の場所にとどまって雌がなわばりに侵入してくるのを待つタイプにおおまかに分けることができ（たとえば Scott, 1974, 1975; Lundgren, 1977; Davies, 1978, Pivnick and McNeil, 1985; Dennis and Williams, 1987; Wickman, 1992, Takeuchi and Imafuku, 2005a, 2005b）、1種が使い分ける例も見られる（Van Dyck *et al.*, 1997a, 1997b; Takeuchi, 2010）。本研究においては、静止しているモデルに対して複数の本種とヤマトシジミの雄が何度も飛来し、飛び立つ行動が見られたため、どちらも巡回型の探雌行動を取ると考えられた。

両種飛翔雄は翅裏モデルに対してのみ関心を示し、翅表モデルにはほとんど接近しなかったことから、両種ともに翅を閉じた状態が、雌探索の視覚イメージであることが示唆された。Wago *et al.* (1976) でも、ヤマトシジミ雄が翅を閉じた状態で視覚的に認識しているとしており、本種でも同様の結果が得られた。本種とヤマトシジミは、どちらも同種のモデルに対して強い関心を示すことが明らかとなった。本種雄は本種の雌雄どちらのモデルに対しても配偶行動を示した。また、交尾試行の継続時間を比較したところ、むしろ雄に対して長

い時間試行を行ったことが明らかになり、接触時に雌雄を判断していない可能性が高かった。Wago *et al.* (1976) はヤマトシジミの既交尾雌は羽ばたき拒否を行うことが観察され、雌が羽ばたくことで雄は求愛行動を中止することがわかっている。モンシロチョウ属 (Suzuki *et al.*, 1977) やモンキチョウ属 (Silberglied and Taylor, 1978) では、腹部を曲げるなどして、交尾拒否の姿勢を取ることも知られている。本種の未交尾雌が雄に対して、はばたき行動を行う例が数回見られ、交尾拒否の意義を持つものと推察された。また本種の雄は他個体の接近に対して、翅を震わせたり、はばたく行動を示すことが明らかになっている (第1章第2節参照)。本種雄は、静止している個体の雌雄の区別しておらず、実際に野外では、本種の飛翔雄が静止雄に接近した場合、静止雄が羽ばたくことで飛翔雄が回避する行動が見られており (坂本, 未発表)、羽ばたき反応を認識することで雄と判断するのではないかと推察された。しかし、小原・日高 (1964) は、モンシロチョウでは、飛翔雄は静止雄に関心を持たないが、静止雄は他の雄が近くを飛翔すると羽ばたき反応を行うため、この静止雄の行動は雄であることを示す信号刺激ではないとしており、雄のはばたき反応には種によって異なる意義を持つと考えられる。本種は雌雄の区別なく接近し、羽ばたき反応が見られなければ交尾試行を行うと考えられた。

ヤマトシジミ雄は、本種のモデルに対して交尾試行したのは1例であったものの、求愛ディスプレイを行い、接触するにいたった個体は数多く観察された。このことから、ヤマトシジミはモデルに接触してから、同種を認識していると考えられた。Wago (1977) はヤマトシジミの雄が本種の雌雄どちらに対しても交尾試行を行うことを明らかにしており、異種に関心を持つという点では本研究と結果はほぼ一致するが、本研究における接触後交尾試行に至る個体は少なかったことや本種雌に対する関心が薄かったという点は、Wago (1977) を再現しなかった。

一方、本種雄はヤマトシジミのモデルに対して接近する頻度が少なく、接触に至った個体は皆無であった。このことから、モデルに接触する前に、本種はヤマトシジミを異種と認識していると推測された。同種の判断は視覚的に行われたと考えられるが、嗅覚信号で区別している可能性も否定できない。封入モデルにまったく関心を示さなかったのは、嗅覚信号を遮断したことによるものと推測できるが、透明なテープによる光の反射などに変化があり、視覚信号が変わったからとも判断できた。Wago *et al.* (1976) では、ヤマトシジミは、封

入したモデルでも同種に対して交尾試行をとったとされ、本研究においても、本種の封入モデルに対して交尾試行が見られた。このことから本種とヤマトシジミにおける同種認識の方法または精度は異なると推測された。また、マークモデルに対しても交尾試行が見られたことから、後翅第6室の斑紋の位置は、両種を区別するのに重要な要素ではないことが明らかになった。

また、Wago *et al.* (1977) は、両種翅裏の可視光における反射スペクトルに、ほとんど差がないこと示している。チョウが紫外線を知覚できることは知られているが、320-400nm の近紫外領域で反射パターンに特徴を持つ種があり（たとえば Scott, 1986; 松野, 1988 ; Imafuku *et al.*, 2002）、これが雌雄の認知や異種間の識別の役立っている例が報告されている（Silberglied, 1979）。そこで本種とヤマトシジミの雌雄の裏面を、紫外線透過フィルタを装着したデジタルカメラで撮影した（Fig. 2-D-1）。その結果、本種とヤマトシジミの種間、種内の雌雄間で可視領域と紫外領域による差異は認められず、紫外領域が種間や雌雄の識別に使用されている可能性は低いことが明らかになった。

配偶行動の順序は両種で異なり、接近から交尾試行に至るまでの時間は、本種の方がはるかに短く、瞬時に行われた。Wago *et al.* (1976) では、ヤマトシジミが求愛の姿勢を取ることは、雌を「説得する」意味を持つと推察している。本種においては、特別な求愛行動を行うことなく、交尾にいたることが明らかになった。このような行動様式は、ギフチョウ（Matsumoto, 1987）やオオカバマダラ（Pliske, 1975; Wells and Wells, 1992）で知られている。本種では、雌に交尾試行せずに求愛だけを行う様式は見られなかったが、交尾試行中に翅を震わせる行動が見られ、これが求愛を兼ねている可能性も考えられた。

本種と近縁種ヒメシルビアシジミの交配実験では、両種間で交配が起こり、F1 雌個体の発育が遅延することが明らかになった。種間雑種において、染色体上の遺伝子間の不和合により、ヘテロの性染色体を持つ性で致死や不妊が見られる現象がある（ホールデンの法則）（Haldane, 1922; Coyne, 1985; Futuyma, 1986）。ハンドペアリング法によるアゲハチョウ科に属するさまざまな種間雑種の F1 個体で雄のみが羽化し、チョウ目においては雌がヘテロの性染色体を持つためと考えられている（阿江, 1986）。本種とヒメシルビアシジミの種間交雑においても、雌の発育が遅延したことはこの法則で説明できると考えられた。

配偶過程において適応度の低下をもたらすあらゆる種類の種間相互作用には様々な段階があるが、それが繁殖成功度を下げる場合はすべて「繁殖干渉」と

呼ばれ、近年注目をされている概念である (Gröning and Hochkirch 2008 ; 高倉他, 2010)。本種の F1 個体の適応度の低下は、種間の接合後隔離がある程度存在することを示したが、繁殖干渉の可能性が示唆された。また、ヤマトシジミの雄から本種が求愛行動を受けることで、交尾機会の減少などの繁殖干渉が起こる可能性が示唆された。

以上のような第2章の結果から、本種雄の雌に対する関心の高さは、日齢と関係することが判明した。また、本種はヤマトシジミやヒメシルビアシジミから求愛行動を受けることが明らかになり、同所的に生息する場合には、繁殖干渉が起こる可能性が考えられた。

第3章

Wolbachia 感染と寄主操作

第3章の緒言

昆虫と共生細菌との関係は多様であり、宿主範囲は広い (e.g. Buchner, 1965; Moran and Telang, 1998; Stouthamer *et al.*, 1990)。アブラムシやシロアリなどの宿主昆虫との間に相利共生関係を築く共生細菌もいれば、(たとえば、Ishikawa *et al.*, 1989 ; Inoue, 2000 など)、一方で片利共生を築く細菌もいる (たとえば、Bovien, 1937 など)。 *Wolbachia* 属の共生細菌は、 α プロテオバクテリア綱に属し (O'Neill *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995)、後者の片利共生タイプの内部共生細菌である。 *Wolbachia* はさまざまな節足動物に広く共生し (Werren *et al.*, 1995; Werren, 1997)、細胞質不和合 (Hoffmann *et al.*, 1990; Turelli and Hoffmann, 1995; Poinso *et al.*, 2003)、産雌性単為生殖 (Stouthamer *et al.*, 1990; Weeks and Breeuwer, 2001)、遺伝的雄の雌化 (Rigaud *et al.*, 1991; Hiroki *et al.*, 2002; Negri *et al.*, 2008)、雄殺し (Hurst *et al.*, 1999; Fialho and Stevens, 2000)、などの多様な繁殖操作を行うことで知られている。 *Wolbachia* と宿主の進化は理論的に考察されており、一般的に細胞質ゲノムは母系遺伝するため、雌に性比が偏ると細胞質ゲノムにとって有利であると考えられている (Werren *et al.*, 1988)。

近年、本種が大阪国際空港とその周辺で生息が確認されたが (Minohara *et al.*, 2007; Ishii *et al.*, 2008)、同地で採集された個体の飼育実験により、子世代が雌ばかりになる事例が報告された (Minohara *et al.*, 2007)。そこで本章第1節では、日本国内の14ヶ所と韓国の2ヶ所から本種成虫を採集し、 *Wolbachia* 感染とその頻度、性比などを調査した (Sakamoto *et al.*, 2011)。通常 *Wolbachia* の検出と系統の調査には、簡便で検出感度が高く、系統関係を反映することなどから、遺伝子解析が用いられているため、本研究においても、遺伝子解析を利用した。さらに第1節の結果、本種の雄を選択的に死亡させることが明らかになった *Wolbachia* に感染した雌個体から、翅の色彩が雄様の成虫とファレート成虫が得られたため、第2節ではそれらの外部生殖器を観察し、性別を調査した (Sakamoto *et al.*, 2010)。第3節では、感染状況の異なる雌雄の組み合わせで交配実験を行い、ふ化率、性比を調査した。第3節の結果から、性モザイクの出現頻度と体内における *wEmeTn2* 系統 *Wolbachia* の密度が関連する可能性があったため、第4節では *Wolbachia* 密度を定量PCRによって調査した。

第1節 性比異常と *Wolbachia* 感染

採集地と採集日

採集地と採集日は以下の通り (Table 3-1-1)。日本国内では、2007年9月9日、9月28日、10月20日、10月21日、11月3日、11月4日、2011年9月17日に関東地方 (4ヶ所、関東1~4)、2011年10月23日に中部地方 (1ヶ所、中部)、2004年9月、10月、11月、2006年6月、8月、10月、2007年4月28日、7月5日、10月22日、11月7日、2009年6月15日、7月28日、8月27日、2010年8月11日に近畿地方 (5ヶ所、近畿-1~5)、2012年7月31日に四国地方 (1ヶ所、四国)、2001年6月27日、2010年9月8日、2011年11月12日、九州地方 (3ヶ所、九州1~3)、計14ヶ所と、2012年8月20日、8月23日に韓国 (2ヶ所、韓国-1~2) で本種雌雄成虫を採集した (Fig. 1-1-1)。第2章で本種と交配したヒメシルビアシジミの雄2個体についても解析した。

方法

Wolbachia 感染の有無とその系統の配列決定

(1) DNA 抽出

各個体群から採集した雌雄成虫の胸部筋肉、中脚、後脚を試料として、DNeasy Tissue Kit (Qiagen) を用いて全DNAを抽出した。

(2) PCR (Polymerase Chain Reaction : ポリメラーゼ連鎖反応)

抽出された全DNAを鋳型として、*Wolbachia* の膜たんぱくに関与する遺伝子 *Wolbachia* surface protein (*wsp*) と細菌類の細胞分裂に関与する遺伝子 Filamenting temperature-sensitive mutant Z (*ftsZ*) の一部を Ex Taq DNA Polymerase (Takara), *rTaq* DNA Polymerase (Toyobo)、*Taq* DNA Polymerase (Finnzymes) または KOD Dash (Toyobo) を用いた PCR 法で増幅した。*wsp* 領域の PCR にはプライマー81F、691R (Braig *et al.*, 1998) を、*ftsZ* 領域はプライマーftsZBf、ftsZBr (Werren *et al.*, 1995) または FTSZFT2、FTSZRTB2 (Wenseleers *et al.*, 1998) 用いた。プライマーはいずれも *Wolbachia* の遺伝子を特異的に増幅するように設計されている。プライマーの塩基配列は以下の通り。

81F 5' -TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3'
691R 5' -AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'

ftsZBf 5' -CCGATGCTCAAGCGTTAGAG-3'

ftsZBr 5' -CCACTTAACTCTTTCGTTTG -3'

FtsZFT2 5'-GAAGGTGTGCGACGTATGCG-3'

FtsZRTB2 5'-ACTCTTTCGTTTGTTTGCTCAGTTG-3'

PCR はサーマルサイクラー (C1000™、BIO-RAD) を用い、以下の温度、サイクルで行った。

wsp 94.0°C : 30 秒 1 回
 94.0°C : 30 秒、55.0°C : 30 秒、75.0°C : 2 分 40 回
 72.0°C : 2 分 1 回

ftsZ 94.0°C : 5 分 1 回 94 °C,
 94.0°C : 30 秒、60.0°C : 1 分、72.0°C : 2 分 45 回
 72.0°C : 2 分

PCR 産物の一部を、1%アガロースゲルを用いて 1×TAE バッファ中で 25 分間 (100V) 電気泳動を行い、泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し、バンドの出現によって目的領域の増幅を確認した。

(3) PCR 産物の精製

増幅した PCR 産物は AMPURE magnetic bead system (Agencourt) を用いて精製した。

(4) サイクルシーケンス

精製した PCR 産物を ABI PRISE® BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンスを行った。サイクルシーケンスには前述のサーマルサイクラー (PC-802 ; ASTEC) を用いた。サイクルシーケンスの温度設定は以下の通り。

96.0°C : 1分 1回

96.0°C : 10秒、50.0°C : 5秒、60.0°C : 2分30秒 40回

(5) サイクルシーケンス産物の精製とシーケンス

サイクルシーケンス産物を Clean SEQ (Agencourt) を用いて精製した後、DNA シーケンサーABI PRISE[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定した。

分子系統の解析

本種から得られた塩基配列に加えて、これまでの研究で知られている別種に感染する *Wolbachia* の塩基配列を Genbank より引用し、CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) を用いてアライメントを行った。アライメントを行った配列をもとに、PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) を使用して、木村2変数法 (Kimura, 1980) で補正した NJ 法 (Saitou and Nei, 1987) によってハプロタイプ系統樹を作成した。

飼育実験

採集した雌成虫または野外雄と交配させた飼育雌にシロツメクサまたはセイヨウミヤコグサを与えて採卵した。得られた卵は産みつけられた寄主植物とともに、産卵日ごとに小型透明プラスチックシャーレ (Becton Dickinson 社製; 直径 50 mm、高さ 9 mm) に分けて飼育を行った。幼虫の餌は、2 齢まではシロツメクサまたはセイヨウミヤコグサの生葉をどちらか一方を与えた。3 齢以降は、インセクタ F-II (日本農産工業社製) に寄主植物の乾燥粉末を重量比で 30% 配合し、調整した人工飼料を与えて飼育した。また、産卵から羽化までの期間は、25°C の 16L-8D (明期 16 時間、暗期 8 時間) で飼育し、ブルードごとのふ化率、性比を記録した。性は羽化直後の翅の色彩からを判断した。その他の飼育方法は第 1 章、第 1 節と同様に行った。すべての統計解析には SPSS version 15.0 for Windows (SPSS Inc)、または R 2.8.1 software (R Development Core Team) を使用した。

抗生物質処理とクロマチン染色

採集雌に、餌として、1 日目は 5% ショ糖溶液、2 日目から 4 日目は 0.20% w/v

テトラサイクリンを含む5%のショ糖溶液、5日目以降は5%ショ糖溶液を与えてシロツメクサを用いて採卵した。得られた卵は前述と同様に飼育し、卵のふ化率、幼虫の死亡率、成虫の性比を記録した。また、1日目採卵の子世代と5日目採卵以降の子世代から全DNAを抽出し、前述のように *wsp* 領域をPCR法で増幅し、バンドの出現によって *Wolbachia* 感染の有無を調査した。さらに、得られた子世代の遺伝的な性を決定するために、27個体の子世代成虫を解剖し性クロマチンを観察した。性クロマチンは、PBSバッファ内で腹部からマルピーギ管を取り出し、約1分間カルノア液（酢酸：メタノール=1：3）に30秒間漬けて固定した後、スライドガラスに乗せて余分なカルノア液を蒸発させた。酢酸乳酸オルセインで約5分間染色し、カバーガラスをかけ、押しつぶさずに光学顕微鏡（E400, Nikon）を用いて観察した。

結 果

3系統の *Wolbachia* の感染頻度

wsp 領域を増幅した結果、関東-1では20% (n=10)、関東-2では100% (n=5)、関東-3では100% (n=1)、関東-4では86% (n=7)、中部では50% (n=2)、近畿-1では76% (n=95)、近畿-3では81% (n=21)、九州-2では71% (n=7)、九州-350% (n=1)の採集個体から *Wolbachia* が検出されたが、近畿-2 (n=14)、近畿-4 (n=33)、近畿-5 (n=5)、四国 (n=10)、九州-1 (n=1)では0%であった。*wsp* 領域では、2種類の配列が得られ、塩基数はプライマー配列を除いてそれぞれ、555、558塩基であった (DDBJ/EMBL/Genbank アクセション No.: AB512756, AB512757) (Fig. 3-1-1)。*ftsZ* 領域では、不確定な塩基配列を除いた621 bpを用いて配列を決定し、3種類の配列が確認された (DDBJ/EMBL/Genbank アクセション No.: AB512758, AB512759、未登録) (Fig. 3-1-2)。*wsp* と *ftsZ* 領域の塩基配列合わせた結果、3種類の配列が確認された。ヒメシルビアシジミは、2個体中1個体が *Wolbachia* に感染しており、上述の3系統とは異なる系統であることが明らかになった。

3系統の *Wolbachia* 間の差異は、*wsp* 領域では91塩基 (16%)、*ftsZ* 領域では14塩基 (2%)であった。近畿-1と大阪では2系統の *Wolbachia* に感染しており、それぞれの感染個体の割合は、*wEmeTn1*: 61%、*wEmeTn2*: 15% (n=95)、近畿-2では *wEmeTn1*: 71%、*wEmeTn2*: 10% (n=21)であった。鴨川では *wEmeTn1*: 0%、*wEmeTn2*: 38% (n=13)であった (Table 3-1-2)。野外で採集

した雄個体からは *wEmeTn2* は検出されなかった。また、2 系統の *Wolbachia* に同時に感染していた個体は見られなかった。

性比異常と *Wolbachia* 感染との関係

近畿-1 の野外雌から得られた子世代のふ化率と雌の割合を示した (Table 3-1-3)。*wEmeTn2* 感染雌から得られたブルードのふ化率 (中央値) は 47% であったが、*wEmeTn1* 感染雌と非感染雌ではそれぞれ 90、88% で、*wEmeTn2* 感染のふ化率は、*wEmeTn1* と非感染に比べて有意に低かった (Table 3-1-4)。*wEmeTn2* 感染雌 13 個体中 11 個体から得られた子世代はすべて雌になったが、2 個体 (個体番号: S123、T241) から得られた子世代から、雄の翅の色彩パターンを有する 17 個体が羽化したが、ほとんどが羽化不全であった。また、同様に、雄様の翅を有し、ファレート成虫で死亡した個体が 2 個体得られた。*wEmeTn1* 感染雌 (n=24) と非感染雌 (n=12) では子世代ではとくに羽化不全は認められず、性比異常も見られなかった ($p < 0.05$ 、二項検定)。*wEmeTn2* 感染の雌率は、*wEmeTn1* と非感染に比べて有意に高かった (Table 3-1-4)。関東-1、関東-2、関東-3 で見られた *wEmeTn2* 感染雌の子世代もふ化率が低く、羽化個体はすべて雌であった。関東-1 の *Wolbachia* 非感染の 1 個体からは雄に偏った子世代が得られた。その他の個体群では、性比異常は見られなかった (Table 3-1-5)。

抗生物質処理とクロマチン染色

wEmeTn2 に感染した雌 1 個体の 1 日目採卵から 12 日目採卵までの雌の割合とふ化率を採卵日ごとにまとめて集計した (Table 3-1-6)。1 日目採卵から 4 日目採卵の子世代の平均ふ化率は 57%、雌の平均割合は 100% (n=28) であったが、6 日目採卵から 12 日目産卵の子世代の平均ふ化率は 100%、雌の平均割合は 60% (n=50) であった (Fig. 3-1-3)。また、子世代の *Wolbachia* 感染について調査したところ、1 日目採卵の子世代 (雌 1 個体) は *Wolbachia* に感染していたが、5 日目採卵以降の子世代 (雄 1 個体、雌 1 個体) は、*Wolbachia* に感染していなかった。翅の色彩から雌と判断された 18 個体、雄と判断された 9 個体のマルピーギ管の細胞を染色したところ、すべての雌で性クロマチンが観察されたが、雄では観察されなかった (Fig. 3-1-4) (Table 3-1-7)。

第2節 性モザイク個体

方 法

2005年6月と2009年4月に近畿-1で採集した雌14個体から得られた子世代を第3章第1節の「飼育実験」の方法と同様に飼育した。本章第1節で雄殺しの *Wolbachia* と考えられた *wEmeTn2* 感染雌の子世代のうち、翅に雄のような色彩を有した個体は、羽化個体が17個体、ファレート成虫で死亡した個体が2個体得られた。そこで、これらの個体の外部形態、交尾器、内部生殖器の観察を行った。比較のために、2005、2009年に採集された *wEmeTn1* 感染雌 (n=5)、*wEmeTn2* 感染雌 (n=6)、*Wolbachia* 非感染雌 (n=3) からさらに子世代を抽出した。前述の3個体を含めて、本節で用いた子世代成虫はそれぞれ15、34、12個体、ファレート成虫それぞれ1、7、2個体であった。死亡して間もない16個体については、PBSバッファ内で開腹し、外部および内部の生殖器と性クロマチンを、実体顕微鏡を用いて観察した (Nikon SMZ1500)。すでに乾燥した46個体については、腹部を切り取り、約80°Cの10%KOH水溶液で15分間浸漬したあと、実体顕微鏡を用いて観察した。解剖は、飼育で得られたすべてのファレート成虫と *wEmeTn2* 感染雌から得られた雄のような翅の色彩を有するすべての個体について行った。*wEmeTn1* 感染雌と *Wolbachia* 非感染雌から得られた成虫個体については、無作為に抽出した雌雄を用いた。*Wolbachia* の感染の有無と系統の解析には、*wsp* 領域を用い、本章第1節の方法と同様に行った。

結 果

wEmeTn2 感染雌の子世代で翅に雄のような色彩を有していた19個体の成虫を解剖した結果、外部生殖器に雄の特徴である *valva* と雌の特徴である卵巣や *papilla analis* が見られた (Fig 3-2-1)。また、これらの個体の前脚は、雌のような形態を有していた。以後、両性の形態的特徴を併せ持つ個体を性モザイクと呼ぶ。また、性モザイク個体についてランダムに抽出した8個体の *Wolbachia* 感染の調査したところ、すべて母チョウと同じ *wEmeTn2* に感染していた。*wEmeTn2* 感染雌の子世代からは性モザイクが確認されたが、*wEmeTn1* と非感染の子世代からは、性モザイク個体はまったく認められなかった (Table 3-2-1)。また、*wEmeTn2* 感染雌 (T241) から得られた雌9個体と性モザイク7個体について、クロマチン染色を行ったところ、雌ではクロマチンの凝集が

観察されたのに対して、性モザイク個体ではクロマチンの凝集はまったく観察されなかった。

なお、とくに詳細に観察した性モザイク 8 個体の交尾器の形態について、Table 3-2-2 に示し、正常な雌雄の交尾器と比較し、以下に記載した。正常な本種の雄は、9 節の腹面に U 字型の *vinculum* という器官を持つ。Valva は腹部基底にある細長い突起で、長く硬い毛を持つ。*Socius* はアーチ状になっており、*falx* は鎌状で細長く、先端部が曲がっている (Fig. 3-2-2f)。正常な本種の雌は、9+10 節由来の柔毛に覆われた *papilla analis* を持ち、側面から見ると三角形である (Fig. 3-2-2d, e)。また、交尾口付近に *lamella* (膈板) と呼ばれる舌状の硬化部が見られ、背面には背板から前方に向かって体内に伸びる 1 対ずつの骨化した *apophysis posterioris* (突出片) がある。

得られた性モザイク個体は、主に 3 つのパターンが認められたため、それらを代表する 3 個体 (S113-1、S123-1、S123-2) の形態について示した。また、性モザイクの 8 個体中 5 個体の翅の色彩は、典型的な雄の特徴を示した。S113-1 の形態は非常に複雑で、未発達な 2 対の *valva* と片方の *valva* が認められた。そのうち 1 対の *valva* と *vinculum* 様の構造は体内に見られた (Fig. 3-2-2a)。S123-2 の外部生殖器の大部分は、雌の特徴を示しており、2 対の未発達な *valva* 様の構造が *lamella* と *papilla analis* の隣接したところにそれぞれ確認された (Fig. 3-2-2b)。S123-1 は腹面に雄の特徴である *phallus*、*valva*、*vinculum*、背面には雌の特徴である *papilla analis*、*apophysis posterioris* が確認された (Fig. 3-2-2c)。

以上のことから、9 節の腹面は *vinculum* や *valva* などの雄の構造を、背面の 9、10 節は *apophysis posterioris* と *papilla analis* などの雌の構造を有する傾向にあることが明らかになった。雄の器官である *socius* は雌の器官の *papilla analis* と相同であり、後者に分化していると考えられた。雄に特徴的な 9 節背面由来の *tegumen* も確認されなかった。これらのことから、本種の性モザイク個体では、背面と腹面はそれぞれ独立に性特異的な形質に分化していると考えられた。一方、S113-1 を例に数個体において、2 対以上の *valva* が確認された。S113-1 の 8 節腹面に位置する突起は、特徴的な形状と剛毛から *valva* であると判断した。また、体腔内に位置した変形した突起についても、同様の判断基準から *valva* と判断した。内側に存在する *vinculum* 様の構造が *vinculum* であるかどうかは明らかではなかった。

第3節 *Wolbachia* 系統間の交配実験

方 法

採集地と採集日・交配実験

wEmeTn1 と *wEmeTn2* の2系統の *Wolbachia* 感染個体と非感染個体の交配実験は、第3章第1節で明らかになった各感染個体と非感染個体が混在する近畿-1と感染個体が見られない近畿-2の個体を用いて行った。

2011年6月24日、6月25日、7月26日、8月9日、2012年5月12日、5月20日に近畿-1で、2011年8月9日、2012年6月24日に近畿-2で、本種雌成虫の採集を行った (Table 3-3-1)。T280 から得られたきょうだいの交配1例を除くすべての交配実験は野外雄を用いた生息地吹流し法で行った。交配実験は、2011年7月26日、8月26日、8月30日、9月8日、9月14日、9月28日、10月4日、10月12日、10月16日、10月18日、11月7日、11月13日、2012年6月24日、7月28日に近畿-1で、2011年8月29日、9月12日、2012年6月24日に近畿-2で実施した (交配実験の母系図は Appendix 参照)。ペアリングに成功した個体は、交尾後すみやかに研究室に持ち帰り、ミヤコグサやシロツメクサを用いて採卵した。ファレート成虫で死亡または羽化した個体の性の判断は、基本的に翅の斑紋と前脚の形態から判断し、*wEmeTn2* から得られた雄の翅の斑紋パターンを有する個体については、腹部を解剖し外部生殖器を観察することで、性モザイク個体か雄個体かを判断した。雌雄成虫は DNA を抽出し、*Wolbachia* 感染の有無とその系統の配列決定を行った (第3章第1節参照)。

結 果

交配実験の結果、*wEmeTn1* と *wEmeTn2* 系統の *Wolbachia* と非感染系統の全6通りの雌雄の組み合わせ、*wEmeTn1* 感染雌と *wEmeTn1* 感染雄 (*wEmeTn1* × *wEmeTn1*、以下同様) が3ペア (すべて近畿-1 × 近畿-1、うち1ペアがきょうだい間の交配)、*wEmeTn1* × 非感染が4ペア (すべて近畿-1 × 近畿-2)、*wEmeTn2* × *wEmeTn1* が7ペア (近畿-1 × 近畿-1:4、交雑 × 近畿-1:3)、*wEmeTn2* 感染雌 × 非感染雌が3ペア (近畿-1 雌 × 近畿-1 雄:2、交雑種 × 近畿-2 雄:1)、非感染と *wEmeTn1* が8ペア (近畿-1 × 近畿-1:6、近畿-2 × 近畿-1:2)、非感染と非感染が4ペア (うち、近畿-1 × 近畿-1:2、近畿-1 × 近畿-2:1、近畿-2 ×

近畿-2 : 1) が得られた。*wEmeTn2* 雌の子世代では、すべてふ化率が低かったが、14~84%とばらつきがみられた。産卵日ごとにふ化率を比較すると、T220とT241から得られた子孫（それぞれT220系統、T241系統、以下同様）10ブルードで、母チョウの日齢経過とともにふ化率の減少傾向が見られた（それぞれFig. 3-3-1、Fig. 3-3-2）。性モザイク個体は10ブルード中7ブルードで確認され、割合はブルード間で0~25%のばらつきが見られた（Table 3-3-2）。また、T220-7からは雄2個体が羽化した。性モザイク個体は、父親の*Wolbachia*感染状況に関係なく出現した。性モザイク個体が見られた7ブルードについて、産卵日ごとに性モザイク率を見てみると、1ブルードでは産卵日による差はほとんどなかったが、6ブルードでは、産卵2日目までは性モザイク個体が出現し、産卵3日目以降は出現しなかった（Fig. 3-3-1、Fig. 3-3-2）。*wEmeTn1* × 非感染の4ペアのうち、2ペアで低いふ化率を示し、それぞれ48、19%であった。それ以外の非感染雌と*wEmeTn1*感染雌の子世代は、父親の感染の有無にかかわらず、すべて90%以上のふ化率を示した。きょうだい間の交配（T280の子世代同士）は1ペアが成立し、95個体の子世代が得られ、ふ化率は74%であった。ふ化個体の羽化率は93%と高かったものの、32%の個体が蛹化時に奇形になり、羽化不全であった。また、性比に偏りはなかった（ $p > 0.05$, binomial test）。

第4節 羽化後の日数と *Wolbachia* 密度

方法

wEmeTn2 感染雌（個体番号：T220-9、T241）から得られた羽化個体に 5% ショ糖液を与え、25°C 16L-8D で飼育した。羽化後 0~9 日目に冷凍することにより死亡させ、DNA 抽出時までそのまま保存した。また、比較のため、T241 から得られた子世代の性モザイク 5 個体と T220-7 から得られた雄 2 個体の *Wolbachia* 密度についても調査した。

(1) DNA 抽出

各個体の胸部の筋肉を試料として、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて全 DNA を抽出した。

(2) 定量 PCR

抽出された全 DNA を鋳型として、*Wolbachia* surface protein (*wsp*) 領域の一部を SYBR Premix Ex Taq (Takara) または THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて定量リアルタイム PCR を行った。*Wolbachia* の密度を本種の核 DNA の増幅量で補正することで評価した。補正に用いる核 DNA 領域は常染色体上にある Elongation factor 1 α (EF-1 α) を選定した。定量 PCR 用のプライマーは、T_m 値が 60°C、配列数が 100bp 前後になるように設計した。*Wolbachia* 用のプライマーは、すでに第 3 章第 1 節で明らかになった 2 系統の *Wolbachia* の *wsp* 領域の配列をもとに Tn2 を特異的増幅する Tn2-158 (5'-AGGGTTGATGTTGAGGGACTTTAC-3') と Tn2-264 (5'-AATCCTGAAAATGCTGCCACACTG-3') を作成した。EF-1 α 用のプライマーは、EFS599 (5'-ATCTCCGGATGGCACGGYGACAA-3') EFA923 (5'-ACGTTCTTCACGTTGAARCCAA-3') (Normark, 1994) を用いて決定した本種の EF-1 α の配列から、EL162 (5'-ACAAAATCGGTGGTATCGGAACG-3') と EL250 (5'-GCTGGGGCAAATACAACAATGG -3') を作成した。各領域を Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System を用いて、以下の温度、サイクルで増幅した。

95.0°C : 10 秒 1 回

95.0°C : 5 秒、60.0°C : 31 秒 40 回

95.0°C : 15 秒 1 回

60.0°C : 1 分 1 回

95.0°C : 15 秒 1 回

(3) 定量の解析

検量線は、1 個体のサンプルを 1、1/2、1/4、1/8 希釈したものの増幅曲線から作成し、Ct 値 (Threshold Cycle) から初期 DNA 量を算出した。*wsp* の増幅量を EF-1 α の増幅量で割った値で *Wolbachia* 密度を推定した。

結 果

T220-9 の子世代はすべて雌であった。羽化日からの日数ごとに *Wolbachia* 密度 (*wsp*/EF-1 α) をプロットし、回帰式を求めたところ、胸部における *Wolbachia* の密度は日齢を経るとともに低下することが明らかになった (Fig. 3-4-1) ($p<0.05$)。また、性モザイク 5 個体の *Wolbachia* 密度は雌と差がなかったが、雄 2 個体の *Wolbachia* 密度は、それらの 1000 分の 1 以下であった。

第3章の考察

遺伝子解析の結果、本種から3系統の *Wolbachia* が確認された。近年の分子系統の研究により、16S リボソーム RNA の塩基配列に基づいて、*Wolbachia* は8つのスーパーグループ (A-H) に分類された (Casiraghi *et al.*, 2005)。そのうち、節足動物で確認された *Wolbachia* の多くがスーパーグループ A と B に属すると考えられている (たとえば Werren *et al.*, 1995; van Meer *et al.*, 1999、Vandekerckhove *et al.*, 1999 など)。本種における *wsp* と *ftsZ* 領域の解析から、3系統の *Wolbachia* はスーパーグループ B に属すると考えられた。*wEmeTn2* と *wEmeNy1* の *wsp* 領域の塩基配列はエンケドンホソチョウ *Acraea encedon*、リュウキュウムラサキ *Hypolimnas bolina*、キチョウ *Eurema hecabe* およびキタキチョウの配列と完全に一致したが (それぞれ、Jiggins *et al.*, 1998; Dyson *et al.*, 2002; Hiroki *et al.*, 2002, 2004) (Fig. 3-1-2)、*ftsZ* 領域では、*wEmeTn2* はそれらの配列と 0.5% 異なり、*wEmeNy1* はエンケドンホソチョウとリュウキュウムラサキと一致した (Fig. 3-1-3)。*wEmeNy1* の *wsp* と *ftsZ* 領域の配列は、チョウ類のみならず、キンモンホソガの一種 *Phyllonorycter esperella* (AJ005887)、カバホシボシホソガ *Parornix devoniella* (AJ005888)、コブノメイガ *Cnaphalocrocis medinalis* (HQ336508)、コチニールカイガラムシの一種 *Dactylopius sp.* に感染する *Wolbachia* と一致することが明らかになった。Schilthuizen and Stouthamer (1998) や Zhou *et al.* (1998) は、*Wolbachia* は通常母子感染するにも関わらず、*Wolbachia* と宿主の系統がしばしば一致しないと述べている。このことは、種内、種間における水平感染の存在を示唆している (Heath *et al.*, 1999)。Chai *et al.* (2011) は、エンケドンホソチョウやリュウキュウムラサキに感染する *Wolbachia* はさまざまな種にから検出され、地理や宿主による制限を受けていないことを指摘している。本種に感染する *wEmeNy1* はこれらの *Wolbachia* と同じ配列を持つことから、種内、種間における水平感染の可能性が示唆された。MLST 法 (Baldo *et al.*, 2006) を用いれば、さらに確実な系統関係が明らかになると考えられた。

wEmeTn2 感染ブロードの一部では、すべてが雌になる性比異常と、約 50% のふ化率になることが確認されたことから、*wEmeTn2* が本種に見られる性比異常と強く関連することが明らかになった。また、*wEmeTn2* 感染個体に対する抗生物質処理実験の結果、抗生物質を与えてから日数が経つほど、子世代の

雌の割合は低下し、ふ化率は増加した。得られた子世代のすべての雌で性クロマチンが観察されたが、雄では観察されなかった。通常、ZWの染色体を持つ雌では性クロマチンが見られるが、ZZの染色体を持つ雄ではそれが見られない (Traut and Marec, 1996)。性クロマチンが見られれば遺伝的に雌、見られなければ遺伝的に雄と判断したところ、表現型と遺伝子型の性はすべての個体で一致した。雄が現れなかった1~4日目採卵の雌が遺伝的にも雌であったことから、死亡しているのは遺伝的な雄であると考えられた。以上のことから、*wEmeTn2* は卵期に雄が選択的に致死になる「雄殺し」の *Wolbachia* であると考えられた。

しかし、*wEmeTn2* 感染雌の一部のブルードからは性モザイク個体が得られた。*wEmeTn1* 感染雌と *Wolbachia* 非感染雌からは得られなかった。このことから、性モザイクの出現に *wEmeTn2* が強く関連していると考えられた。アズキノメイガ *Ostrinia scapulalis* (チョウ目) では、雄殺しの *Wolbachia* 感染雌に抗生物質を与えたり、非感染個体に *Wolbachia* を人為的に感染させることによって、一部の性モザイクが現れることを報告している (Kageyama *et al.*, 2003 ; Kageyama and Traut, 2004)。その後、性決定に関わる *doublesex* 遺伝子の発現から、遺伝的な雄を雌化し、遺伝的な性と性決定因子の型が一致しない場合に致死になることが明らかになった (Takafumi *et al.*, 2012)。アズキノメイガに感染する雄殺し *Wolbachia* が雌化する能力を持つことから考察すると、本種の性モザイク個体出現の一つの可能性として、*Wolbachia* 感染により部分的に雌化したものの、遺伝的な性と性決定因子の性が完全には不一致にならず、死に至らなかったことが考えられた。

また、母チョウの日齢ごとに分析してみると、性モザイク個体の出現は産卵初期に集中することが明らかになった。性モザイク個体の出現頻度を野外個体と交配個体で比較すると、交配個体が有意に高かった。これは、野外で採集した雌では、すでにある程度日齢が経過していたことに起因すると考えられた。Kageyama *et al.* (2007) は、*Wolbachia* と同様に寄主操作を行うことが知られる *Spiroplasma* 属の細菌 (以下、*Spiroplasma*) において、共生細菌の密度と雄殺しのタイミングについて、仮説を提唱している。*Spiroplasma* の密度が日齢を経過するほど高くなることがすでに知られており (Anbutsu and Fukatsu, 2003)、母親の日齢が経過するほど、「雄殺し」のタイミングが早く、完全になることから、*Spiroplasma* が高密度では初期型雄殺しになり、低密度では後期型の雄殺しにな

ると考察されている (Kageyama *et al.*, 2007)。本種における日齢の経過と性モザイク個体の出現頻度に関連があると思われたため、雌の日齢と胸部の *Wolbachia* 密度を調査した結果、日齢を経過するほど胸部の *Wolbachia* の密度が低下することが明らかになったが、これは、上述の仮説と一致しない。この現象を説明する可能性として次のような仮説が考えられる。トコジラミ *Cimex lectularius* (Hosokawa *et al.*, 2010) では *Wolbachia* が卵巣で局在することや、ウンカ類 (Noda, 1977) では、通常脂肪体細胞内に酵母様共生微生物が生息しているが、雌成虫の卵巣が発達する頃になると、脂肪体から出て卵巣小管の下部に侵入し、卵内に入り込むことが知られている。このように共生細菌が卵巣に移動する性質や、卵巣での密度が高くなる例が知られていることから、本種においても、羽化後に *Wolbachia* が卵巣に集中することなどが考えられ、このために胸部の *Wolbachia* 密度が低下した可能性が考えられた。その他の可能性としては、*Wolbachia* 密度が高いほど、性モザイク個体が出現することや、性モザイクの出現に密度は関係していないことが考えられた。

本種の性モザイク個体の形態的、発生的観点から考察すると、以下のようなことが明らかになかった。性モザイク個体は、9節の腹面に *vinculum* や *valva* などの雄の構造を、背面の9、10節に *apophysis posterioris* と *papilla analis* などの雌の構造を有する傾向にあった。このことから、本種の性モザイク個体では、背面と腹面はそれぞれ独立に性特異的な形質に分化していると考えられた。さらに *vinculum* は9節の腹板から分化し、*valva* は9節の付属肢であると考えられている (Kristensen, 2003)。2つ目の *valva* と *vinculum* が確認されたことから、少なくとも9節の一部が重複したことを示唆している。しかし、一説では、*valva* はチョウ目の幼虫の後期や蛹期の初期から見られる *phallic lobe* から派生したとされる (Snodgrass, 1935; Matsuda, 1976)。この説から考察すると、*phallic lobe* が重複した可能性が考えられた。Matsuda (1976) は、*phallic lobe* には *penis* になる部分 (本研究では *phallus*) と *valva* になる部分がそれぞれ違う時期に独立に生じると述べている。したがって、*valva* と *phallus* が同時に観察されなかったことと矛盾しないと考えられた。性モザイクの器官の重複のメカニズムは不明であるが、性モザイクパターンの考察は、性決定と形態形成のメカニズムを考察する上で有益であると考えられる。また、本研究で得られた性モザイクのほとんどが、翅が完全に伸びない羽化不全であることやファレート成虫で死亡したこ

と、さらに形態的な観点から、野外で交尾し生殖することは困難であると考えられた。

本種で見られた *wEmeTn2* の感染率は関東-1 で、*wEmeTn1* と *wEmeNy1* の感染率は関東-4、近畿-1、近畿-3、韓国で高く、*Wolbachia* の効率的な感染と生殖操作が関与する可能性が考えられた。特に、「初期（卵期）の雄殺し」のダイナミクスは、以下のようなものに起因するとされている。例えば、きょうだい間で共食いが起こるような宿主の生態では、きょうだい間で不均衡な相互作用を生み、初期の雄殺しの性質は個体群内で拡がると考えられる (Hurst *et al.*, 1997)。もう一つの要因は、近親交配を回避することで致死遺伝子の影響を受ける可能性を低下させることである (Hurst and Majerus, 1993)。*wEmeTn2* 感染個体が確認された個体群では、雄殺しの *Wolbachia* に感染することで、近親交配が回避され、感染個体にとって有益である可能性が考えられた。また、細胞質不和合による寄主操作も、非感染雌と感染雄の子が死にいたるため、急速に集団内に拡大すると考えられているが (たとえば Hoffmann *et al.*, 1990)、本種の交配実験の結果、非感染雌と *wEmeTn1* 感染雄の交配の子世代のふ化率は90%以上と高く、細胞質不和合による寄主操作は行われていないと考えられ、*wEmeTn1* に高頻度に感染することを説明できる明確な生殖操作は確認されなかった。*wEmeNy1* については交配実験などを実施して検証することが必要である。

wEmeTn1 雌と非感染雄の組合せでは、2 ペアの子世代で著しく低いふ化率を示すものがあつた。しかし、性比異常は見られず、*Wolbachia* 感染によるふ化率の低下とは考えにくい。また、これらの組み合わせは、雌は近畿-1、雄は近畿-2 の異なる個体群の交配であつたため、個体群分化によるふ化率の低下である可能性も考えられた。

Wolbachia 感染による性比異常は、チョウ類では、エンケドンホソチョウ (Jiggins *et al.*, 1998)、リュウキュウムラサキ (Dyson *et al.*, 2002)、キチョウおよびキタキチョウ (Hiroki *et al.*, 2002, 2004) に続く 4 番目の事例である。チョウ類において、本種で見られたような、3 系統の *Wolbachia* に感染し、そのうち 1 系統が雄殺しであるという報告例はない。さらに、*wEmeTn2* 系統の *Wolbachia* は「雄殺し」を引き起こすだけでなく、性モザイク個体の出現にも関与している可能性がある。これらのことから、本種における *Wolbachia* 感染は、宿主であるシルビアシジミの個体群動態や遺伝的多様性を理解するうえで重要な要素

となると考えられた。

以上のような第3章の結果から、本種に感染する *Wolbachia* 感染系統と頻度は個体群間で異なり、そのうち1系統の *Wolbachia* は卵期に雄を死亡させる「雄殺し」であるとともに、一部の個体を性モザイク化することが明らかになった。

第 4 章

遺伝的多様性

第4章の緒言

動植物の分布は、時間や空間において非常に多様で (Hewitt 1996, 2000; Taberlet *et al.* 1998)、地理的な分断や気候の変化による進化プロセスが遺伝的パターンを形成してきた (Avise, 1994, 2000; Nichols and Hewitt, 1994; Schmitt and Müller, 2007; Saitoh *et al.* 2008; Dvořáková *et al.*, 2010; Šmídová *et al.*, 2011, Hucka *et al.*, 2012)。チョウ類においても、これまでに保全を目的とした遺伝的構造の解析がなされてきた (Anthony *et al.*, 2001; Krauss *et al.*, 2004; Schmitt *et al.*, 2004; Schmitt *et al.*, 2005)。すでに、シルビアシジミ属の分子系統と生物地理に関する研究が行われ、本種内で遺伝子型がいくつか確認されているが (Yago *et al.*, 2008)、種内でどのような遺伝的構造を有しているか、どの程度集団が分化しているかについては明らかになっていない。

また、1970年代から、絶滅危惧種における遺伝的要因の重要性が認められるようになった。絶滅リスクに影響する遺伝的要因の一つとして、近交弱勢が考えられる (Frankel and Soulé, 1981)。集団サイズが小さいことや、種内や集団内の遺伝的多様性が低いことで近交弱勢が起こりやすくなる (たとえば O'Brien, 1994 など)。Crnokrak and Roff (1999) は、実際に 34 種を含む 151 例の動物と植物類で近親交配による影響を調査し、約 90% の交配で近交弱勢が起こることを結論付けている。種内の遺伝的多様性や遺伝的構造を明らかにすることは、絶滅リスクを評価するために重要である。

チョウ類における個体群の遺伝的多様性の研究では、アロザイム (たとえば, Meglecz *et al.*, 1999; Vamdeupestojine *et al.*, 1999; Krauss *et al.*, 2004)、マイクロサテライトマーカー (Haraper *et al.*, 2003)、ミトコンドリア DNA (mtDNA) (Bogdanowicz *et al.*, 1993; Sperling, 1993)、核 DNA (Beltrán *et al.*, 2002)、AFLP (Takami *et al.*, 2004) などが解析に用いられている。そこで本章では、かつ解析が容易であると考えられる mtDNA と核 DNA の塩基配列を用いて遺伝子解析を行った。

方 法

採集地と採集日

採集地と採集日は以下の通り (Table 4-1-1)。日本国内では、2007年9月9日、9月28日、10月20日、10月21日、11月3日、11月4日、2011年9月17日に関東地方 (4ヶ所、関東-1~4)、2011年10月23日に中部地方 (1ヶ所、中部)、2004年9月、10月、11月、2006年6月、8月、10月、2007年4月28日、7月5日、10月22日、11月7日、2009年6月15日、7月28日、8月27日、2010年8月11日に近畿地方 (5ヶ所、近畿-1~5)、2012年7月31日に四国地方 (1ヶ所、四国)、2001年6月27日、2010年9月8日、2011年11月12日、九州地方 (3ヶ所、九州-1~3)、計14ヶ所と、2012年8月20日、8月23日に韓国 (2ヶ所、韓国-1、2) で本種雌雄成虫を採集した (Fig. 1-1-1)。

(1) DNA 抽出

各個体群から採集した雌雄成虫をサンプルとして用いた。各個体の脚部を試料として、DNeasy Tissue kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。

(2) PCR (Polymerase Chain Reaction : ポリメラーゼ連鎖反応)

抽出された全 DNA を鋳型として、mtDNA 内の NADH dehydrogenase subunit 5 (*ND5*) 領域の一部 830bp と cytochrome oxidase subunit I (*COI*) 領域の一部 658bp、同様に核 DNA 内の性染色体 (Z 染色体) 上に存在する triose phosphate isomerase (*Tpi*) 領域の一部 356bp を、Ex Taq DNA Polymerase (Takara), *rTaq* DNA Polymerase (Toyobo)、*Taq* DNA Polymerase (Finnzymes) または KOD Dash (Toyobo) を用いた PCR 法で増幅した。*ND5* 領域の PCR にはプライマー-V1 (Yagi *et al.*, 1999)、KA1L (谷川他, 1998) を、*COI* 領域の PCR にはプライマー-LCO1490、HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) を使用した。*Tpi* 領域の PCR にはプライマー (Jiggins *et al.*, 2001) を使用して得られた本種の塩基配列から新たにプライマーを開発した。プライマーの塩基配列は以下の通り。

V1	5'-CCTGTTTCTGCTTTAGTTCA-3'
KA1L	5'-GTTCTAATATAAGGTATAAATCATAT-3'

LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'
TpiziF	5'-AGAAAGACGAATTGGTTGCTGA-3'
TpiziR	5'-TGGTAATAGGGCTTTAGTCTG-3'

PCR はサーマルサイクラー (C1000™、BIO-RAD) を用い、以下の温度、サイクルで行った。

<i>ND5</i>	94.0°C : 1 分 1 回	
	94.0°C : 1 分、45.0°C : 1 分、72.0°C : 2 分	30 回
<i>COI</i>	94.0°C : 2 分 1 回	
	94.0°C : 15 秒、52.0°C : 30 秒、72.0°C : 1 分	40 回
	72.0°C : 5 分 1 回	
<i>Tpi</i>	95.0°C : 1 分 1 回	
	95.0°C : 1 分、54.0°C : 1 分、72.0°C : 30 秒	35 回
	72.0°C : 5 分 1 回	

PCR 産物の一部を、1%アガロースゲルを用いて 1×TAE バッファ中で 25 分間 (100V) 電気泳動を行い、泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し、バンドの出現によって目的領域の増幅を確認した。

(3) PCR 産物の精製

増幅した PCR 産物は AMPure magnetic bead system (Agencourt) を用いて精製した。

(4) サイクルシーケンス

精製した PCR 産物を ABI PRISE® BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンスを行った。サイクル

シーケンスには前述のサーマルサイクラー (C1000™、BIO-RAD) を用いた。
サイクルシーケンスの温度設定は以下の通り。

96.0°C : 1分 1回

96.0°C : 10秒、50.0°C : 5秒、60.0°C : 2分30秒 40回

(5) サイクルシーケンス産物の精製とシーケンス

サイクルシーケンス産物を Clean SEQ (Agencourt) を用いて精製した後、DNA シーケンサーABI PRISE® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定した。

分子系統の解析

本種から得られた塩基配列を CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) を用いてアライメントを行い、PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) を使用して、最尤法によってハプロタイプ系統樹を作成した。最尤法の構築は、Modeltest3.7 (Posada and Crandall, 1998) を用いて階層的尤度比検定により、最適な分子進化モデルを選択して行った。

ハプロタイプ多様度・頻度解析

遺伝的多様性を表す指標として、ハプロタイプ多様度 (haplotype diversity; h) (式3; Nei, 1973) および塩基多様度 (nucleotide diversity; π) (式4; Nei and Li, 1979) を、ARLEQUIN ver. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いて求めた。

$$\text{ハプロタイプ多様度 } (h) = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) \quad (\text{式 3})$$

$$\text{塩基多様度 } (\pi) = \sum_{ij}^q x_i x_j d_{ij} \quad (\text{式 4})$$

n : 集団内の対立遺伝子の総数、 k : 集団内のハプロタイプ数、 p_i 番目のハプロタイプ頻度

$x_{i,j}$: 集団内における i, j 番目の対立遺伝子の平均頻度の推定値

d_{ij} : i 番目と j 番目の対立遺伝子間での 1 サイトあたりの塩基置換数の推定値

ここで、ハプロタイプ多様度 (h) は0~1の値をとり、1に近づくほど多様度が高いことを示す指標で、塩基多様度 (π) は2つの塩基配列間で異なる塩基の割合を示す量の平均値である。

個体群間の遺伝的な集団構造を明らかにするために、各個体群を1つの個体群と仮定し、ARLEQUIN ver. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いて AMOVA (analysis of molecular variance; Excoffier *et al.*, 1992) による解析を行い、 F_{ST} を算出した。それぞれの分集団から無作為に抽出された2つの配偶子間の相関で、分集団の遺伝的分化の程度を表す数値である (Wright, 1951)。本研究では、Wright (1951) が提唱した定義式を改良したもので、自然集団にも適用可能とされる Nei (1987) の定義式 (5) により F_{ST} を算出した。

$$F_{ST} = (h_T - h_S) / h_T \quad (\text{式 5})$$

ここで、 h_T は集団全体の総ヘテロ接合度、 h_S は分集団内のヘテロ接合度の期待値である。 F_{ST} は0~1の値をとり、1に近いほど遺伝的に異なるという (Wright, 1951)。

結 果

日本国内における上記14ヶ所から採集された雌雄成虫のND5領域からは、832塩基中4塩基に変異が見られ、4種類のハプロタイプが確認された (Genbank: AB714583-AB714594)。COI領域からは、658塩基中3塩基に変異が見られ、4種類のハプロタイプが確認された (Genbank: AB714595-AB714606 未登録あり)。上述の2つの領域を合わせると、合計で6種類のハプロタイプ (I-VI) に分けられた (Fig. 4-1) (Table 4-2)。Fig. 4-2はmtDNAハプロタイプを用いてネットワーク樹を構築し、ハプロタイプを各個体群で塗り分けたものである。近畿-1が3ハプロタイプ (I, II, IV) ともっとも多く、近畿3 (I, IV)、近畿-2 (I, II)、近畿-4 (I)、関東-4 (I) 近畿-5 (II)、四国 (I)、九州-1 (IV) 九州-2 (IV)、九州-3 (IV) で見られたハプロタイプはいずれも近畿-1のものと共通であった (Table 4-3)。関東-1、関東-2、関東-3 (III) と中部 (V, VI) で見られたハプロタイプは、他のいずれの個体群とも共通のものは認められなかった。他の個体群では見られなかった。塩基多様度は0.001以下であった。近畿

地方では、共通のハプロタイプが見られたが、近畿-1 と近畿-3 では IV (それぞれ 66、87%)、近畿-2 では II (91%)、近畿-4 ではハプロタイプ I (100%) が集団内で優占し、ハプロタイプの構成比は個体群によって異なっていた。

一方、103 個体の雌の *Tpi* 領域からは 355-360 塩基が得られ、6 ハプロタイプが確認された (Table 4-4)。挿入欠失を除いた 355 塩基について 4 ハプロタイプ (A-D) の系統解析を行った (Genbank: AB714607-AB714624) (Fig. 4-3)。挿入欠失は 4 塩基と 1 塩基の 2 ヶ所に認められ、それらを 5 番目の変異とみなし、ハプロタイプネットワーク樹を構築すると、6 ハプロタイプ (A-F) が確認された。Fig. 4-4 は核 DNA ハプロタイプを各個体群で塗り分けたものである。近畿-4 が 4 ハプロタイプ (A、B、C、E) ともっとも多く、続いて、関東-1、関東-2 (A、D、F)、近畿-1、近畿-3 (A、B)、近畿-2 (A、C)、関東-3 (D)、関東-4 (D)、中部 (D) であった (Table 4-5)。ハプロタイプ B、C は近畿と四国地方で、ハプロタイプ D、F は関東と中部地方で、ハプロタイプ E は近畿-4 でのみ見られた。近畿地方では、共通のハプロタイプが見られたものの、近畿-1 と近畿-3 ではハプロタイプ A+B (いずれも 100%)、近畿-4 では B (53%)、近畿-2 では C (90%) が集団内で優占し、ハプロタイプの構成比は個体群によって異なっていた。韓国で見られた mtDNA ハプロタイプは 2 種類 (VII、VIII) で、いずれも日本国内のものとは異なったが、核 DNA はすべて関東地方で見られたハプロタイプ D と一致した。

第4章の考察

集団の分化は遺伝子流動に左右されるため、集団間の分化は主の移動・分散能力や集団間の隔離の程度に関連すると予想されており、実際の観察はおおむねこれらの予測を支持している (Hastings and Harrison, 1994; Harmrick and Godt, 1996)。サンプル数が 10 以上ある 6 個体群において、mtDNA と核 DNA の AMOVA 解析の結果、個体群間で遺伝的構造が異なることが明らかになった ($p < 0.001$) (Table 4-D-1)。また、上述の 6 個体群において、mtDNA と核 DNA のペアワイズ F_{ST} 解析を行った結果、近畿-1 と近畿-3、近畿-4 と四国間を除くすべての個体群間で遺伝的分化が認められた (Table 4-D-2)。mtDNA の近畿-3 と近畿-4 間では遺伝的に異なることが示されたものの、核 DNA ではそれが示されなかった。しかし、近畿-4 のみで、ハプロタイプ E が確認されたため、近畿-4 はある程度隔離されている個体群であることが示された。関東-1、関東-2、関東-3 ではハプロタイプ III のみが確認され、これらの個体群では、遺伝的な分化が認められなかった。韓国の核 DNA ハプロタイプは関東地方で見られるものと一致したが、mtDNA ハプロタイプはすべて異なったため、遺伝子交流はないと考えられた。以上のことから、本種の個体群間では、遺伝的分化が生じていると推測され、本種は移動性が低いことが示された。

本種の ND5 領域の塩基配列データに加えて、日本各地の同領域の塩基データを Genbank から引用し、比較した結果、Yago *et al.* (2008) では、本研究で確認された ND5 領域における 4 ハプロタイプに加えて、異なる 1 ハプロタイプが確認されていた。そのハプロタイプの採集地は、鹿児島県であった。全国的にみても、近畿-1 のハプロタイプ数がもっとも多くで、ハプロタイプ III は関東地方固有であった。

絶滅が危惧される哺乳類、鳥類、魚類、昆虫などの 38 種のうち、32 種は絶滅のおそれのない近縁種と比べて遺伝的多様性が低いことが明らかになっている (Frankham, 1995b)。他のチョウ類の mtDNA の多様性は、ナガサキアゲハ *Papilio memnon* で 9 つのハプロタイプ (吉尾, 2005)、本州に生息するベニヒカゲ *Erebia nipponica* で 11 ハプロタイプ (ND5 + COI: 942 bp) (中谷他, 2006) が確認されている。また、核 DNA の解析からは、本州に広く分布するキタキチョウの *Tpi* 領域 (457 bp) で 29 のハプロタイプが確認されている (Narita *et al.*, 2006)。これらの例と本種の遺伝的多様性を比較すると、本種に見られたハ

プロタイプ数は少ないことが明らかになった。本種の野外調査や飼育では、しばしば翅に斑紋異常が見られることがある（例えば、中村，2007；大塚，2008など）。翅の斑紋などの形態に異常は、遺伝子の変異とも考えられ（Carroll *et al.*, 1994; Hiyama *et al.*, 2012）、各地で個体数が減少していることから考えると、近交弱勢の影響の一つと考えられた。以上のことから、本種は遺伝的多様性が低下している可能性が考えられた。

近畿-1では6つのハプロタイプのうち3つが確認され、本種の中では、もっとも mtDNA ハプロタイプ数は多かったが。核 DNA のハプロタイプでは。近畿-4 がもっとも多く確認されたため、核 DNA と mtDNA の遺伝的多様性の傾向は異なる可能性が示唆された。mtDNA は細胞質ゲノムであるので、本種の母系の系統関係を反映すると考えられる。mtDNA と核 DNA 間で遺伝的多様性の傾向が異なることから。遺伝子流動に性差がある可能性が考えられた。

以上のような第4章の結果から、本種の遺伝的多様性は低く、比較的近隣の組合せを除くすべての個体群間でハプロタイプ頻度が異なり、個体群の分化が認められた。

総合考察

寄主植物利用

第1章では、個体群間で寄主植物選好性が異なることが明らかになった。そこで、産卵選好性を第4章で得られた遺伝子解析から考察した。Table D-1はミヤコグサ属 *L. spp.* とシロツメクサの二者択一実験における産卵選好性をミトコンドリアと核DNAハプロタイプ別にまとめたものである。mtDNAハプロタイプと産卵選好性の関係を見てみると、ハプロタイプIIについては、すべてミヤコグサを選好したが、ハプロタイプI、III、IVでは、どちらを選好する個体も確認された。同様に、核DNAハプロタイプと産卵選好性の関係を見てみると、ハプロタイプCでシロツメクサを選好する個体が見られなかったものの、ハプロタイプA、B、Dでは、どちらを選好する個体も見られた。近畿-1の核DNAでは、2ハプロタイプが見られているが、その選好性の頻度はハプロタイプ間で差がなかった (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。近畿-1のmtDNAハプロタイプは3種類が認められたが、産卵選好性のデータが得られたのはIVのみであったため、ハプロタイプ間の比較はできなかった。これらのことから、一部のハプロタイプでは、産卵選好性に偏りがあったものの、ハプロタイプと選好性に明確な対応関係は見られず、産卵選好性を遺伝的背景から説明するには不十分であった。幼虫の発育についても、個体群間で異なることが明らかになったが、遺伝的背景から明確な体サイズの違いを説明するには不十分であった。

そこで、本種における寄主植物利用を各植物の来歴と合わせて考察した。福田他 (1984) は、ミヤコグサを帰化種と考え、本種がヤハズソウやコマツナギを本来の食草としていたか、ミヤコグサの帰化後に本種が移入したと述べている。ヤハズソウの利用記録はあるものの、秋冬に枯死することから、ヤハズソウのみを利用しては考えにくく、コマツナギ *Indigofera bungeana* に関しては、利用記録はあるものの単体での利用は知られていないことから、これらの植物のみを利用して生息するのは困難ではないかと考えられた。ウマゴヤシ *Medicago polymorpha*、コメツブウマゴヤシ *M. lupulina* でも利用記録があるが、同様の理由で主な食草として利用されていないと考えられる。ミヤコグサについては、前川 (1943, 1978) が史前に帰化した植物ではないかと指摘しているが、確証はなく、現在でもほとんどの生息地がミヤコグサに依存していることから、本種は主にミヤコグサを利用してきたと考えられる。仮に、ミヤコグサが帰化種で、弥生時代以降に本種が侵入したとすれば、およそ3,000年以内に本種は分布を拡大したことになるが、複数のハプロタイプが地域ごとに固有であ

ることと分子進化速度を考慮すると矛盾するため、この説は支持できない。シロツメクサは、1846年の江戸後期にガラス製品の詰め物として干し草に混ざって種子が渡来し、明治時代以降に、牧草や緑肥などとして本格的に輸入されるようになった帰化植物であるとされている（貴志, 1856; 長田, 1972; 浅井, 1993）。セイヨウミヤコグサについては、渡来年に関しては諸説あるものの、1940年代以降に初めて記録され、これも帰化植物であるとされている（清水, 2003）。いずれの個体群においてもシロツメクサよりミヤコグサにおける適応度が高く、シロツメクサを利用できる個体群は限られていた。これらのことから、ミヤコグサは古来より自生する植物で、本種は主にミヤコグサを利用していたが、シロツメクサの帰化後、この植物を利用する個体が現れ、寄主の拡大が生じたと考えられた。セイヨウミヤコグサはミヤコグサの同属種であるとされ、化学・生態学的な障壁が少なく、ミヤコグサと同様に利用できる可能性が考えられる。

繁殖干渉の影響

第2章では、本種はヒメシルビアシジミからの繁殖干渉を受けることが明らかになった。Kuno (1992) は、2種の生物が配偶過程で相互に作用するモデルを構築し、2種の分布域が拡大し二次的に出会った場合には、一方が絶滅することを示し、分布域は重なることなく、側所的な分布を保つことを推定した。Zizina 属におけるニュージーランド固有の *Z. oxleyi* が、人為的に移入された *Z. otis labradus* によって分布域を徐々に侵食され、絶滅の危機に瀕しているが（Yago *et al.*, 2008）、これを説明する一つの要因として繁殖干渉の可能性が考えられた。このことから、ヒメシルビアシジミとの繁殖干渉が、本種の分布にも影響を与える可能性が考えられ、将来的に本種の主な衰退要因の一つとなり得ることが推定される。

Wolbachia が本種の遺伝的構造に与える影響

第3章では、*Wolbachia* 感染系統と頻度は個体群によって異なり、そのうち1系統が本種に対して「雄殺し」と呼ばれる生殖操作と一部の個体を性モザイク化することが明らかになった。そこで、*Wolbachia* による本種の mtDNA と核 DNA に対する遺伝的影響について考察した。解析のためには、TCS* version 1.21 (Clement *et al.*, 2000) を用いたハプロタイプネットワーク樹を作成した。mtDNA と *Wolbachia* 感染との関係をネットワーク樹で示したところ、

wEmeTn1 感染個体の mtDNA ハプロタイプは IV、*wEmeTn2* 感染個体のハプロタイプは I、II、III のいずれか、*wEmeNy1* 感染個体はハプロタイプ I または V のいずれかであったことから、*Wolbachia* 感染系統と mtDNA ハプロタイプは関連していると考えられた (Fig.D-1)。一方、核 DNA のネットワーク樹と *Wolbachia* 感染系統には明確な対応関係は見られなかった (Fig.D-2)。Johnstone and Hurst (1996) は、数理生態学的な解析を用いて、雄殺しの *Wolbachia* に感染した雌の適応度が非感染の雌より高いと仮定した場合に、集団内で雄殺しの *Wolbachia* に感染した個体の mtDNA ハプロタイプの割合が増加し、mtDNA の多様性が減少することを示した。幼虫期にきょうだい間で競争が起こるエンケドンホソチョウにおいて、雄が死亡することで雌の適応度が高まり、*Wolbachia* 感染個体が持つハプロタイプが集団内で優占して、非感染系統のハプロタイプが排除されたと考えられている (Jiggins *et al.*, 2003)。またオナジショウジョウバエ *Drosophila simulans* (Turelli and Hoffman, 1991) やキチョウおよびキタキチョウ (Narita *et al.*, 2006) に細胞質不和合を引き起こす *Wolbachia* についても、集団内に感染個体の mtDNA ハプロタイプが拡がることが報告されている。そこで、本種における mtDNA の多様性の減少の可能性を検討するために、DnaSP version 5.10 (Rozas *et al.*, 2003) を用いて HKA 検定 (Hudson *et al.*, 1987) を行った。mtDNA (ND5+COI) と Z 染色体 (*Tpi*) の有効集団サイズを 1:3 で補正し、外群にはヒメシルビアシジミを用いて各遺伝子の変異率を比較した。解析の結果、感染と非感染のどちらの個体群でも有意な差は見られなかった (Table D-2)。mtDNA の多様性が減少することは統計学的に示されなかったものの、野外個体群のほぼすべてのハプロタイプで *Wolbachia* 感染が確認されたことから、感染個体の mtDNA ハプロタイプが維持されるメカニズムが存在する可能性が考えられた。また、数理モデルから、mtDNA だけでなく、核 DNA への影響を推定する研究も進んでおり、Engelstädter and Hurst (2007) は、「雄殺し」が存在する個体群では、核 DNA の致死遺伝子は固定しやすく、進化上有利な遺伝子は固定されにくいため、核 DNA の遺伝的多様性は低下すると結論付けている。このことは、本種において、mtDNA の減少が検出されなかったことの一要因として考えられる。また、種間交雑により近縁種の *Wolbachia* が感染し、mtDNA 遺伝子に影響を及ぼした例がいくつかの昆虫で報告されており (Ballard *et al.* 1996; Dean *et al.* 2003; Gompert *et al.*, 2006; Narita *et al.*, 2006)、本種とヒメシルビアシジミ間の遺伝子浸透にともない、互いのもつ共生

細菌が寄主操作を起こす可能性が考えられる。

さらに、近年、雄殺しの共生細菌が、宿主の行動に影響を与える事例も報告されている。雄殺し *Wolbachia* 感染個体の頻度が高いことで知られるエンケドンホソチョウでは、集団内の性比が極端に雌に偏ることにより、雌が雄をめぐる競争するというような求愛様式の逆転現象が生じている (Jiggins *et al.*, 2000; Randerson *et al.*, 2000)。本種の近畿-1 の野外調査の結果では、性比はむしろ雄に偏っていたが、これは雄が探雌行動を行い、活動的であることに起因すると考えられ、エンケドンホソチョウのような配偶行動の変化は観察されなかった。また、近畿地方 (近畿-1, 3) と関東地方 (関東-1~3) の雌個体における雄殺し *Wolbachia* の感染頻度はそれぞれ 20、50%であり、すべての雌が均等に子を産むと仮定すると、性比はそれぞれ雌 : 雄 = 1 : 0.80、1 : 0.50 と推定され、極端に雄が少なくなる頻度ではなかった。しかし、Bonte *et al.* (2009) は数理生態学的解析から、雄殺しの共生細菌に感染する集団では、雄に偏った分散行動が進化しすることを論証し、絶滅リスクが軽減されることを示している。このことから、本種の雄殺し *Wolbachia* に感染した個体群でも、雄の分散頻度が高くなる可能性が示唆された。このように、*Wolbachia* は本種の遺伝的多様性のみならず、成虫行動にも影響を与えている可能性が考えられる。

遺伝的分化と地理的距離の関係

第 4 章では個体群間の遺伝子流動を、*FST* を用いて推定し、個体群間で遺伝的分化が生じていることが明らかになった。*FST* と種の移動、分散能力との間には強い負の相関があることが知られており、ある種における移動パターンは、分集団の遺伝子流動と地理的距離の関係から推定することができる (Frankham *et al.*, 2002)。実際に、ほ乳類では、オオツノヒツジ *Ovis canadensis*、ハイイロオオカミ *Canis lupus*、ヒグマ *Ursus arctos* (Forbes and Hogg, 1999)、鳥類では、ホオジロシマアカゲラ *Picoides borealis*、キタ・ニシアメリカフクロウ *Strix occidentalis* (Haig *et al.*, 2001) において、遺伝的分化が地理的距離と相関していたことが報告されている。そこで、本種においても *mtDNA* と核 DNA から得られた各個体群間の *FST* 値と距離の関係を解析した。その結果、地理的に離れるほど、遺伝子流動が低下することが示されなかった (Fig. D-3)。遺伝的距離と地理的距離の関係については、さまざまな分散モデルが構築されており (たとえば、Kimura and Weiss, 1964; Ibrahim *et al.*, 1995)、本種における *FST*

と地理的距離の相関は、Ibrahim *et al.* (1995) における飛び石分散モデルに近いと考えられる。一定以上の距離では、個体群間において遺伝子流動はほとんど起こらないことから、本種の移動性は低く、個体群は非連続的であることが明らかになった。

遺伝的隔離の背景

以上のように、さまざまな観点から、本種の集団の分化が支持された。そこで、本種の遺伝的構造を、気候と地史の変遷から考察した。ほとんどのチョウ類は植食性で、その分布は寄主植物の分布と一致し、とくに、日本固有種の多くは、照葉樹林や落葉樹林などの森林植生と結びついている (石井, 2001b)。植物の分布は気候の影響を強く受けるため、植生帯はおおむね緯度と平行に形成される (日浦, 1973)。たとえば、ヒロハヘビノボラス *Berberis amurensis* やメギ *B. thunbergii* を利用するミヤマシロチョウ *Aporia hippia* の分布は亜高山帯と、ブナ *Fagus crenata* やイヌブナ *F. japonica* を利用するフジミドリシジミ *Sibataniozephyrus fujisanus* は落葉広葉樹林帯と、イチイガシ *Quercus gilva* を利用するルーミスシジミ *Panchala ganesa* の分布は照葉樹林帯とそれぞれ一致することが知られている (石井, 2001; 白水, 2006)。本種は、西日本を中心とする低地に分布する。これを現在の植生分布と重ねると、照葉樹林帯の分布域内にほぼ限定されることが明らかになった (Fig. D-4)。実際には、本種は照葉樹林を生息場所として利用しているわけではないが、照葉樹林が成立する気候帯に分布していると考えられる。

気候変化における集団の分化の例がいくつか知られている。たとえば、現在のアメリカのフロリダ半島南部は、気候学的に温暖な北部や西部と異なり亜熱帯気候地域である。フロリダ半島は、寒冷期には現在よりもずっと大きく、南方に分布域が狭まった温帯性種の重要なレフュージアであったとされ、半島固有の多様な陸生動物群が形成された (Remington, 1968; Avise, 2000; Muhs *et al.*, 2003)。現在は、半島亜種の北上にともなって、本土亜種との交雑が見られる接触帯が存在する (Remington, 1968)。また、沿岸部に生息する温帯種についても、氷河期に南部に移動し、間氷期に北上した際に、大西洋沿岸部とメキシコ湾岸部に物理的に分断したとされている (Avise, 2000)。フロリダ半島の沿岸部に生息するハマヒメドリ *Ammodramus maritimus* (Avise and Nelson, 1989)、ブラックシーバス *Centropristis striata* (Bowen and Avise, 1990)、ハンミョウ属の

一種 *Cicindela dorsalis* (Vogler and DeSalle, 1993, 1994) などは、遺伝子解析からも2つの集団に分かれることが支持されている。このように、気候変化による分布の縮小と拡大が生物集団に変化をもたらしてきたと考えられる。

植生帯と日本列島の地史との関係は諸説あるが、おおまかには次のような変遷をたどっている。約200~15万年前は、現在の日本列島と朝鮮半島は陸続きであった(湊, 1977; 安田, 1980)。3~2万年前の更新世後期には、日本は、朝鮮半島と分断し、1万年前~現在の完新世に、本州、四国、九州が分離した。2~1万年前の寒冷期には、本州から九州の大部分が冷温帯性落葉広葉樹林で覆われ、照葉樹林帯は、太平洋側の海岸線にまで追いやられた後、寒冷期が終わり、温暖化に伴って再び北上してきたとされている(安田, 1980) (Fig. D-5)。とくに、太平洋側は半島や岬などの先細りの地形が多く、寒冷期に本種の分布域が南に行くにしたがって、生息地が限定されたと考えられた。集団サイズが縮小すると遺伝的浮動の影響を受けやすいため、集団内の遺伝的多様性の消失とアリの固定が生じやすい(Frankham *et al.*, 2002)。すなわち、本種は、現在の房総半島、伊豆半島、紀伊半島、四国南部、九州南部に分断され、集団サイズの縮小にともない、それぞれに固有の遺伝子型と頻度を形成した(Fig. D-6)。その後、照葉樹林帯の北上にともなって本種の分布も北へと拡大したと考えられる。実際に、本種におけるmtDNAと核DNAの遺伝子構成は、地史と植生の変遷とよく一致している。現在の分布は分断された各集団が、それぞれ北上したものが定着したものと考えられる。これらのことは大阪府と兵庫県の個体群が最短で約30kmしか離れていないにもかかわらず、遺伝的分化が認められたことと矛盾しない。

以上のような遺伝学的、生態学的、疫学的な知見を踏まえて、本種の保全のあり方について考察する。生息域内保全では、まず、保全単位を決定する必要がある。本研究の結果、ごく近隣の個体群を除いて遺伝子流動が起らないことが示された。また、各個体群において感染する *Wolbachia* と頻度が異なることも、各個体群間でほとんど交流がないことを支持する結果となった。Nice *et al.*

(2009) は、*Wolbachia* の繁殖操作が個体群の存続に影響することから、絶滅危惧種の保全の際にそれらを調査する必要性を主張しており、本研究において明らかになった寄主操作や感染頻度からも、*Wolbachia* 感染の調査は、本種の保全上不可欠な要素であると考えられる。さらに、個体群間で寄主利用能力が異な

ることが明らかになったことから、最小保全単位を決定する上で、生態学的な差異も重要であると考えられる。そこで、これらの結果に基づき、比較的十分にデータを集積した関東から四国の 11 個体群について、本種の最小保全単位を設定した。まず、mtDNA および核 DNA の解析では、共通のハプロタイプが認められない個体群間は、異なる保全単位とした。共通のハプロタイプが認められる場合は、サンプルサイズが 10 以上の個体群で F_{ST} 解析を行い、有意差がある場合は異なる単位とした。サンプルサイズが 10 未満の個体群については、共通のハプロタイプが見られる近隣の個体群と同一と見なした。mtDNA もしくは核 DNA のいずれか一方で、遺伝的分化が示された場合は異なる保全単位とした。その結果、mtDNA および核 DNA の解析からは 6 分類が認められた。*Wolbachia* 感染状況については、感染個体が 1 個体でも確認されれば感染個体群として扱い、非感染の個体群と異なる単位と見なした。感染個体群についても、異なる系統が検出された場合は、同様に異なる単位として扱った。その結果、*Wolbachia* 感染状況からは、4 分類が認められた。寄主利用能力については、産卵選好性と幼虫の体サイズにおいてそれぞれ個体群間で有意差があったことから、独立の単位として扱った。産卵選好性はシロツメクサに産卵した割合が 10% を基準に、体サイズは平均蛹体重が 45 mg を基準に考慮した結果、4 分類が考えられた。これらの単位から総合的に判断すると、7 つの保全単位が提案できる (Fig. D-7)。生物集団の保全や多様性の評価を行う際には、これまでのように遺伝的固有性のみに基づいて設定される進化的重要単位 (Evolutionarily Significant Unit; ESU) や管理単位 (Management Unit; MU) (Moritz, 1994) の基準だけでは、繁殖集団の固有性を認識するのに不十分で、共生細菌の感染状況や寄主植物利用能力の差異を含めて総合的に保全単位を決定する必要があると考えられる。

生息域内保全では、もっとも優先される施策であるが、まず、最小保全単位をもとに、生息環境を管理する必要がある。本種はシバ型の草地に生息し、ミヤコグサやシロツメクサを利用することが明らかになった。大崎 (1986) は、モンシロチョウが日向の草地に生息していることは、多化多産の r 戦略にもとづく、不安定な生息地や寄主植物に適応した結果であると述べている。同様に本種 (シルビアシジミ) は、年 6 化の r 戦略者と考えられ、不安定なシバ型草地へ適応していると考えられる。本種の生息環境は、海浜や火山地帯などの人為的な影響をほとんど受けていない自然草地と、河川堤防、畦畔、ため池の周

辺など人的管理により維持されている草地の2つのタイプに分けられる(福田他, 1984)。牛馬による農耕の衰退や刈敷肥料の廃止などの人間の生活様式の変化にともない、草刈などの管理が行われなくなることで遷移が進行したため、遷移の初期段階の草地に生息するチョウ類多くは衰亡の危機にさらされており(石井, 2001a)、これらの保全には、生息地の管理が重要である。北原(2003)は、ホシチャバネセセリ *Aeromachus inachus*、アカセセリ *Hesperia florinda*、ミヤマシジミ *Lycaeides argyrognomom*、クロシジミ *Niphanda fusca*、ゴマシジミ *Maculinea teleius*、ヒョウモンチョウ *Brenthis daphne*、キマダラモドキ *Kirinia fentoni* などの絶滅危惧種が北富士演習場(山梨県)に集中分布することを明らかにし、演習による攪乱や人的に管理された二次草原がこれらの種の繁栄と存続に大きく関与していること指摘している。演習地のように人為により管理された草地に多くのレッド種が生息する例は他にもいくつかあり、広い意味での里地里山問題のひとつに位置づけられる(たとえば、石井, 2001; 森本, 2001; 北原, 2003)。

本種の保全活動は、すでに栃木県さくら市氏家町において活発に行われており、ミヤコグサを駆逐する外来種のシナダレスズメガヤ *Eragrostis curvula* の除去や、ミヤコグサを移植した保護区を造成することで成果を上げている(財団法人リバーフロント整備センター, 2012)。また、Kobayashi *et al.* (2009) は、本種の保全においては、春季とそれ以降に毎月草地の刈り払いを行うことが望ましいと述べている。また、本研究において、本種は冬季も温暖な日には摂食を行うことが明らかになっており、1年を通じて草丈を低く保ち、外来種の除去を行うなどの管理が必要であると考えられる。本種は、大阪府域では1980年代に絶滅したと考えられていたが(蓑原, 2005)、近年、大阪国際空港内とその周辺で、高密度で生息することが確認され、空港内の草地の管理状態が本種の生息に好ましいことが指摘されている(Minohara *et al.*, 2007; Ishii *et al.*, 2008)。このような事例から、本種の生息地として、草丈を維持するだけでなく、広大な面積を持つ明るく開けた環境条件も不可欠で、とくに本種においては、大阪国際空港は保全上重要な生息地であると考えられる。

しかしながら、集団が小さくなりすぎると、生息環境が改善されても、人口学的変動、環境変動、遺伝的変異の3つの要因から集団がさらに小さくなり、絶滅の一途をたどりはじめる(絶滅の渦)(Gilpin and Soule, 1986; Guerrant, 1992)。生息域内での保存が困難な場合は、生息域外保全の手法を組み合わせる

ことが有用であるとされている（プリマック・小堀，2008）。たとえば、イギリスでは、1970年代に絶滅したアリオンゴマシジミ *Maculinea arion* を復活させるために、スウェーデンの個体をもとに再導入事業を行った（Thomas, 1999）。江田（2011）は、絶滅危惧種のオオルリシジミの主な死亡要因がメアカタマゴバチによる寄生であることを発見し、生息地の野焼きを行うことと飼育した蛹個体を放すことで、絶滅に瀕した個体群の回復に成功しており、生息環境の管理と個体群の補強を組み合わせた有用な保全方法として注目に値する。このように個体群の補強や再導入などの実践例はわずかであるものの、絶滅危惧種の保全に大きく貢献してきた。本研究では、本種の生活史形質の解明や管理技術の開発から、生息域外での繁殖に必要な基礎技術の確立がなされたと言える。まず、雌成虫からの採卵は、プラスチック容器のような密閉した狭い空間で十分可能であること、幼虫の飼育においては、人工飼料を用いて本種を大量に飼育できることが明らかになり、作業・空間における効率的な飼育・管理方法が確立された。とくに、人工飼料の利用は、寄主植物の鮮度や質を均一にし、発育のばらつきを最小限に抑えることや、冬季における寄主植物の減少に左右されることがないなどの点からも、安定した繁殖に欠かせない要素であると考えられた。人工条件下における交配では、改善すべき点は少なからず残るものの、本研究から明らかになった配偶行動の解析結果が交配技術の確立に有用であることが示された。

ファウンダー個体の選定については、本研究の結果から遺伝的多様性の低下や近交弱勢が示唆されたため、遺伝的な偏りを防ぐためにファウンダーを多く採集し、交配の組合せには十分配慮する必要があると考えられる。また、本研究では、*Wolbachia* は本種に対して多面的な影響があることが明らかになったことから、残存個体群の感染頻度から大きく逸脱しないような繁殖管理を行うべきと考えられる。繁殖場所については、近縁種の影響を考慮して選定すべきである。

他にも、干ばつ、嵐、洪水、津波、火山の噴火、火事、疫病などのカタストロフィも、生物群集を周期的に死滅に追いやる原因の一つとされている（プリマック・小堀、2008）。カタストロフィなどの環境変動における集団の存続率は、個体群が大きいほど高いが（Drayton and Primack, 1999）、本種の生息地は非連続的で各集団が孤立していることが明らかになり、カタストロフィにより個体群単位で絶滅する可能性がある。このような個体群の絶滅を防ぐには、野外

個体群を定期的に調査しながら、生息域外で保存し繁殖させることがもっとも確実な保全方法である。中村（2005）は、チョウ類の保全のためには、実際に保全活動を担う主体が必要であること指摘しており、このような生息域外保全システムの構築は、各地域の動物園や昆虫館と連携して推進していくことが望ましいと考えられる。

以上のような本研究の結果より、本種の保全においては、まず、各個体群の寄主植物利用能力、*Wolbachia* 感染、遺伝的多様性の調査から、最小保全単位を決定し、1年を通じて生息環境を管理する必要があると考えられる。将来的に、生息域外での増殖や野生復帰のニーズが生じると考えられるが、その場合には、近縁種による繁殖干渉を考慮しつつ、保全単位をもとに繁殖個体や導入場所の選定を行うことが重要である。

摘要

シルビアシジミ *Zizina emelina emelina* (シジミチョウ科) (以下、本種) は、関東地方以西から種子島以北と韓国に分布する。河川敷、畦畔、海岸などの丈の低い草地に生息し、幼虫の主な寄主植物としてミヤコグサ *Lotus japonicus* (マメ科) やシロツメクサ *Trifolium repens* (マメ科) が知られる。本種は近年、各地で生息地や個体数が減少し、環境省レッドリストでは絶滅危惧 IB 類にランクされており、同省による生息域外保全モデル事業の対象になっている。生息域外保全を含む、本種の保全方法を検討するためには、分布状況や遺伝的多様性、寄主植物、生活史形質、配偶行動、共生細菌などの基礎情報を収集するとともに、成虫の交配、採卵、幼虫の飼育、休眠個体の管理などの基礎技術の確立が欠かせない。そこで本研究では、本種の保全のあり方について考察することを目的として、これらの基礎情報や基礎技術を集積するための野外調査と室内実験を日本各地および韓国の個体群を用いて行った。第 1 章では、本種的生活史や寄主利用を明らかにするために、室内飼育実験を行った。また第 2 章では、本種の配偶行動を生息地で観察するとともに、近縁種ヒメシルビアシジミや同所的に生息するヤマトシジミとの繁殖干渉の可能性について調査を行った。さらに、第 3 章では遺伝子解析により共生細菌の感染状況と本種への影響について調査し、第 4 章では日本各地および韓国の個体群の遺伝的分化の程度について解析を行った。

第 1 章 生活史と寄主植物利用

本種的生活史と寄主植物利用を明らかにするために、野外調査および室内実験を行った。まず、野外での季節消長を明らかにするために、近畿地方中部の 1 ヶ所の生息地において、2009 年に成虫の捕獲調査を実施するとともに、雌成虫から採卵し、子世代の卵・幼虫・蛹を 20~30°C 16 L (明期 16 時間、暗期 8 時間、以下同様) および 20°C 15~12 L の条件下で飼育し、発育期間や休眠性の有無を調査した。野外では、成虫は 4 月下旬~10 月下旬にほぼ継続的に確認された。飼育実験の結果、16 L では、すべての個体が発育の遅延を生じることなく 4 齢の幼虫期を経て蛹化し成虫になったのに対して、20°C 12 L では、ほとんどの個体で 4 齢期以降の発育が遅延し、わずかに摂食を続けながら脱皮を繰り返すことが確認された。これらのことから、本種は幼虫期後期に休眠に入り

越冬することが明らかになった。また、各日長条件における休眠率から、休眠誘起の臨界日長は 20°C で約 12 時間 40 分と推定された。飼育実験より得られた発育零点、有効積算温度、臨界日長と生息地付近の日平均気温の季節変化から、本種は近畿地方中部において 1 年に 5~6 世代を経過すると推定された。推定された周年経過と野外での季節消長がほぼ一致していたことから、本種は定住性が高いと考えられた。

日本各地の生息地における雌成虫の産卵選好性を比較するために、計 8 ヶ所の個体群を対象として、ミヤコグサとシロツメクサの生葉を野外で採集した雌成虫に同時に提示し、各植物上の卵数を記録した。その結果、シロツメクサに産卵した割合は、近畿地方中部の個体群がもっとも大きく、中部地方、近畿地方西部、九州地方南部の各個体群では小さかったことから、選好性は個体群間で異なることが明らかになった。シロツメクサに産卵した割合がごく小さい個体群に大きい個体群を交配したところ、その子世代ではやや大きくなった。次に、各植物を与えた場合の幼虫の発育を調べるために、上記の 8 ヶ所のうち 4 ヶ所の個体群を対象として、両植物による幼虫の飼育を行った。その結果、羽化率には個体群と供試植物による違いは認められず、ほとんどの個体が正常に羽化したが、蛹体重は、いずれの個体群においても、ミヤコグサを与えた区の方が有意に重かった。また、いずれの食草を与えた場合も、近畿地方中部と四国地方の個体群は近畿地方西部と九州地方南部の個体群よりも蛹体重は有意に重かった。蛹体重の異なる個体群間で交配を行ったところ、子世代の蛹体重は中間的な傾向を示した。これら一連の実験で得られたデータをもとに、雌の蛹体重と総産卵数について解析を行ったところ、両者には正の相関が認められた。韓国の個体群は、シロツメクサにも産卵し、幼虫もこの植物で成虫まで発育した。

これらのことから、本種の本来の食草はミヤコグサで、一部の個体群でシロツメクサに寄主の拡大が起こったと推察された。

第 2 章 配偶行動と近縁種の影響

本種の配偶行動における雄の雌探索の鍵刺激を明らかにするために、さまざまな成虫の標本モデルを用いて野外観察を行った。その際、本種と同所的に生息し、比較的近縁なヤマトシジミ *Pseudozizeeria maha* についても同様の観察を行った。その結果、両種ともに、雄は翅を広げたモデルにはほとんど接近しな

かったのに対して、翅を閉じたモデルに強い関心を示すことが明らかになった。交尾試行にいたるまでの過程では、本種の雄はモデルに接近し、直後に接触して交尾姿勢をとったが、*P. maha* の雄はモデルの近隣で求愛を行うなど、種間で違いが見られた。本種の雄は、*P. maha* の雌雄のモデルにはほとんど接近しなかったが、*P. maha* の雄は、本種の雄モデルに対して、求愛や接触を行った。

次に、近縁種ヒメシルビアシジミ *Z. otis* との交雑の可能性を明らかにするために、同種の雄と本種の雌を円筒型ネットに入れて配偶行動を観察した。その結果、*Z. otis* 雄は本種の雌に強い関心を示し、交尾が成立した。F1 世代をシロツメクサで飼育したところ、雄は正常に発育したが、雌は卵期または幼虫期に発育が遅延した。

これらのことから、本種は上記 2 種の近縁種の雄から求愛行動を受けることが明らかになり、とくに *Z. otis* が同所的に生息する場合には、繁殖干渉が起こる可能性が考えられた。

第 3 章 *Wolbachia* 感染と寄主操作

飼育実験の結果、子世代がすべて雌になる事例が発見されたため、日本各地の 14 ヶ所と韓国の個体群を対象に、*wsp* 領域の一部 (555-558 bp) と *ftsZ* 領域の一部 (621 bp) を用いて、昆虫類に性比異常を引き起こすことが知られる細胞内共生細菌 *Wolbachia pipientis* (以下、*Wolbachia*) の感染の有無とその系統を調査した。その結果、全体で合計 3 系統の *Wolbachia* (Tn1、Tn2、Ny1) が確認された。近畿地方中部の 2 ヶ所の個体群では Tn1 と Tn2 が確認され、そのうち 1 ヶ所では 50% 以上の高頻度で Tn1 に感染していた。九州地方の個体群では Tn1、関東地方の個体群では Tn2 または Ny1、中部地方の個体群では Ny1 が確認されたのに対して、近畿地方西部と四国地方の個体群はすべて非感染であった。また、韓国の個体群では、解析した 16 個体すべてが Tn1 もしくは Ny1 に感染しており、非感染個体は見られなかった。これらのことから、*Wolbachia* の感染については、非感染も含めて個体群間で頻度が異なるとともに、感染系統にも違いがあることが明らかになった。

各個体群の子世代の性比を調査したところ、近畿・関東両地方の個体群では、Tn2 感染雌の子世代のふ化率は約 50% でほとんどが雌として羽化した。擬成虫期に死亡した個体や羽化に失敗した個体のほとんどは雄の翅の斑紋パターンと外部生殖器に雌雄の特徴を有する性モザイクであった。その細胞を観察した

ところ、これらの性モザイク個体はすべて遺伝的には雄であったことから、体の一部が雌化したものと考えられた。また、Tn2 感染雌の一部では、産卵初期の子世代に性モザイクの出現率が高い傾向が認められた。一部の個体群では Tn1 と Ny1 が高い感染率を示したものの、明確な寄主操作は確認されなかった。

これらのことから、Tn2 系統の *Wolbachia* は、本種に対して「雄殺し」と呼ばれる寄主操作を行い、さらに一部の個体を性モザイク化することが明らかになった。

第4章 遺伝的多様性

本種の遺伝的多様性と集団分化の程度を明らかにするために、前章の個体群を対象として、ミトコンドリア DNA (以下、mtDNA) の ND5 領域の一部 (832 bp) と COI 領域の一部 (658 bp)、核 DNA の *Tpi* 領域の一部 (355-360 bp) の塩基配列を調査した。日本各地の個体群における mtDNA の解析では、ND5 と COI の 2 つの領域を合わせて 6 通りのハプロタイプ (I~VI) が確認された。近畿地方の個体群では、3 ハプロタイプ (I、II、IV) が確認され、関東地方北部、四国地方、九州地方の個体群では、共通のハプロタイプが見られたが、それらの出現頻度は異なっていた。関東地方南部の個体群では 1 ハプロタイプ (III)、中部地方の個体群では 2 ハプロタイプ (V、VI) が見られ、他のいずれの個体群とも共通のものは認められなかった。mtDNA ハプロタイプは、Tn1 感染個体では IV、Tn2 感染個体では I、II、III のいずれか、Ny1 感染個体では I または V であったことから、*Wolbachia* 感染系統と関連していると考えられた。核 DNA の解析では 6 ハプロタイプ (A~F) が確認された。ハプロタイプ A は全国に分布していたが、ハプロタイプ B、C は近畿・四国両地方の個体群、ハプロタイプ D、F は関東・中部両地方の個体群にのみ見られ、個体群間で出現頻度は異なっていた。また、韓国の個体群で見られた 2 種類の mtDNA ハプロタイプ (VII、VIII) は、いずれも日本国内のものとは異なったが、核 DNA はすべて関東・中部両地方の個体群で見られたハプロタイプ D と一致した。

日本国内の個体群の遺伝的多様性を比較したところ、ほぼすべての個体群間でハプロタイプ頻度が異なり、個体群の分化が認められた。遺伝的分化の程度と地理的距離の関係について解析したところ、離れた個体群間では分化の程度が高かったことから、本種の移動性は低く、各個体群の遺伝的構造は不連続であることが明らかになった。

以上のような本研究の結果から、本種の保全方法を検討するうえでの基礎情報が明らかになり、飼育や交配などの繁殖に関する技術も確立された。本種の保全においては、まず、各個体群の寄主植物の利用能力、*Wolbachia* 感染の有無、遺伝的多様性解析などの調査を実施したうえで、最小保全単位を決定し、生息環境の維持・管理手法を確立する必要がある。また、生息域外での累代飼育と野生復帰を実施する場合には、近縁種による繁殖干渉を考慮しつつ、保全単位をもとにファウンダー個体や導入場所の選定を行うことが重要と考えられる。

謝 辞

多大なご指導、ご助言を賜った大阪府立大学大学院生命環境科学研究科の石井実教授、広渡俊哉准教授、ならびに平井規央助教に厚く御礼申し上げます。また、本論文の作成にあたり、貴重な意見を賜った同研究科の大木理教授、藤原宣夫教授に厚く御礼申し上げます。

同研究科の天満和久博士、天満奈央氏、藤澤貴弘氏、長田庸平氏、鳥居美宏氏、松岡悠氏、水田早苗氏、猪塚彬土氏、吉田貴大氏には、調査実験等で多大な御協力をいただいた。深く感謝申し上げます。

また、同研究科の大門弘幸教授、大江真道准教授、三柴啓一郎准教授、中山祐一郎准教授、青木大輔博士、立花詠子氏、東京大学総合研究博物館の矢後勝也博士、橿原市昆虫館の木村史明博士、中谷康弘氏、鳥取大学の中秀司助教、中部県環境科学研究所の小林隆人博士、(独法)森林総合研究所の井上大成博士、横浜植物防疫所の吉田優二氏、日本鱗翅学会会員の森地重博氏、蓑原茂氏、大阪昆虫同好会会員の吉崎孝氏、近畿中国四国農業研究センターの三浦一芸教授、九州大学の阿部芳久教授、コペンハーゲン大学の Niels Peder Kristensen 教授、ハワイ大学の Janice Y. Uchida 教授、北海道大学の坂本洋典博士、大阪府環境農林水産総合研究所の安達（萩森）鉄矢博士、協友アグリ株式会社の谷川哲朗氏には、実験材料の収集や解析方法の御教授など、本研究の遂行にあたって多大なご協力、ご助言をいただいた。深く感謝申し上げます。

最後になったが、折に触れ、ご助言、ご協力頂いた同研究科の各位、そして、博士課程への進学を快諾いただき、温かく見守り続けてくれた母と祖父母に深く感謝の意を表す。

引用文献

- 阿江 茂 (1986) アゲハチョウの生物学. たたら書房. 鳥取. 118pp.
- 愛知県 (2009) 愛知県の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブックあいち 2009—. 愛知県環境部自然環境課.
- Allendorf, F. W., R.F. Leary, P. Spruell, J. K. Wenburg (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 613-622.
- Anbutsu, H. and T. Fukatsu (2003) Population dynamics of male-killing and non-male-killing spiroplasmas in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1428-1434.
- Anthony, N., D. Gelembiuk, D. Rateman and C. Nice (2001) Isolation and characterization of microsatellite markers from the endangered Karner blue butterfly *Lycaeides melissa samuelis* (Lepidoptera). *Hereditas* 134: 271-273.
- Armbruster, P. and R. A. Hutchinson (2002) Pupal mass and wing length as indicators of fecundity in *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes geniculatus* (Oliver) (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 39: 699-704.
- 浅井康宏 (1993) 緑の侵入者たち—帰化植物のはなし—. 朝日選書. 朝日新聞社. 294pp.
- Avise, J. C. (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York. 511pp.
- Avise, J. C. (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 447pp.
- Avise, J. C. and W. S. Nelson (1989) Molecular genetic relationships of the extinct Dusky Seaside Sparrow. *Science* 243:646-648.
- Awmack, C. S. and S. R. Leather (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 47: 817-844.
- Baillie, J. E. M. C. Hilton-Taylor and S. N. Stiert (2004) *IUCN Red list of Threatened Species. A Global Species Assessment*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge.
- Baldo, L., J. C. D. Hotopp, K. A. Jolley, S. R. Bordenstein, S. A. Biber R. R. Choudhury, C. Hayashi, M. C. J. Maiden, H. Tettelin and J. H. Werren

- (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 7098–7110.
- Ballard, J. W. (2000) Comparative genomics of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans*. *Journal of Molecular Evolution*. 51(1): 64-75.
- Beck, S. D. (1968) *Insect Photoperiodism*. Academic Press, New York. 288pp.
- Begon, M., J. L. Harper and C. R. Townsend (1996) *Ecology; individuals, populations and communities*, 3rd ed. Blackwell, Oxford.
- Beltrán, M., C. D. Jiggins, V. Bull, M. Liares, J. Mallet, W. O. McMillan and E. Bermingham (2002) Phylogenetic discordance at the species boundary: gene genealogies in *Heliconius* butterflies. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2176-2190.
- Benton, M. J. and R. J. Twitchett (2003) How to kill (almost) all life: the end-Permian extinction event. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 358-365.
- Bernays, E. A. (2001) Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual Review of Entomology* 46: 703-727.
- Bucher, G. E. and G. K. Bracken (1976) The bertha armyworm *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). Artificial diet and rearing technique. *The Canadian Entomologist* 108: 1327-1338.
- Boggs, C. L. and L. E. Gilbert (1979) Male contribution to egg production in butterflies: evidence for transfer of nutrients at mating. *Science* 206: 83-84.
- Bonte, D., T. Hovestadt and H. J. Poethke (2009) Sex-specific dispersal and evolutionary rescue in metapopulations infected by male killing endosymbionts. *BMC Evolutionary Biology* 9:16.
- Bossart, J. L. and J. M. Scriver (1999) Preference-variation in the polyphagous Tiger Swallowtail butterfly (Lepidoptera: Papilionidae). *Environmental Entomology* 28: 628-637.
- Bowen, B.W. and J.C. Avise (1990) Genetic structure of Atlantic and Gulf of Mexico populations of sea bass, menhaden, and sturgeon: the influence of zoogeographic factors and life-history patterns. *Marine*

- Biology* 107: 371-381.
- Bowers, M. D. (1986) Population differences in local hostplant use in the checkerspot butterfly, *Euphydryas chalcedona*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 40: 61-69.
- Bogdanowicz, S. M., W. E. Wallner, J. Bell, T. M. Odell and R. G. Harrison (1993) Asian gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae) in North America: Evidence from molecular data. *Annals of the Entomological Society of America* 86: 710-715.
- Bourtzis, K. and S. L. O'Neill (1998) *Wolbachia* infections and arthropod reproduction. *Bioscience* 48(4): 287-293.
- Bovien, P. (1937) Some types of association between Nematodes and Insects. *Vidensk. Meddr dansk. Naturh. Foren.* 101: 1-114.
- Braig, H. R., W. G. Zhou, S. L. Dobson, S. L. O'Neill (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology* 180: 2373-2378.
- Buchner, P. (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Micro-organisms*. New York, 909pp.
- Carroll, S. B., J. Gates, D. Keys, F. Kesbeke, P. J. Wijngaarden, A. Moneiro, V. French and S. B. Carroll (1994) Pattern formation and eye spot determination in butterfly wings. *Science* 265: 109-113.
- Casiraghi, M., S. R. Bordenstein, L. Baldo, N. Lo, T. Beninati, J. J. Wernegreen, J. H. Werren and C. Bandi (2005) Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology* 151: 4015-4022.
- Chai H-N., Y-Z. Du, B-L. Qiu, B-P. Zhai (2011) Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in the Asiatic rice leafroller, *Cnaphalocrocis medinalis*, in Chinese populations. *Journal of Insect Science* 11:123
- 蝶研サロン編集部 (2005) シルビアシジミ記録地一覧 (第一稿). 蝶研サロン 225: 4-12.
- Clement, M., D. Posada and K. A. Crandall (2000) TCS: A computer program to

- estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Cohen, A. C. and L. K. Smith (1998) A New Concept in Artificial Diets for *Chrysoperla rufilabris*: The Efficacy of Solid Diets. *Biological Control* 13: 49–54.
- Coyne, J.A. (1985) The genetic basis of Haldane's rule. *Nature* 314: 736–738.
- Crnokrak, P. and D. A. Roff (1999) Inbreeding depression in the wild. *Heredity* 83: 260–270.
- Daily, G. C. (1999) Developing a scientific basis for managing Earth's life support systems. *Conservation ecology* 3: 14.
[online] URL: <http://www.consecol.org/vol3/iss2/art14/>
- Danilevsky, A. S. (1961) *Photoperiodizm i sezonnoje razvitije nasekomykh (Photoperiodism and seasonal development of insects)*. Izdat. Leningrad Gos. Universit., Leningrad, 243 pp. (in Russian).
- Danks, H. V. (1978) Modes of seasonal adaptation in the insects. I. Winter survival. *Canadian Entomologist* 110: 1167–1205.
- Davies, N. B. (1978) Territorial defence in the speckled wood butterfly (*Pararge aegeria*): the resident always wins. *Animal Behaviour* 26: 138–147. (doi:10.1016/0003-3472(78)90013-1)
- Dean, M. D., K. J. Ballard, A. Glass and J. W. O. Ballard (2003) Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of east African *Drosophila simulans*. *Genetics* 65: 1959–1969.
- Dennis, R. L. H. and W. R. Williams (1987) Mate location behaviour of the large skipper butterfly *Ochlodes venata*: flexible strategies and spatial components. *The Journal of the Lepidopterists' Society* 41: 45–64.
- Drayton, B. and R. B. Primack (1999) Experimental extinction of garlic mustard (*Alliaria petiolata*) populations: Implications for weed science and conservation biology. *Biological Invasions* 1: 159–167.
- Dvořáková, H., T. Fér and K. Marhold (2010) Phylogeographic pattern of the European forest grass species *Hordelymus europaeus*: cpDNA evidence. *Flora* 205: 418–423.
- Dyson, E. A., M. K. Kamath, G. D. D. Hurst (2002) *Wolbachia* infection associated with all-female broods in *Hypolimnas bolina* (Lepidoptera:

- Nymphalidae): evidence for horizontal transmission of a butterfly male killer. *Heredity* 88: 166-171.
- 愛媛県 (2003) 愛媛県レッドデータブック. 愛媛県県民環境部環境局自然保護課. 447pp.
- Ehrlich, P. R. and A. H. Ehrlich (1992) The value of biodiversity. *Ambio* 21(3): 219-226.
- Engelstädter, J. and G. D. D. Hurst (2007) The impact of male-killing bacteria on host evolutionary processes. *Geneics* 175: 245-254.
- Excoffier, L. and H. E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fialho, R. F. and L. Stevens (2000) Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267: 1469-1473.
- Fitch, W. M. (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase submit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294-299.
- Forbes, S. H. and J. T. Hogg (1999) Assessing population structure at high levels of differentiation: microsatellite comparisons of bighorn sheep and large carnivores. *Animal Conservation* 2: 223-233.
- Forister, M. L. (2004) Oviposition preference and larval performance within a diverging lineage of lycaenid butterflies. *Ecological Entomology* 29: 264-272.
- Frankel, O. H. and M. E. Soulé (eds.) (1981) *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambrodfe, UK.
- Frankham, R. (1995) Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29:

- 305-327.
- Frankham, R. (1995b) Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conservation biology* 9: 792-799.
- Frankham, R., J. D. Ballou, D. A. Briscoe (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. 617pp.
- 福田晴夫 (2012) 1950 年以降に南西諸島を北上したチョウ類 (1). やどりが. 232: 16-33.
- 福田晴夫 (2012) 1950 年以降に南西諸島を北上したチョウ類 (2). やどりが. 234: 28-39.
- 福田晴夫・浜栄一・葛谷健・高橋昭・高橋真弓・田中蕃・田中洋・若林守男・渡辺康之 (1984) 原色蝶類生態図鑑 (III). 保育社, 大阪. 373pp.
- Futuyma, D. J. (1986) *Evolutionary Biology*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 岐阜県 (2009) 岐阜県の絶滅のおそれのある野生生物 (動物編) 改訂版—岐阜県レッドデータブック (動物編) 改訂版—. 環境生活部清流の国ぎふづくり推進課.
- Gilbert, L. E. (1976) Postmating female odor in *Heliconius* butterflies : a male-contributed antiaphrodisiac? *Science* 193: 419-420.
- Gilpin, M. E. and M. E. Soulé (1986) Minimum viable populations: Processes of species extinction. 19-34. In ed. M. E. Soulé. *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer & Associates, Sunderland.
- Gompert, Z., C. C. Nice, J. A. Fordyce, M. L. Forister and A. M. Shapiro (2006) Identifying units for conservation using molecular taxonomy: the cautionary tale of the Karner blue butterfly. *Molecular Ecology* 15: 1759–1768.
- Gröning, J. and A. Hochkirch (2008) Reproductive interference between animal species. *Quarterly Review of Biology* 83: 257–282.
- Guerrant, E. O. (1992) Genetic and demographic considerations in the sampling and reintroduction of rare plants. pp321-346 In Fiedler, P. L., S. K. Jain editors. *Conservation biology: theory and practice of nature conservation and management*. Chapman and Hall, New York.
- Haig, S. M., R. S. Wagner, E. D. Forsman, T. D. Mullins (2001) Geographic

- variation and genetic structure in spotted owls. *Conservation Genetics* 2: 25-40.
- Haldane, J. B. S. (1922) Sex-ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* 12: 101-109
- Harper, G. L., N. Maclean, D. Goulson (2003) Microsatellite markersto assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Molecular Ecology* 12: 3349-3357.
- Hamrick, J. L. and M. J. W. Godt. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. pp281-304. In Avise, J. C. and J. L. Hamrick (eds). *Conservation Genetics*, Chapman and Hall, New York.
- Hastings, A. and S. Hrrison (1994) Metapopulation dynamics and genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 167-188.
- Heath, B. D., R. J. Butcher, W. G. F. Whitfield and S. F. Hubbard (1999) Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a natural occurring mechanism. *Current Biology* 9: 313-316.
- Hewitt, G. M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hewitt, G. M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- 平林純之介・江田慧子・中村寛志 (2009) 国営アルプスあづみの公園保護区におけるオオルリシジミ *Shijimiaeoides divinus barine* 蛹導入個体群に関する生命表調査. 信州大学農学部紀要 45: 21-30.
- Hiroki, M. and Y. Kato (1996) Age-related sexual receptivity change in virgin females of a butterfly, *Eurema hecabe*. *Applied Entomology and Zoology* 31: 455-458.
- Hiroki, M., Y. Kato, T. Kamito, K. Miura (2002) Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera : Pieridae). *Naturwissenschaften* 89: 167-170.
- Hiroki, M., Y. Tagami, K. Miura and Y. Kato (2004) Multiple infection with

- Wolbachia* inducing different reproductive manipulations in the butterfly *Eurema hecabe*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271: 1751-1755.
- Hiyama, A., C. Nohara, S. Kinjo, W. Taira, S. Gima, A. Tanahara and J. M. Otaki (2012) The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. *Scientific Reports* 2: 570.
- 日浦勇 (1973) 海を渡る蝶. 蒼樹書房、東京. 200pp.
- Hoffmann, A. A., M. Turelli, L. G. Harshman (1990) Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics* 126: 933-948.
- 本田計一 (2005a) 配偶行動. 本田計一・加藤義臣編, 「チョウの生物学」 pp. 302-349.
- 本田計一 (2005b) 形態と体色. 本田計一・加藤義臣編, 「チョウの生物学」 pp. 255-301.
- Honda, K. and N. Hayashi (1995a) Chemical factors in rutaceous plants regulating host selection by two swallowtail butterflies, *Papilio protenor* and *P. zuthus* (Lepidoptera: Papilionidae). *Applied Entomology and Zoology* 30: 327-334.
- Honda, K. and N. Hayashi (1995b) A flavonoid glucoside, phellamurin, regulates differential oviposition on a rutaceous plant, *Phellodendron amurense*, by two sympatric swallowtail butterflies, *Papilio protenor* and *P. xuthus*: the front line of a coevolutionary arms race? *Journal of Chemical Ecology* 21: 1531-1539.
- Honěk, A. (1996) The relationship between thermal constants for insect development: a verification. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 60: 115-152.
- Hopkins, A. D. (1916) Economic investigations of the scolytid bark and timber beetles of North America. U.S. Department of Agriculture Program of Work for 1917, p. 353.
- Hosokawa, T., Y. Kikuchi, M. Shimada and T. Fukatsu (2008) Symbiont acquisition alters behaviour of stinkbug nymphs. *Biology Letters* 4: 45-48.

- Hougen-Eitzman, D. and M. D. Rausher (1994) Interactions between herbivorous insects and plant-insect coevolution. *American Naturalist* 143: 677-697.
- Hsiao, T. (1978) Host plant adaptations among geographic populations of the Colorado Potato Beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 437-447.
- Hudson, R. R., M. Kreitman and M. Aguade (1987) A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. *Genetics* 116: 153-159.
- Hucka, S., B. Büdelba and T. Schmitta (2012) Ice-age isolation, postglacial hybridization and recent population bottlenecks shape the genetic structure of *Meum athamanticum* in Central Europe. *Flora* 207: 399- 407.
- Hurst, G. D. D., T. C. Hammarton, C. Bandi, T. M. O. Majerus, D. Bertrand and M. E. N. Majerus (1997) The diversity of inherited parasites of insects: the male-killing agent of the ladybird beetle *Coleomegilla maculata* is a member of the Flavobacteria. *Genetical Research* 70: 1-6.
- Hurst, G. D. D., F. M. Jiggins, J. H. G. von der Schulenburg, D. Bertrand, S. A. West, Goriacheva, I. I. *et al* (1999). Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266: 735-740.
- Hurst, G. D. D. and M. E. N. M Majerus (1993) Why do maternally inherited microorganisms kill males? *Heredity* 71: 81-95.
- Ibrahim, K. M., R. A. Nichols and G. M. Hewitt (1995) Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* 77: 282-291.
- Imafuku, M., Y. Hirose, T. Takeuchi (2002) Wing colors of *Chrysozephyrus* butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae) : ultraviolet reflection by males. *Zoological Science* 19: 175-183.
- Inoue, T., O. Kitade, T. Yoshimura, I. Yamaoka (2000) Symbiotic associations with protists. pp275-288. In Abe, T., D. E. Bignell and M. Higashi (ed.). *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 石井実 (1993) チョウ類のトランセクト調査. 矢田 脩・上田恭一郎編, 「日本

- 産蝶類の衰亡と保護第2集」, pp. 91-101, 日本鱗翅学会 (大阪)・日本自然保護協会 (東京).
- 石井実 (2000) 生活史の適応と行動. 中筋房夫・内藤親彦・石井実・藤崎憲治・甲斐英則・佐々木正己「応用昆虫学の基礎」朝倉書店.東京 pp42-73.
- 石井実 (2001a) 生き物からみたミティゲーションー昆虫. 森本幸裕・亀山 章編「ミティゲーションー自然環境の保全・復元技術ー」. ソフトサイエンス. pp. 154-171.
- 石井実 (2001b) 森林文化とチョウ相の成り立ちー大阪での考察ー. 金子務・山口裕文編「照葉樹林文化論の現代的展開」. 北海道大学図書刊行会. pp. 351-372.
- Ishii, M., N. Hirai and T. Hirowatari (2008) The occurrence of an endangered lycaenid, *Zizina emelina* (de l'Orza) (Lepidoptera, Lycaenidae), in Osaka International Airport, central Japan. *Transaction of the Lepidopterological Society of Japan* 59: 78-82.
- Ishii, M. and Y. Nakamura (2012) Development and future of insect conservation in Japan. In, New TR. *Insect Conservation: Past, Present and Prospects*. pp.339-357.
- Ishikawa, H. (1989). Biochemical and molecular aspects of endosymbiosis in insects. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* 116: 1-45.
- 岩坂佳和 (2004) ふおとぎやらりーII: 鴨川市嶺岡のシルビアシジミ生態写真. 房総の昆虫 32: 68-69.
- Jiggins, C. D., M. Linares, R. E. Naisbit, C. Salazar, Z. H. Yang, J. Mallet (2001) Sex-linked hybrid sterility in a butterfly. *Evolution* 55: 1631-1638.
- Jiggins, F. M (2003) Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: Selective Sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics* 164: 5-12.
- Jiggins, F. M., G. D. D. Hurst and M. E. N. Majerus (1998) Sex ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera : Nymphalidae) is caused by a male killing bacterium. *Heredity* 81: 87-91.
- Jiggins, F. M., G. D. D. Hurst and M. E. N. Majerus (2000) Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267: 69-73.

- Johnstone, R. A., and G. D. D. Hurst (1996) Maternally inherited male-killing microorganisms may confound interpretation of mtDNA variation in insects. *Biological Journal of the Linnean Society* 53: 453-470.
- Kageyama, D., H. Anbutsu, M. Shimada, T. Fukatsu (2007) Spiroplasma infection causes either early or late male killing in *Drosophila*, depending on maternal host age. *Naturwissenschaften* 94: 333-337.
- Kageyama, D. and W. Traut (2004) Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with the sex determination of its host *Ostrinia scapulalis*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 271: 251-258.
- Kageyama, D., S. Ohno, S. Hoshizaki and Y. Ishikawa (2003) Sexual mosaics induced by tetracycline treatment in the *Wolbachia*-infected adzuki bean borer, *Ostrinia scapulalis*. *Genome* 46: 983-989.
- 環境省 (2012) 第 4 次レッドリスト昆虫類. 環境省生物多様性情報システム HP. http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html (2012 年 12 月 28 日確認)
- 環境庁自然保護局野生生物課 (1991) 日本の絶滅のおそれのる野生生物ーレッドデータブック無脊椎動物編ー, 日本野生生物研究センター, 東京.
- 加藤啓三・須田真一・鷺谷いづみ (2007) 栃木県鬼怒川流域におけるシルビアシジミの保全. *昆虫と自然* 42: 23-26.
- Kato, Y. (2000) Interpopulational variation in pupal diapause of the butterfly *Atrophaneura alcinous* (Klug) (Lepidoptera, Papilionidae) in the Kanto District, eastern Japan. *Transactions of the Lepidopterological Society of Japan* 51: 233-242.
- 加藤義臣・遠藤克彦 (2005) 季節適応. 本田計一, 加藤義臣編「チョウの生物学」 pp. 379-403
- 河添信人 (2009) 屋久島におけるシルビアシジミ (広義) について. *月刊むし* 498: 44
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 167-180.
- Kimura, M. and G. H. Weiss (1964) The Stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561-576.

- 貴志孫太夫忠義 (1856) 竹園草木図譜 21 卷
- 気象庁 (2009) 気象統計情報. <http://www.jma.go.jp/jma/menu/report.html>
- 北原正彦 (2003) 富士山山麓のチョウ類群集の多様性に関する一連の研究. 環動昆 14: 49-60.
- 桐谷圭治 (1991) 地球の温暖化は昆虫にどんな影響を与えるか. インセクタリウム 28(7): 4-15.
- 桐谷圭治 (1997) 日本産昆虫、ダニ、線虫の発育零点と有効積算温度. 農環研資料 21: 1-72.
- 桐谷圭治 (2012) 日本産昆虫、ダニの発育零点と有効積算温度定数: 第2版. 農環研報 31: 1-74.
- Kobayashi, T., M. Kitahara, Y. Suzuki and S. Tachikawa (2009) Assessment of the habitat quality of the threatened butterfly, *Zizina emelina* (Lepidoptera, Lycaenidae) in the agro-ecosystem of Japan and implications for conservation. *Transactions of the Lepidopterological Society of Japan* 60: 25-36.
- 高知県 (2002) 高知県レッドデータブック動物編. 高知県文化環境部環境保全課.
- 江田慧子 (2011) オオルリシジミなど里山環境に生息する絶滅危惧シジミチョウ類の保全・保護に関する生態学的研究—オオルリシジミ自然個体群の回復に向けて—. 日本環境動物昆虫学会誌 22: 207-219.
- 江田慧子・平林純之介・中村寛志 (2009) 長野県安曇野における卵寄生蜂メアカタマゴバチによるオオルリシジミ卵への寄生について. 日本環境動物昆虫学会誌 20: 95-102.
- Krauss, J., T. Schmitt, A. Seitz, I. Steffan-dewenter and T. Tschardt (2004) Effects of habitat fragmentation on the genetic structure of the nomophagous butterfly *Polyommatus coridon* along its northern range margin. *Molecular Ecology* 13: 311-320.
- Kristensen, N. P. (2003) *Lepidoptera, moths and butterflies 2: morphology, physiology and development. handbook of zoology, Vol. II, part 36*. Berlin: Walter de Gruyter.
- 久保田義則 (2009) 屋久島にヒメシルビアがいた!. SATSUMA 59(141): 79-83.
- Kudrna, O. (1986) *Butterflies of Europe-Aspects of the Conservation of Butterflies in*

- Europe. Aula-Verlag, Wiesbaden.
- Kuno, E. (1992) Competitive exclusion through reproductive interference. *Researches on Population Ecology* 34: 275-284.
- 葛谷健 (2007) シルビアシジミ : 1950 年代の思い出と栃木県の現状. *昆虫と自然* 42(6): 27-30.
- 京大蝶類研究会 (2004) 兵庫県南部のシルビアシジミ産地. *SPINDA* 19: 3-13.
- Levin, D. A., J. Franciscoortega, R. K. Jansen (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation biology* 10: 10-16.
- Lundgren, L. (1977) The role of intra- and interspecific male: male interactions in *Polyommatus icarus* Rott and some other species blues (Lycaenidae). *J Res. Lepid* 16: 249-264.
- 前川文夫 (1943) 史前帰化植物について. *植物分類地理* 13: 274-279.
- 前川文夫 (1978) 史前帰化植物考. *世界の植物* 3214-3217.
- Magnus, D. B. E. (1950) Beobachtungen zur Balz und Eiablage des Kaisermantels *Argynnis paphia* L. (Lep., Nymphalidae). *Z. Tierpsychol* 7: 435-449.
- 間野隆裕・藤井恒 (2009) 日本産チョウ類の衰亡と保護. 第6集
- 正木進三・矢田脩 (1988) 蝶の季節適応と光周性. 「蝶類学の最近の進歩」日本鱗翅学会特別報告 6 : 341-383
- Matsuda, R. (1976) Morphology and evolution of the insect abdomen. Oxford New York, Pergamon Press.
- Matsumoto, K., (1987) Mating patterns of a sphragis-bearing butterfly, *Luehdorfia japonica* Leech (Lepidoptera: Papilionidae), with descriptions of mating behavior. *Researches on Population Ecology* 29: 97-110.
- van Meer, M. M. M., J. Witteveldt and R. Stouthamer (1999) Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Molecular Biology* 8: 399-408.
- Meffe, G. K. and R. C. Carroll (1997) *Principles of Conservation Biology*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sutherland, Massachusetts.
- Meglecz, E., G. Nve, K. Nave and Z. Varga (1999) Genetic variations in space and time in *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera) populations in north-east Hungary: implications for conservation. *Biol. Conserv.* 89:

251-259.

Menken, S. B. J. and P. Roessingh (1998) Evolution of insect-plant associations. Sensory perception and receptor modifications direct food specialization and host shifts in phytophagous insects. In "Endless Forms: Species and Speciation" Howard DJ and Berlocher SH eds., Oxford University Press, New York, 145-156.

Muhs, D. R., J. F. Wehmler, K. R. Simmons and L. L. York (2003) Quaternary sea-level history of the United States. In Gillespie A.R. (ed), Atwater, B. F. and S. C. Porter, *Quaternary Period in the United States: Developments in Quaternary Science*. Elsevier Science. pp147-153.

Miller, J. R. and K. Strickler (1984) Plant-herbivore relationships: Finding and accepting host plants. In W.J. Bell and R.T. Cardé (eds.), *Chemical Ecology of Insects*. Chapman and Hall, London, pp127-157.

湊正雄監修 (1977) 日本の自然. 平凡社, 223pp

蓑原茂 (2005) シルビアシジミ. 大阪昆虫同好会 (編), 「大阪府の蝶」 p105.

Minohara, S., S. Morichi, N. Hirai, M. Ishii (2007) Distribution and seasonal occurrence of the lycaenid, *Zizina emelina* (de l'Orza) (Lepidoptera, Lycaenidae), around the Osaka International Airport, central Japan. *Transaction of the Lepidopterological Society of Japan* 58: 421-432.

Moran, N. A., A. Telang (1998) Bacteriocyte-associated symbionts of insects: a variety of insect groups harbor ancient prokaryotic endosymbionts. *Bioscience* 48: 295-304.

森本幸裕 (2001) 丘陵地の湿地環境と生物多様性: 信太山を例に. 武内和彦・鷺谷いづみ・恒川篤史編「里山の環境学」東京大学出版会, 東京. pp100-112.

Moritz, C. (1994) Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.

中村英夫 (2007) シルビアシジミの斑紋異常型, ゆずりは 33: 44

中邨徹・田西一義 (1988) シルビアシジミの一食草. 蝶研フィールド 3(7): 40.

中村康弘 (2005) 保全研究の現状と対策. 本田計一・加藤義臣(編), 「チョウの生物学」. pp543-566.

中村康弘 (2009) オガサワラシジミと現状と保全にむけて. 昆虫と自然 44(6):

17-20.

- 中谷貴壽・田下昌志・丸山潔・宇佐美真一・伊藤建夫 (2006) 高山蝶ベニヒカゲ個体群の遺伝的構造. 昆虫 DNA ニュースレター 5: 28-40.
- Narita, S., M. Nomura, Y. Kato and T. Fukatsu (2006) Genetic structure of sibling butterfly species affected by *Wolbachia* infection sweep: evolutionary and biogeographical implications. *Molecular Ecology* 15: 1095-1108.
- Negri, I., M. Pellicchia, P. J. Mazzoglio, A. Patetta, A. Alma (2008) Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex determination system. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 273: 2409-2416.
- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. 512pp
- Nei, M. and W.-H. Li (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5296-5273.
- New, T. R. (1997) *Butterfly conservation 2nd ed.*, Oxford University Press, Cambridge.
- Nichols, R. A. and G. M. Hewitt (1994) The genetic consequences of long distance dispersal during colonization. *Heredity* 72: 312-317.
- Nitao, J. K., M. P. Ayres, R. C. Lederhouse and J. M. Scriber (1991) Larval adaptation to lauraceous hosts: geographic divergence in the spicebush swallowtail butterfly. *Ecology* 72: 1428-1435.
- Normark, B. B. (1994) Phylogeny and evolution of parthenogenesis in the *Aramigus tessellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae). PhD Dissertation, Cornell University, Ithaca, New York.
- 小原嘉明・日高敏隆 (1964) モンシロチョウ (*Pieris rapae crucivora*) の配偶行動に関する研究 : I. 深雌飛翔雄に対する静止雄の flutter response について
- Oberhauser, K. S. (1992) Rate of ejaculate breakdown and intermating intervals

- in monarch butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 31:367-373.
- O'Brien, S. J. (1994) Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annual Review of Genetics* 28: 467-489.
- O'Neill, S. L., R. Giordano, A. M. E. Colbert, T. L. Karr, H. M. Robertson (1992) 16S ribosomal RNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 89: 2699-2702.
- 長田武正 (1972) 日本帰化植物図鑑. 北隆館, 東京. p88
- 大阪府 (2000) 大阪府における保護上の重要な野生生物: 大阪府レッドデータブック. 大阪府環境農林水産部. 443pp.
- 大崎直太 (1986) モンシロチョウー人類営力のパートナー. 桐谷圭治 (編) 「日本の昆虫ー侵略と攪乱の生態学ー」 東海大学出版会 179pp.
- Ohsaki, N. and Y. Sato (1994) Food plant choice of *Pieris* butterflies as a trade-off between parasitoid avoidance and quality of plants *Ecology* 75: 59-68.
- 大塚喜久 (2008) シルビアシジミの斑紋異常個体, 蝶研フィールド. 259・260: 98
- Pivnick, K. A. and J. McNeil (1985) Mate location and mating behavior of *Thymelicus lineola* (Lepidoptera: Hesperidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78: 651-656.
- Pliske, T. E. (1975) Courtship behavior of the monarch butterfly, *Danaus plexippus* L. *Annals of the Entomological Society of America* 68: 143-151.
- Poinsot, D., S. Charlat and H. Mercot (2003). On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *Bioessays* 25: 259-265.
- Posada D and Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Primack, R. B. (2004) *A Primer of Conservation Biology, 3rd edn.* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- プリマック RB・小堀洋美 (2008) 保全生物学のすすめ 改訂版-生物多様性保全のための学際的アプローチ-. 文一総合出版. 400pp.

- Purvis, A. and A. Hector (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature* 405: 212-219.
- Raup, D. M. (1992) *Extinction: Bad genes or bad luck?* W. W. Norton and Company, New York.
- Remington, C. L. (1968) Suture-zones of hybrid interaction between recently joined biotas. *Evolutionary Biology* 2: 321-428.
- Rhainds, M., S. R. Leather, C. Sadof (2008) Polyphagy, flightlessness, and reproductive output of females: a case study with bagworms (Lepidoptera: Psychidae). *Ecological Entomology* 33: 663-672.
- Rigaud, T., C. Soutygrosset, R. Raimond, J. P. Mocquard, P. Juchault (1991) Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *armadillidium-vulgare* latr (isopoda) – recent acquisitions. *Endocytobiosis and Cell Research* 7: 259-273.
- Rozas, J., J. C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer, R. Rozas (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rutowski, R. L. (1991) The evolution of male mate-locating behaviour in butterflies. *The American Naturalist* 138: 1121-1139.
- 埼玉県 (2008) 埼玉県レッドデータブック 2008 動物編. 埼玉県環境部自然環境課.
- Saitoh, S., S. Miyai and H. Katakura (2008) Geographical variation and diversification in the flightless leaf beetles of the *Chrysolina angusticollis* species complex (Chrysomelidae, Coleoptera) in northern Japan. *Biological Journal of the Linnean Society* 93: 557-578.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sakai, T. and S. Masaki (1965) Photoperiod as a factor causing seasonal forms in *Lycaena phlaeas daimio* Seitz. *Kontyû* 33: 275-283.
- Sakamoto, Y., N. Hirai, T. Hirowatari, M. Yago and M. Ishii (2010) Genital Segments of Sexual Mosaic Offspring from *Wolbachia*-Infected Female *Zizina emelina* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Entomological News* 121:

443-450.

- Sakamoto, Y., N. Hirai, T. Tanikawa, M. Yago and M. Ishii (2011) Infection by two strains of *Wolbachia* and sex ratio distortion in a population of the endangered butterfly, *Zizina emelina* (Lepidoptera: Lycaenidae), in Northern Osaka Prefecture, Central Japan, *Annals of the Entomological Society of America* 104: 483-487.
- Saunders, P. T. (1980) *An Introduction to Catastrophe Theory*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Schilthuizen, M. and R. Stouthamer (1997) Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing symbionts in *Trichogramma*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B-Biological Sciences* 264: 361-366.
- Schmitt, T., O. Cizek and M. Konvicka (2005) Genetics of a butterfly relocation: large, small and introduced populations of the mountain endemic *Erebia epiphron silesiana*. *Biological Conservation* 123(1): 11-18.
- Schmitt, T. and G. M. Hewitt (2004) The genetic pattern of population threat and loss: a case study of butterflies. *Molecular Ecology* 13: 21-31.
- Schmitt, T. and P. Müller (2007) Limited hybridization along a large contact zone between two genetic lineages of the butterfly *Erebia medusa* (Satyrinae: Lepidoptera) in Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45: 39-46.
- Scott, J. A. (1974) Mate-locating behavior of butterflies. *The American Midland Naturalist* 91: 103-117.
- Scott, J. A. (1975) Mate-locating behaviour western North American butterflies. *The Journal of Research on the Lepidoptera* 14: 1-40.
- Scott, J. A. (1986) *The butterflies of North America*. Stanford University Press, Stanford.
- Scriber, J. M. (1994) Climatic legacies and sex chromosomes: latitudinal patterns of voltinism, diapause, body size, and host-plant selection on two species of swallowtail butterflies at their hybrid zone. In H. V. Danks (ed.) *Insect life-cycle polymorphism: theory, evolution and ecological consequences for seasonality and diapause control*. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands.

- Scriber, J. M. B. L. Giebink and D. Snider (1991) Reciprocal latitudinal clines in oviposition behaviour of *Papilio glaucus* and *P. canadensis* across the Great Lakes hybrid zone: possible sex-linkage of oviposition preferences. *Oecologia* 87: 360-368.
- 清水建美編 (2003) 日本の帰化植物. 平凡社. 337 pp.
- 自然環境研究センター (2011) 絶滅する前にできることー絶滅危惧種の生息域外保全ー. 環境省自然環境局野生生物課. 東京. 11pp.
- 白水 隆 (1989) 琉球列島のチョウ. 日本の生物 3(2): 14-24.
- 白水 隆 (2006) 日本産蝶類標準図鑑. 学習研究社. 336 pp.
- Silberglied, R. E. (1979) Communication in the ultraviolet. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 373-398.
- Silberglied, R. E. and O. R. Taylor (1978) Ultraviolet reflection and its behavioral role in the courtship of the sulfur butterflies *Colias eurytheme* and *C. philodice* (Lepidoptera, Pieridae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 3: 203-244.
- Šmídová, A., Z. Münzbergová and I. Plačková (2011) Genetic diversity of a relict plant species, *Ligularia sibirica* (L.) Cass. (Asteraceae). *Flora* 206: 151-157.
- Smiley, J. T. (1985) Are chemical barriers necessary for evolution of butterfly-plant association? *Oecologia* 65: 580-583.
- Snodgrass, R. E. (1935) *Principles of Insect Morphology*. London and New York: McGraw-Hill.
- Sperling, F. A. H. (1993) Mitochondrial DNA phylogeny of the *Papilio machaon* species group (Lepidoptera: Papilionidae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 165: 233-242.
- Stouthamer, R., RF Luck RF, Hamilton WD (1990). Antibiotics cause parthenogenetic trichogramma (Hymenoptera, Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 2424-2427.
- 巢瀬司・枝恵太郎 (2003) 日本産蝶類の衰亡と保護 第5集. 日本鱗翅学会, 東京. 242pp.
- 鈴木芳人 (1980) 羽化場所におけるモンシロチョウの雄にかたよった性比の成

- 立過程. 昆虫 48: 299-306
- Suzuki, Y., A. Nakanishi, H. Shima, O. Yata and T. Saigusa (1977) Mating behaviour of four Japanese species of the genus *Pieris* (Lepidoptera: Pieridae). *Kontyû* 45: 300-313.
- 鈴木雄太 (2007) シルビアシジミの生息条件と保全. 昆虫と自然 42(12): 10-12.
- Svärd, L. and C. Wiklund (1991) The effect of ejaculate mass on female reproductive output in the European swallowtail butterfly, *Papilio machaon* (L.) (Lepidoptera: Papilionidae). *Journal of Insect Behavior* 4: 33-41.
- Swofford, D. L. (2002) *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P., L. Fumagalli, A-G. Wust-Saucy, J-F. Cosson (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonisation routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Sugimoto, T. N. and Y. Ishikawa (2012) A male-killing *Wolbachia* carries a feminizing factor and is associated with degradation of the sex-determining system of its host. *Biology Letters* 8: 412-415.
- 高倉耕一・西田佐知子・西田隆義 (2010) 植物における繁殖干渉とその生態・生物地理に与える影響. *Bunrui*. 10(2): 151-162.
- Takami, Y., C. Koshio, M. Ishii, H. Fujii, T. Hidaka and I. Shimizu (2004) Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. *Molecular Ecology* 13: 245-258.
- 竹井一 (2005) シルビアシジミを探してみよう. 蝶研フィールド 20(5): 24-26.
- Takeuchi, T. (2010) Mate-locating behavior of the butterfly *Lethe diana* (Lepidoptera: Satyridae): do males diurnally or seasonally change their mating strategy? *Zool Sci* 27: 821-825.
- Takeuchi, T. and M. Imafuku (2005a) Territorial behavior of a green hairstreak *Chrysozephyrus smaragdinus* (Lepidoptera: Lycaenidae): site tenacity and wars of attrition. *Zoological Science* 22: 989-994.
- Takeuchi, T. and M. Imafuku (2005b) Territorial behavior of *Favonius taxila* (Lycaenidae): territory size and persistency. *The Journal of Research on*

- the Lepidoptera* 38: 59-66.
- Tani, S. (1984) Summer diapause of *Neope niphonica* BUTLER (Lepidopera, Satyridae) in the Boso peninsula and its ecological significance. *Kontyû* 52: 119-127.
- Tauber, M. J., C. A. Tauber and S. Masaki (1986) *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press. N. Y., USA
- 竹田敏 (2007) 脱皮・変態、休眠. 河野義明・田付貞洋 (編) 「昆虫生理生態学」 pp25-31
- 谷川由希子・長谷部光泰・毛利秀雄 (1998) ミトコンドリアゲノムを用いた昆虫の系統推定へのアプローチ. 蝶類 DNA ニュースレター2: 19-22.
- Thomas, J. A. (1989) The return of the large blue butterfly. *British Wildlife* 1: 2-13.
- Thomas, J. A. (1999) Return of the Large Blue. Butterfly. *Conservative news* 71: 18-21.
- Thomas, J. A. and R. Lewington (1991) *The butterflies of Britain and Ireland*. Dorling Kindersley, London
- Thomas, J. A. and M. G. Morris (1994) Patterns mechanisms and rates of extinction among UK invertebrates. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 344: 47-54.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D. G. Higgins (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Thompson, J. N. (1988) Evolutionary genetics of oviposition preference in swallowtail butterflies. *Evolution* 47: 1585-1594.
- Thompson, J. N. and O. Pellmyr (1991) Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 36: 65-89.
- Thompson, J. N., W. Wehling and R. Podolsky (1990) Evolutionary genetics of host use in swallowtail butterflies. *Nature* 344:148-150.
- Thornhill, R. (1976) Sexual selection and paternal investment in insects. *The American Naturalist* 110: 153-163.
- 栃木県林務部・栃木県立博物館 (編) (2005) レッドデータブックとちぎー栃木

- 県の保護上注目すべき地形・地質・野生動植物一. 栃木県林務部, 宇都宮. 898pp.
- Traut, W. and F. Marec (1996). Sex chromatin in Lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology* 71: 239-256.
- Tsuchida, T., R. Koga and T. Fukatsu (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* 303: 1989.
- Turelli, M. and A. A. Hoffmann (1995) Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics* 140: 1319–1338
- Vandekerckhove, T. T. M., S. Watteyne, A. Willems, J. G. Swing, J. Mertens, M. Gillis (1999) Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *Fems Microbiology Letters* 80: 279-286.
- van Dyck, H., E. Matthysen and A. A. Dhondt (1997a) The effect of wing colour on male havioural strategies in the speckled wood butterfly. *Animal Behaviour* 53: 39-51.
- van Dyck, H., E. Matthysen and A. A. Dhondt (1997b) Mate-locating strategies are related to relative body length and wing colour in the speckled wood butterfly *Pararge aegeria*. *Ecological Entomology* 22: 116-120.
- Vane-Wright, R. I. and M. Boppre (1993) Visual and chemical signalling in butterflies: Functional and phylogenetic perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 340: 197–205.
- van Oosterhout, C., W. G. Zijlstra, M. K. van Heuven and P. M. Brakefield (2000) Inbreeding depression and genetic load in laboratory meapopulations of the butterfly *Bicyclus anynana*. *Evolution* 54: 218-225
- Wago, H., Unno, K. and Suzuki, Y. (1976). Studies of the mating behavior of the Pale Grass Blue, *Zizeeria maha argia* (Lepidoptera: Lycaenidae). I Recognition of conspecific individuals by flying males. *Applied Entomology and Zoology* 11: 302–311.
- Wago, H. (1977) Mating behavior of *Zizeeria maha argia* in connection with the

- visual stimuli from *Zizina otis*. *Applied Entomology and Zoology* 12: 203-205.
- Vandewestjine, S., G. Nave and M. Barurette (1999) Spatial and temporal population genetic structure of the butterfly *Aglais urticae* L. (Lepidoptera, Nymphalidae). *Molecular Ecology* 8: 1539-1543.
- Varga, Z. (1977) The distribution of *Amphipyra berbera* Rungs 1949 (Lep.: Noctuidae) in Hungary (in Hung. with German summary). *Annales Musei Herman Ottó, Miskolc* 15: 341-350.
- Vogler, A. P. and R. DeSalle (1993) Phylogeographic patterns in coastal North American tiger beetles (*Cicindela dorsalis* Say) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 47: 1192-1202.
- Vogler, A. P. and R. DeSalle (1994) Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution* 11: 393-405.
- 鷺谷いづみ・矢原徹一 (1996) 保全生態学入門. 文一総合出版. 東京. 270pp.
- Watanabe, M. (1988) Multiple Matings Increase the Fecundity of the Yellow Swallowtail Butterfly, *Papilio xuthus* L., in Summer Generations. *Journal of Insect Behavior* 1: 17-29.
- Weeks, A. R., J. A. Breeuwer (2001) *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268: 2245-2251.
- Wehling, W. F. and J. N. Thompson (1997) Evolutionary conservatism of oviposition preference in a widespread polyphagous insect herbivore, *Papilio zelicaon*. *Oecologia* 111: 209-215.
- Wells, H. and P. H. Wells (1992) The monarch butterfly: a review. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 91: 1-25.
- Wenseleers, T., F. Ito, S. Van Borm, R. Huybrechts, F. Volckaert, J. Billen (1998) Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 265: 1447-1452.
- Werren, J. H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* 42: 587-609.
- Werren, J. H., U. Nur, C. I. Wu (1988) Selfish genetic elements. *Trends in Ecology*

- & *Evolution* 3: 297-302.
- Werren, J. H., W. Zhang, L. R. Guo (1995) Evolution and phylogeny of *Wolbachia* reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 261: 55-63.
- Wickman, P. O. (1992) Mating systems of *Coenonympha* butterflies in relation to longevity. *Animal Behaviour* 44: 141-148.
- Wiklund, C. (1975) The evolutionary relationship between adult oviposition preferences and larval host plant range in *Papilio machaon*. *Oecologia* 18: 85-197
- Wiklund, C., B. Karlsson and O. Leimar (1996) Early male emergence and reproductive phenology of the acult overwintering butterfly *Gonepteryx rhamni* in Sweden. *Oikos* 75: 227-240.
- Wilson, E. O. (1989) Threats to biodiversity. *Scientific American* 261(3): 108-116.
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354
- Yagi, T., G. Sasaki and H. Takebe (1999) Phylogeny of Japanese papilionid butterflies inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial *ND5* gene. *Journal of Molecular Evolution*. 48: 42-48.
- Yago, M., N. Hirai, M. Kondo, T. Tanikawa, M. Ishii, M. Wang, M. Williams, and R. Ueshima (2008) Molecular systematics and biogeography of the genus *Zizina* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Zootaxa*. 1746: 15-38.
- 安田喜憲 (1980) 環境考古学事始. NHK ブックス, 日本放送協会 : 270pp.
- Yin, C. M. and G. M. Chippendale (1979) Diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*: further evidence showing juvenile hormone to be the regulator. *Journal of Insect Physiology*. 25: 513-23.
- 吉尾政信 (2002) チョウの分布拡大と気候の温暖化. 昆虫と自然 37(1): 4-7.
- 吉尾政信 (2005) 日本産ナガサキアゲハのミトコンドリアゲノムの解析と個体群構造. 昆虫 DNA 研究会ニュースレター2: 38-43.
- Yoshio, M. and M. Ishii (1998) Geographical variation of pupal diapause in the great mormon butterfly, *Papilio memnon* L. (Lepidoptera: Papilionidae), in western Japan. *Applied Entomology and Zoology* 33: 281-288.
- 財団法人リバーフロント整備センター (2012) 河川における外来種対策. —誰

でもわかる外来種対策～河川を事例として―. 財団法人リバーフロント整備センター. pp40-44.

Zalucki, M. P., A. R. Clarke and S. B. Malcolm (2002) Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 47: 361-393.

Zhang, P., Y. Lu, M. P. Zalucki and S. Liu (2012) Relationship between adult oviposition preference and larval performance of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Pest Science* 85:247-252.

Zhou, W., F. Rousset, S. O'Neill (1998) Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265: 509–515.

Summary

A study on conservation ecology of life history and genetic diversity in the lycaenid butterfly, *Zizina emelina*

Yoshiko SAKAMOTO

The lycaenid butterfly, *Zizina emelina emelina* (de l'Orza) (Lepidoptera), is distributed from the Kanto district to Tanegashima Island in Japan, and in Korea. *Zizina emelina* occurs in short grasslands such as those of riverbanks, seashores, and ridge of paddy fields, and major larval food plants are the bird's-foot trefoil, *Lotus japonicus* (Fabaceae), and the white clover, *Trefolium repens* (Fabaceae), in Japan. This species is listed in the Red Data List of Japan as one of the most endangered species due to habitat and population destruction and chosen as a model insect for the ex-situ conservation project of the Ministry of Environment, Japan. In order to consider the conservation measures including the ex-situ conservation, essential are the collection of basic information concerning distribution, genetic diversity, host plant, life-history trait, mating behavior, and symbiont, and the establishment of basic techniques for mating, egg collection, larval rearing, and management of diapausing larvae. In this study, both field and laboratory researches for acquiring basic information and techniques were conducted to consider the measures to conserve *Z. emelina* of the Japanese and Korean populations. In Chapter 1, laboratory experiments were conducted to clarify the life history and host plant utilization in *Z. emelina*. In Chapter 2, field observations of mating behavior of *Z. emelina* and investigations of the possibilities of reproductive interference from the most related species, *Z. otis*, and the sympatric lycaenid, *Pseudozizeeria maha*, were conducted. The symbiont infection status was investigated by genetic analysis in Chapter 3, and the degree of genetic differentiation between populations was analyzed in Chapter 4.

Chapter 1: Life history and host-plant utilization

Both field and laboratory researches were conducted to clarify life history and host-plant utilization in *Z. emelina*. A field survey was conducted to elucidate the seasonal prevalence of a population in central Kinki district (a central Kinki population) in 2009. To clarify the temperature and photoperiodic response, egg, larva and pupa of this species were reared under a photoperiod of 16-h light and 8-h dark (16L) at a different constant temperature of 20-30°C and under a different constant photoperiod of 15-12L at 20°C. As a result, adults were observed almost continuously from late April to late October in the field (Fig. 1-1-2). Results of rearing experiment showed that arrested development was not observed in any stages under 16L, while almost 100% of larvae entered diapause under 12L at 20°C as they slightly fed on food with extra molts (Fig. 1-1-5). The results demonstrate that the late instar larvae of *Z. emelina* enter diapause and pass the winter. It is inferred from the incidence of diapause under each photoperiodic condition that the critical photoperiod for inducing larval diapause in the population is approximately 12 h 40 min at 20 °C (Fig. 1-1-4). *Z. emelina* was estimated to have five or six generations in the population, according to the developmental zero, effective accumulated temperature and critical photoperiod obtained from rearing experiment, and the data for the daily mean temperature in 2009 (Table 1-1-1, 1-1-2, Fig. 1-D-1, 1-D-2). It is considered that *Z. emelina* has the low dispersal/migratory ability because the estimated seasonal life cycle is almost consistent with the seasonal prevalence observed in the field.

For comparison of oviposition preference among eight populations in Japan, female adults were put into a plastic container with leaves of *L. japonicus* and *T. repens* and the number of eggs laid on each plant was counted (Fig. 1-4-1). As a result, the rate of eggs laid on *T. repens* was highest in females of the central Kinki population, while it was low in those of the Chubu, western Kinki and southern Kyushu populations, indicating that the preference was different among populations (Table 1-4-2, 1-4-3). When a population with a low oviposition preference for *T. repens* was crossed with the other one with a high preference for the plant, preference of their progenies for the plant was

intermediate between the two populations (Table 1-4-10). Larvae of four of the above eight populations were reared on the two plants to examine the development on each plant. As a result, the emergence rates were not significantly different between both populations and host plants (Table 1-3-2), and almost all individuals made the adult eclosion normally. However, the pupal weights of *L. japonicus* fed groups were significantly greater than those of *T. repens* fed groups in all populations (Table 1-3-4). In both host plants, the pupal weights of central Kinki and Shikoku populations were significantly greater than those of western Kinki and southern Kyushu ones (Fig. 1-3-2). The pupal weight of the hybrids was intermediate between populations with different pupal weights (Fig. 1-3-9). It was proved from the data of these experiments that the number of eggs laid per female was positively correlated with the pupal weight of female (Fig. D-3). In the Korea population, adult females laid on leaves of *T. repens*, and the larvae developed on the plant.

The results showed that the original host plant of *Z. emelina* is *L. japonicus*, and the host range was expanded to *T. repens* in some populations.

Chapter 2: Mating behavior and influences of related species on reproduction

In order to clarify the key stimuli to female finding in the male mating behavior of *Z. emelina* and *Pseudozizeeria maha*, a sympatric lycaenid with a similar wing pattern, observations on the response of flying male to various wing models were carried out in the field (Fig. 2-2-1). As a result, in both species, flying males showed a strong interest in closed-wing models, while they scarcely approached open-wing ones. In the sequence of events, the flying *Z. emelina* males approached and immediately touched the models, and tried to copulate with them, while *P. maha* males displayed courtship posture around them, indicating that both species have the different behavioral patterns. In addition *P. maha* males frequently approached and contacted *Z. emelina* male models, and tried to copulate with them, while *Z. emelina* scarcely approached the *P. maha* models (Fig. 2-2-2, 2-2-3, 2-2-4).

The mating behavior of *Z. emelina* females and *Z. otis* males was observed in net cages to estimate the possibility of hybridization between the most

related species,. As a result, *Z. otis* males were strongly interested in *Z. emelina* females, and two couples were obtained. When the F1 offspring was reared on *T. repens*, males normally developed, but the development of females was retarded in egg or larval stages.

The results showed that *Z. emelina* was affected by means of the reproductive interference especially when *Z. otis* is sympatric with *Z. emelina*.

Chapter 3: *Wolbachia* infection and host manipulation

Some females produced no male offspring in rearing experiments. Therefore, the detection of *Wolbachia pipientis* affecting the host sex ratio and its strain were investigated by genetic analysis of parts of *wsp* and *ftsZ* genes in a total of 14 populations in Japan and Korea. As a result, three strains of *Wolbachia*, Tn1, Tn2 and Ny1, were found in the populations of Japan and Korea (Fig. 3-1-1, 3-1-2). Both Tn1 and Tn2 were found in central Kinki populations, and more than 50% of individuals were infected with Tn1 in one of them (Table 3-1-2). As for Kyushu, Kanto and Chubu populations, infections by Tn1, Tn2 and Ny1 and Ny1 were found respectively. In contrast, no infection was found in western Kinki and Shikoku populations. In Korea, all of the 16 individuals examined were infected with Tn1 or Ny1. The results showed that *Wolbachia* infection strains and their rates were different among populations.

The mean egg hatchability of broods from *wEmeTn2*-infected females was almost 50%, and most of them emerged as female adults in Kinki and Kanto populations (Table 3-1-3, 3-1-4). In that strain, however, individuals which were dead in the pharate adult stage or incompletely emerged had male-like wing patterns, and were sexual mosaics with male and female characteristics in external genitalia (Fig. 3-2-1, 3-2-2). Close observations of somatic cells revealed that these sexual mosaics were genetically male and their body parts were feminized (Fig. 3-1-4). The incidence of sexual mosaics has a tendency to be higher in early offspring produced by Tn2-infected females (Fig. 3-3-1, 3-3-2). Although some populations showed high incidence of Tn1 and Tn2 infection, clear manipulations were not found.

The results showed that Tn2 strain of *Wolbachia* kills the host males and/or induces sexual mosaic in *Z. emelina*.

Chapter 4: Genetic diversity

Mitochondrial *ND5* and *COI* genes and a nuclear *Tpi* gene were analyzed to investigate the genetic diversity and degree of differentiation in above mentioned populations in *Z. emelina*. Six haplotypes (I-VI) were found by analyses of combined *ND5* and *COI* genes (Fig. 4-1). Three haplotypes (I, II, IV) were found in Kinki populations, and northern Kanto, Shikoku and Kyushu populations have haplotypes common to those of Kinki populations. The haplotype frequencies were different among populations. One (III) and Two (V, VI) haplotypes were unique to southern Kanto and Chubu population, respectively. Individuals infected with Tn1 *Wolbachia* had an only mitotype IV, while Tn2- and Ny1-infected individuals a mitotype I, II or III, and I or V, respectively. This indicates that mitochondrial haplotypes are associated with *Wolbachia* strains of infection. Six haplotypes (A-F) were found by analyzing of nuclear DNA (Fig. 4-3). Haplotype A was distributed throughout *Z. emelina* populations in Japan, while Haplotypes B and C, and D and F were unique to Kinki and Shikoku, and Kanto and Chubu populations, respectively, although haplotype frequencies were different among populations. Two mytotypes (VII, VIII) in Korean populations were different from any mytotypes in Japan, while nuclear types of all the Korean individuals examined were identical to Haplotype D in Kanto and Chubu populations in Japan. Haplotype frequencies were proved to be different among almost all populations from comparison of genetic diversity of Japanese populations, indicating the population differentiation in *Z. emelina*. Analysis of the degree of genetic differentiation and geographic distance showed that the degrees were high between distant populations (Fig. D-3), indicating that *Z. emelina* has little migratory activity and the populations are not continuous.

From the results of this study, the basic information on considering measures for the conservation of *Z. emelina* was accumulated with the reproductive techniques for rearing and crossing established.

For conservation of *Z. emelina*, it is essential to decide conservation units and to establish the measures for maintaining habitat environments after investigating the host-plant utilization ability, *Wolbachia* infection and genetic diversity. When the ex-situ preservation plan for successive rearing and reintroduction is arranged, it is important to select populations for obtaining founder individuals and introducing reproducing individuals according to conservation units with due consideration to reproductive interference from the related species.

Table 1-1-1. Developmental periods of eggs, larvae and pupae of *Z. emelina* under different temperature conditions

Temperature (°C)	Egg		Larva		Pupa	
	Number of samples	mean ± SE (days)	Number of samples	mean ± SE (days)	Number of samples	mean ± SE (days)
20	80	6.69 ± 0.06 ^a	134	28.25 ± 0.23 ^a	134	13.20 ± 0.10 ^a
23	48	5.02 ± 0.02 ^b	48	21.42 ± 0.17 ^b	48	10.08 ± 0.13 ^b
25	80	3.78 ± 0.06 ^c	80	18.50 ± 0.21 ^c	81	8.13 ± 0.08 ^c
30	26	2.65 ± 0.10 ^d	26	11.81 ± 0.16 ^d	26	5.58 ± 0.13 ^d

Values followed by a different letter in the same column are significantly different (anova, Tukey–Kramer test, $p < 0.05$).

Table 1-1-2. The regression lines for temperature (t) and developmental rate (V), developmental threshold (t^0) and thermal constants (K) calculated by relations between temperatures and developmental rates of eggs, larva, pupa, and whole immature stages of *Z. emelina*.

Stage	Regression line	R^2	t_0 (°C)	K (day degree)	N
Egg	$V = - 0.341 + 0.0243t$	0.80	14.0	41.2	235
Larva	$V = - 0.057 + 0.0046t$	0.90	12.4	217.4	289
Pupa	$V = - 0.129 + 0.0102t$	0.89	12.7	98.0	289
Egg-Pupa	$V = - 0.040 + 0.0030t$	0.94	13.3	333.3	235

Table 1-3-1. Collected individuals of *Z. emelina* for developmental experiments from ten populations in Japan and two populations in Korea .

Location	Main larval food plant	Landscape	Month of sampling	Female	Male
Kanto-1	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	glassland	Sep. & Nov. 2007	11	0
Kanto-2	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	meadow, glassland	Sep. 2007	3	0
Kanto-3	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	seashore	Nov. 2007	1	0
Chubu	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Oct. 2011	1	0
Kinki-1	<i>T. repens</i> ² , <i>L. sp.</i> ⁴⁾	glassland	June-Oct. 2011 May & June 2012	13	7
Kinki-2	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of pond	June, Aug. & Sep. 2011 June & Jul. 2012	4	7
Kinki-3	<i>L. corniculatus</i> ²	glassland	Apr. 2007	7	0
Kinki-4	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of pond	Jul. 2007	3	0
Shikoku	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Jul. 2012	10	0
Kyushu-1	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Nov. 2011	3	0
Korea-1	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> , <i>Kummerowia stipulacea</i> , <i>K.</i> <i>striata</i>	glassland	Aug. 2012	6	0
Korea-2		glassland	Aug. 2012	1	0

1) Suzuki (2007)

2) Minohara et al. (2007)

3) Takei (2005)

4) This species had both *L. japonicus* and *L. corniculatus*'s characteristics.

Table 1-3-2. Larval survival rates of *Z. emelina* reared under 25-26 °C16L-8D conditions on artificial diet of *L. japonicus* or *T. repens* in nine populations.

Population	Larval food	Survival rate ¹⁾	N
Kanto-1	<i>T. repens</i>	94.9 a	294
Kanto-2	<i>T. repens</i>	91.1 a	79
Kanto-3	<i>T. repens</i>	100 a	7
Chubu	<i>L. japonicus</i>	100 a	14
	<i>T. repens</i>	66.7 a	9
Kinki-1	<i>L. japonicus</i>	98.1 a	317
	<i>T. repens</i>	95.6 a	453
Kinki-2	<i>L. japonicus</i>	93.0 a	57
	<i>T. repens</i>	90.0 a	90
Kinki-3	<i>T. repens</i>	90.0 a	150
Shikoku	<i>L. japonicus</i>	98.1 a	103
	<i>T. repens</i>	95.0 a	119
Kyushu-1	<i>L. japonicus</i>	96.4 a	56
	<i>T. repens</i>	98.0 a	49

1) Rates followed by the same letter are not significantly different at 5% levels by Tukey-type multiple comparison test ($p > 0.05$).

Table 1-3-3. Larval periods of *Z. emelina* reared on *L. japonicus* or *T. repens* artificial diets

Population		Mean \pm SE of larval periods (Days)				<i>t</i> -test ¹⁾	Mann-Whitney <i>U</i> test ²⁾
		<i>L. japonicus</i> fed group	N	<i>T. repens</i> fed group	N		
Chubu	♀	17.4 \pm 0.5	5	17	1	ns	-
	♂	16.9 \pm 0.4]ns		18 \pm 0.8]ns			
Kinki-1	♀	18.5 \pm 0.1	156	17.9 \pm 0.2	242	**	-
	♂	18.1 \pm 0.2]ns		17.1 \pm 0.2]**			
Kinki-2	♀	17.9 \pm 0.2	21	17.6 \pm 0.2	44	ns	ns
	♂	16.8 \pm 0.3]**		16.6 \pm 0.2]**			
Shikoku	♀	19.0 \pm 0.2	53	18.2 \pm 0.2	51	**	-
	♂	18.5 \pm 0.2]ns		17.6 \pm 0.1]**			
Kyushu-1	♀	20.6 \pm 0.4	29	19.0 \pm 0.3	20	**	-
	♂	19.1 \pm 0.3]**		17.2 \pm 0.2]**			

1) Student's *t*-test was performed between *L. japonicus* and *T. repens* fed groups

2) Mann-Whitney *U* test was performed when the group sample variances were unequal.

p* < 0.01, *p* < 0.001, ns: not significant.

Table 1-3-4. Pupal weights of *Z. emelina* reared on *L. japonicus* and *T. repens* artificial diets

Population		Mean \pm SE of pupal weight (mg)				<i>t</i> -test ¹⁾	Mann-Whitney <i>U</i> test ²⁾
		<i>L. japonicus</i> fed group	N	<i>T. repens</i> fed group	N		
Chubu	♀	52.0 \pm 2.5	5	45.6	1	ns	-
	♂	54.0 \pm 4.1] ns		43.1 \pm 4.1] ns			
Kinki-1	♀	53.2 \pm 0.5	156	48.0 \pm 0.4	240	***	-
	♂	51.4 \pm 0.4] **		47.8 \pm 0.5] ns			
Kinki-2	♀	46.9 \pm 0.9	21	40.1 \pm 0.7	44	***	-
	♂	47.1 \pm 0.6] ns		40.9 \pm 0.7] ns			
Shikoku	♀	54.3 \pm 0.6	53	47.8 \pm 0.7	51	***	-
	♂	53.3 \pm 0.7] ns		46.3 \pm 0.9] ns			
Kyushu-1	♀	40.8 \pm 1.4	29	36.1 \pm 1.6	20	*	-
	♂	44.0 \pm 1.2] ns		40.6 \pm 1.3] *			

1) Student's *t*-test was performed between *L. japonicus* and *T. repens* fed groups

2) Mann-Whitney *U* test was also performed when the group sample variances were unequal.

*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, ns: not significant

Table 1-3-5. Pupal weights of *Z. emelina* in four broods in the Kinki-1 population

Larval food	Mother ID	N	Pupal weight (mg)	Tukey Kramer	
			Mean \pm SE		
<i>L. japonicus</i>	♀	T280	21	51.6 \pm 0.6	a
		T281	9	55.9 \pm 0.9	b
		T282	15	55.1 \pm 0.6	b
		T283	20	58.2 \pm 1.0	b
	♂	T280	15	51.4 \pm 0.8	a
		T281	16	52.0 \pm 0.8	a
		T282	12	51.4 \pm 1.8	a
		T283	18	54.9 \pm 0.9	a
<i>T. repens</i>	♂	T280	28	48.0 \pm 1.0	a
		T281	14	52.4 \pm 0.9	b
		T282	15	51.6 \pm 0.9	ab
		T283	27	53.4 \pm 1.2	b
	♂	T280	21	45.7 \pm 1.2	a
		T281	9	50.6 \pm 1.3	b
		T282	10	51.7 \pm 1.1	b
		T283	20	53.3 \pm 0.8	b

Means followed by the same letter in each condition of larval food and sex are not significantly different at 5 % levels by Tukey-Kramer test.

Table 1-3-6. Larval survival rates of *Z. emelina* reared on *L. japonicus* and *T. repens* fresh leaves

Population	No. of broods	Larval food	Survival rate ¹⁾	N
Kinki-1	5	<i>L. japonicus</i>	95.5 a	22
		<i>T. repens</i>	92.3 a	26
Kinki-2	3	<i>L. japonicus</i>	100 a	11
		<i>T. repens</i>	100 a	13

1) Rates followed by the same letter are not significantly different at 5% levels by Tukey-type multiple comparison

Table 1-3-7. Comparison of larval periods between individuals reared on artificial diet and on fresh leaves in the Kinki-1 and Kinki-2 populations in *Z. emelina*

Population	Larval food plant	Sex	Mean \pm SE of larval period (Days)				<i>t</i> -test ¹⁾
			on artificial diet	N	on fresh leaves	N	
Kinki-1	<i>L. japonicus</i>	♀	18.5 \pm 1.8	156	20.9 \pm 0.9	8	***
		♂	18.1 \pm 2.1	151	19.3 \pm 0.4	12	ns
	<i>T. repens</i>	♀	17.8 \pm 2.2	240	18.4 \pm 0.4	9	ns
		♂	17.1 \pm 2.3	165	17.5 \pm 0.3	15	ns
Kinki-2	<i>L. japonicus</i>	♀	17.9 \pm 0.9	21	17.8 \pm 0.5	6	ns
		♂	16.8 \pm 1.4	30	17.2 \pm 0.4	5	ns
	<i>T. repens</i>	♀	17.6 \pm 1.5	44	15.7 \pm 0.3	9	**
		♂	16.5 \pm 1.3	36	15.3 \pm 0.5	4	ns

1) Student's *t*-test was performed between *L. japonicus* and *T. repens* fed groups

***p* < 0.01, ns: not significant.

Table 1-3-8. Comparison of pupal weights between individuals reared on artificial diet and on fresh leaves in the Kinki-1 and Kinki-2 populations in *Z. emelina*

Population	Larval food plant	Sex	Mean \pm SE of pupal weight (mg)				<i>t</i> -test ¹⁾
			on artificial	N	on fresh	N	
Kinki-1	<i>L. japonicus</i>	♀	53.2 \pm 0.5	156	42.9 \pm 2.0	8	***
		♂	51.4 \pm 0.4	151	41.3 \pm 1.9	12	***
	<i>T. repens</i>	♀	48.0 \pm 0.4	240	34.3 \pm 2.3	9	***
		♂	47.8 \pm 0.5	165	32.9 \pm 0.9	15	***
Kinki-2	<i>L. japonicus</i>	♀	46.9 \pm 0.9	21	35.2 \pm 0.7	6	***
		♂	47.1 \pm 0.6	30	34.2 \pm 2.1	5	***
	<i>T. repens</i>	♀	40.1 \pm 0.7	44	28.5 \pm 1.1	9	***
		♂	40.9 \pm 0.7	36	27.9 \pm 2.7	4	***

1) Student's *t*-test was performed between artificial diet and on fresh leaf fed groups

***: $p < 0.001$

Table 1-4-1. Collected individuals of *Z. emelina* for oviposition experiments from nine populations in Japan and two populations in Korea

Location	Main larval food plant	Landscape	Month of sampling	Female	Male
Kanto-1	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	glassland	Sep. & Nov. 2007	13	0
Kanto-2	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	meadow, glassland	Sep. 2007	5	0
Kanto-3	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	seashore	Nov. 2007	1	0
Chubu	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Oct. 2011	1	0
Kinki-1	<i>T. repens</i> ² , <i>L. sp.</i> ⁴⁾	glassland	Oct. 2007 Aug. 2010 Aug.-Nov. 2011 May & Jul. 2012	34	28
Kinki-2	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of pond	Jul. 2007 June Aug. & Sep. 2011	20	10
Kinki-3	<i>L. corniculatus</i> ²	glassland	Jul. & Aug. 2006	3	0
Kinki-4	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of pond	Jul. 2007 Aug. 2010	8	0
Shikoku	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Jul. 2012	12	0
Kyushu-1	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Nov. 2011	3	0
Kyushu-2	<i>L. japonicus</i>	campsite	Sep. 2010	3	0
Korea-1	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> , <i>Kummerowia stipulacea</i> , <i>K.</i> <i>striata</i>	glassland	Aug. 2012	6	0
Korea-2		glassland	Aug. 2012	1	0

1) Suzuki (2007)

2) Minohara et al. (2007)

3) Takei (2005)

4) This species had both *L. japonicus* and *L. corniculatus*'s characteristics.

Table 1-4-2. Host-plant preference for *L. japonicus* and *T. repens* of female adults collected from eight populations and the rate of females preferring each host plants in *Z. emelina*

Population	Preference ¹⁾ ($p < 0.05$)			Rate of female preferring	Rate of female preferring
	<i>L. japonicus</i>	n.s.	<i>T. repens</i>	<i>L. japonicus</i> (%)	<i>T. repens</i> (%)
Kanto-1	2	1	0	66.7	0
Chubu	1	0	0	100	0
Kinki-1	7	1	5	53.8	38.5
Kinki-2	15	0	0	100	0
Kinki-4	1	1	0	50.0	0
Shikoku	11	1	0	91.7	0
Kyushu-1	3	0	0	100	0
Kyushu-2	2	1	0	66.7	0

1) by binomial test

Table 1-4-3. Total number of eggs oviposited on *L. japonicus* and *T. repens* in dual-choice tests by field-collected females from eight populations in *Z. emelina*

Population	No. of eggs oviposited		No. of females	Rate on <i>T. repens</i> (%)
	on <i>L. japonicus</i>	on <i>T. repens</i>		
Kanto-1	167	38	3	18.5 c
Chubu	39	1	1	2.5 cd
Kinki-1	559	361	13	39.2 a
Kinki-2	914	17	15	1.9 d
Kinki-4	104	36	2	25.7 b
Shikoku	387	32	13	7.6 c
Kyushu-1	138	4	3	2.8 cd
Kyushu-2	32	19	3	37.3 ab

Rates followed by the same letter in each stage are not significantly different at 5% levels by Tukey-type multiple comparison test ($p > 0.05$).

Table 1-4-4. Host-plant preference for *L. japonicus* and *T. repens* of female adults collected from the Kinki-1 and Kinki-2 populations and the rate of females preferring each host plants

population	Preference ⁽¹⁾ ($p < 0.05$)			Rate of female preferring	Rate of female preferring
	<i>L. japonicus</i>	n.s.	<i>T. repens</i>	<i>L. japonicus</i> (%)	<i>T. repens</i> (%)
Kinki-1	4	1	0	80.0	0
Kinki-2	3	0	0	100.0	0

1. by binomial test

Table 1-4-5. Total number of eggs oviposited on *L. japonicus* and *T. repens* by field-collected females in alternation test from the Kinki-1 and Kinki-2 populations in *Z. emelina*

Population	No. of eggs oviposited		Number of females	Rate on <i>T. repens</i> (%)
	on <i>L. japonicus</i>	on <i>T. repens</i>		
Kinki-1	307	153	6	33.2
Kinki-2	111	0	3	0

There is a significantly difference between population and rate on *T. repens* ($p < 0.05$)

Table 1-4-6. Host-plant preference for *L. corniculatus* and *T. repens* of female adults collected from six populations and the rate of females preferring each host plants in *Z. emelina*

population	Preference ¹ ($p < 0.05$)			Rate of female preferring	Rate of female preferring
	<i>L. corniculatus</i>	n.s.	<i>T. repens</i>	<i>L. japonicus</i> (%)	<i>T. repens</i> (%)
Kanto-1	4	2	1	100	0
Kanto-2	4	0	1	80.0	20
Kinki-1	3	3	7	23.1	53.8
Kinki-2	5	0	0	100	0
Kinki-3	2	1	0	67	0
Kinki-4	2	0	0	100.0	0

1. by binomial test

Table 1-4-7. Total number of eggs oviposited on *L. corniculatus* and *T. repens* by field-collected females from six populations in *Z. emelina*

Population	No. of eggs oviposited		No. of females	Rate on <i>T. repens</i> (%)
	on <i>L. corniculatus</i>	on <i>T. repens</i>		
Kanto-1	252	85	7	25.2 bc
Kanto-2	132	32	5	13.5 c
Kinki-1	156	205	13	56.8 a
Kinki-2	144	2	5	1.4 d
Kinki-3	52	34	3	39.5 b
Kinki-4	92	0	3	0 d

Rates followed by the same letter in each stage are not significantly different at 5% levels by Tukey-type multiple comparison test ($p > 0.05$).

Table 1-4-8. Comparison of oviposition rates for *T. repens* between two combinational dual-choice tests in *Z. emelina*

Population	Oviposition rate for <i>T. repens</i> %		Chi-square test
	(Total no. of eggs laid)		
	<i>L. japonicus</i> and <i>T. repens</i>	<i>L. corniculatus</i> and <i>T. repens</i>	
Kanto-1	18.5 (205)	25.2 (337)	ns
Kanto-2	-	13.5 (164)	-
Chubu	2.5 (40)	-	-
Kinki-1	39.2 (920)	56.2 (365)	$p < 0.001$
Kinki-2	1.9 (931)	1.4 (146)	ns
Kinki-4	25.7 (140)	0 (92)	$p < 0.001$
Shikoku	7.6 (419)	-	-
Kyushu-1	2.8 (142)	-	-
Kyushu-2	37.3 (41)	-	-

Table 1-4-9. Number of eggs oviposited by mated and unmated female offspring of *Z. emelina* obtained from females in six populations.

population	Median (no. of females)		<i>p</i> ¹⁾
	Mated	Unmated	
Kanto-1	-	4 (14)	-
Kanto-2	-	0 (17)	-
Kinki-1	169 (13)	6 (6)	***
Kinki-2	102 (4)	1 (17)	***
Kinki-3	-	3 (54)	-
Kinki-4	-	5 (11)	-
Hybrid ²⁾	123 (15)	0 (1)	NS
Total	132 (32)	2 (130)	***

1) Mann-Whitney *U* test

2) Hybrid between the Kinki-1 and Kinki-2 populations

Table 1-4-10. Total number of eggs oviposited on *L. japonicus* and *T. repens* in dual-choice tests by females reared on the each host plant from the crossing experiments between the Kinki-1 and Kinki-2 populations in *Z. emelina*

Crossing experiment ♀ × ♂	Larval food plant	No. of eggs oviposited		No. of females	Rate on <i>T. repens</i> (%)
		on <i>L. japonicus</i>	on <i>T. repens</i>		
Kinki-1 × Kinki-1	<i>L. japonicus</i>	582	258	5	30.7 ba
	<i>T. repens</i>	430	312	6	42.1 a
Kinki-1 × Kinki-2	<i>L. japonicus</i>	743	58	4	7.2 de
	<i>T. repens</i>	468	24	4	4.9 ef
Kinki-2 × Kinki-1	<i>L. japonicus</i>	359	63	4	14.9 c
	<i>T. repens</i>	245	35	4	12.5 cd
Kinki-2 × Kinki-2	<i>L. japonicus</i>	345	3	3	0.8 f
	<i>T. repens</i>	86	0	1	0 f

Rates followed by the same letter in each stage are not significantly different at 5% levels by Tukey-type multiple comparison test ($p > 0.05$).

Table 3-1-1. Collected individuals of *Z. emelina* for *Wolbachia* detection from 14 populations in Japan and two populations in Korea

Population	Main larval food plant	Landscape	Month of sampling	Female	Male
Kanto-1	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	glassland	Sep. & Nov. 2007	10	0
Kanto-2	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	meadow, glassland	Sep. 2007	5	0
Kanto-3	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	seashore	Nov. 2007	1	0
Kanto-4	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Sep. 2011	5	2
Chubu	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Oct. 2011	1	1
Kinki-1	<i>T. repens</i> ² , <i>L. sp.</i> ⁴	glassland	Aug. Sep. Oct. & Nov. 2004 June 2005 Apr. Oct. & Nov. 2007 Jun. Jul. & Aug. 2009	62	33
Kinki-2	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of pond	Jul. 2007 Aug. 2010	10	4
Kinki-3	<i>L. corniculatus</i> ²	glassland	Jul. & Aug. 2006 Apr. 2007	14	7
Kinki-4	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of pond	Oct. 2006 Jul. 2007 Aug. 2010	17	16
Kinki-5	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of paddy field	Aug. & Oct. 2006	2	3
Shikoku	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Jul. 2012	10	0
Kyushu-1	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Nov. 2011	1	0
Kyushu-2	<i>L. japonicus</i>	glassland	Sep. 2010	6	1
Kyushu-3	<i>L. japonicus</i>		Jun. 2001	0	2
Korea-1	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> , <i>Kummerowia stipulacea</i> , <i>K.</i>	glassland	Aug. 2012	10	2
Korea-2		glassland	Aug. 2012	4	0
				158	71

1) Suzuki (2007)

2) Minohara et al. (2007)

3) Takei (2005)

4) This species had both *L. japonicus* and *L. corniculatus*'s characteristics

Table 3-1-2. Infection rates of *Wolbachia* in *Z. emelina* in 14 populations in Japan and two populations in Korea

Population	<i>Wolbachia</i> strain	Female	Male	Total	Population	<i>Wolbachia</i> strain	Female	Male	Total
Kanto-1	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Kinki-4	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeTn2	2 (20%)	0 (0%)	2 (20%)		<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	uninfected	8 (80%)	0 (0.0%)	8 (80%)		uninfected	17 (100%)	16 (100%)	33 (100%)
	Total	n=10	n=0	n=10		Total	n=17	n=16	n=33
Kanto-2	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Kinki-5	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeTn2	5 (100%)	0 (0%)	5 (100%)		<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	uninfected	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		uninfected	2 (100%)	3 (100%)	5 (100%)
	Total	n=5	n=0	n=5		Total	n=2	n=3	n=5
Kanto-3	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Shikoku	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeTn2	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)		<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	uninfected	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		uninfected	10 (100%)	0 (0%)	10 (100%)
	Total	n=1	n=0	n=1		Total	n=10	n=0	n=10
Kanto-4	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Kyushu-1	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeNy1	4 (80%)	2 (100%)	6 (86%)		<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	uninfected	1 (20%)	0 (0%)	1 (14%)		uninfected	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
	Total	n=5	n=2	n=7		Total	n=1	n=0	n=1
Chubu	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Kyushu-2	<i>w</i> EmeTn1	4 (0%)	1 (0%)	5 (71%)
	<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	1 (100%)	1 (50%)		<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	uninfected	1 (100%)	0 (0%)	1 (50%)		uninfected	2 (100%)	0 (0%)	2 (29%)
	Total	n=1	n=1	n=2		Total	n=6	n=0	n=7
Kinki-1	<i>w</i> EmeTn1	34 (55%)	24 (73%)	58 (61%)	Kyushu-3	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)
	<i>w</i> EmeTn2	14 (23%)	0 (0%)	14 (15%)		<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	uninfected	14 (23%)	9 (27%)	23 (24%)		uninfected	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)
	Total	n=62	n=33	n=95		Total	n=0	n=2	n=2
Kinki-2	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Korea-1	<i>w</i> EmeTn1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		<i>w</i> EmeNy1	10 (100%)	2 (100%)	12 (100%)
	uninfected	10 (100%)	4 (100%)	14 (100%)		uninfected	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Total	n=10	n=4	n=14		Total	n=10	n=2	n=12
Kinki-3	<i>w</i> EmeTn1	9 (65%)	6 (86%)	15 (71%)	Korea-2	<i>w</i> EmeTn1	2 (50%)	0 (0%)	2 (50%)
	<i>w</i> EmeTn2	2 (14%)	0 (0.0%)	2 (10%)		<i>w</i> EmeTn2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>w</i> EmeNy1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		<i>w</i> EmeNy1	2 (50%)	0 (0%)	2 (50%)
	uninfected	3 (21%)	1 (14%)	4 (19%)		uninfected	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Total	n=14	n=7	n=21		Total	n=4	n=0	n=4

Table 3-1-3. *Wolbachia* infection of female adults of *Z. emelina* collected in the Kinki-1 population in 2004, 2005, 2007 and 2011 and egg hatchability, viability, and sex ratio of their offspring.

Mother		Offspring					
Individual number	<i>Wolbachia</i> infection	Egg hatchability	Larval Survival rate	Female	Male	Female rate	<i>p</i> ¹
<i>in 2004</i>							
S1	uninfected	ne	ne	19	28	0.40	ns
S2	<i>w</i> EmeTn1	ne	ne	7	12	0.37	ns
S3	<i>w</i> EmeTn2	ne	ne	16	0	1.00	***
S4	uninfected	ne	ne	13	17	0.43	ns
S5	uninfected	ne	ne	24	19	0.56	ns
S6	<i>w</i> EmeTn2	ne	ne	28	0	1.00	***
S7	<i>w</i> EmeTn1	0.84 (32)	0.96 (25)	19	5	0.79	**
S8	uninfected	0.89 (37)	0.91 (33)	16	14	0.53	ns
S13	<i>w</i> EmeTn2	0.45 (22)	0.70 (10)	7	0	1.00	**
S14	<i>w</i> EmeTn1	0.95 (41)	0.97 (39)	21	17	0.55	ns
S15	uninfected	0.86 (105)	ne	34	26	0.57	ns
S17	<i>w</i> EmeTn1	0.93 (44)	0.88 (41)	17	16	0.52	ns
S21	uninfected	1.00 (21)	0.80 (21)	8	9	0.47	ns
S25	<i>w</i> EmeTn1	0.88 (34)	ne	12	14	0.46	ns
S32	<i>w</i> EmeTn1	ne	ne	17	4	0.81	**
<i>in 2005</i>							
S103	<i>w</i> EmeTn1	0.89 (108)	ne	23	36	0.39	ns
S104	uninfected	0.91 (46)	ne	16	18	0.47	ns
S105	<i>w</i> EmeTn2	0.48 (58)	ne	13	0	1.00	***
S106	<i>w</i> EmeTn2	0.38 (88)	ne	20	0	1.00	***
S108	uninfected	0.78 (45)	ne	11	9	0.55	ns
S109	<i>w</i> EmeTn1	0.86 (59)	ne	20	24	0.45	ns
S110	<i>w</i> EmeTn1	0.94 (53)	ne	19	23	0.45	ns
S111	<i>w</i> EmeTn2	0.47 (115)	ne	31	0	1.00	***
S112	<i>w</i> EmeTn1	0.90 (30)	ne	15	4	0.79	**
S113	<i>w</i> EmeTn2	0.44 (39)	ne	6	0	1.00	ns
S114	<i>w</i> EmeTn2	0.47 (101)	ne	37	0	1.00	***
S115	<i>w</i> EmeTn1	0.38 (55)	ne	5	6	0.45	ns
S116	<i>w</i> EmeTn1	0.58 (80)	ne	13	11	0.54	ns
S117	uninfected	0.75 (44)	ne	8	9	0.47	ns
S118	<i>w</i> EmeTn2	0.58 (12)	ne	7	0	1.00	*
S119	<i>w</i> EmeTn1	0.86 (43)	ne	10	15	0.40	ns
S120	<i>w</i> EmeTn1	0.85 (27)	ne	9	8	0.53	ns
S121	<i>w</i> EmeTn1	0.93 (59)	ne	20	14	0.59	ns
S122	uninfected	0.55 (20)	ne	2	7	0.22	ns
S123	<i>w</i> EmeTn2	0.60 (124)	ne	41	1	0.98	***
S124	uninfected	0.77 (48)	ne	17	12	0.59	ns
<i>in 2007</i>							
T8	<i>w</i> EmeTn1	0.90 (19)	0.88 (17)	10	5	0.67	ns
T12	<i>w</i> EmeTn1	0.90 (10)	1.00 (9)	4	5	0.44	ns
T13	<i>w</i> EmeTn1	0.95 (22)	0.86 (21)	12	7	0.63	ns
T14	<i>w</i> EmeTn1	1.00 (15)	0.80 (15)	4	8	0.33	ns
T15	<i>w</i> EmeTn1	1.00 (25)	0.92 (24)	11	11	0.50	ns
T23	uninfected	0.91 (23)	0.90 (21)	10	9	0.53	ns
T24	<i>w</i> EmeTn1	1.00 (38)	0.91 (35)	14	25	0.36	ns
T25	<i>w</i> EmeTn2	0.44 (23)	ne	5	0	1.00	*
T27	<i>w</i> EmeTn1	0.92 (38)	ne	12	13	0.48	ns
T28	<i>w</i> EmeTn1	0.98 (41)	ne	9	10	0.47	ns
T29	<i>w</i> EmeTn2	0.46 (22)	0.90 (10)	9	0	1.00	**
T32	<i>w</i> EmeTn1	0.90 (10)	1.00 (10)	7	3	0.70	ns
<i>in 2011</i>							
T241	<i>w</i> EmeTn2	1.00 (48)	1.00 (33)	17	16	0.52	NS

ne, not examined. ¹⁾ by binominal test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ns: $p > 0.05$.

Egg hatchabilities and viabilities are given with total numbers of eggs and larvae in parentheses.

Not all of laid eggs were used for the experiment and total numbers were inconsistent because of accidental death.

Table 3-1-4. Hatchabilities and female rates of *Z. emelina* by *Wolbachia* strains in the Kinki-1 population.

<i>Wolbachia</i> strain	Median (rate)	
	Hatchability	Female rate
<i>w</i> EmeTn1	0.90 a	0.50 a
<i>w</i> EmeTn2	0.54 b	0.92 b
uninfected	0.88 a	0.53 a

Mann-Whitney *U* -test for two-group comparisons.

Values with the same letter in the same column was not significantly different by Bonferroni method after Mann-Whitney *U* test ($p > 0.05$).

Table 3-1-5. *Wolbachia* infection of female adults of *Z. emelina* collected in the Kanto-1, Kanto-2, Kanto-3, Kinki-1, Kinki-2, Kinki-3 and Kinki-4 populations in 2007, and egg hatchability and sex ratio of their

Site	Mother		Offspring				p^1
	Individual	<i>Wolbachia</i> infection	Egg hatchability	Female	Male	Female rate	
Kanto-1	K1	uninfected	0.75	10	10	0.50	NS
	K4	uninfected	0.88	15	15	0.50	NS
	K11	uninfected	0.87	10	15	0.40	NS
	K22	uninfected	0.96	18	32	0.34	*
	K23	uninfected	0.91	25	26	0.49	NS
Kanto-2	K8	<i>w</i> EmeTn2	0.71	24	0	1.00	***
	K9	<i>w</i> EmeTn2	0.68	13	0	1.00	***
Kanto-3	K24	<i>w</i> EmeTn2	0.40	11	0	1.00	***
Kinki-3	P6	<i>w</i> EmeTn1	1.00	14	21	0.40	NS
	P7	uninfected	1.00	10	18	0.36	NS
	P9	<i>w</i> EmeTn1	1.00	13	18	0.42	NS
	P10	uninfected	0.97	10	14	0.42	NS
	P11	<i>w</i> EmeTn1	0.98	23	20	0.53	NS
	P12	<i>w</i> EmeTn1	1.00	4	3	0.57	NS
	P13	<i>w</i> EmeTn1	1.00	18	21	0.46	NS
Kinki-2	h4	uninfected	0.89	7	4	0.64	NS
	h5	uninfected	0.86	5	2	0.71	NS
	h6	uninfected	0.94	8	6	0.57	NS
	h7	uninfected	1.00	10	7	0.59	NS
Kinki-4	h1	uninfected	0.79	12	5	0.71	NS
	h2	uninfected	0.95	11	11	0.50	NS

1) by binomial test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, NS: $p > 0.05$

Table 3-1-6. Fate of successive eggs batches laid by a *w* EmeTn2 infected female of *Z. melina* with tetracycline treatment from day 2 to day 4

Day of oviposition	Eggs			Adults emerged	
	laid	hatched	unhatched	females	males
1	37	19	18	13	0
2	-	-	-	-	-
3	34	17	7	11	0
4	14	7	7	4	0
5	36	31	5	6	8
6	22	22	0	4	13
7	9	9	0	4	5
8	15	14	0	7	2
9	9	9	0	6	2
10	5	5	0	2	1
11	-	-	-	-	-
12	5	5	0	3	1

Table 3-1-7. Observation of sex chromatin obtained by a *w* EmeTn2 infected female of *Z. melina* with tetracycline treatment from day 2 to day 4

Day of oviposition	Phenotypic female		Phenotypic male	
	sex chromatin	sex chromatin	sex chromatin	sex chromatin
	+	-	+	-
1	2			
2				
3	6			
4	2			
5	1			3
6	1			4
7	1			2
8	2			
9	1			
10	2			
11				
12				

Table 3-2-1. Sexual phenotype of genitalia obtained by adult and pharate adult females of *Z. emelina* infected and uninfected with the two strains of *Wolbachia* collected in the Kinki-1 population

	No. of individuals (No. of mothers)	Sex		
		male	sexual mosaic	female
Adult				
<i>in 2005</i>				
<i>w</i> EmeTn1	15 (5)	6	-	9
<i>w</i> EmeTn2	10 (5)	-	1	9
uninfected	12 (3)	7	-	5
<i>in 2011</i>				
<i>w</i> EmeTn2	25 (1)	-	16	9
Pharate adult				
<i>in 2005</i>				
<i>w</i> EmeTn1	1 (1)	1	-	-
<i>w</i> EmeTn2	9 (5)	-	5	2
uninfected	2 (2)	-	-	2
<i>in 2009</i>				
<i>w</i> EmeTn2	2 (1)	0	2	0
Total	74 (15)	14	24	36

Table 3-2-2. Developmental stage at death and presence and absence of each genital apparatus in eight sexual mosaic offsprings obtained from females infected with *w* EmeTn2 *Wolbachia* in *Z. emelina*

Individual Number	Mother's <i>Wolbachia</i> strain	Developmental stage at death	Male organ					Female organ		
			phallus	IX		X		lamella	IX	IX+X
				vinculum	valva	socius	falx		apophysis posterioris	papilla analis
S113-1	<i>w</i> EmeTn2	pharate adult	+	+	++	-	-	+	+	+
S123-1	<i>w</i> EmeTn2	adult	-	+	+	-	-	+	+	+
S123-2	<i>w</i> EmeTn2	pharate adult	+	+	++	-	-	-	+	+
S113-2	<i>w</i> EmeTn2	pharate adult	+	+	++	-	-	-	-	+
S113-3	<i>w</i> EmeTn2	pharate adult	+	+	+	-	-	-	+	+
S123-3	<i>w</i> EmeTn2	pharate adult	+	+	+	-	-	+	+	+
T101-1	<i>w</i> EmeTn2	pharate adult	+	+	++	-	-	-	+	+
T101-2	<i>w</i> EmeTn2	pharate adult	+	+	++	-	-	-	+	+

+, observed, ++; more than two pairs of apparatuses observed, -; not observed.

*; the vinculum appeared inside the body and was possible to be duplicated (see text).

Table 3-3-1. Collected individuals of *Z. emelina* for crossing experiments from the Kinki-1 and Kinki-2 populations

Population	Main larval food plant	Landscape	Month of sampling	Female	Male
Kinki-1	<i>T. repens</i> ¹⁾ , <i>L. sp.</i> ³⁾	glassland	June Jul. and Aug. 2011 May 2012	10	41
Kinki-2	<i>L. japonicus</i> ²⁾	ridge of pond	Aug. 2011 June 2012	5	7
Total				15	48

1) Minohara et al. (2007)

2) Takei (2005)

3) This species had both *L. japonicus* and *L. corniculatus*'s characteristics

Table 3-3-2. Egg hatchability, larval survival rate and sex ratio of offspring produced by crossing combinations of two strains of *Wolbachia* -infected and uninfected *Z. emelina* in the Kinki-1 and Kinki-2 populations

Crossing combination (Mother × Father)	Hatchability	Larval survival	Female rate †	Sex mosaic rate †
<i>wEmeTn1-infected</i> × <i>wEmeTn1-infected</i>				
T238-2 × T256	0.96 (157)	0.79 (149)	0.46 (109)	0 (109)
T238-3 × T257	0.93 (148)	0.86 (107)	0.63* (92)	0 (92)
T298 × T310	0.74 (95)	0.93 (70)	0.41 (54)	0 (54)
<i>wEmeTn1-infected</i> × <i>uninfected</i>				
T246-1 × Y223	0.48 (54)	0.86 (25)	0.57 (21)	0 (21)
T246-2 × Y224	0.19 (27)	0.25 (4)	0.00 (1)	0 (1)
T290-1 × Y230	0.91 (205)	0.92 (187)	0.51 (168)	0 (168)
T290-2 × Y231	1.00 (135)	0.99 (130)	0.51 (130)	0 (0.51)
<i>wEmeTn2-infected</i> × <i>wEmeTn1-infected</i>				
T220-1 × T229	0.63 (113)	0.79 (72)	1.00*** (57)	0 (57)
T220-2 × T231	0.68 (225)	0.67 (134)	1.00*** (90)	0 (90)
T220-5‡ × T255	0.71 (334)	0.76 (217)	0.98*** (165)	0.02 (165)
T220-6‡ × T278	0.81 (133)	0.63 (105)	0.87*** (69)	0.12 (69)
T220-7‡ × T279	0.66 (156)	0.81 (96)	0.91*** (78)	0.08 (78)
T241-2 × T268	0.14 (35)	1.00 (4)	0.75 (4)	0.25 (4)
T241-3 × T269	0.82 (293)	0.63 (207)	0.85*** (130)	0.15 (130)
<i>wEmeTn2-infected</i> × <i>uninfected</i>				
T241-1 × T253	0.51 (89)	0.65 (41)	0.89*** (28)	0.11 (28)
T220-4 × T254	0.84 (186)	0.50 (86)	0.88*** (43)	0.09 (43)
T220-3 × Y222	0.67 (186)	0.48 (106)	1.00*** (51)	0 (51)
<i>uninfected</i> × <i>wEmeTn1-infected</i>				
T217-1 × T226	0.98 (208)	0.92 (163)	0.56 (150)	0 (150)
T217-2 × T227	0.96 (128)	0.95 (121)	0.49 (117)	0 (117)
T217-3 × T228	0.96 (250)	0.91 (223)	0.52 (203)	0 (203)
T218-1 × T230	0.98 (151)	0.92 (144)	0.44 (132)	0 (132)
T218-2 × T232	0.99 (118)	0.93 (95)	0.50 (88)	0 (88)
T219-1 × T233	0.97 (154)	0.80 (139)	0.53 (110)	0 (110)
Y215-2 × T262	1.00 (111)	0.83 (102)	0.58 (85)	0 (85)
Y215-3 × T263	0.92 (76)	0.95 (65)	0.52 (62)	0 (62)
<i>uninfected</i> × <i>uninfected</i>				
T217-4 × T234	0.95 (225)	0.91 (193)	0.48 (176)	0 (176)
T217-5 × T235	0.98 (269)	0.86 (240)	0.51 (216)	0 (216)
T294-1 × Y232	0.88 (118)	0.99 (118)	0.56 (117)	0 (117)
Y215-1 × Y225	0.97 (88)	0.87 (78)	0.48 (68)	0 (68)

The first letters 'T' and 'Y' indicate the collection sites, the Kinki-1 and Kinki-2 population, Female rates were analyzed by binomial test *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$

Egg hatchabilities and viabilities are given with total numbers of eggs and larvae in Not all of laid eggs were used for the experiment and total numbers were inconsistent because of accidental death.

† It is including individuals which died during pharate adult stage

‡ Hybrids between the Kinki-1 and Kinki

Table 4-1. Collected individuals of *Z. emelina* for genetic analyses from 14 populations in Japan and two populations in Korea

Location	Main larval food plant	Landscape	Month of sampling	Females	Males
Kanto-1	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	glassland	Sep. & Nov. 2007	10	0
Kanto-2	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	meadow, glassland	Sep. 2007	5	0
Kanto-3	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> ¹	seashore	Nov. 2007	1	0
Kanto-4	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Sep. 2011	5	2
Chubu	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Oct. 2011	1	1
Kinki-1	<i>T. repens</i> ² , <i>L. sp.</i> ⁴	glassland	Aug. Sep. Oct. & Nov. 2004 Apr. Oct. & Nov. 2007 Jun. Jul. & Aug. 2009	41	33
Kinki-2	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of pond	Jul. 2007 Aug. 2010	10	4
Kinki-3	<i>L. corniculatus</i> ²	glassland	Jul. & Aug. 2006 Apr. 2007	14	7
Kinki-4	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of pond	Oct. 2006 Jul. 2007 Aug. 2010	17	16
Kinki-5	<i>L. japonicus</i> ³	ridge of paddy field	Aug. & Oct. 2006	2	3
Shikoku	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Jul. 2012	10	0
Kyushu-1	<i>L. japonicus</i>	riverbank	Nov. 2011	1	0
Kyushu-2	<i>L. japonicus</i>	glassland	Sep. 2010	6	1
Kyushu-3	<i>L. japonicus</i>		Jun. 2001	0	2
Korea-1	<i>L. japonicus</i> , <i>T. repens</i> , <i>Kummerowia stipulacea</i> , <i>K.</i> <i>striata</i>	glassland	Aug. 2012	10	2
Korea-2		glassland	Aug. 2012	4	0
				123	69

1) Suzuki (2007)

2) Minohara et al. (2007)

3) Takei (2005)

4) This species had both *L. japonicus* and *L. corniculatus*'s characteristics

Table 4-2. Eight haplotypes and nine variable sites obtained from analyses of *ND5* (832bp) and *COI* (658bp) regions in mitochondrial DNA in *Z. emelina*

Haplotype	variable site ¹⁾ : <i>ND5</i> region					<i>COI</i> region			
	121	188	654	688	789	235	469	470	535
I	A	T	C	G	G	T	G	G	G
II	A	T	T	G	G	T	G	G	G
III	A	T	C	A	G	T	G	G	G
IV	G	T	C	G	A	T	G	G	A
V	A	T	C	G	G	T	A	G	G
VI	A	T	C	G	G	C	G	G	G
VII	G	C	C	G	A	T	G	G	A
VIII	G	C	C	G	A	T	G	A	A

1) The number indicates the location of 3'-end of sequences in each region.
(not including primers)

Table 4-3. Genetic diversity of mitochondrial haplotype within populations in *Z. emelina*

Population	No. of individuals	Nucleotide diversity	Haplotype	Haplotype diversity
Kanto-1	10	0.000000	III	0.000
Kanto-2	3	0.000000	III	0.000
Kanto-3	1	0.000000	III	0.000
Kanto-4	7	0.000000	I	0.000
Chubu	2	0.001342	V, VI	1.000
Kinki-1	40	0.000726	I, II, IV	0.344
Kinki-2	14	0.000096	I, II	0.143
Kinki-3	21	0.000767	I, IV	0.381
Kinki-4	25	0.000000	I	0.000
Kinki-5	4	0.000000	II	0.000
Shikoku	10	0.000000	I	0.000
Kyushu-1	1	0.000000	IV	0.000
Kyushu-2	7	0.000000	IV	0.000
Kyushu-3	2	0.000000	IV	0.000
Total	137	-	6	-

Table 4-4. Six haplotypes and eight variable sites obtained from analyses of *Tpi* (355-360bp) region in nuclear DNA in *Z. emelina*

Haplotype	variable site ¹⁾ : <i>Tpi</i> region							
	52	196	213	246	247	248	249	354
A	G	A	G	-	-	-	-	A
B	G	A	A	-	-	-	-	A
C	A	A	G	-	-	-	-	A
D	G	A	G	-	-	-	-	G
E	A	A	G	C	A	T	A	A
F	G	-	G	-	-	-	-	G

1) The number indicates the location of 3'-end of sequences in each region. (not including primers)

Table 4-5. Genetic diversity of nuclear haplotype within populations in *Z. emelina*

	No. of individuals (No. of alleles)	Nucleotide diversity	Haplotype	Haplotype diversity
Kanto-1	10 (10)	0.001315	A, D (+F)	0.467
Kanto-2	5 (5)	0.001690	A, D (+F)	0.600
Kanto-3	1 (1)	0.000000	D	0.000
Kanto-4	4 (4)	0.000000	D	0.000
Chubu	1 (1)	0.000000	D	0.000
Kinki-1	28 (28)	0.001461	A, B	0.519
Kinki-2	10 (10)	0.000563	A, C	0.200
Kinki-3	14 (14)	0.001486	A, B	0.528
Kinki-4	17 (17)	0.002858	A, B, C (+E)	0.618
Shikoku	10 (10)	0.002629	B, C	0.467
Total	94 (94)	-	4	-

1) The number of individuals with each of the haplotypes

Table 4-D-1. Analysis of molecular variance (AMOVA) of mitochondrial and nuclear haplotypes in *Z. emelina*

	d.f.	Sum of squares	Variance of components	%	F_{ST}	P^*
Frequency and the number of different bases						
Mitochondrial DNA (<i>ND5</i> + <i>COI</i>)						
Among populations	5	75.24	0.78	72.68	0.73	<0.001
Among individuals within populations	114	33.46	0.29	27.32		
Total	119	108.63	1.07			
Nuclear DNA (<i>Tpi</i>)						
Among populations	5	18.28	0.23	43.04	0.43	<0.001
Among individuals within populations	83	25.75	0.31	56.96		
Total	88	44.02				

*After 10,000 random permutations.

Table 4-D-2. Population pairwise F_{ST} -values based on the frequency and the number of different bases in *Z. emelina*

	Kanto-1	Kinki-1	Kinki-2	Kinki-3	Kinki-4	Shikoku
Kanto-1	-	0.765 ***	0.956 ***	0.773 ***	1.000 ***	1.000 ***
Kinki-1	0.583 ***	-	0.758 ***	-0.031	0.739 ***	0.680 ***
Kinki-2	0.792 ***	0.701 ***	-	0.774 ***	0.945 ***	0.910 ***
Kinki-3	0.606 ***	-0.046	0.737 ***	-	0.768 ***	0.681 ***
Kinki-4	0.504 ***	0.116 *	0.420 **	0.086*	-	0.000
Shikoku	0.588 ***	0.439 ***	0.115	0.421 **	0.088	-

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, after 100,000 random permutations

Upper: mitochondrial DNA

Lower: nuclear DNA

Table D-1. Relationship between oviposition preferences and mitochondrial and nuclear haplotypes in *Z. emelina*

DNA	Haplotype	No. of individuals		
		Preference of <i>L. spp.</i>	n.s.	Preference of <i>T. repens</i>
<i>All populations</i>				
mitochondria	I	15	1	2
	II	7	0	0
	III	8	2	2
	IV	6	4	7
	V	0	0	0
	VI	1	0	0
nuclear	A	5	4	2
	B	6	1	4
	C	16	1	0
	D	3	1	1
	E	1	0	0
	F	3	1	0
<i>Kinki-1*</i>				
nuclear	A	2	4	2
	B	1	1	4

* A significant difference was not observed in the oviposition preference between nuclear haplotypes ($p < 0.05$ by Fisher's exact test).

Table D-2. The HKA test for mitochondrial and Z-chromosomal polymorphism within *Z. emelina* and divergence between *Z. emelina* and *Z. otis*.

	Total individuals		Kanto-1, 2 and 3 (infected with <i>w</i> EmeTn2)		Kinki-1 (infected with <i>w</i> EmeTn1 and <i>w</i> EmeTn2)		Kinki-4 (uninfected)		
	mtDNA	Nuclear DNA	mtDNA	Nuclear DNA	mtDNA	Nuclear DNA	mtDNA	Nuclear DNA	
	<i>ND5 + COI</i>	<i>Tpi</i>	<i>ND5 + COI</i>	<i>Tpi</i>	<i>ND5 + COI</i>	<i>Tpi</i>	<i>ND5 + COI</i>	<i>Tpi</i>	
Intraspecific polymorphism									
No. of alleles	141	103	13	16	40	28	25	17	
Segregating sites (obs*)	7	3	0	1	4	1	0	2	
Segregating sites (expt)	6.55	3.45	0.64	0.36	3.43	1.57	1.22	0.78	
Total number of sites‡	1490	352	1490	352	1490	352	1490	352	
Interspecific divergence									
No. of differences (obs*)	28.68	6.30	30.00	4.63	27.45	5.50	29.00	5.47	
No. of differences (expt)	29.13	5.85	29.36	5.26	28.02	4.93	27.78	6.69	
Sum of deviation ¶		0.11		1.74		0.32		3.10	
<i>P</i> value		0.74		0.18		0.57		0.08	

*Observed value.

†Expected value.

‡Nucleotide sites containing alignment gaps were excluded.

¶The effective population sizes of the mitochondrial gene (*ND5 + COI*), the Z-chromosomal gene (*Tpi*) were corrected.

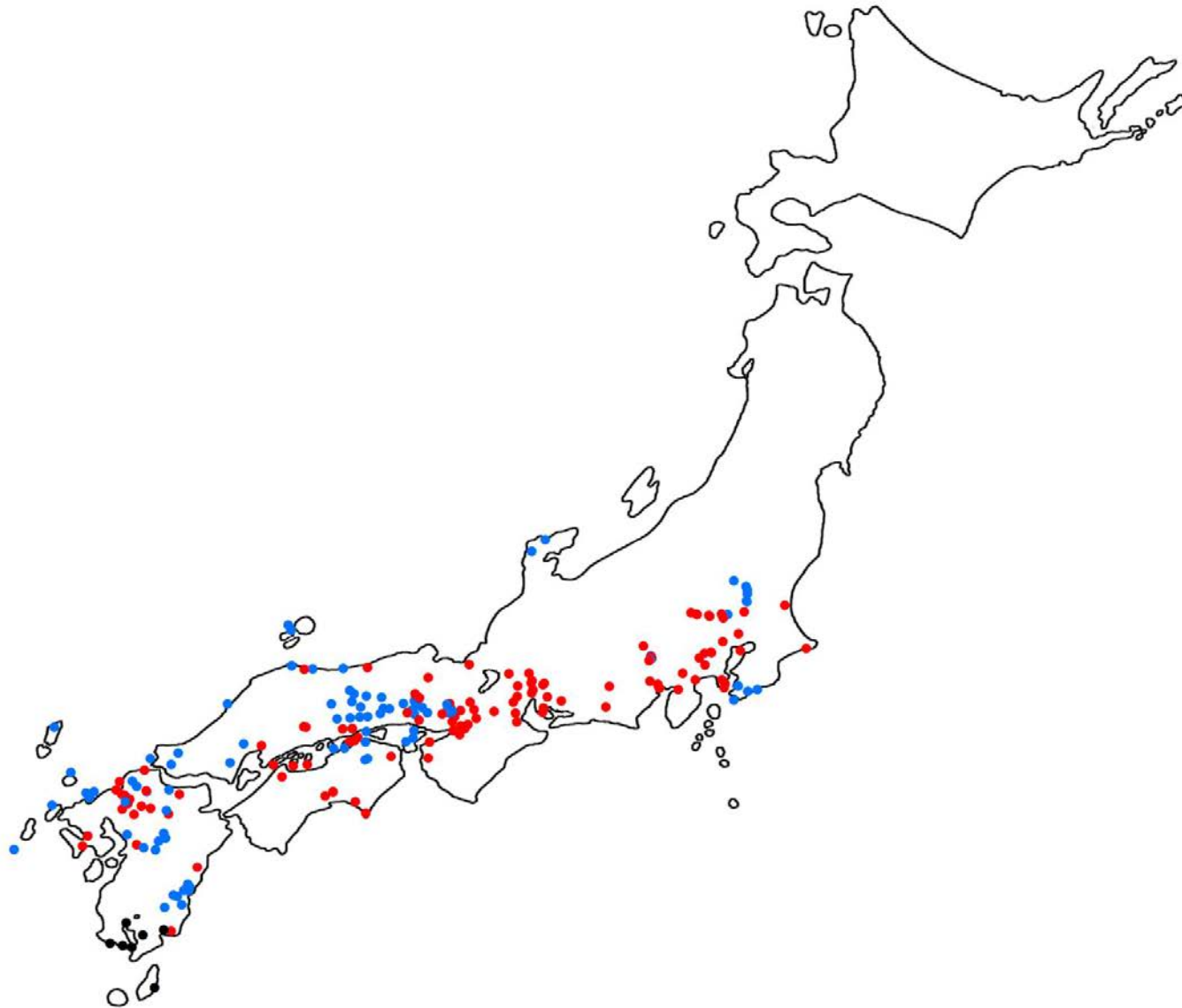


Fig. I. The map of distribution closed circles of *Z. emelina* in Japan drawn from Editorial staff of Cho-ken Salon (2005) and Mano and Fujii (2009) etc. The blue, red and black points indicate extant, extinct and data deficient.

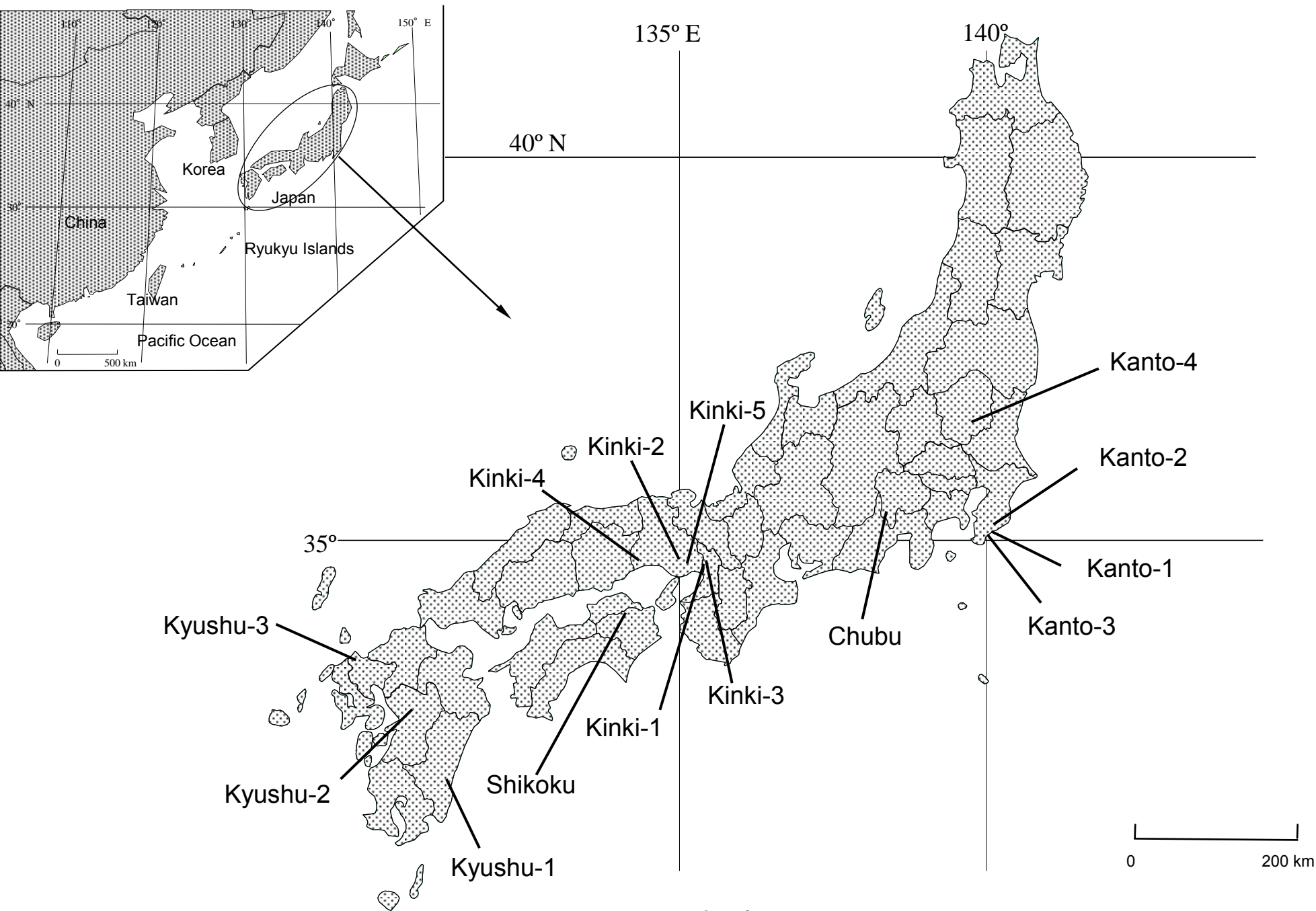


Fig. 1-1-1. Study sites.

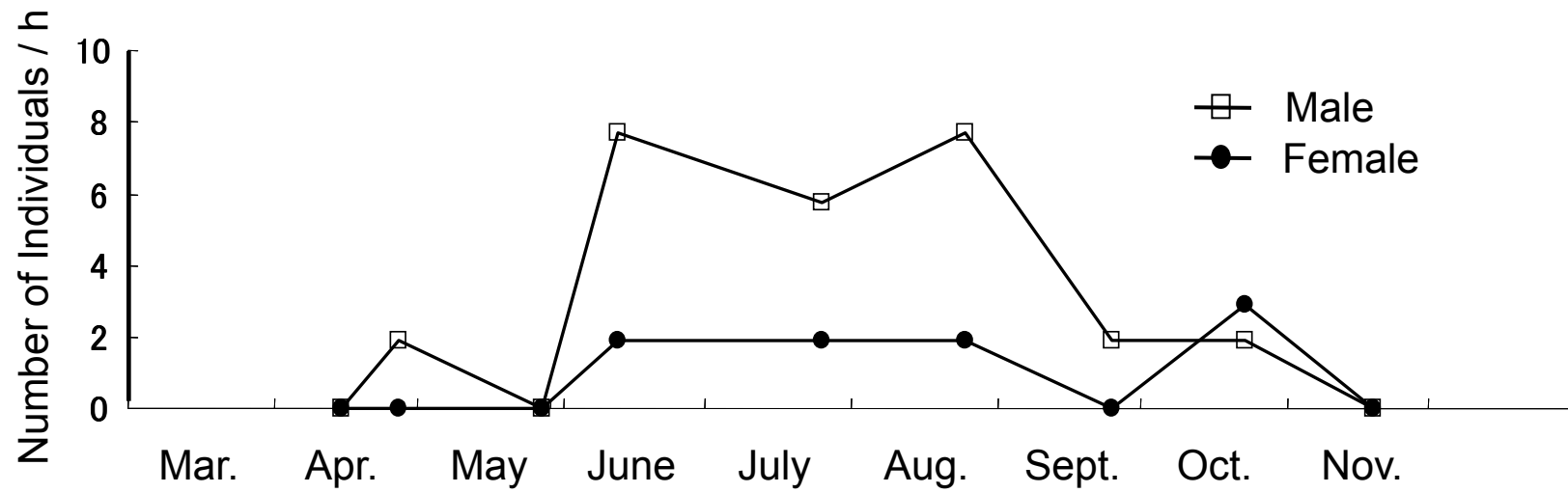


Fig. 1-1-2. Seasonal change in numbers of adults of *Z. emelina* in the Kinki-1 population in 2009.

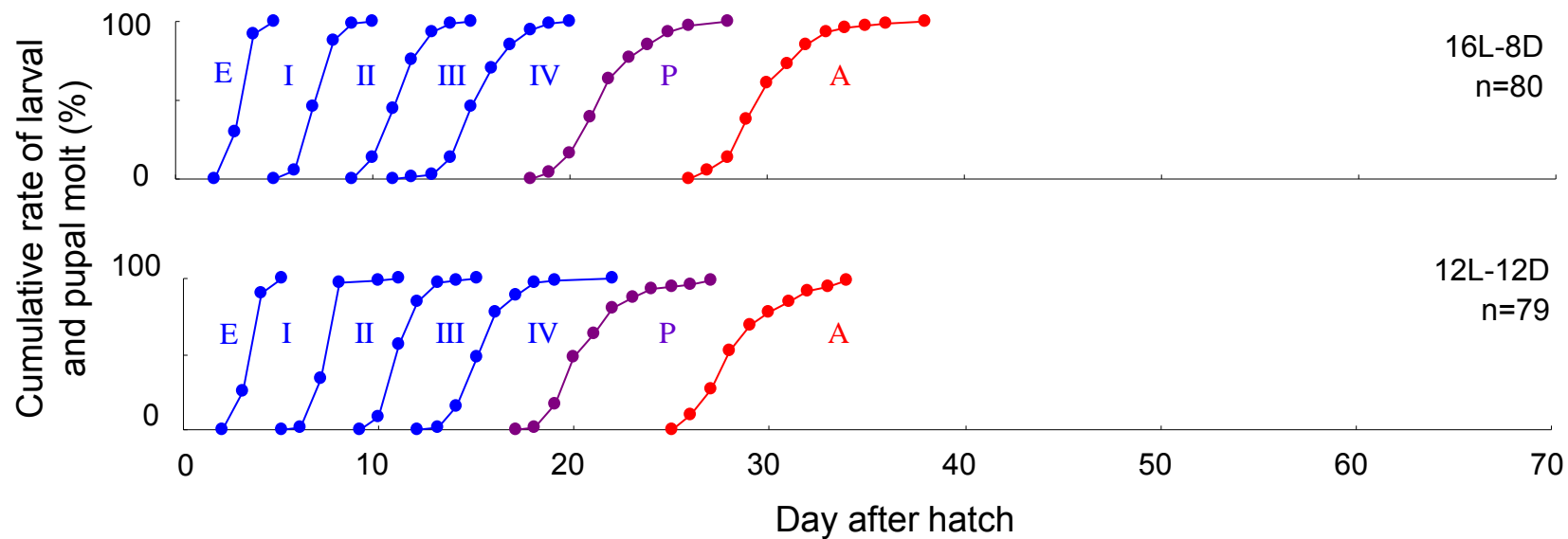


Fig. 1-1-3. Cumulative rate of larval and pupal molts in *Z. emelina* collected from the Kinki-1 population in 2009 under 16L-8D and 12L-12D conditions at 25 °C.

E: egg, I-VI: larval instars, P: pupa. A: adult

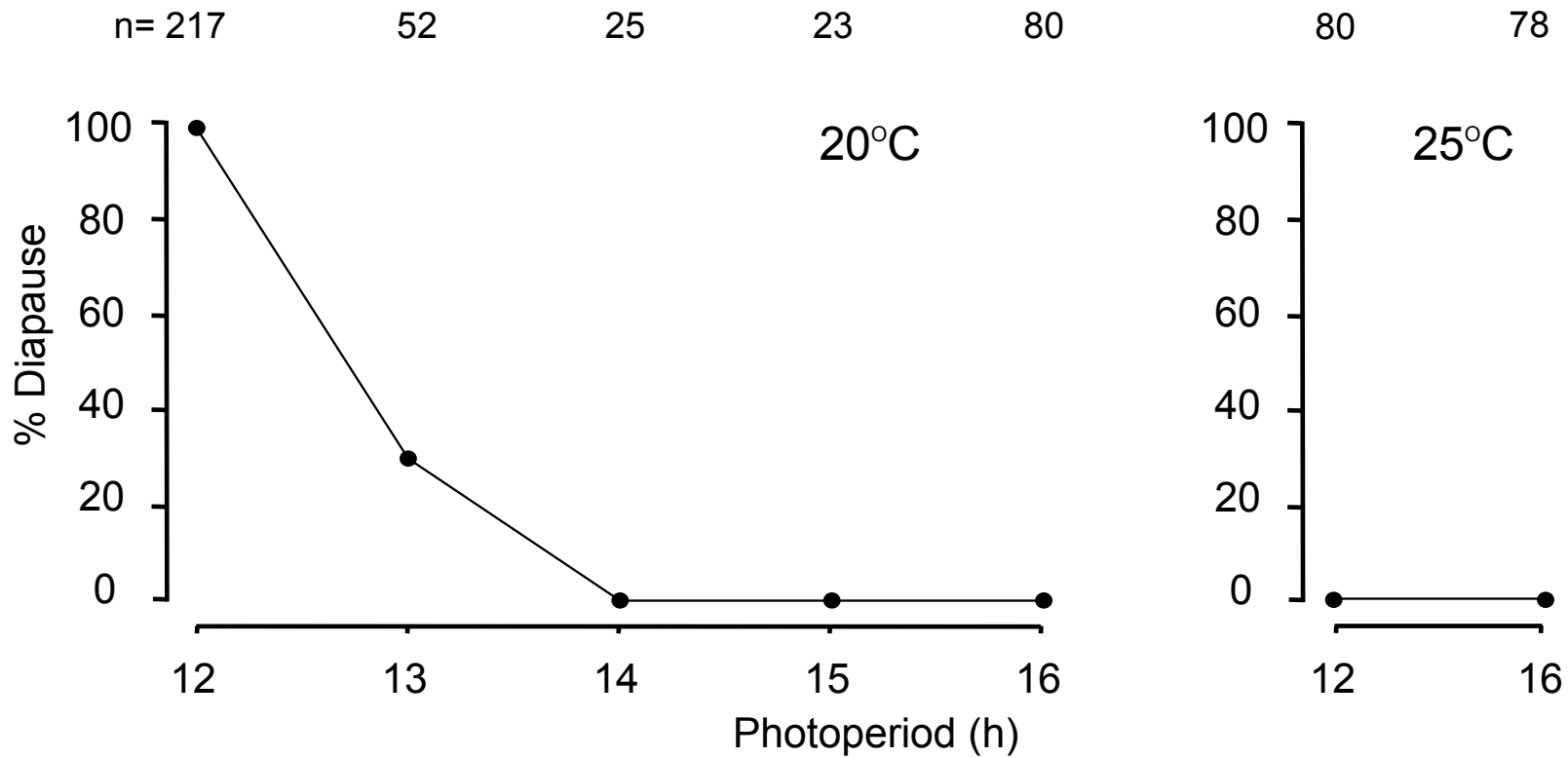


Fig. 1-1-4. Incidence of larval diapause of *Z. emelina* collected from the Kinki-1 population in 2008 and 2009, reared under different photoperiods at 20 and 25 °C.

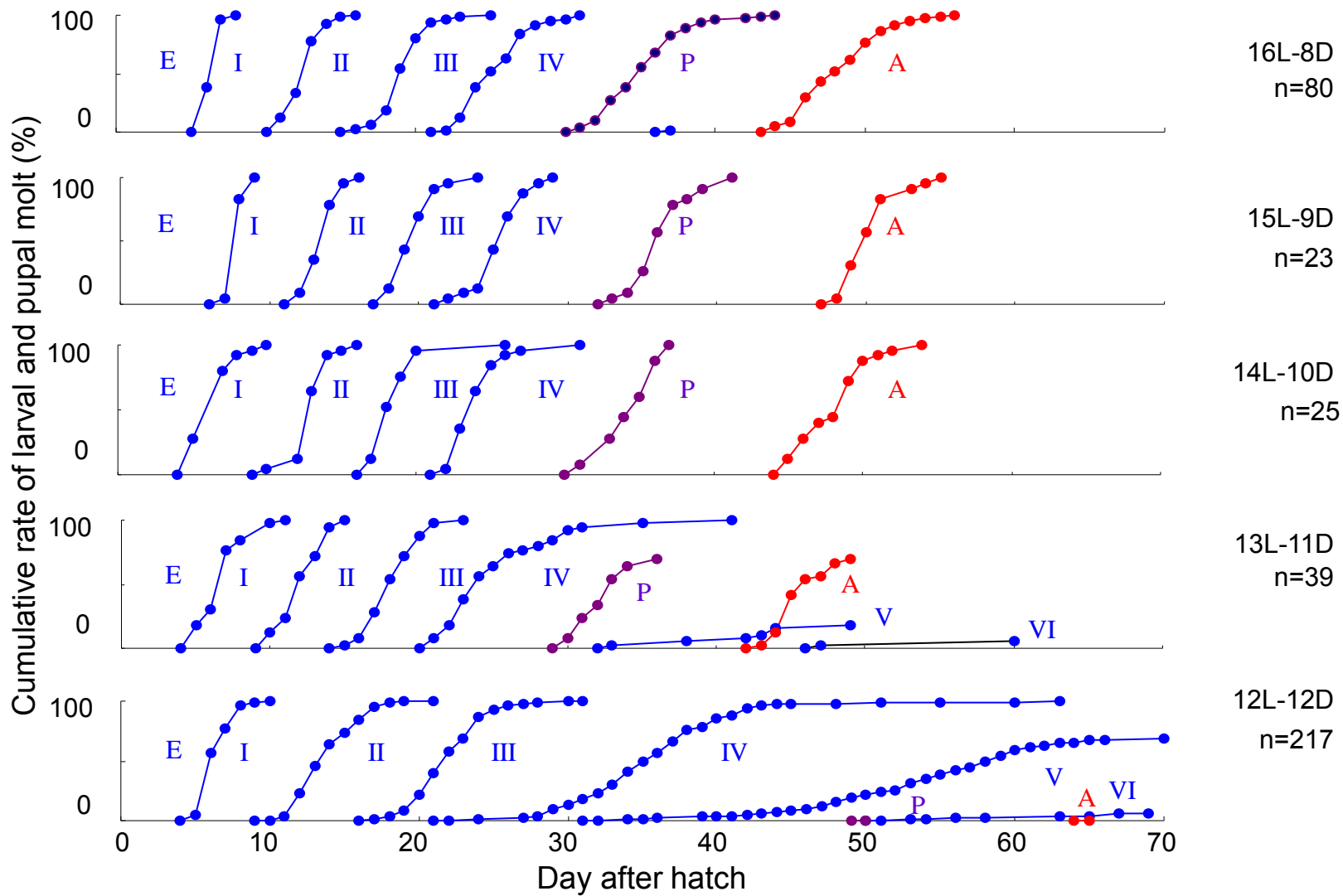


Fig. 1-1-5. Cumulative rate of larval and pupal molts in *Z. emelina* collected from the Kinki-1 population in 2009 under different photoperiodic conditions at 20 °C.

E: egg, I-VI: larval instars, P: pupa. A: adult

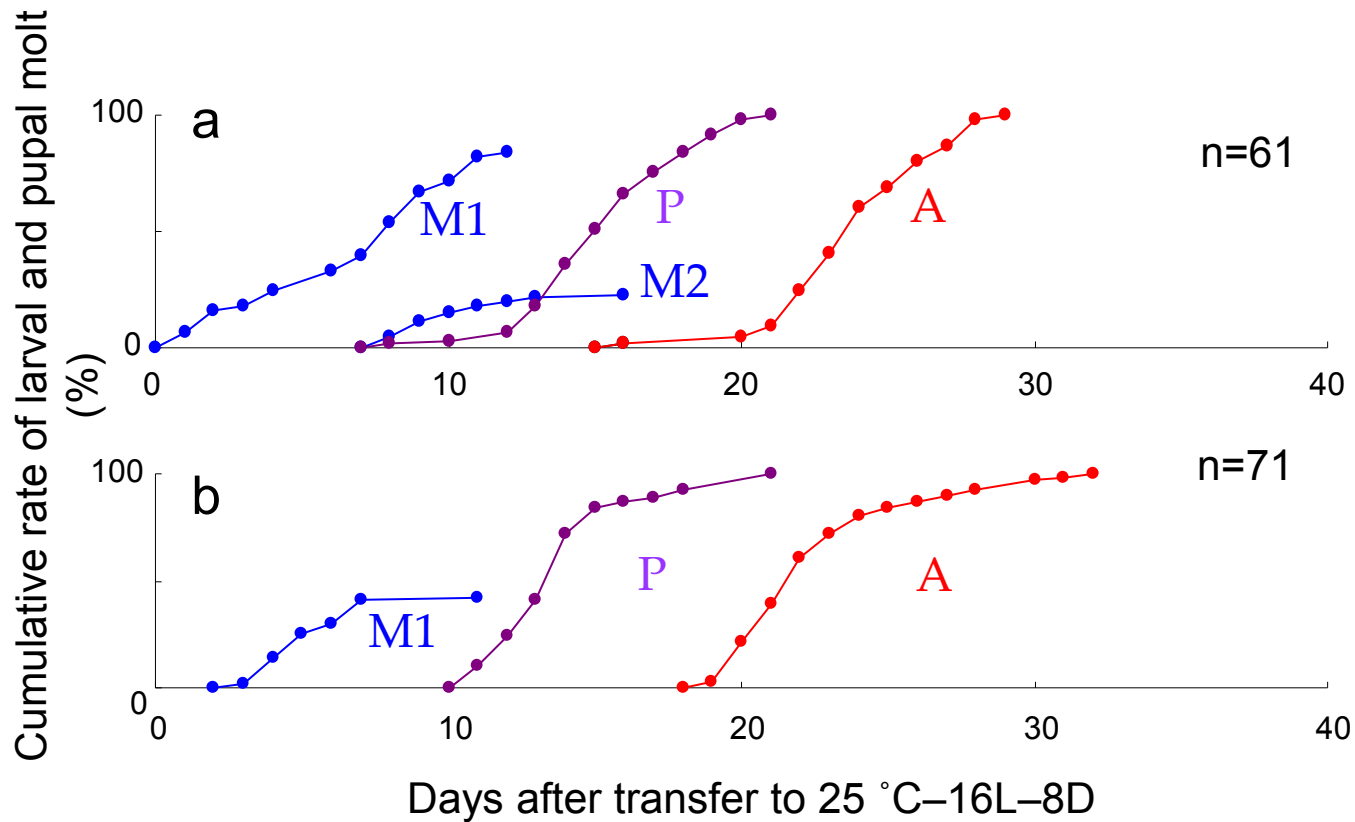


Fig. 1-1-6. Cumulative rate of larval and pupal molts after transfer to 25 °C-16L-8D in *Z. emelina*
 a: Larvae were reared in 20 °C-12L-12D for 2 months.
 b: Larvae were reared in 20 °C-12L-12D for 2 months and chilled at 10 °C for 2 months.

M1: first larval molt after transfer, M2: second larval molt after transfer, P: pupa, A: adult



Fig. 1-2-1. A facility and equipments for mating in *Z. emelina*. a: Cylindrical nets, b: A rearing tent, c: A glasshouse in the Kashihara City Insectarium, d: A large-size cage

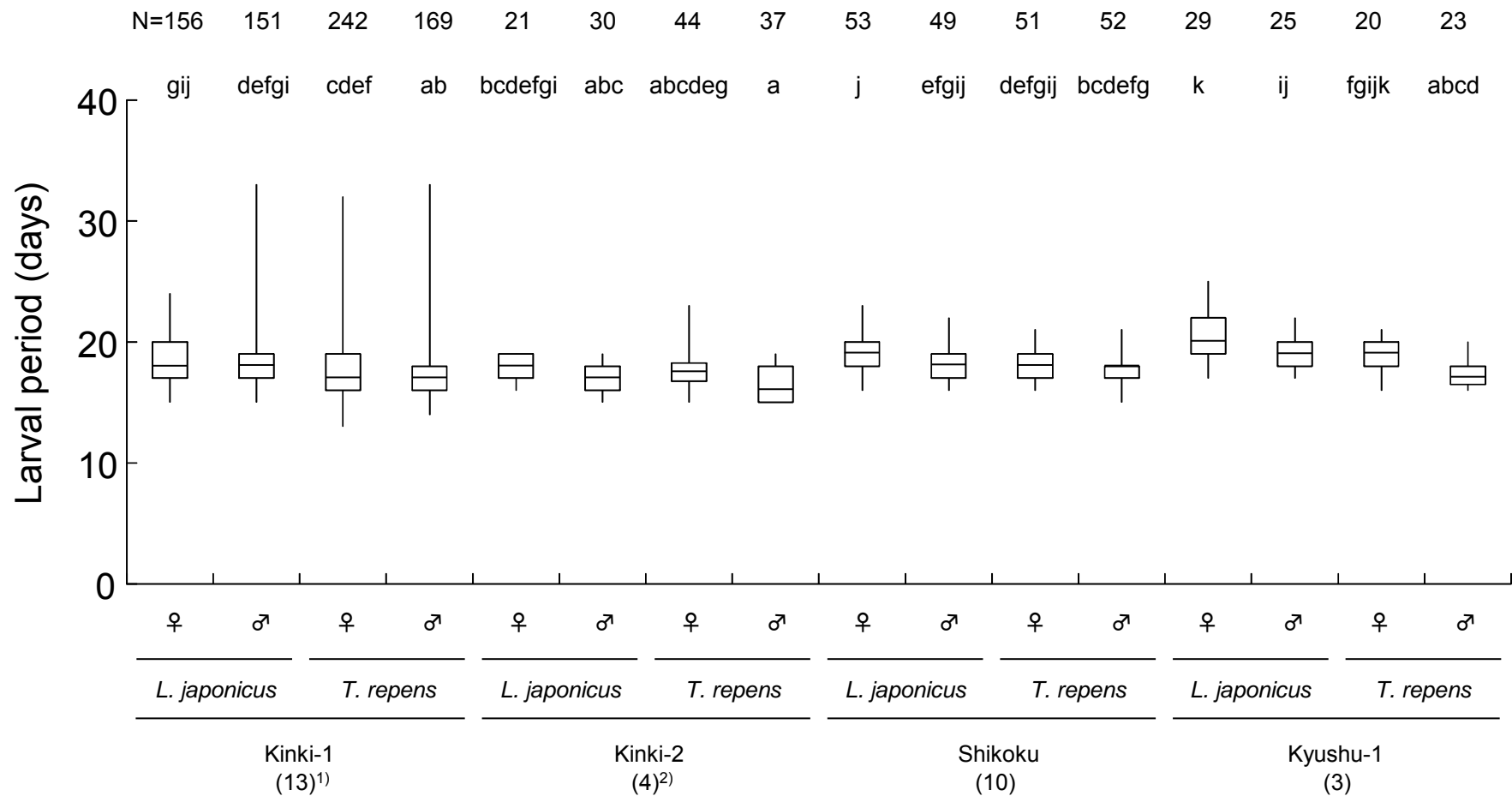


Fig. 1-3-1. Larval periods of *Z. emelina* on the two host plants fed groups in offspring obtained from four populations, Kinki-1, Kinki-2, Shikoku and Kyushu-1. The numbers in parentheses are the number of females. Box: 25th–75th percentile, line in the box: median, whiskers: minimum and maximum. Box plots with same letter are not significantly different at 5% levels by Steel-Dwass test.

1) Three females obtained from cross experiments are included.

2) A female obtained from cross experiments are included.

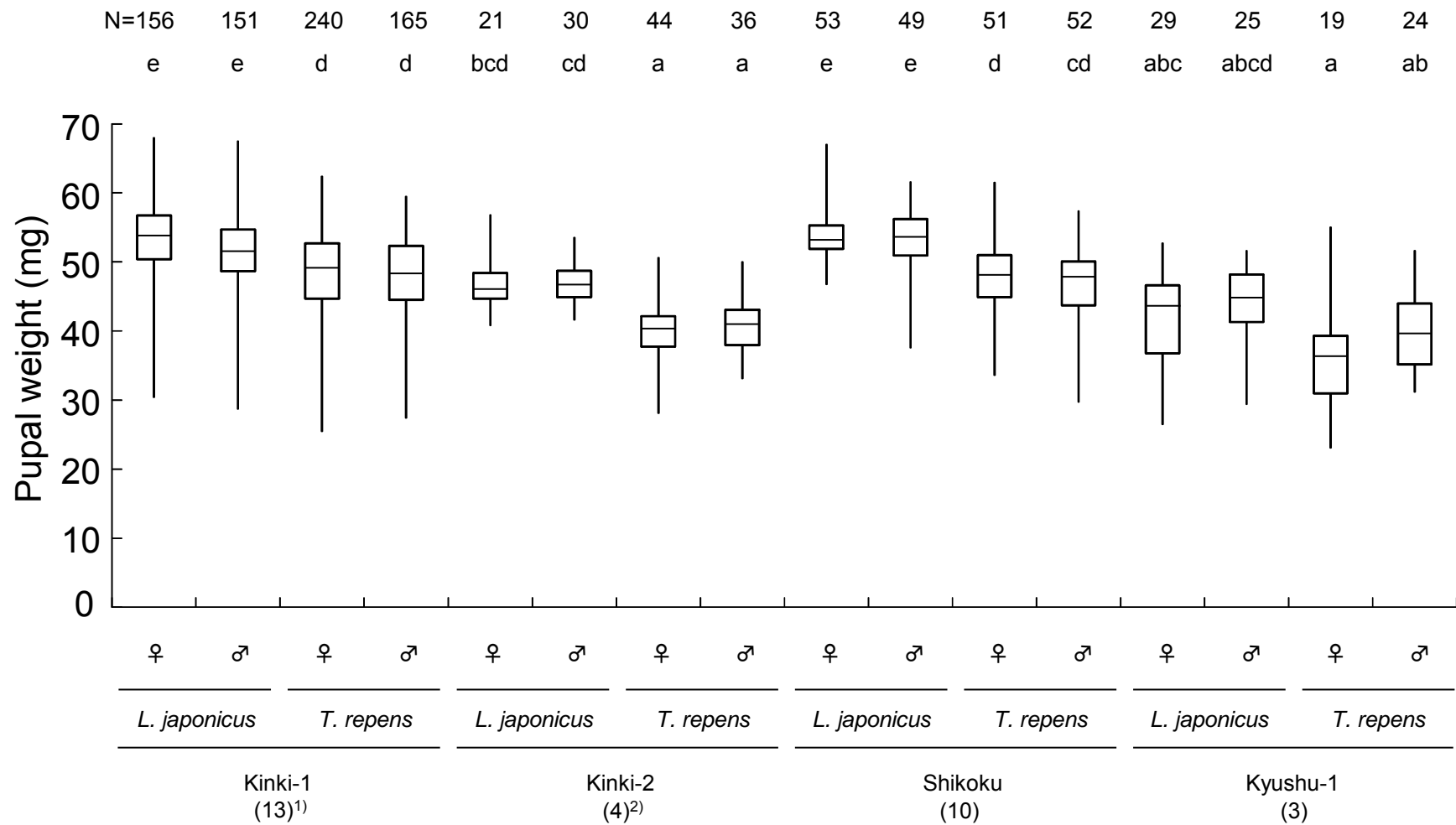


Fig. 1-3-2. Pupal weights of *Z. emelina* on the two host plants fed groups in offspring obtained from four populations, Kinki-1, Kinki-2, Shikoku and Kyushu-1. The numbers in parentheses are the number of females. Box: 25th–75th percentile, line in the box: median, whiskers: minimum and maximum. Box plots with same letter are not significantly different at 5% levels by Steel-Dwass test.

1) Three females obtained from cross experiments are included.

2) A female obtained from cross experiments are included.

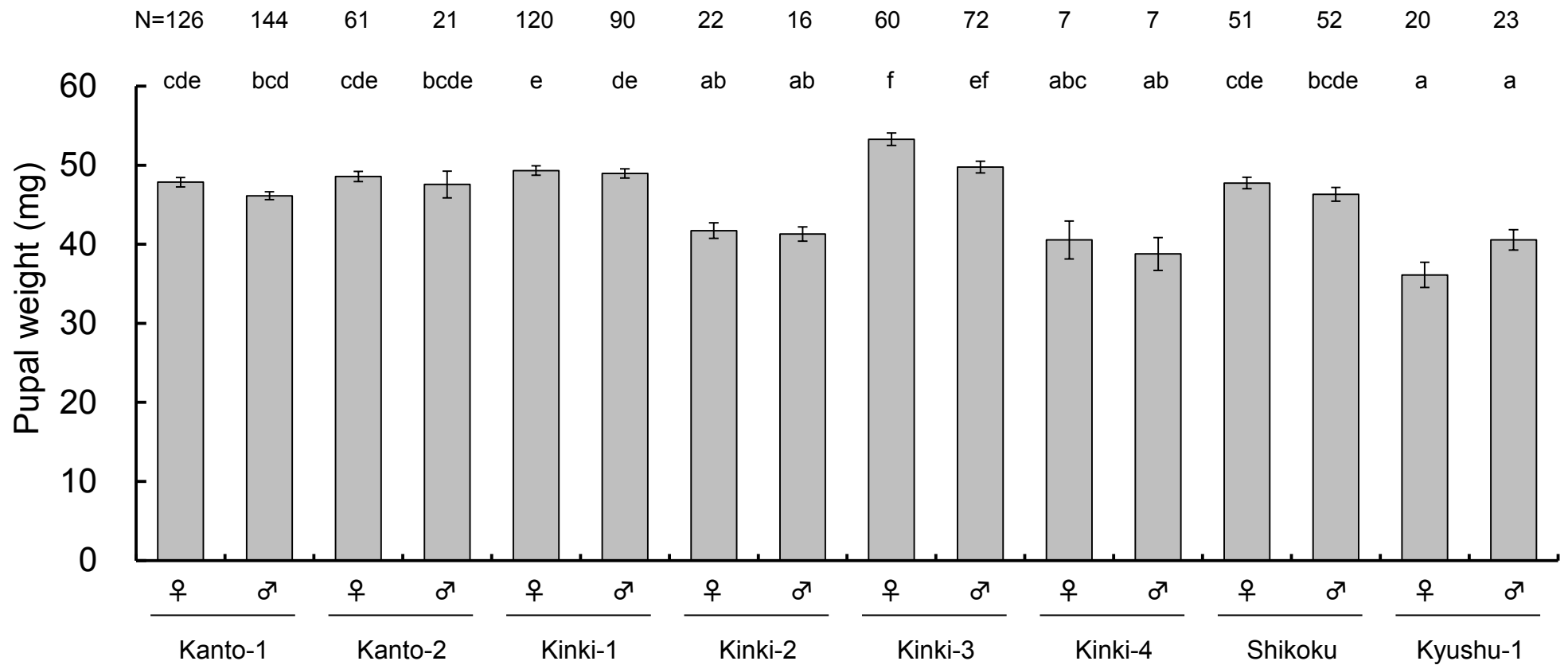


Fig. 1-3-3. Pupal weights of *Z. emelina* in *T. repens* fed group under a 25-26°C16L-8D condition in offspring obtained from eight populations, Kanto-1, Kanto-2, Kinki-1, Kinki-2, Kinki-3, Kinki-4, Shikoku and Kyushu-1. Means followed by the same letter are not significantly different at 5% levels by Tukey-Kramer test ($p>0.05$).

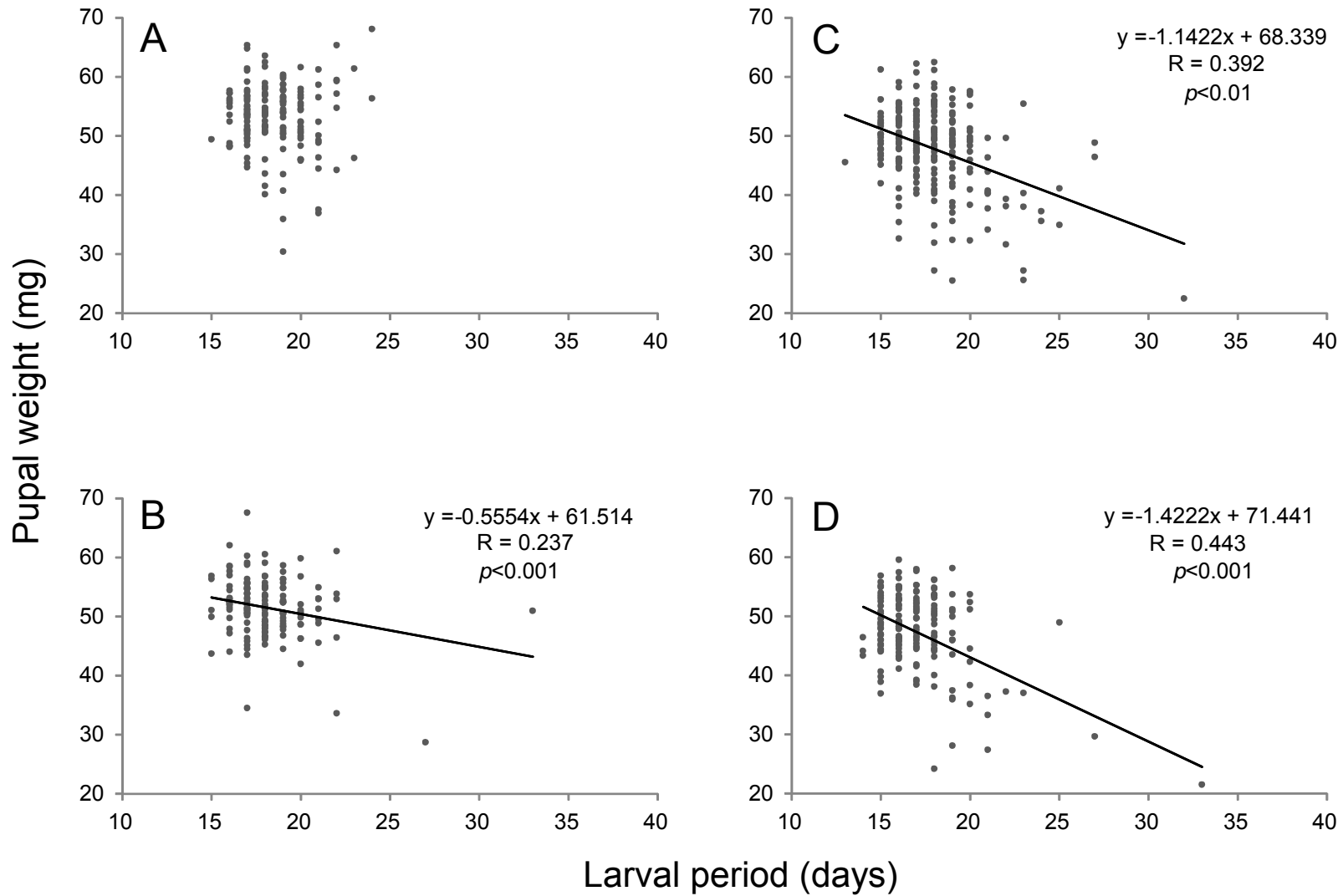


Fig. 1-3-4. Relationship between larval periods and pupal weights of *Z. emelina* obtained from females collected from the Kinki-1 population. A: *L. japonicus* fed females, B: *L. japonicus* fed males, C: *T. repens* fed females D: *T. repens* fed males.

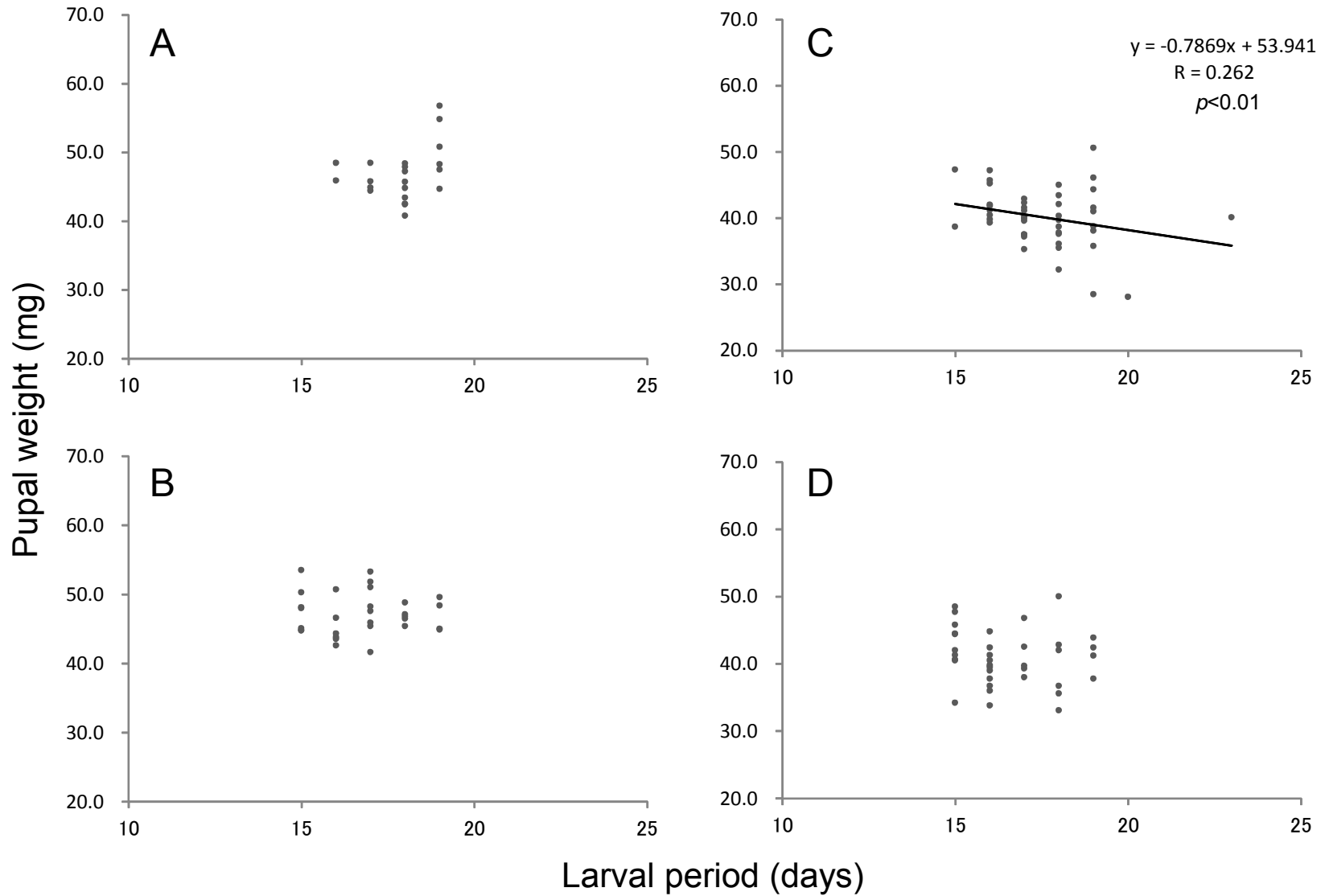


Fig. 1-3-5. Relationship between larval periods and pupal weights of *Z. emelina* obtained from females collected from the Kinki-2 population. A: *L. japonicus* fed females, B: *L. japonicus* fed males, C: *T. repens* fed females D: *T. repens* fed males.

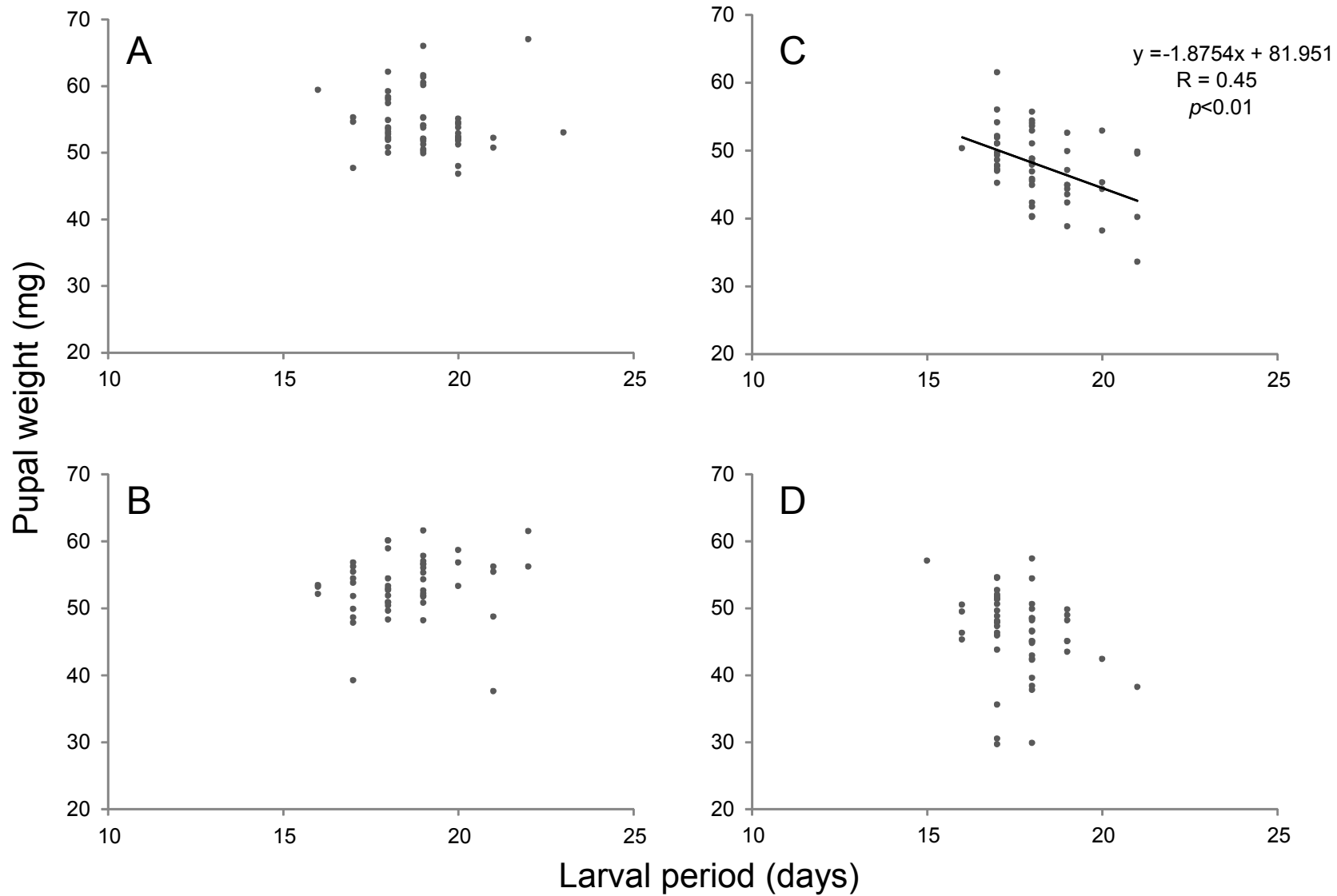


Fig. 1-3-6. Relationship between larval periods and pupal weights of *Z. emelina* obtained from females collected from the Shikoku population. A: *L. japonicus* fed females, B: *L. japonicus* fed males, C: *T. repens* fed females D: *T. repens* fed males.

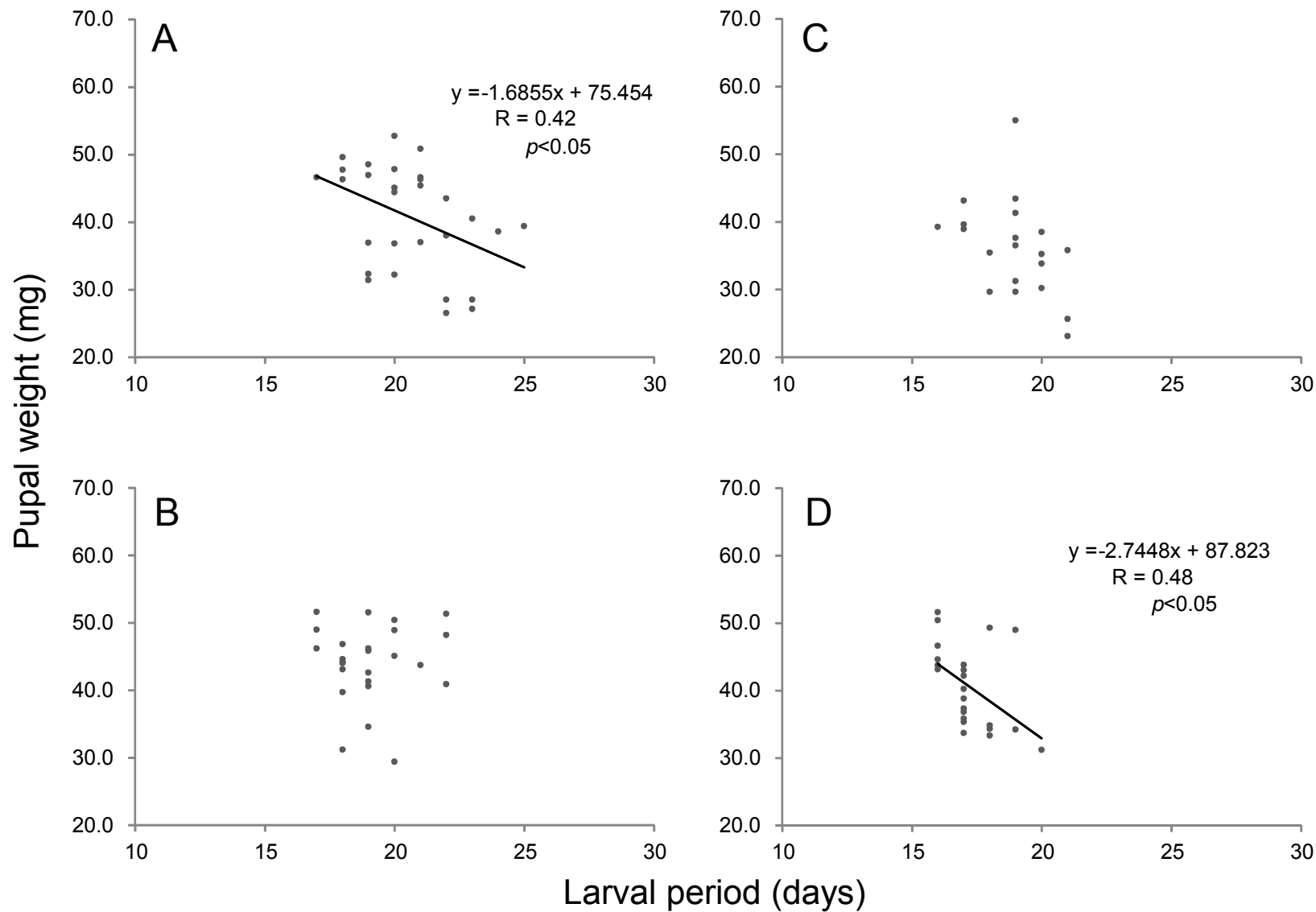


Fig. 1-3-7. Relationship between larval periods and pupal weights of *Z. emelina* obtained from females collected from the Kyushu-1 population. A: *L. japonicus* fed females, B: *L. japonicus* fed males, C: *T. repens* fed females D: *T. repens* fed males.

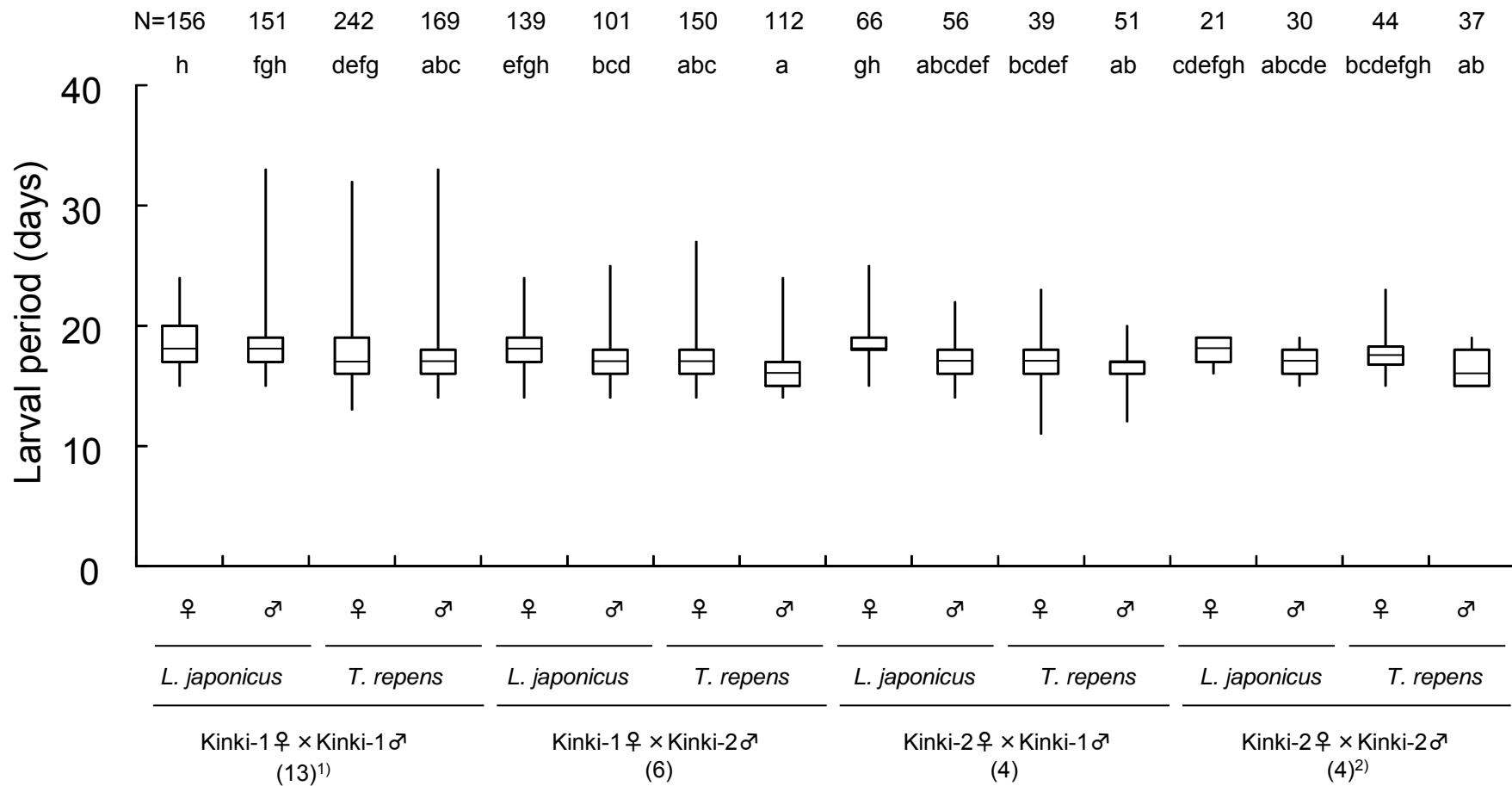


Fig. 1-3-8. Larval periods for the four cross combinations on the two host plants fed groups. The numbers in parentheses are the number of broods tested for each combination. Box: 25th–75th percentile, Line in the box: median, Whiskers: minimum and maximum. Box plots with same letter are not significantly different at 5% levels by Steel-Dwass test.

- 1) Ten broods obtained from field-collected females are included.
- 2) Three broods obtained from field-collected females are included.

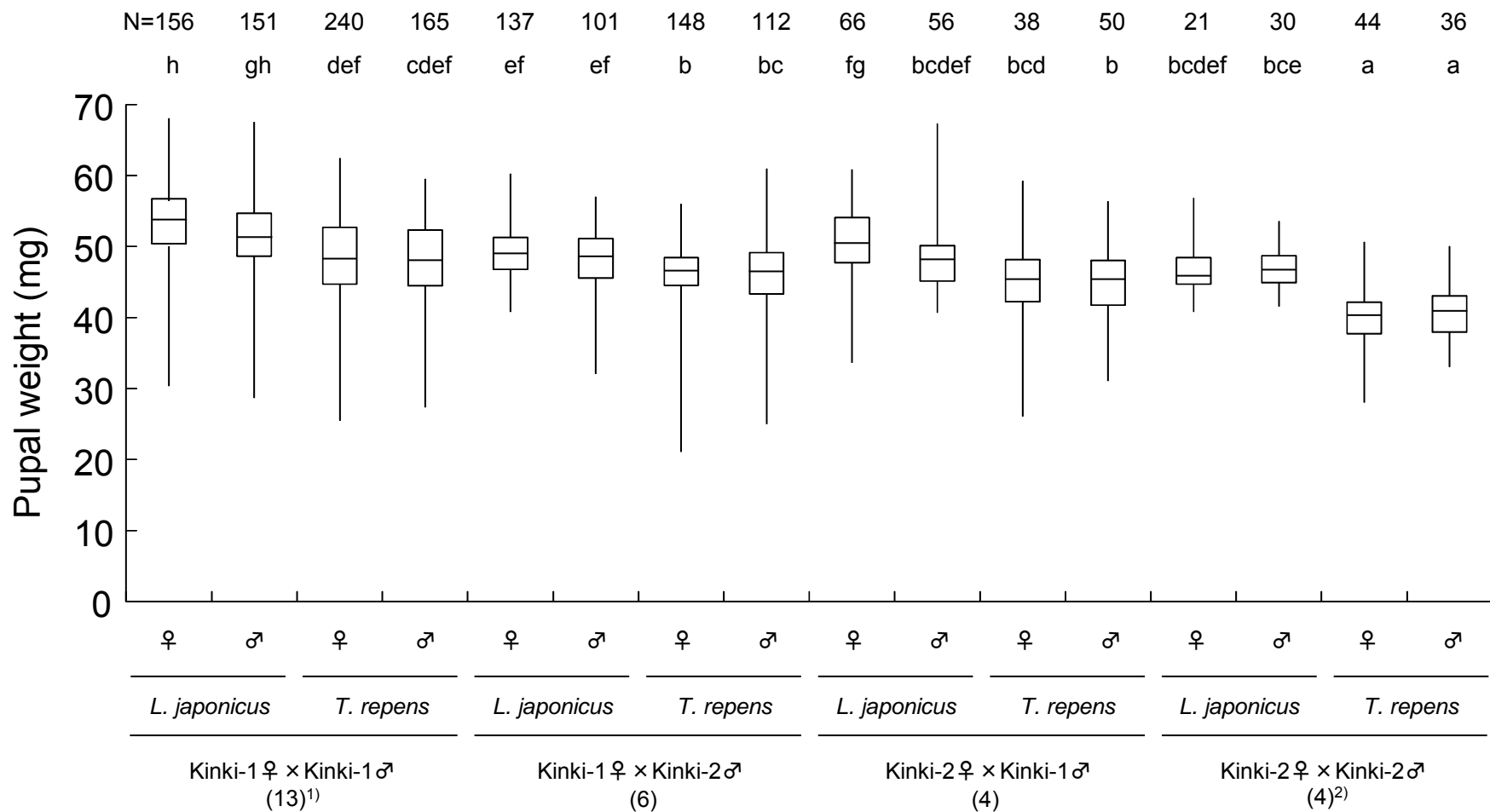


Fig. 1-3-9. Pupal weights for the four cross combinations on the two host plants fed groups. The numbers in parentheses are the number of broods tested for each combination. Box: 25th–75th percentile, Line in the box: median, Whiskers: minimum and maximum. Box plots with same letter are not significantly different at 5% levels by Steel-Dwass test.

- 1) Ten broods obtained from field-collected females are included.
- 2) Three broods obtained from field-collected females are included.



Fig. 1-4-1. A petri dish and host-plants for investigating adult oviposition preference of *Z. emelina*.

Left : *T. repens* Right : *L. corniculatus* Center: sucrose-saturated paper

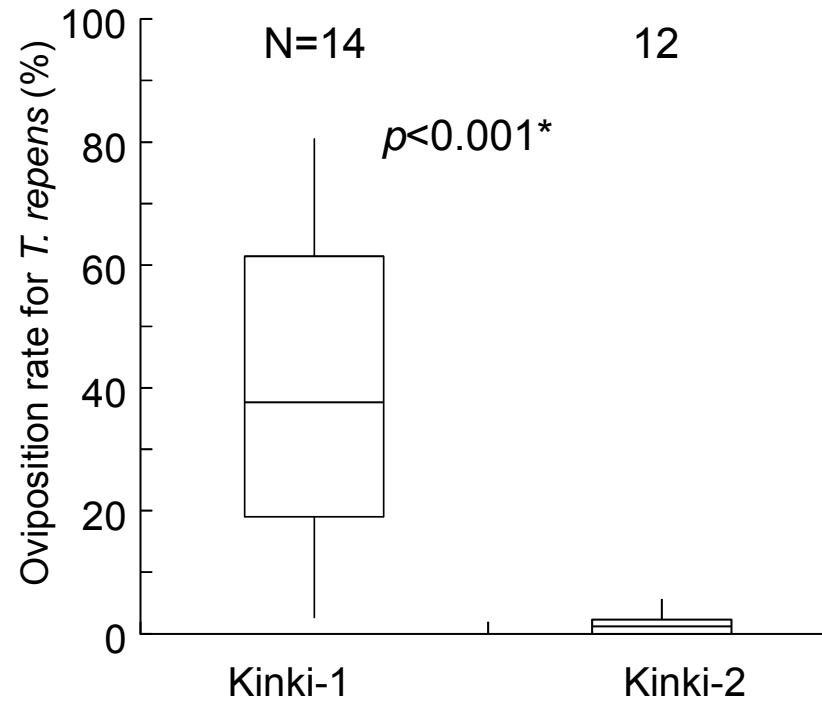


Fig. 1-4-2. Oviposition rate of *Z. emelina* for *T. repens* in field-collected females from Kinki-1 and Kinki-2 populations.

*: significantly different by Mann-Whitney *U* test

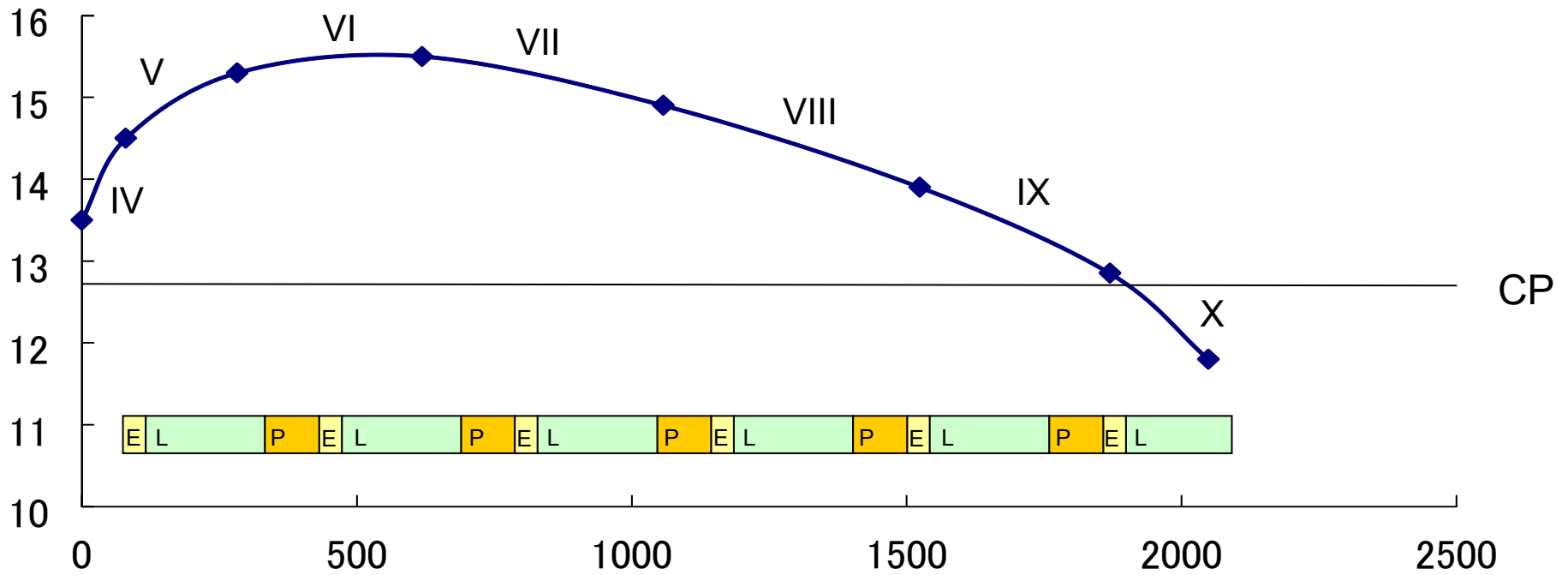


Fig. 1-D-1. Photothermograph for *Z. emelina* at Kinki-1 City in 2009. Roman figure indicates month. CP: critical photoperiod for inducing 4th instar larval diapause, A: adult. E: egg, L: larva, P: pupa.

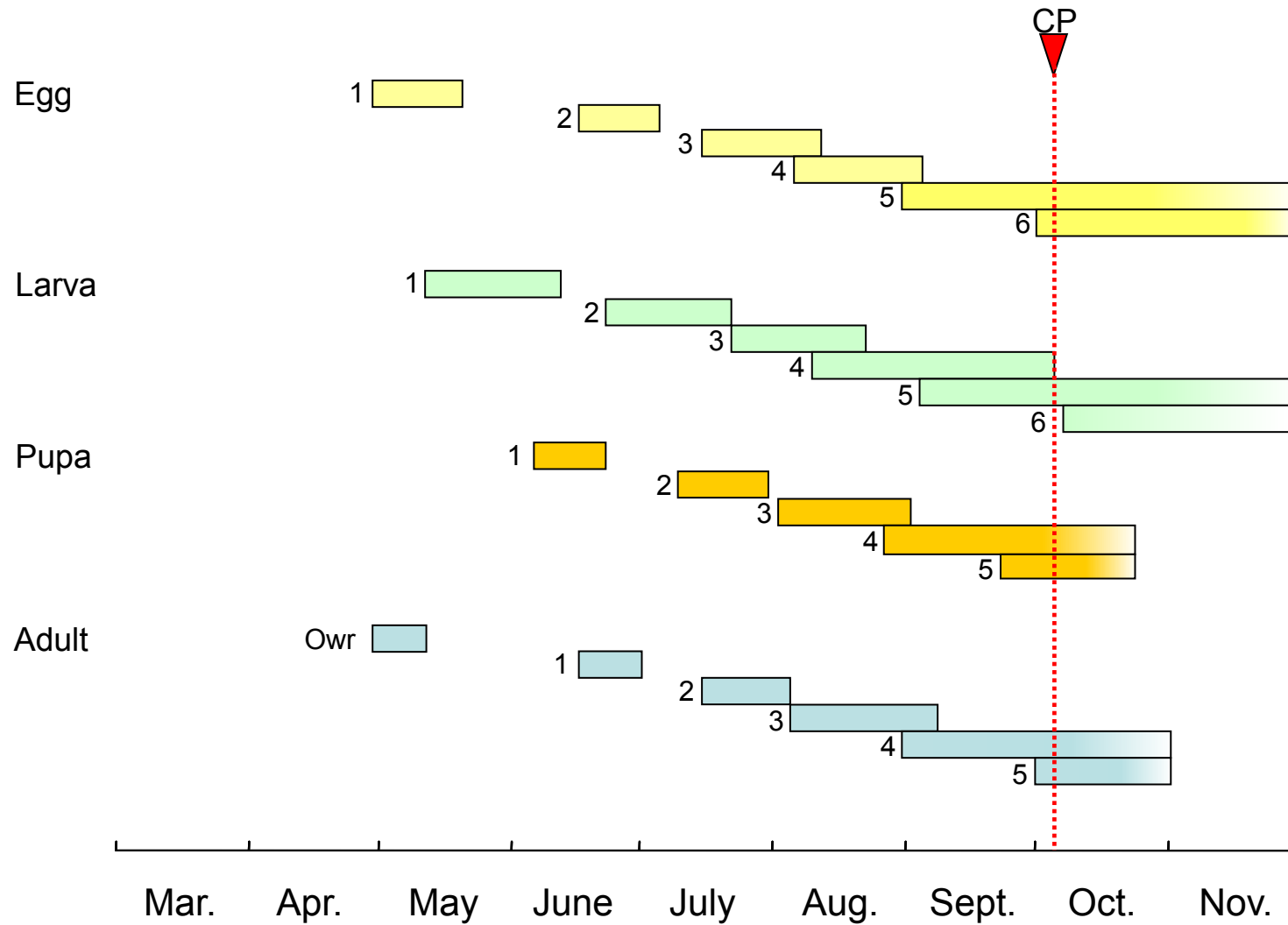


Fig. 1-D-2. Estimated seasonal occurrence of adults, eggs, larvae and pupae of *Z. emelina* in the Kinki-1 population in 2009. CP: critical photoperiod for inducing 4th instar larval diapause.

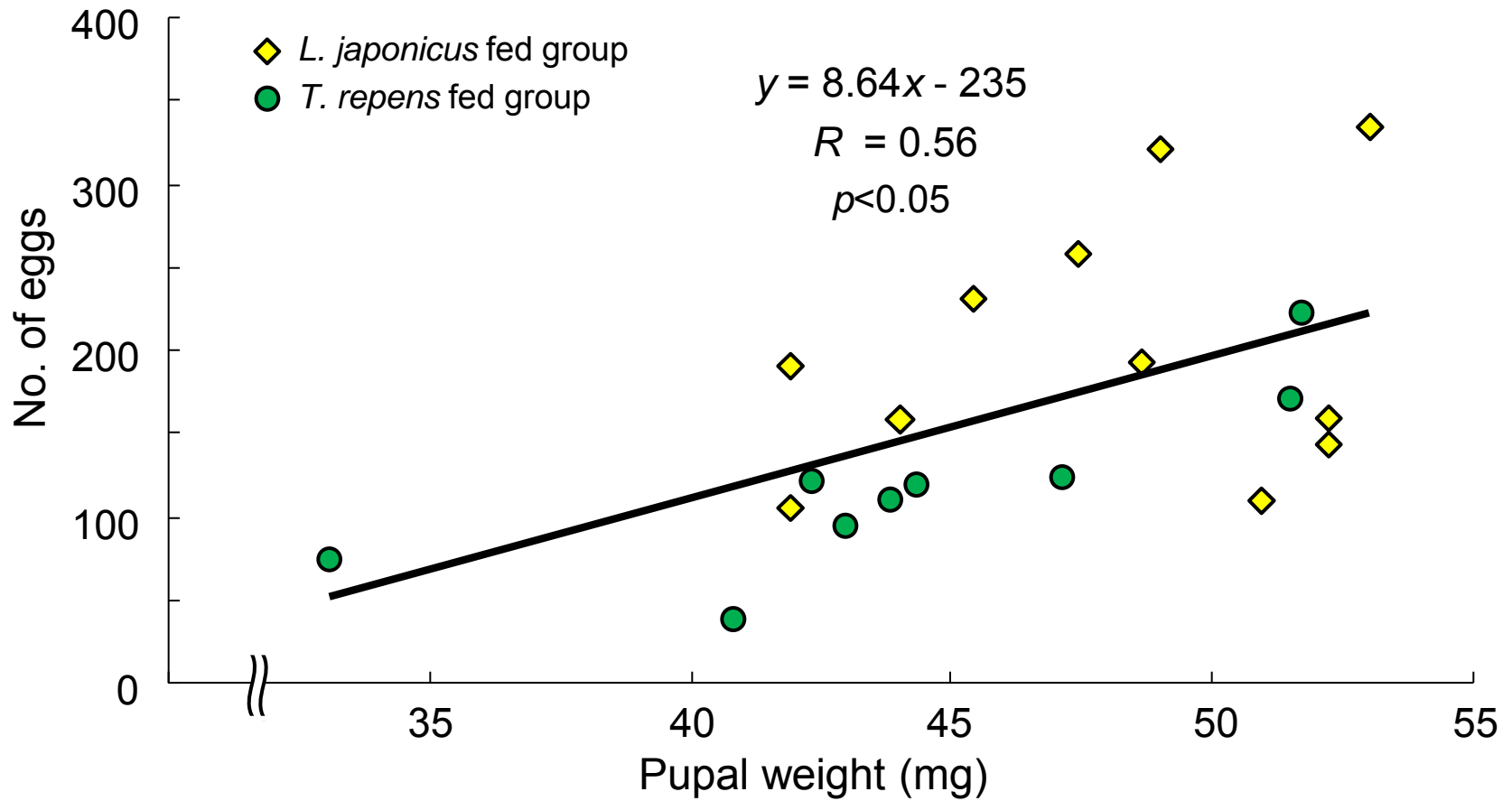


Fig. 1-D-3. Relationship between pupal weight and adult fecundity.

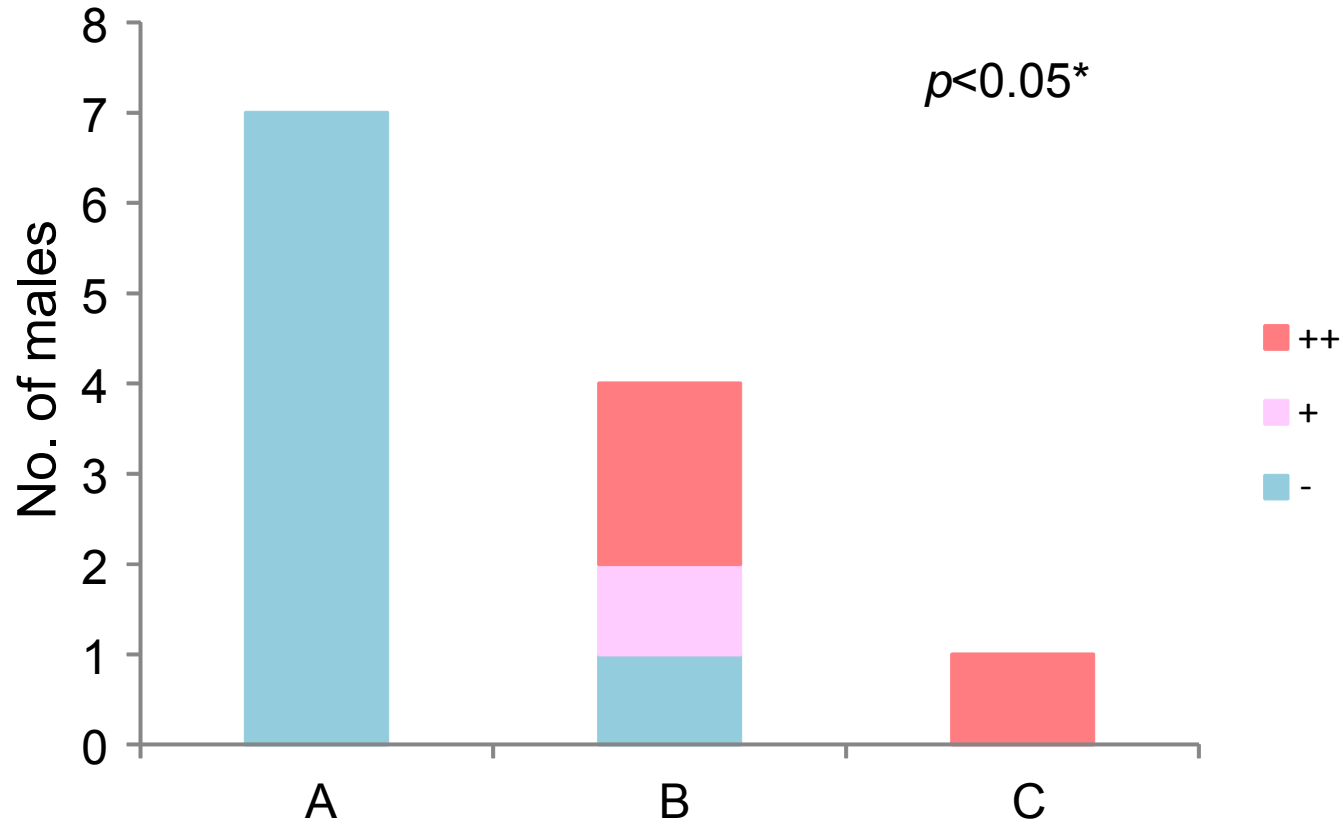


Fig. 2-1-1. Number of field-collected males of *Z. emelina* in the Kinki-2 population classified by their mating behavior for Kinki-1's females.
 Alphabets A-C indicate the levels of freshness in alphabetical order.
 ++ : Males trying to copulate more than once, + : Males trying to copulate once, - : Males not trying to copulate.
 *: significantly different by Fisher's exact test

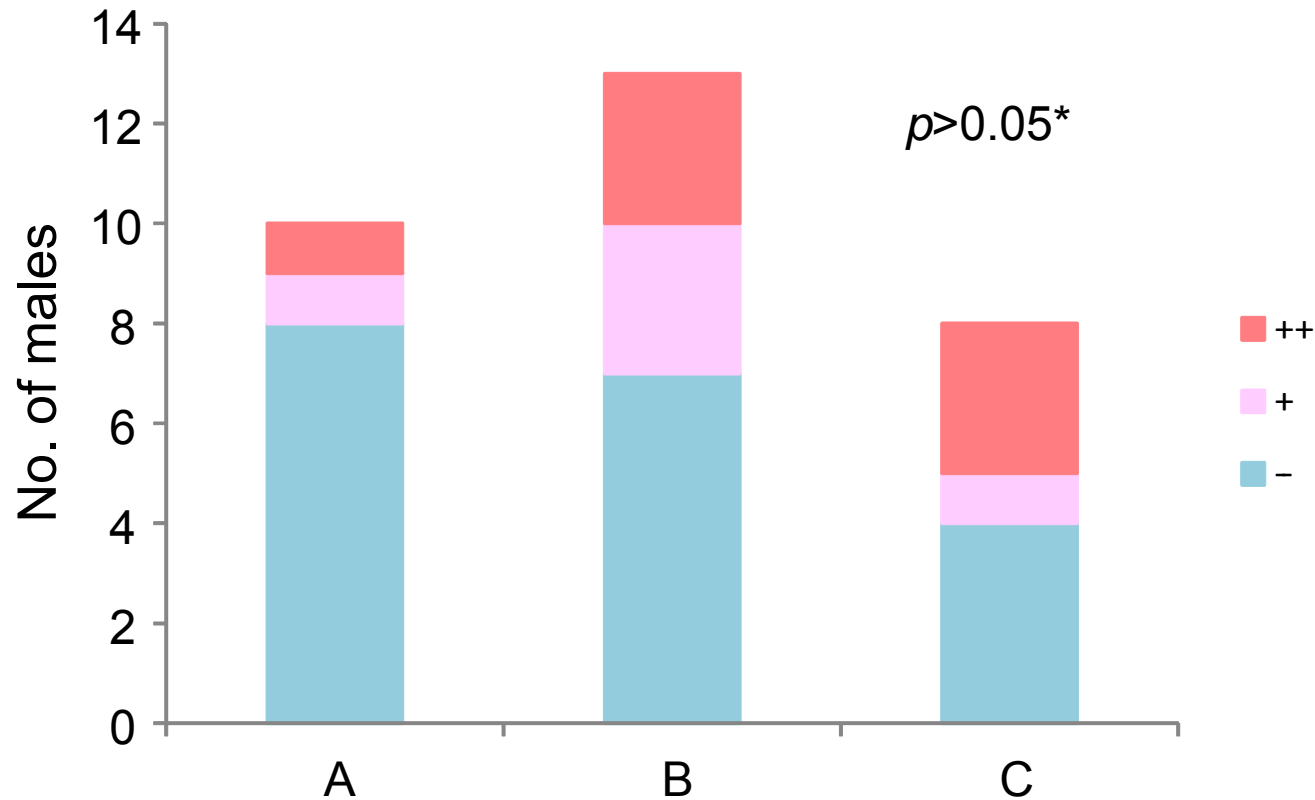


Fig. 2-1-2. Number of field-collected males in the Kinki-1 population classified by their mating behavior for Kinki-2's and hybrid females.

Alphabets A-C indicate the levels of freshness in alphabetical order.

++ : Males trying to copulate more than once, + : Males trying to copulate once, - : Males not trying to copulate.

*: not significantly different by Fisher's exact test

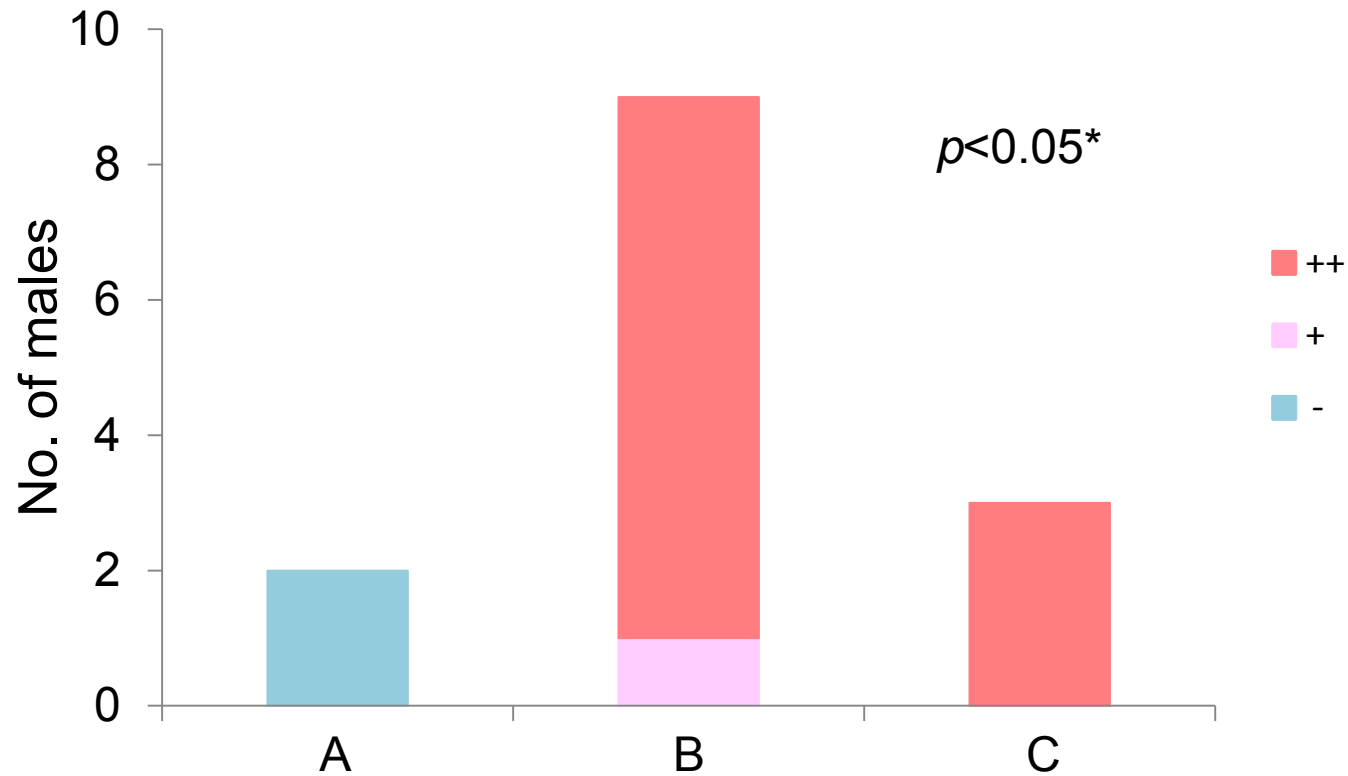


Fig. 2-1-3. Number of field-collected males of *Z. emelina* in the Kinki-1 population classified by their mating behavior for hybrid females.
 Alphabets A-C indicate the levels of freshness in alphabetical order.
 ++ : Males trying to copulate more than once, + : Males trying to copulate once, - : Males not trying copulate.
 *: significantly different by Fisher's exact test

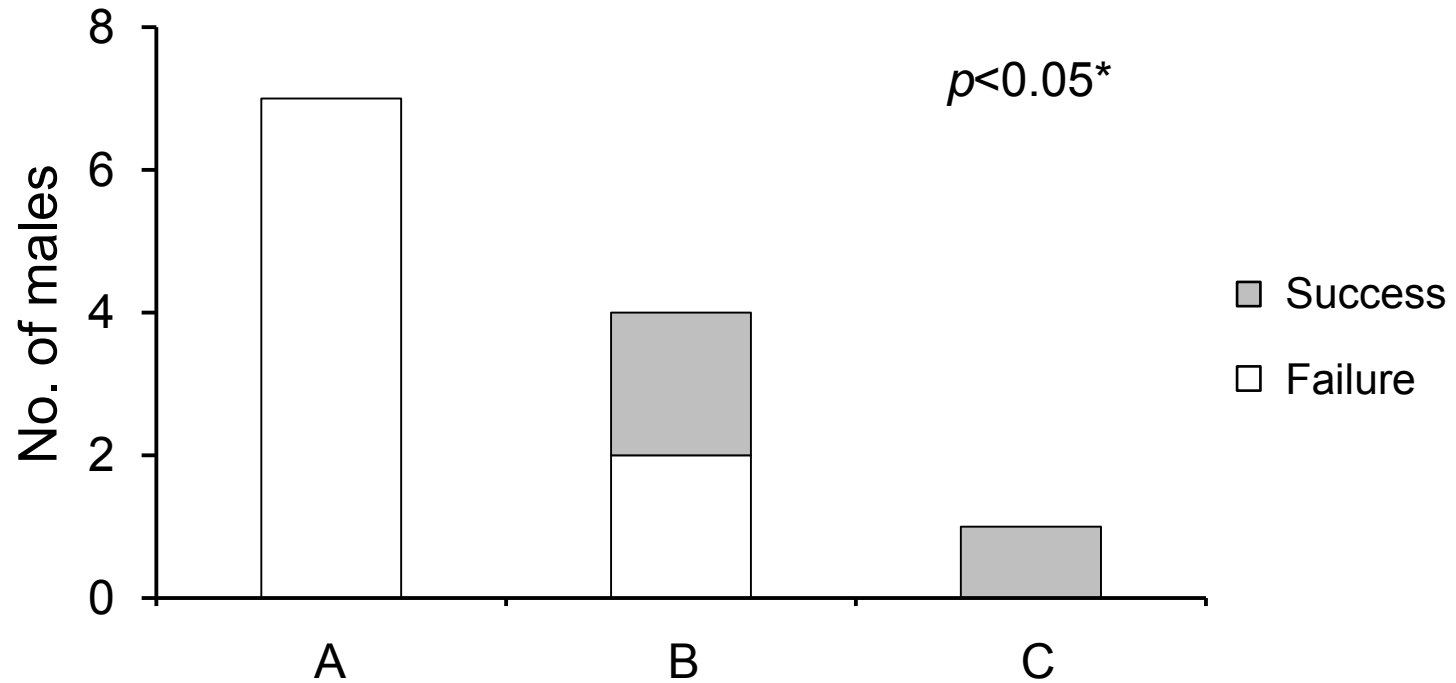


Fig. 2-1-4. Number of field-collected males of *Z. emelina* in the Kinki-2 population classified by success or failure of copulations for Kinki-1's females.

Alphabets A-C indicate the levels of freshness in alphabetical order.

*: significantly different by Fisher's exact test

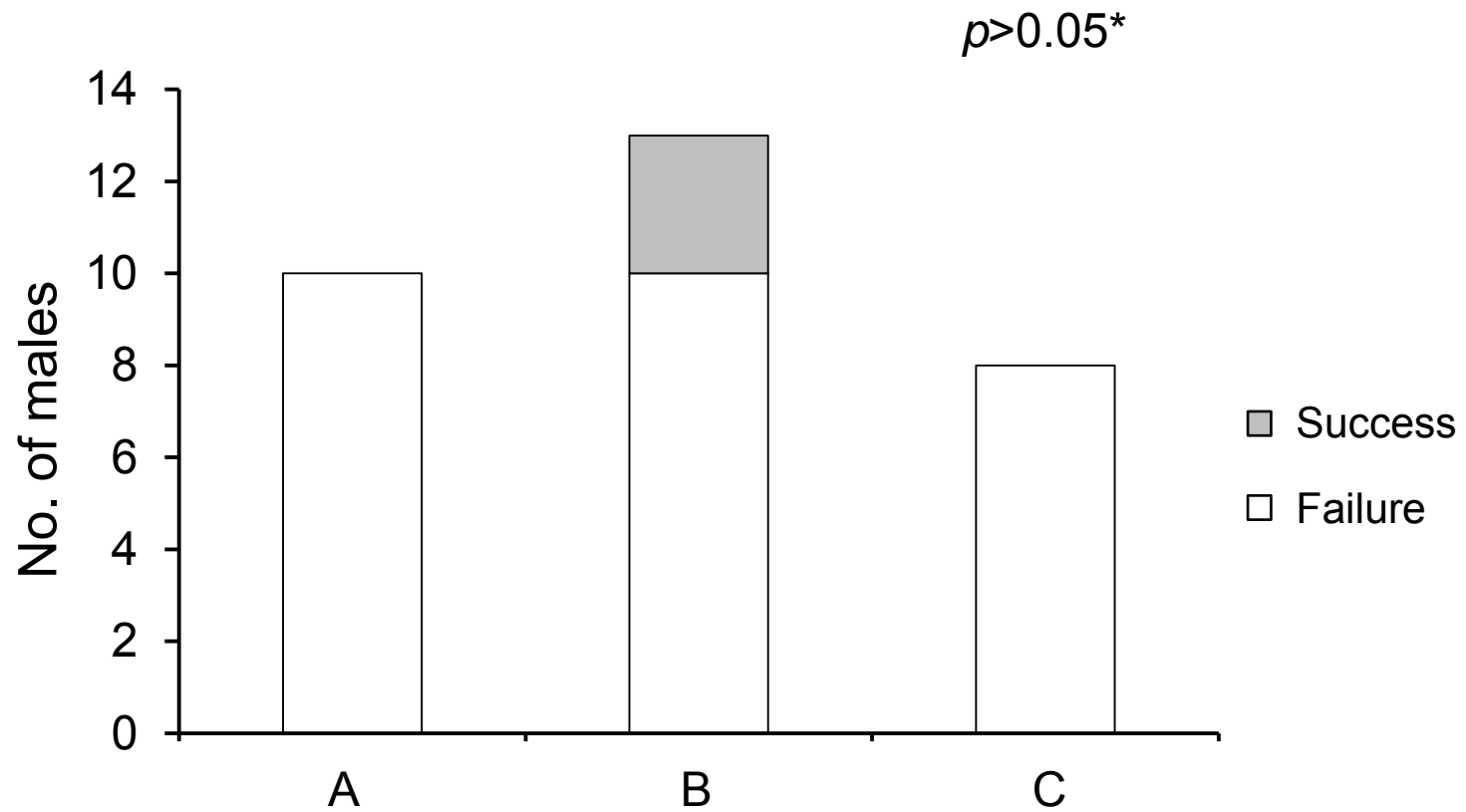


Fig. 2-1-5. Number of *Z. emelina* field-collected males in the Kinki-1 population classified by success or failure of copulations for Kinki-2's and hybrid females.

Alphabets A-C indicate the levels of freshness in alphabetical order.

*: not significantly different by Fisher's exact test

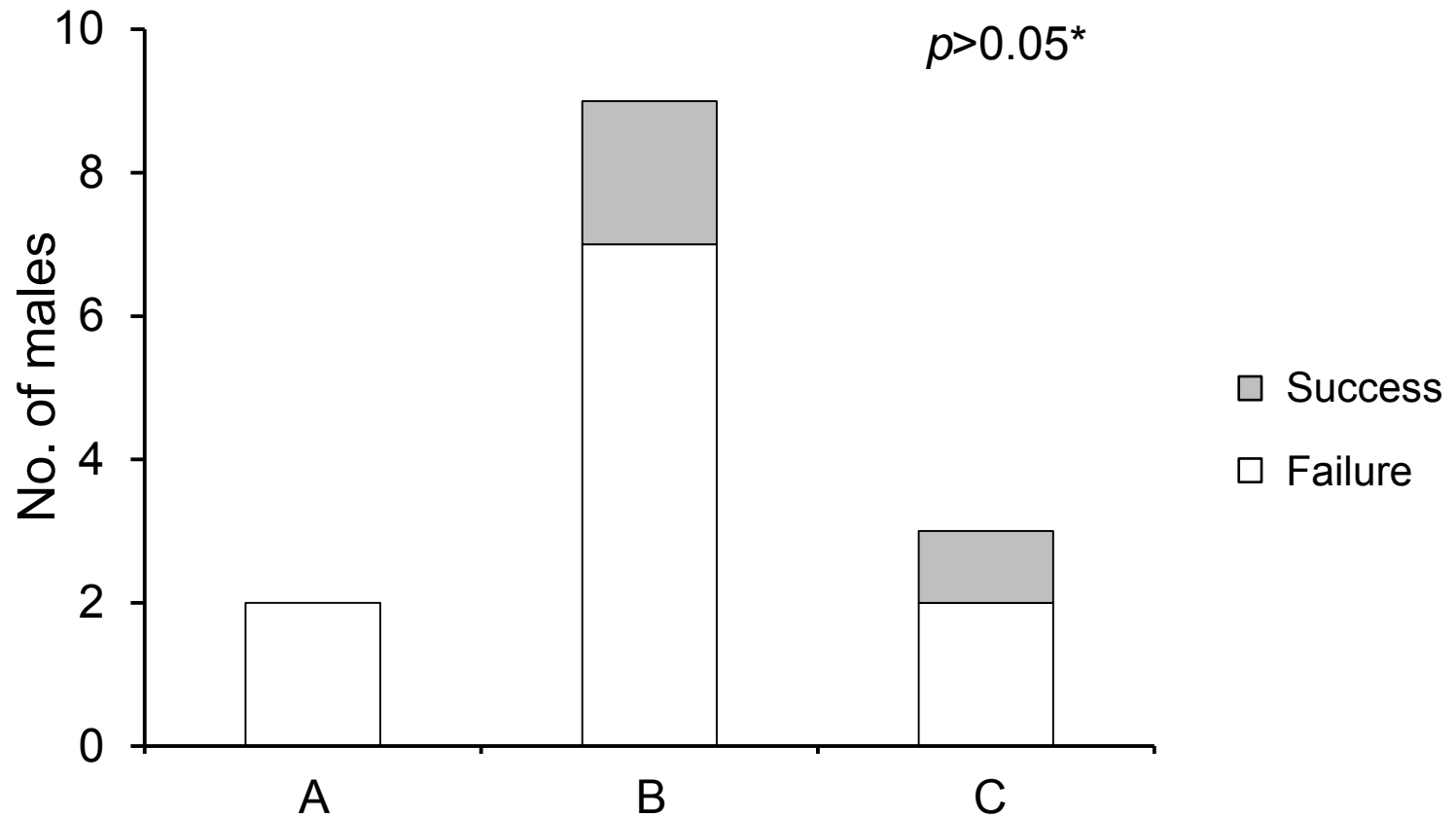


Fig. 2-1-6. Number of field-collected males of *Z. emelina* in the Kinki-1 population classified by success or failure of copulations for hybrid females..

Alphabets A-C indicate the levels of freshness in alphabetical order.

*: not significantly different by Fisher's exact test



Fig. 2-2-1. Examples of closed wing models for mating behavior experiment. a: a female of *Z. emelina*, b: a male of *Z. emelina*, c: a sealed female of *Z. emelina*, d: a sealed male of *Z. emelina*, e: a female of *P. maha*, f: a male of *P. maha*.

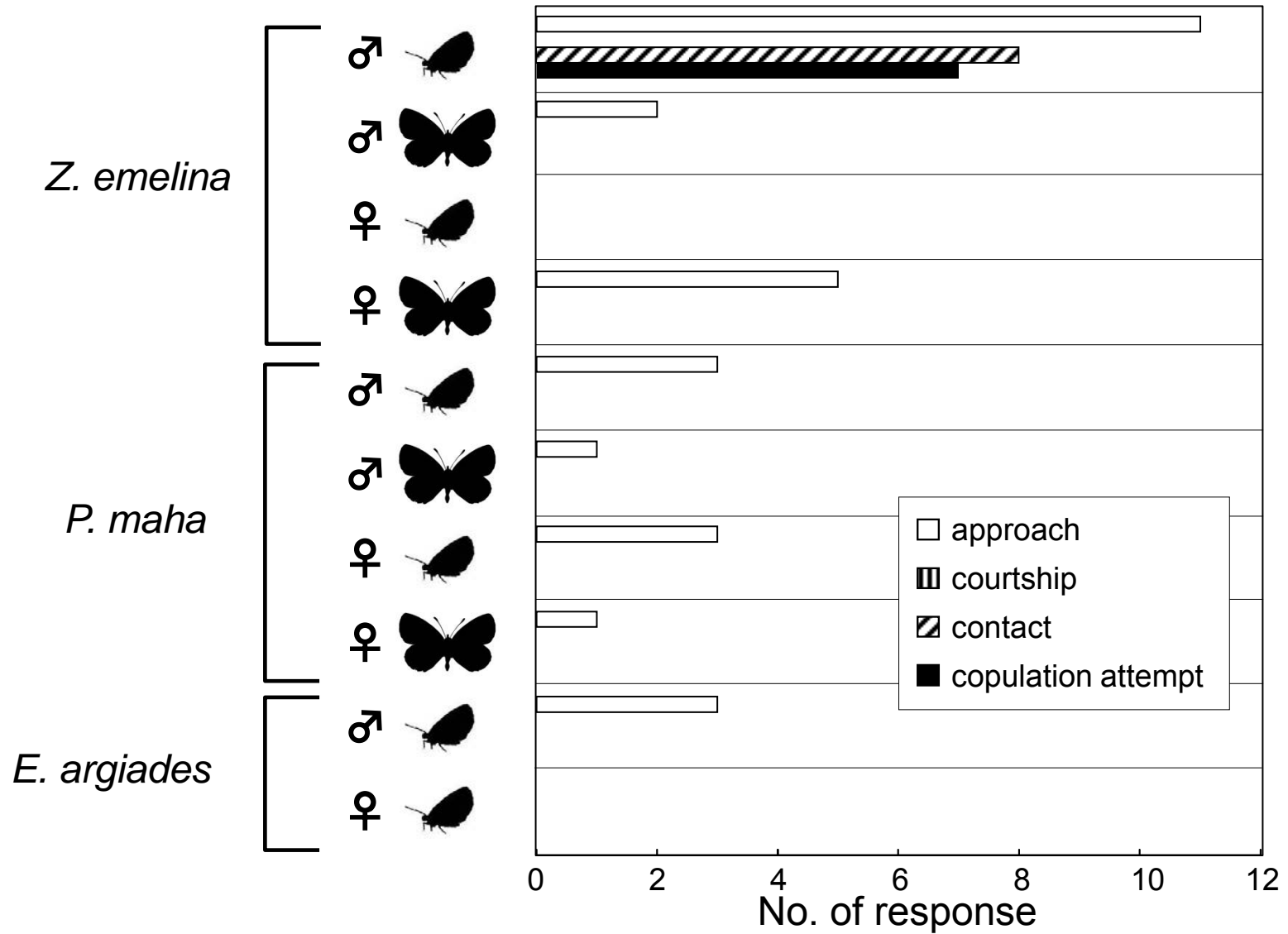


Fig. 2-2-2. Number of responses for each model in flying males of *P. maha* in crop field of the OPU on 26th September, 2010.

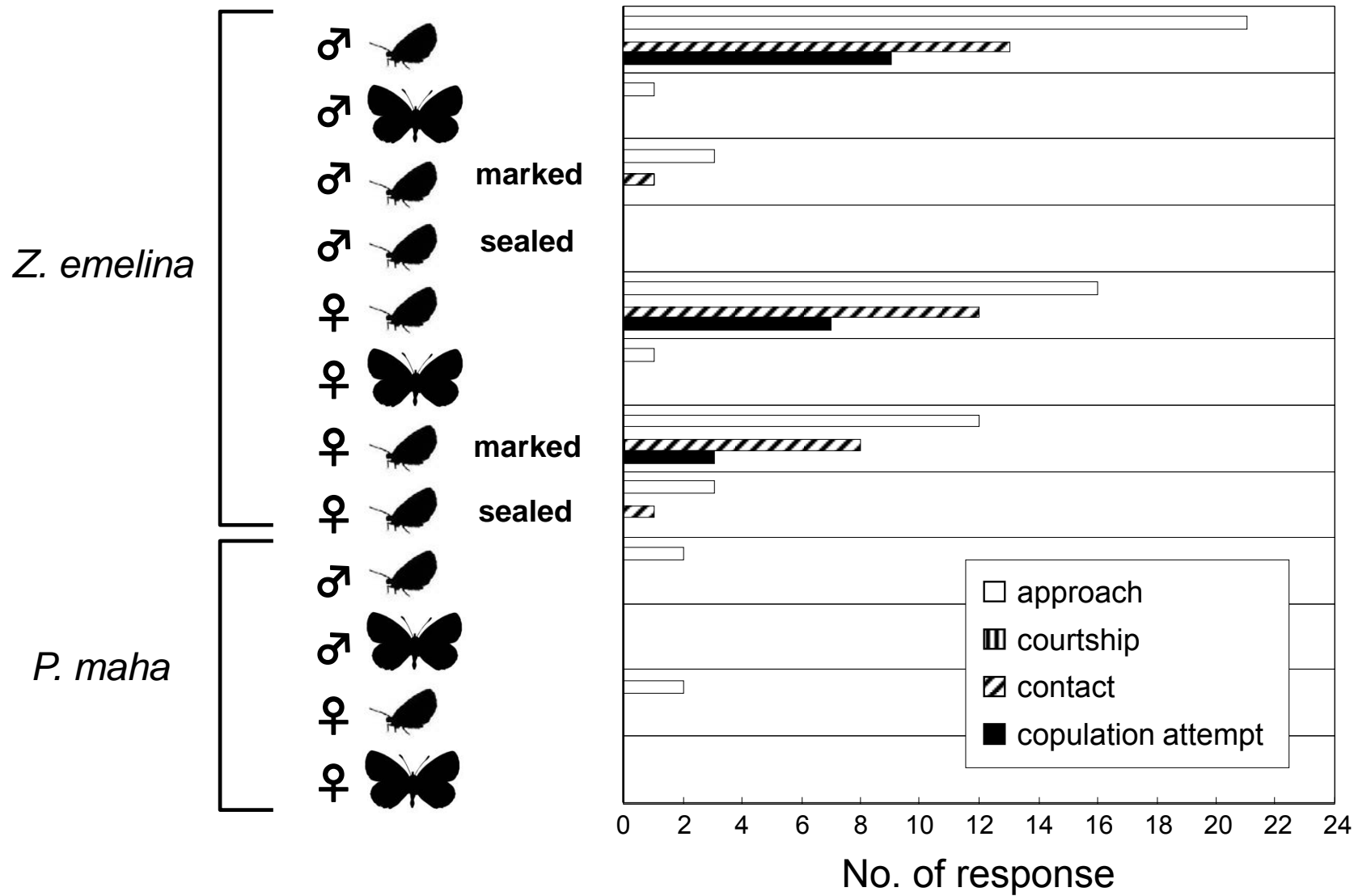


Fig. 2-2-3. Number of responses for each model in flying males of *Z. emelina* in the Kinki-1 population on 6th October, 2010

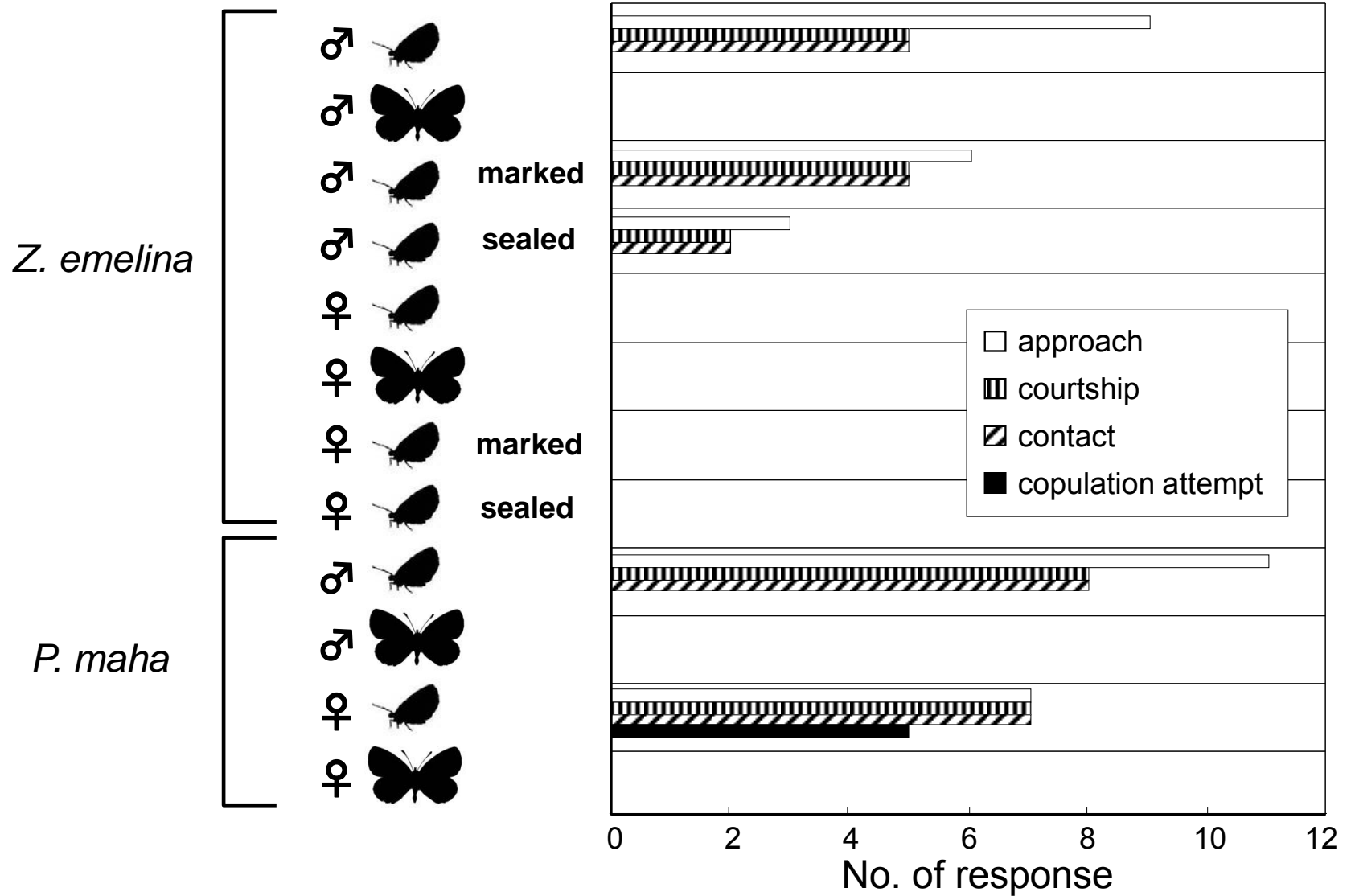


Fig. 2-2-4. Number of responses for each model in flying males of *P. maha* in crop field of the OPU on 11th October, 2010.

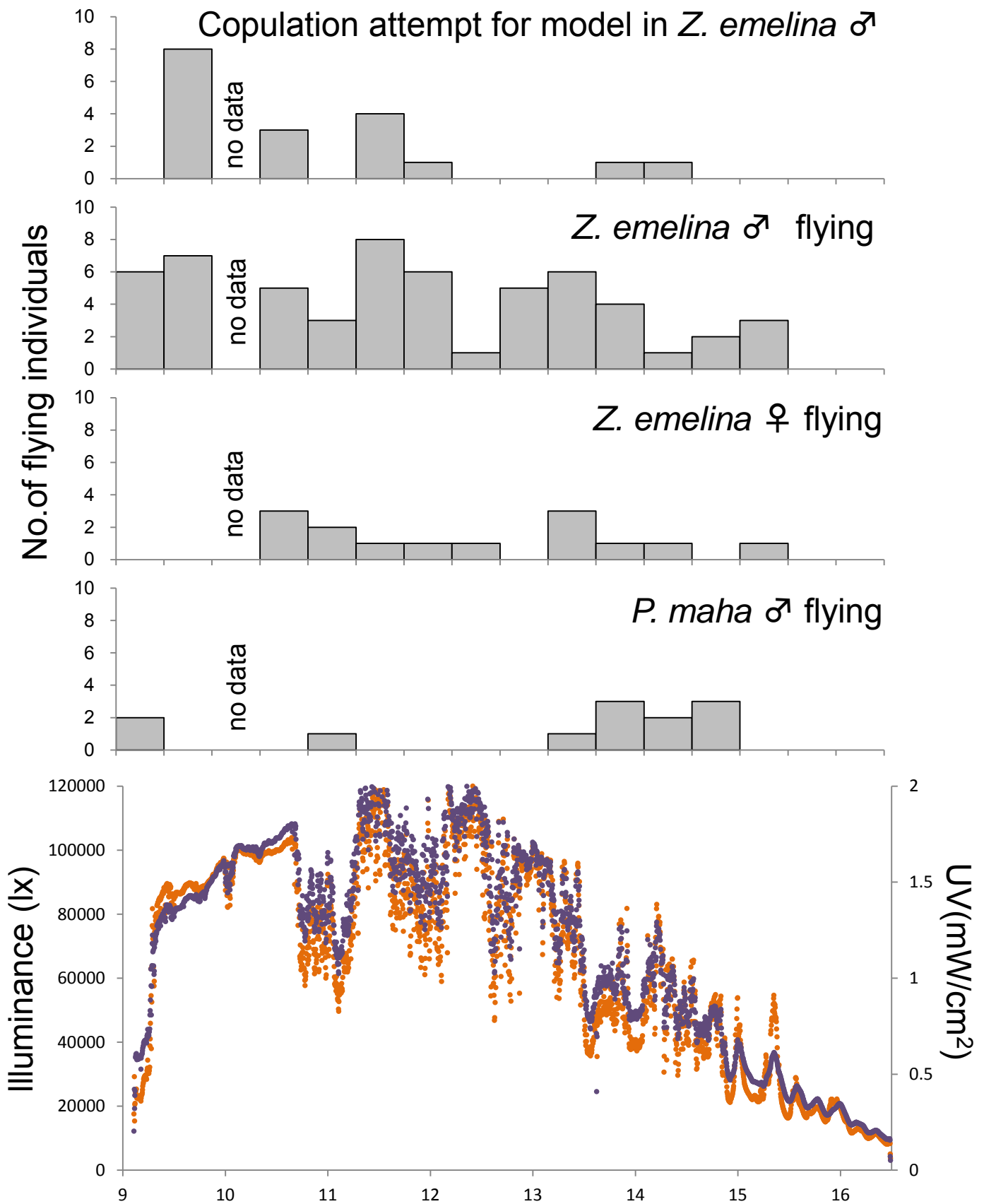


Fig. 2-2-5. Number of copulation attempt for models, flying individuals *Z. emelina* and *P. maha*, and amount of illuminance and UV.

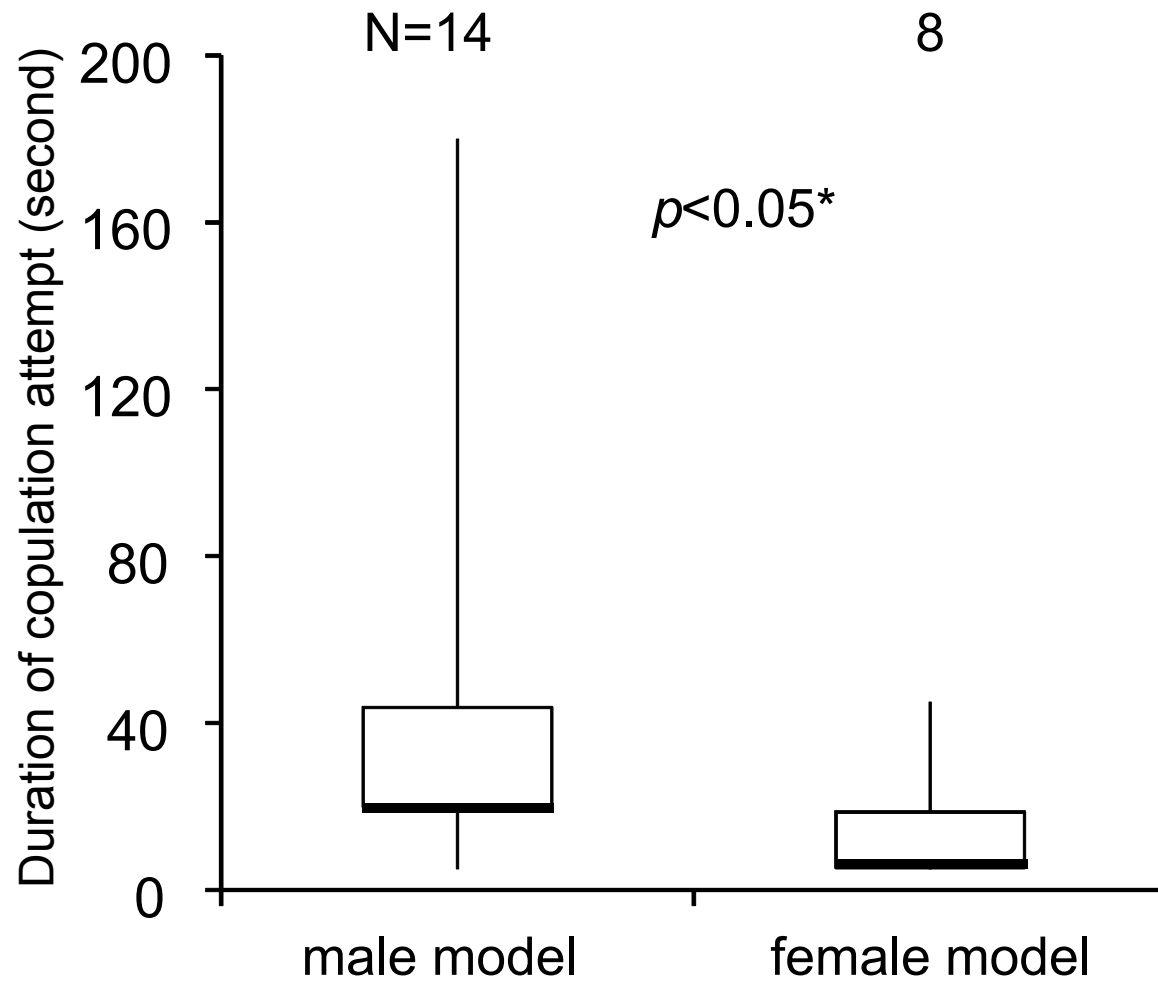


Fig. 2-2-6. Duration of copulation attempt for male and female models in flying males of *Z. emelina* in the Kinki-1 population in 2010.

*: significantly different by Mann-Whitney *U* test

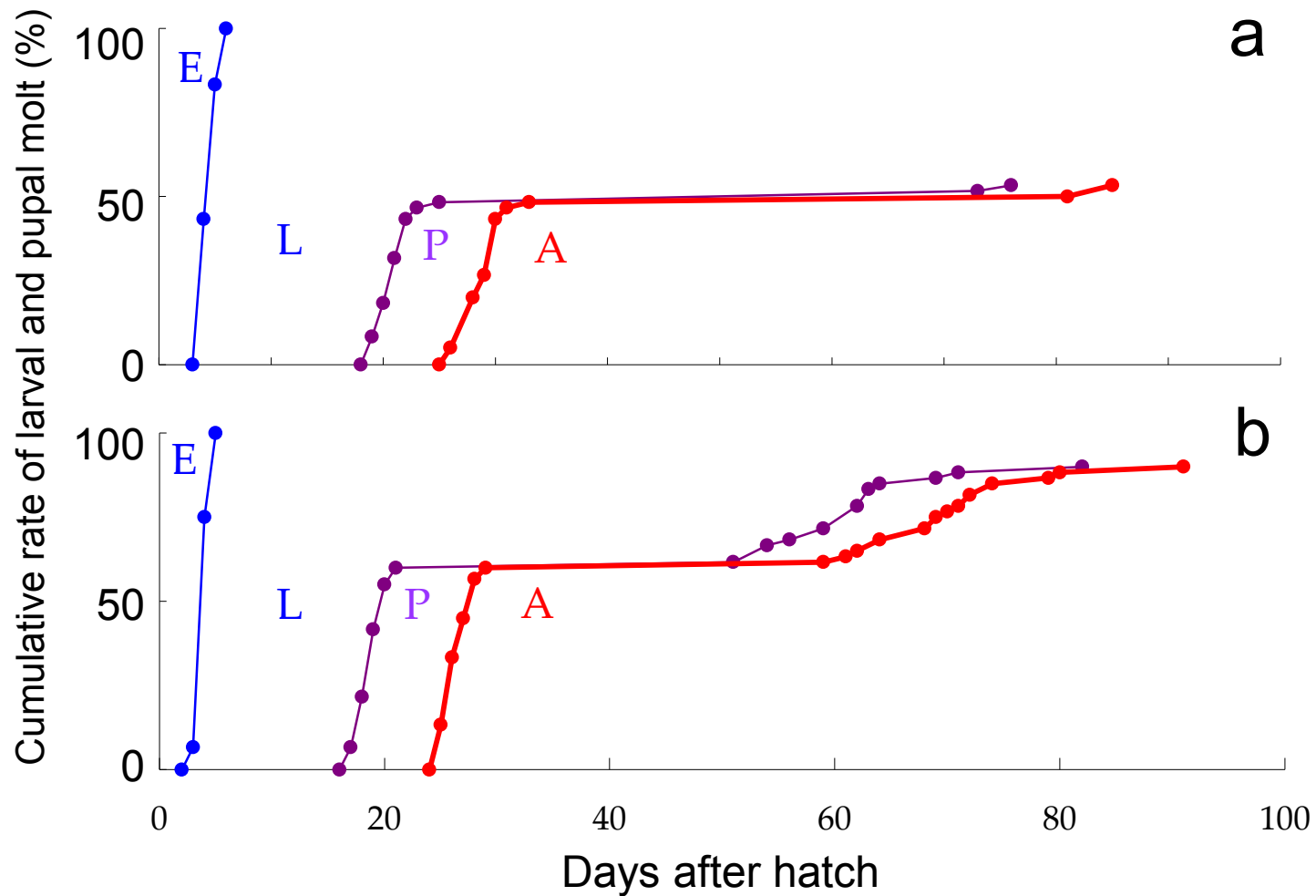


Fig. 2-3-1. Cumulative rate of larval and pupal molts in hybrids between *Z. emelina* and *Z. otis* in 2012 under 16L-8D photoperiodic conditions at 20 °C. a: a brood of T298-1, b: a brood of T298-2, E: egg, L: larva, P: pupa. A: adult

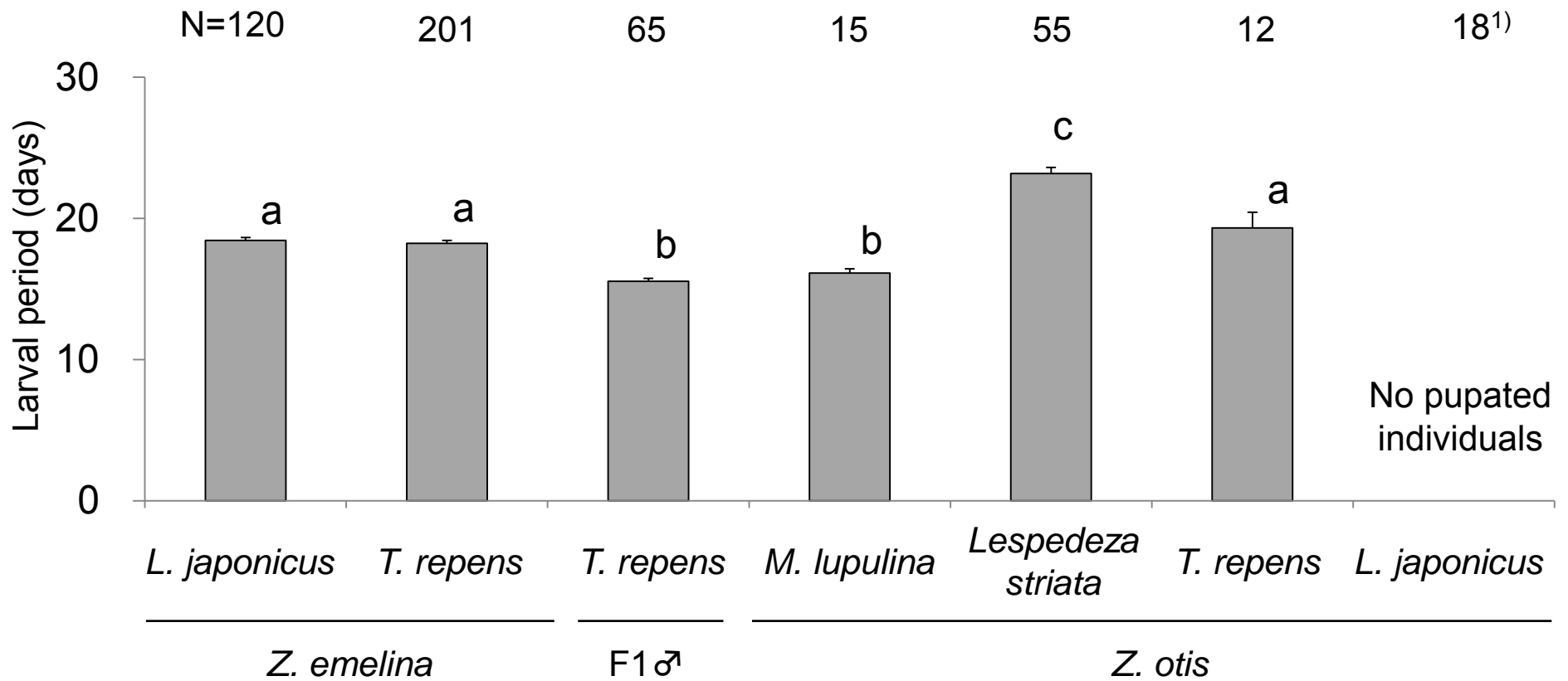


Fig. 2-3-2. Larval periods of individuals reared on *L. japonicus*, *T. repens*, *M. lupulina* and *Lespedeza striata* fed groups in *Z. emelina*, *Z. otis* and their hybrid offspring. Means followed by the same letter are not significantly different at 5% levels by Tukey-Kramer test ($p>0.05$).

1) All individuals died in larval stage.

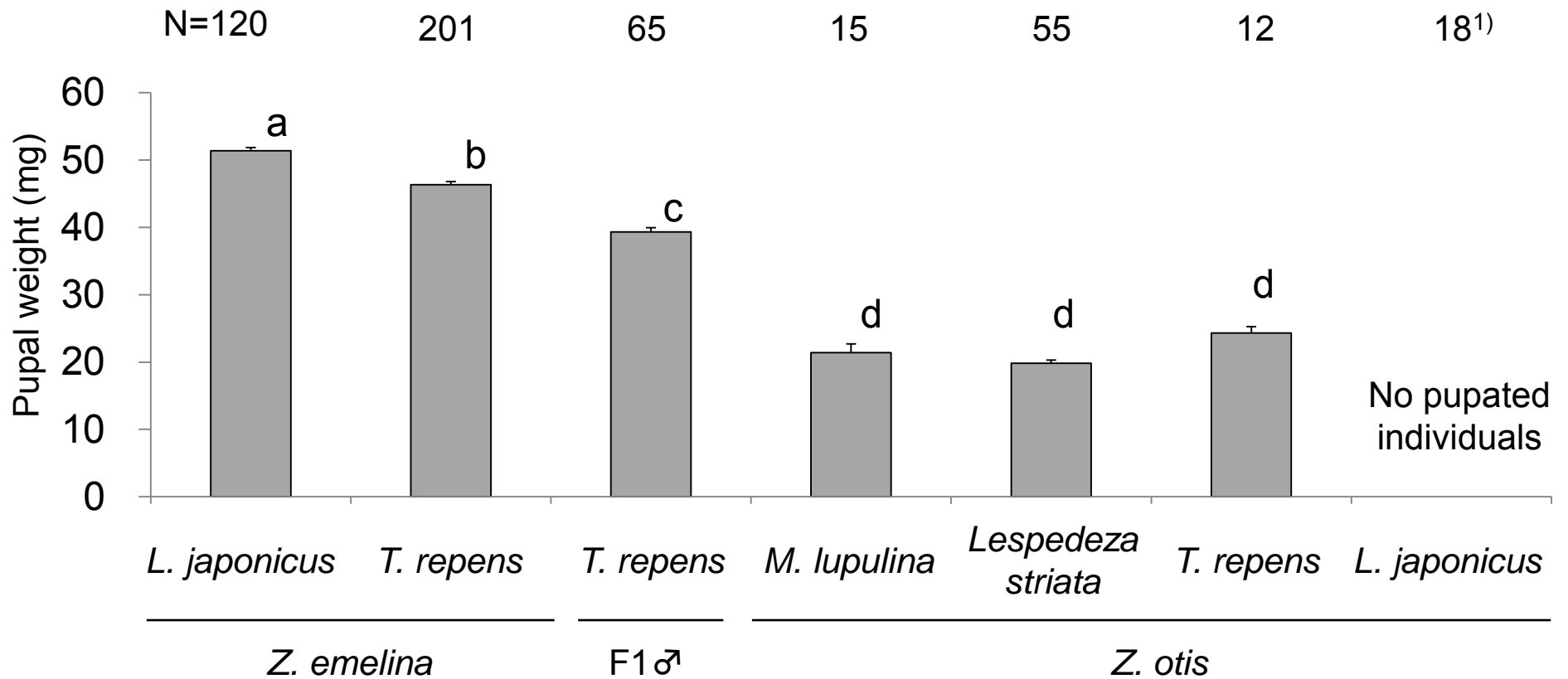


Fig. 2-3-3. Pupal weights of individuals reared on *L. japonicus*, *T. repens*, *M. lupulina* and *Lespedeza striata* fed groups in *Z. emelina*, *Z. otis* and their hybrid offspring. Means followed by the same letter are not significantly different at 5% levels by Tukey-Kramer test ($p > 0.05$).

1) All individuals died in larval stage.



Z. emelina

F1 hybrid

Z. otis

Fig. 2-3-4. The undersurface of male wings in *Z. emelina*, *Z. otis* and their F1 hybrids.



Z. emelina

F1 hybrid

Z. otis

Fig. 2-3-5. The uppersurface of male wings in *Z. emelina*, *Z. otis* and their F1 hybrids.

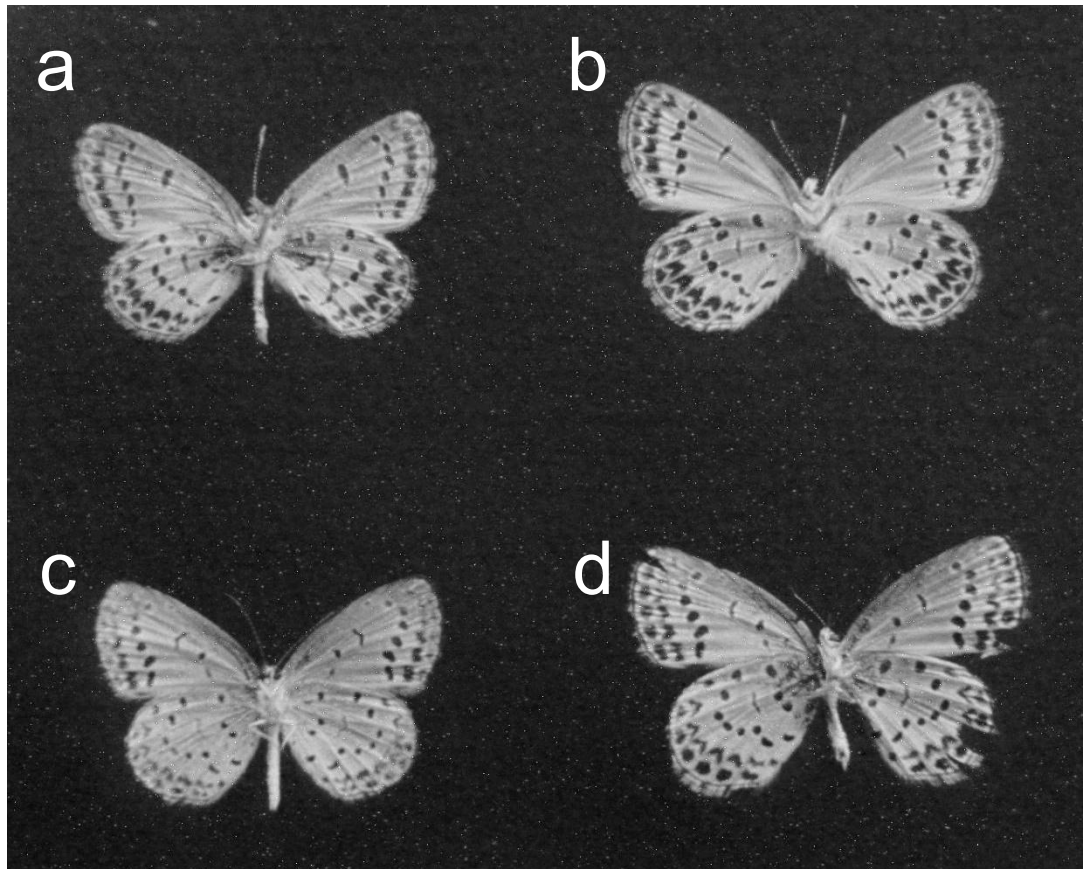
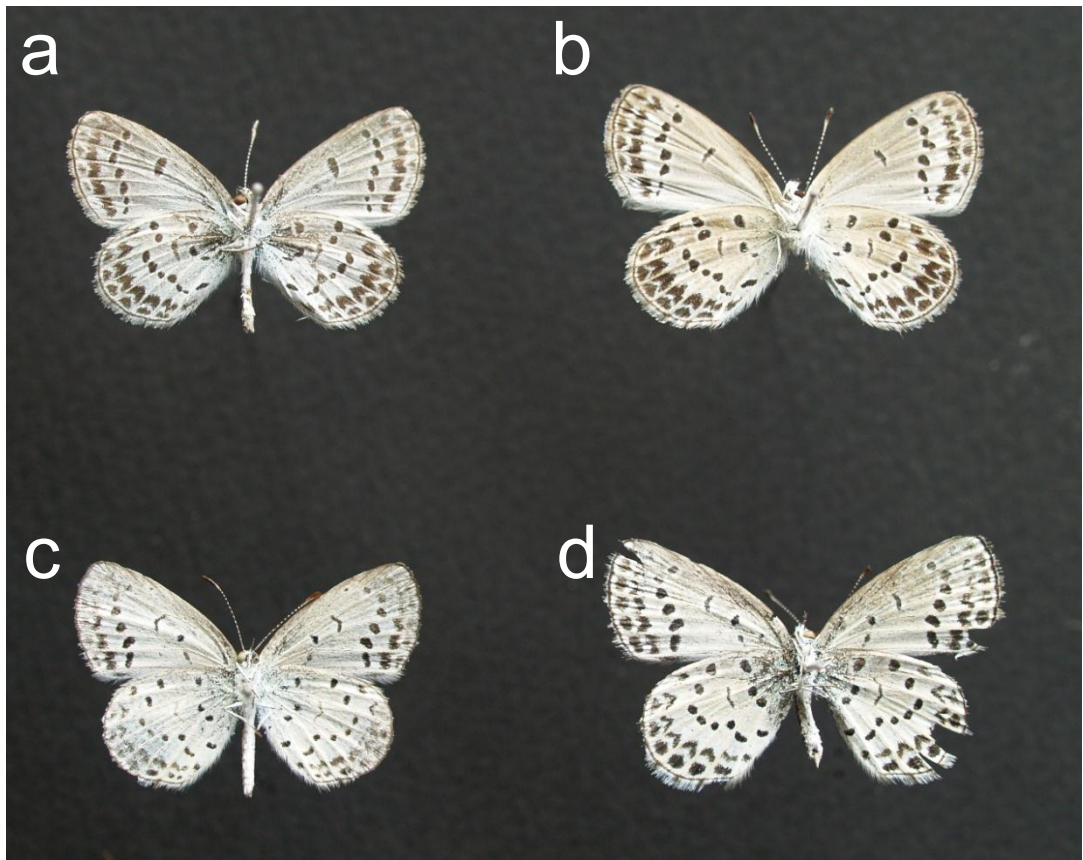


Fig. 2-D-1. A photograph of the undersurface of wings in visible (upper) and ultraviolet (under).

a, b: *Z. emelina*, c, d: *P. maha*, a, c: male, b, d: female

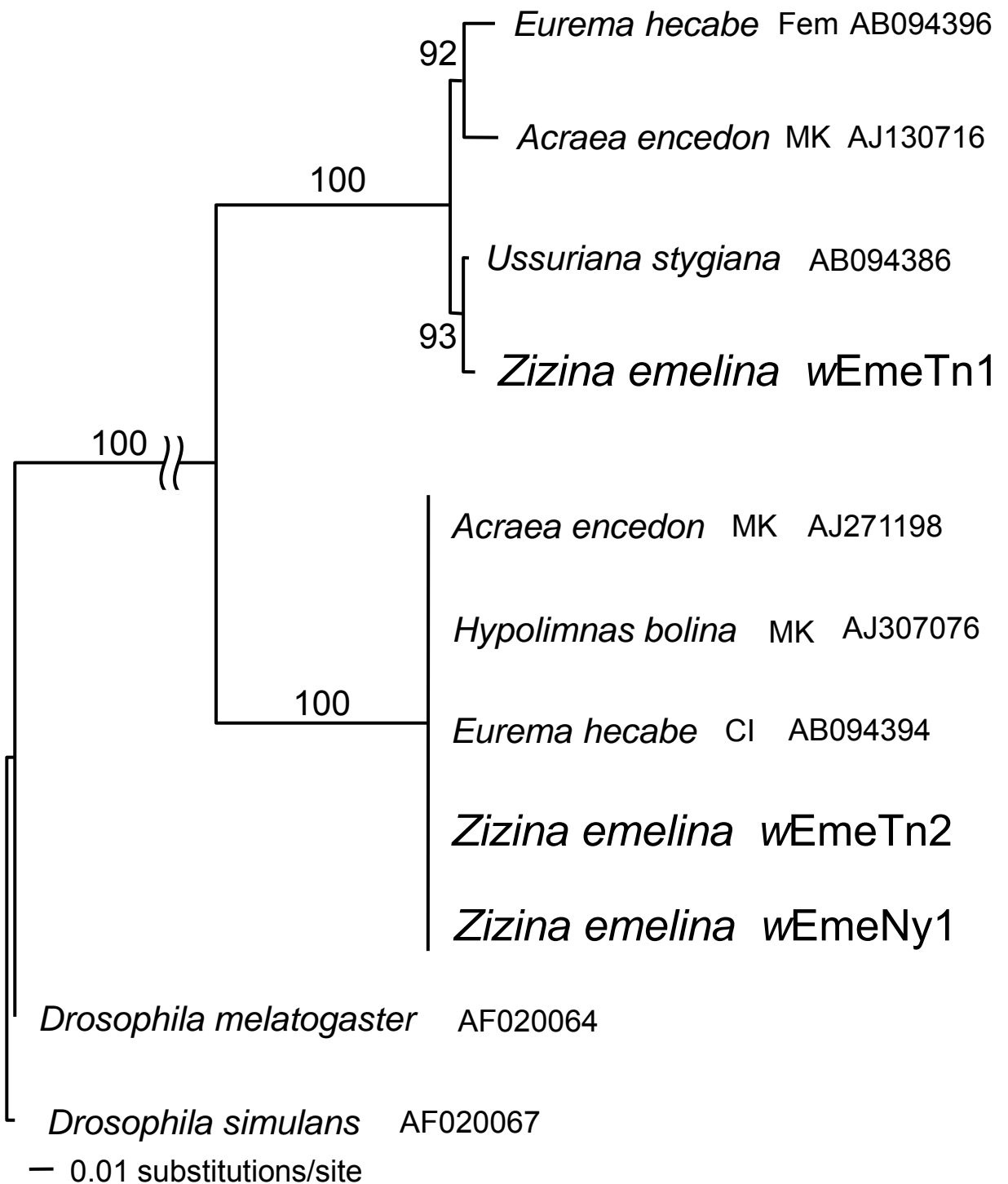


Fig. 3-1-1. Phylogenetic tree of B-group of *Wolbachia* based on the *wsp* gene with outgroup of A-group *Wolbachia* form *Drosophila melanogaster* (AF020064). The tree was constructed by NJ methods. Bootstrap values of less than 50% are not shown. *Wolbachia* strains are given as their host species names.
 Fem: Feminization MK: Male-killing CI: Cytoplasmic incompatibility

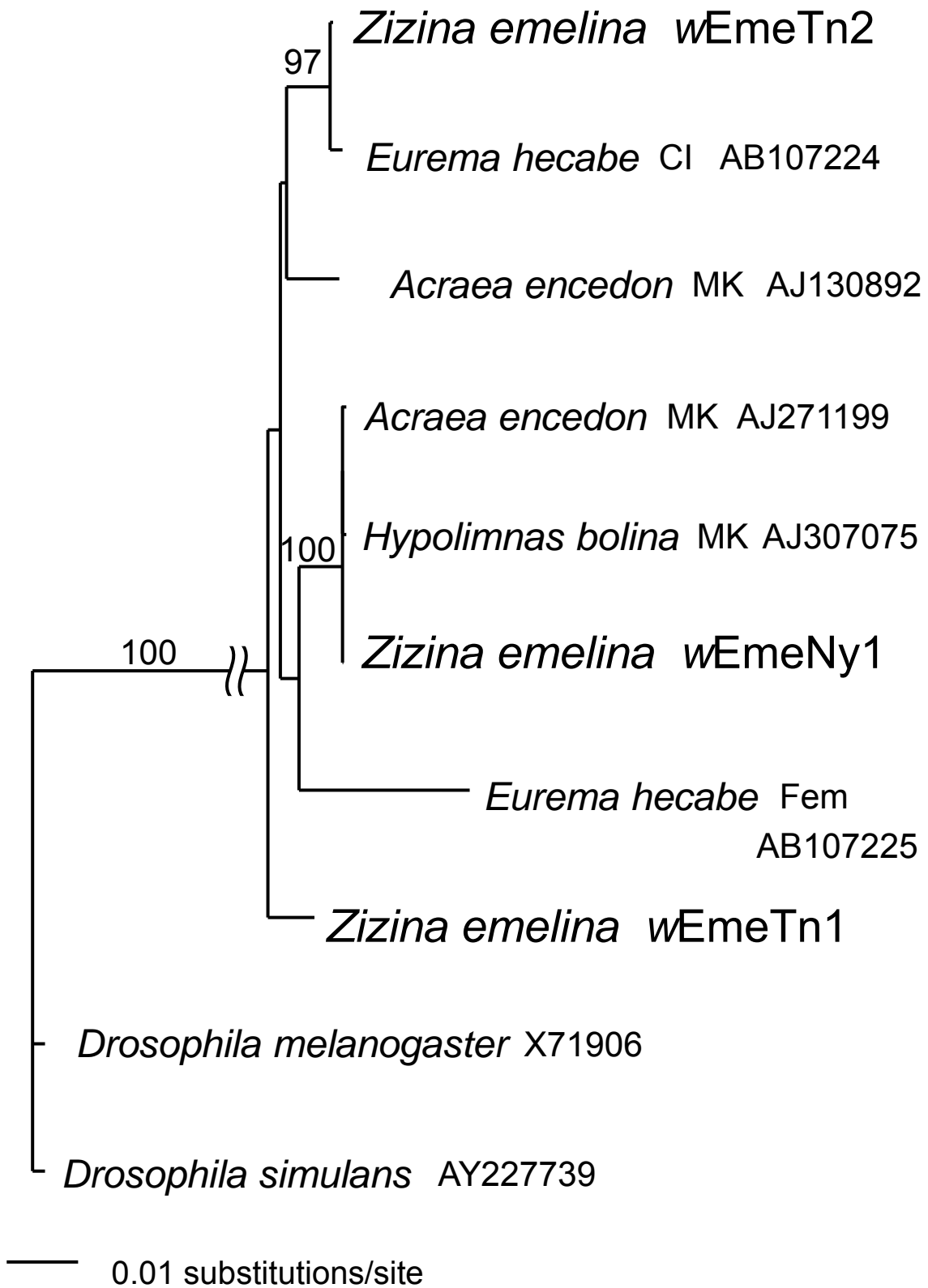


Fig. 3-1-2. Phylogenetic tree of the B-group of *Wolbachia* based on the *ftsZ* gene with outgroup of A-group *Wolbachia* form *Drosophila simulans* (AY227739). The tree was constructed by NJ methods. Bootstrap values of less than 50% are not shown. *Wolbachia* strains are given as their host species names. Fem: Feminization MK: Male-killing CI: Cytoplasmic incompatibility

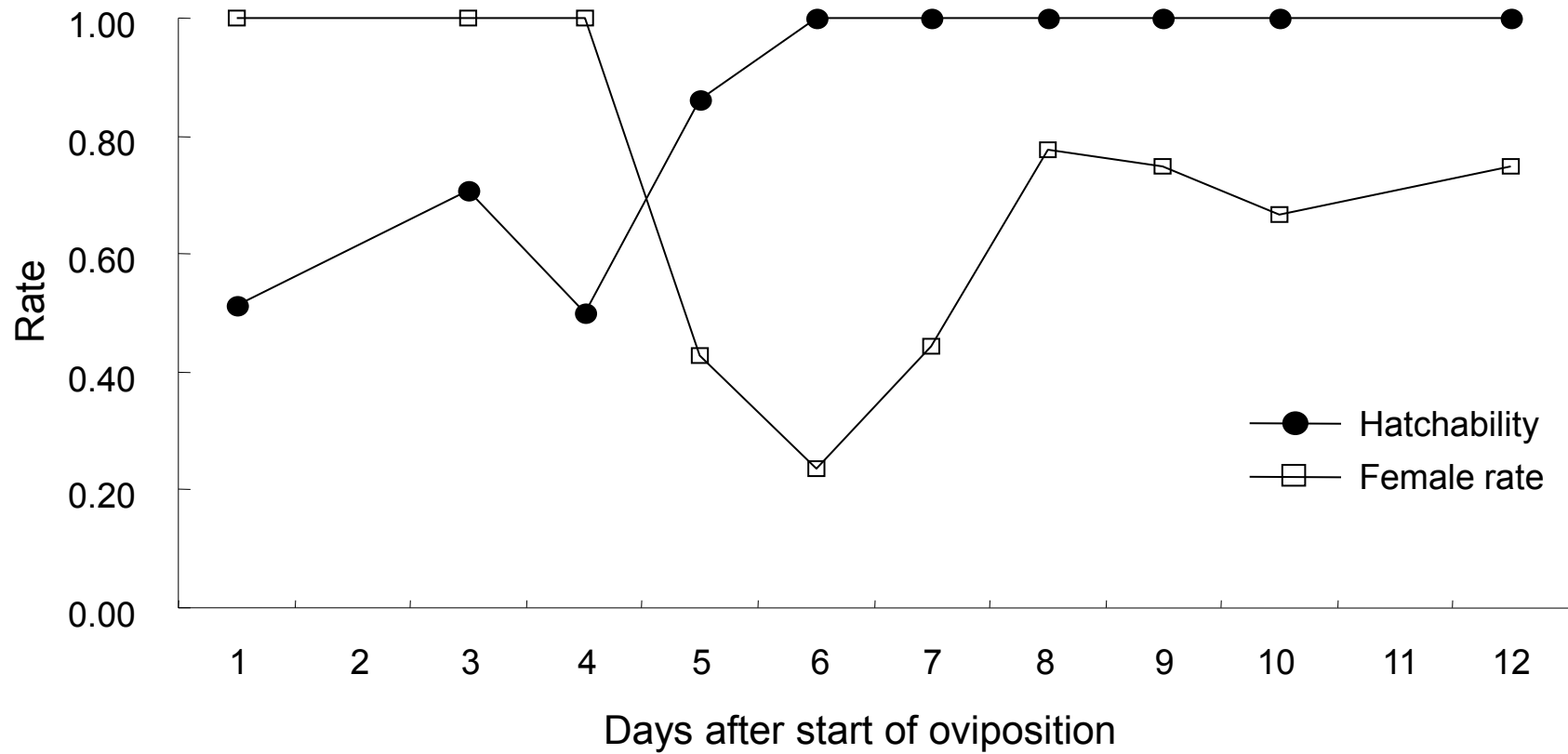


Fig. 3-1-3. Female rate and hatchability of successive eggs batches laid by a *wEmeTn2*-infected female of *Z. emelina* with tetracycline treatment from day 2 to day 4.



Fig. 3-1-4. Sex chromatin of malpighian tubule cells, stained with lactic acetic orcein in *Z. emelina*.
a: a male obtained from the uninfected female, b: a female obtained from the infected female
Arrows: W chromatin bodies.



Fig. 3-2-1. Internal and external genitalia of *Z. emelina*. Red and blue arrows indicate ovaries and valvae, female and male characteristics, respectively.

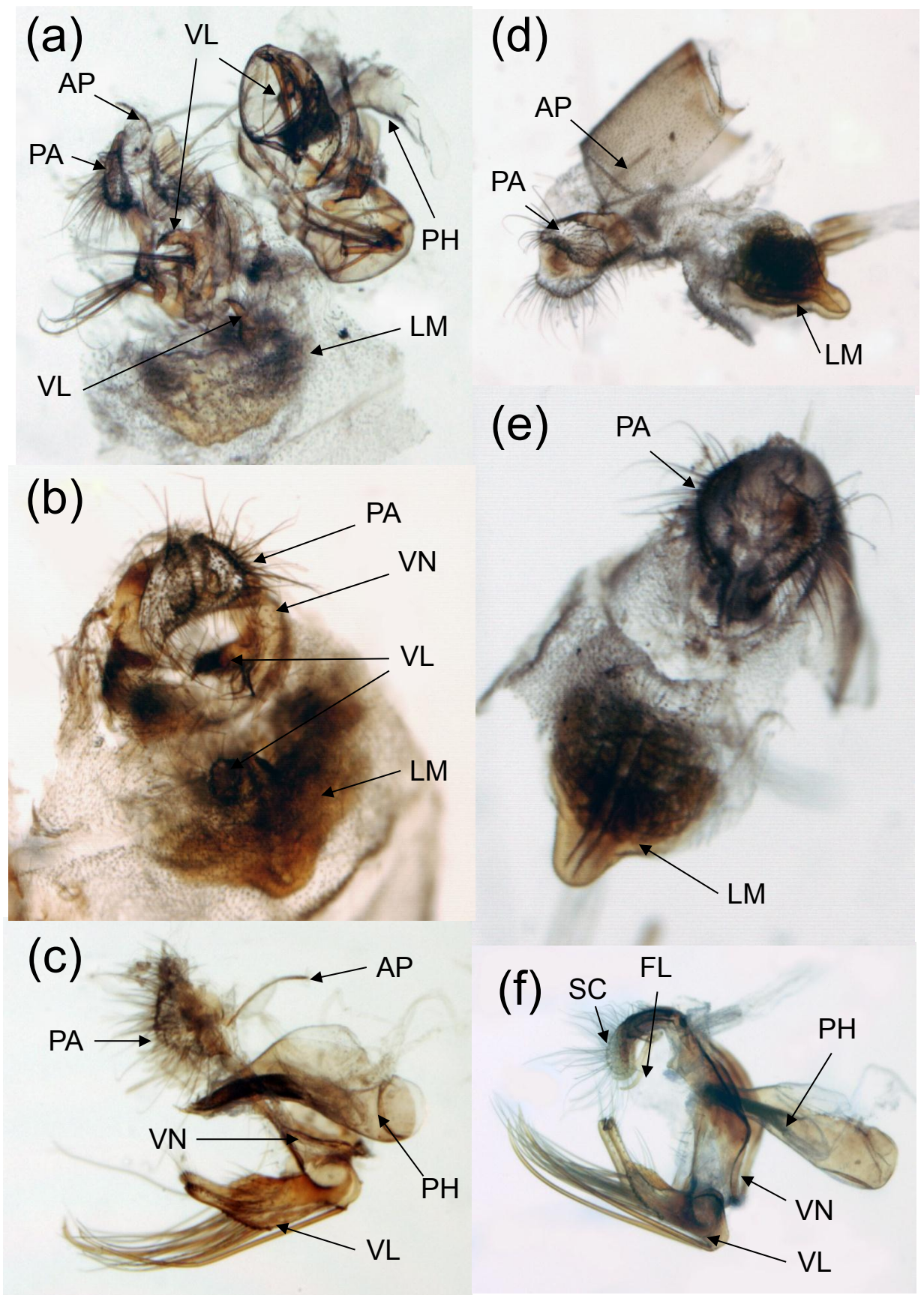


Fig. 3-2-2. External genitalia of *Z. emelina* (a): S113-1, (b): S123-2, (c): S123-1, (d)(e): a normal female, (f): a normal male, (a)(b)(e): in ventral view, (c)(d)(f): in right lateral view, VL: valva, SC: socus, FL: falx, PH: phallus, VN: vinculum, PA: papilla analis, LM: lamella, AP: apophysis posterioris

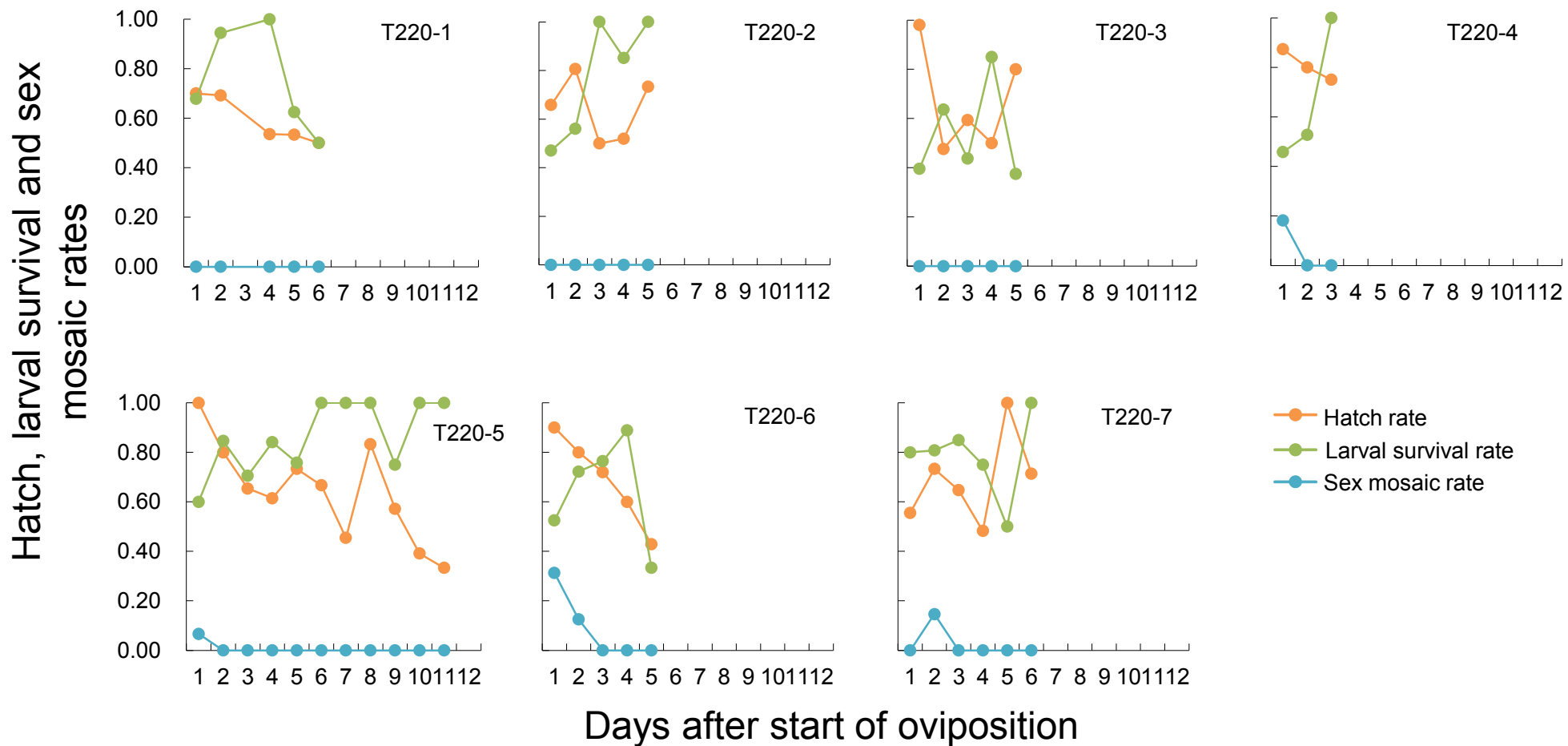


Fig. 3-3-1. Hatch, larval survival and sex mosaic rates of successive egg batches laid by T220-offspring females of *Z. emelina* infected with *wEmeTn2*.

T220-3, 4, 5, 6 and 7 were hybrids between Kinki-1 and Kinki-3.

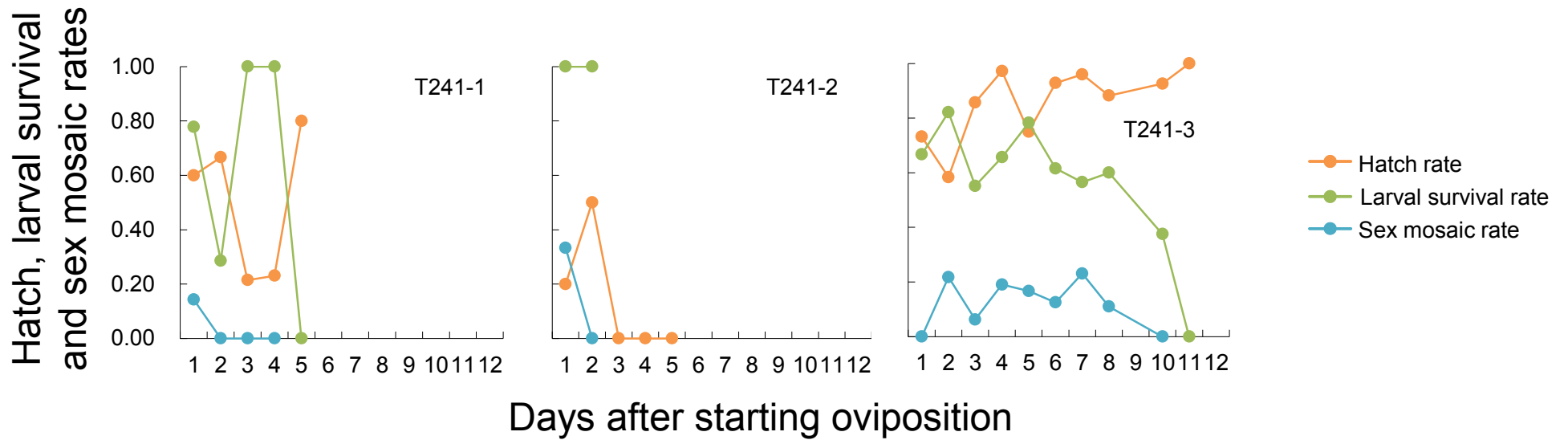


Fig. 3-3-2. Hatch, larval survival and sex mosaic rates of successive eggs batches laid by T241-offspring females infected with *wEmeTn2*.

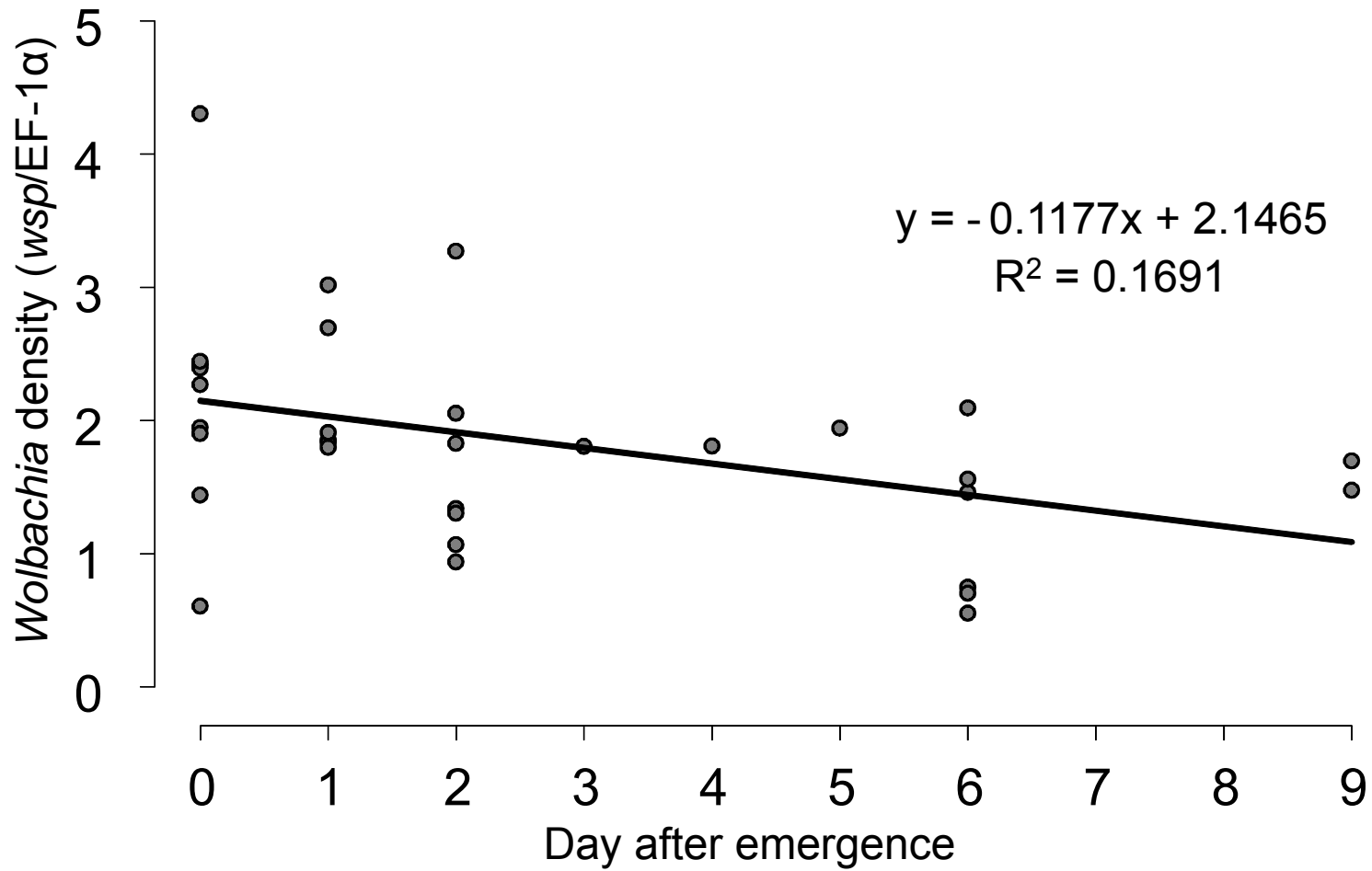


Fig. 3-4-1. Relationship between *Wolbachia* density and day after emergence in females infected with *wEmeTn2* *Wolbachia*.

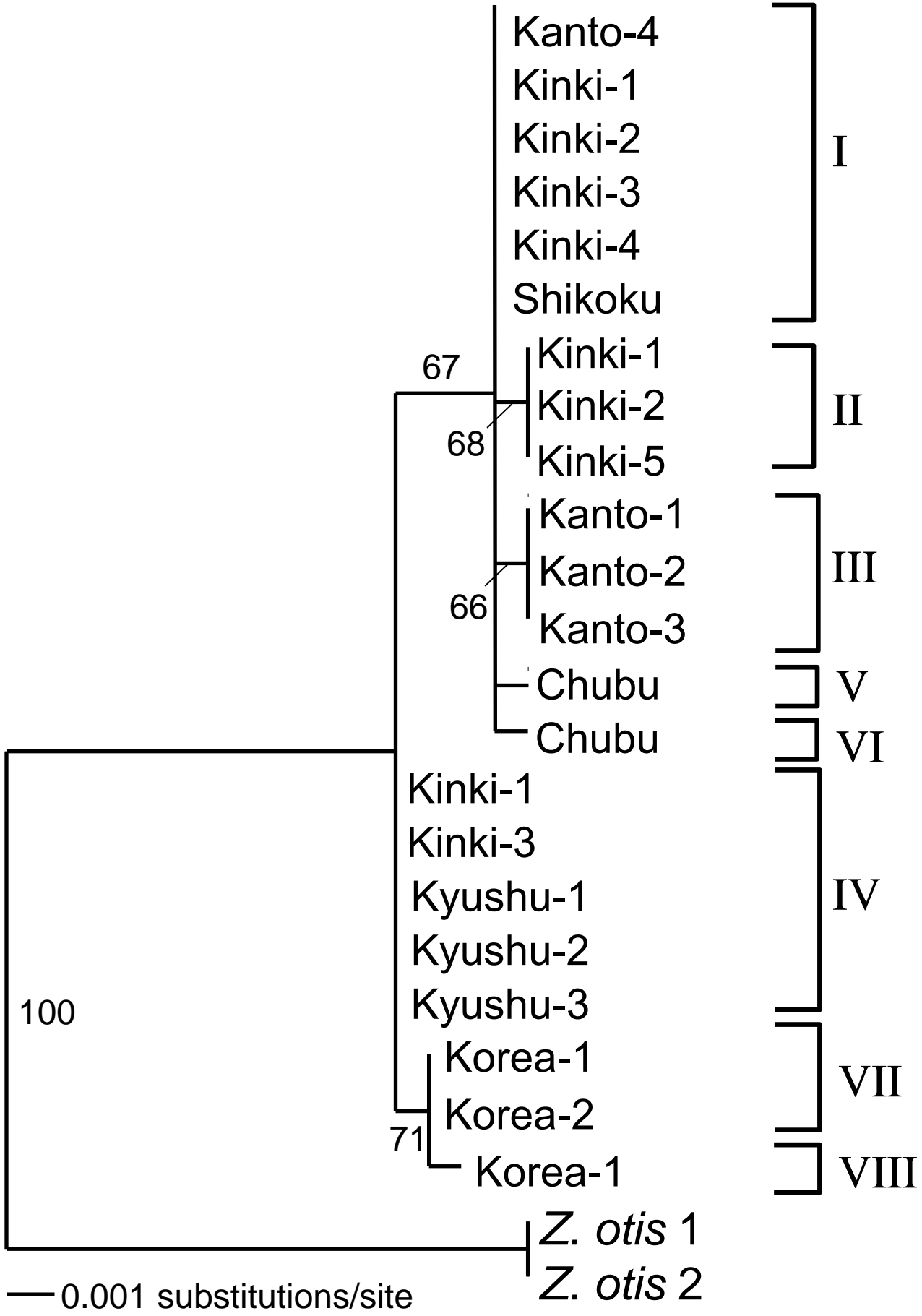


Fig. 4-1. Maximum-likelihood phylogeny on the basis of the mitochondrial *ND5+COI* gene sequences (1490 aligned nucleotide sites) of *Z. emelina*. The roman figures (I-VIII) indicate each different haplotype. *Z. otis* was used as outgroup.

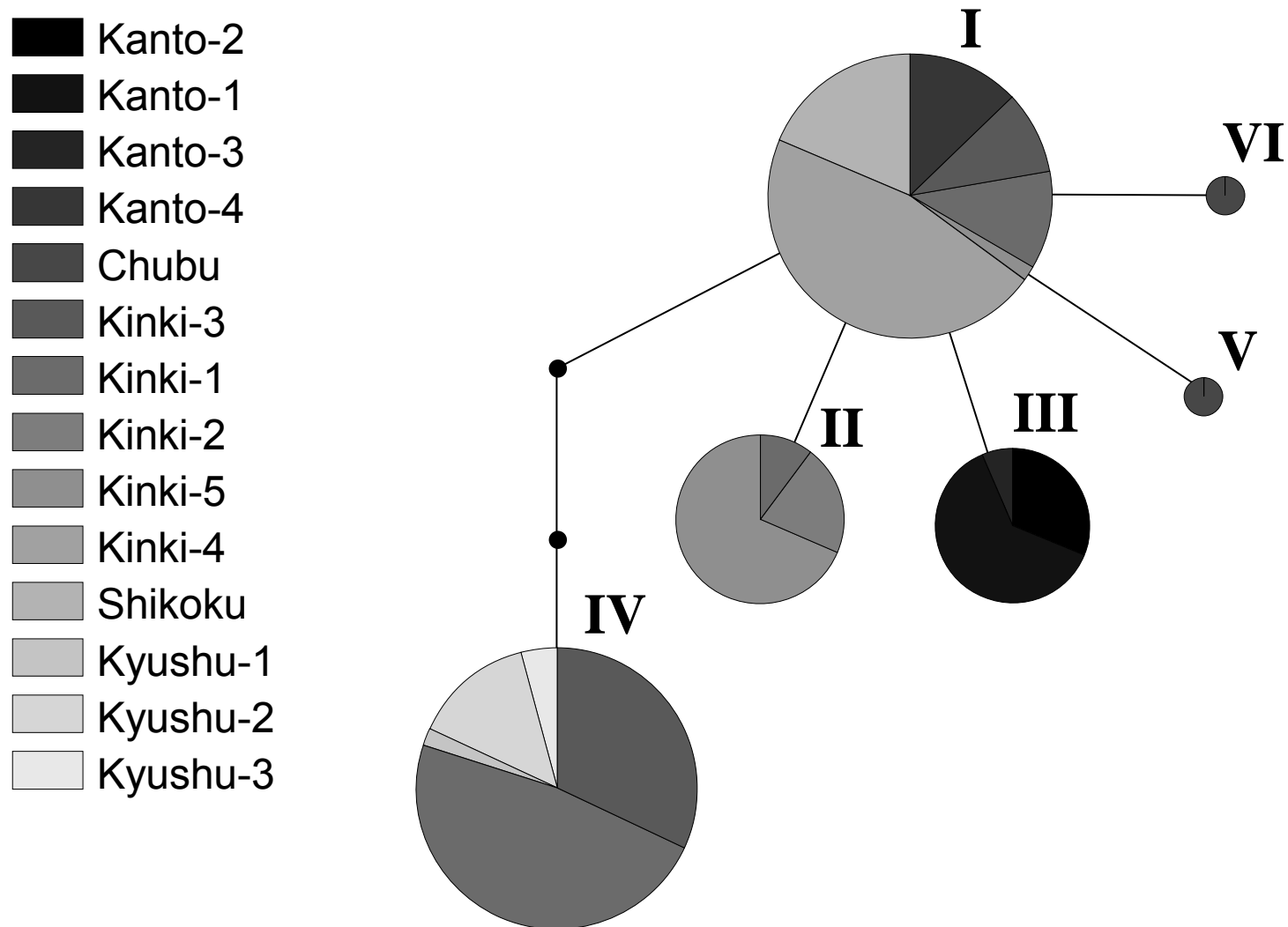


Fig. 4-2. Haplotype network on the basis of the *ND5 + COI* gene sequences (1490 bp) of *Z. emelina*. A network with 95% connection limit is shown, where the size of each of the circles reflects the number of individuals with each of the haplotypes, respectively. Each haplotype is shaded according to the proportion of individuals classified by collection site.

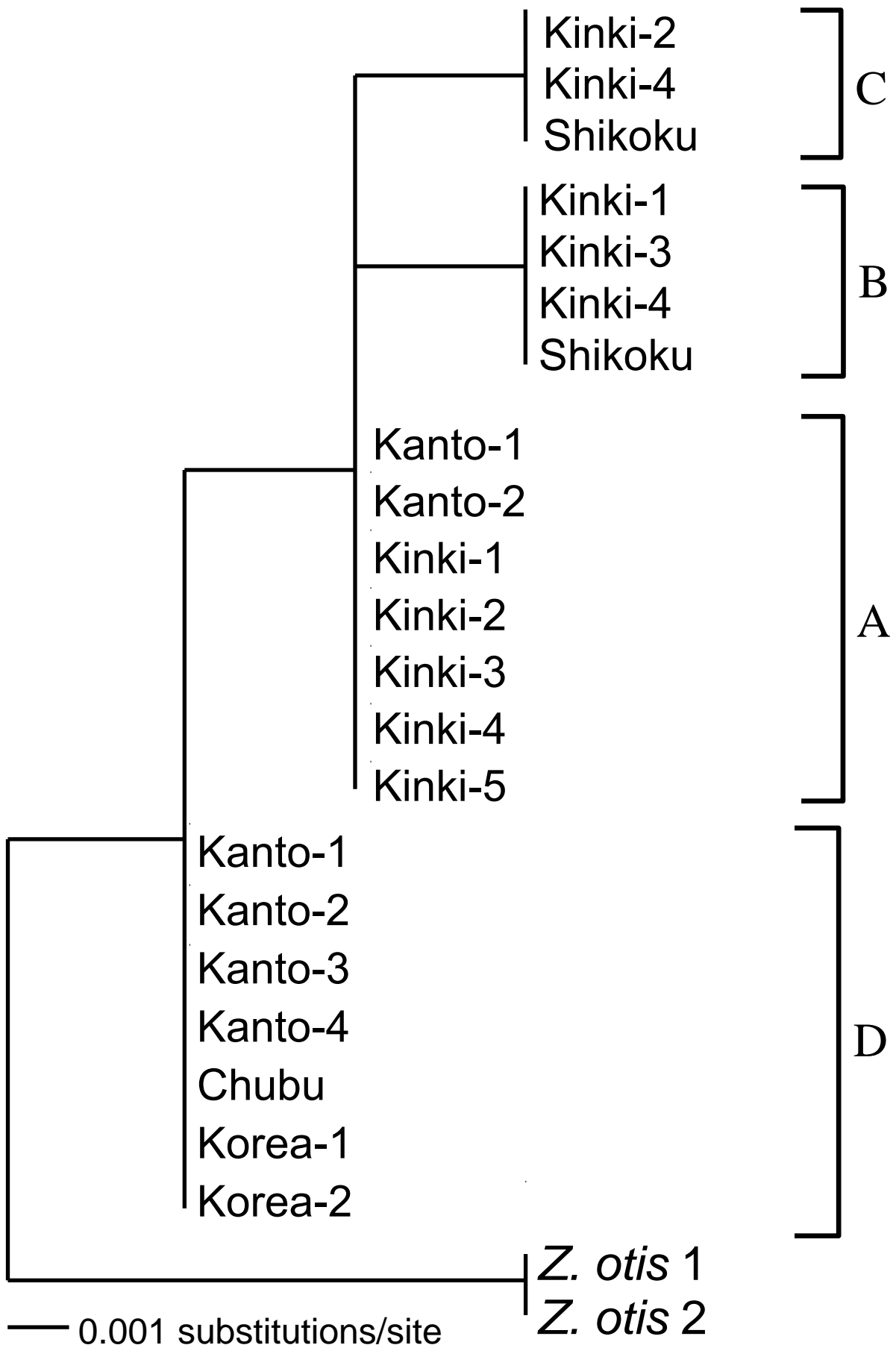


Fig. 4-3. Maximum-likelihood phylogeny on the basis of the nuclear *Tpi* gene sequences (355 aligned nucleotide sites) of *Z. emelina*. The roman figures (A-D) indicate each different haplotype. *Z. otis* was used as outgroup.

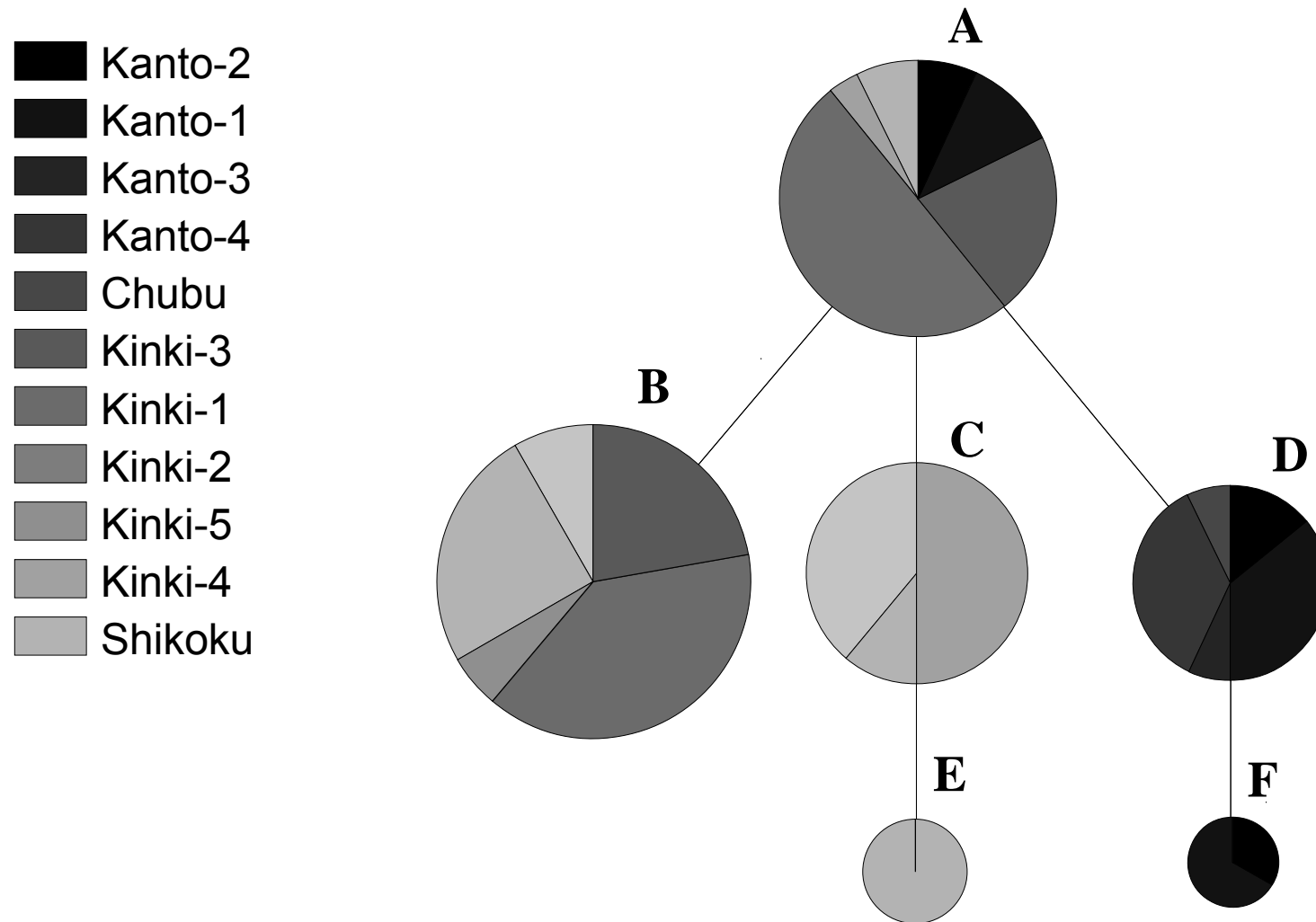


Fig. 4-4. Haplotype network on the basis of the *Tpi* gene sequences (355-360 bp) of *Z. emelina*. A network with 95% connection limit is shown, where the size of each of the circles reflects the number of individuals with each of the haplotypes, respectively. Each haplotype is shaded according to the proportion of individuals classified by collection site.

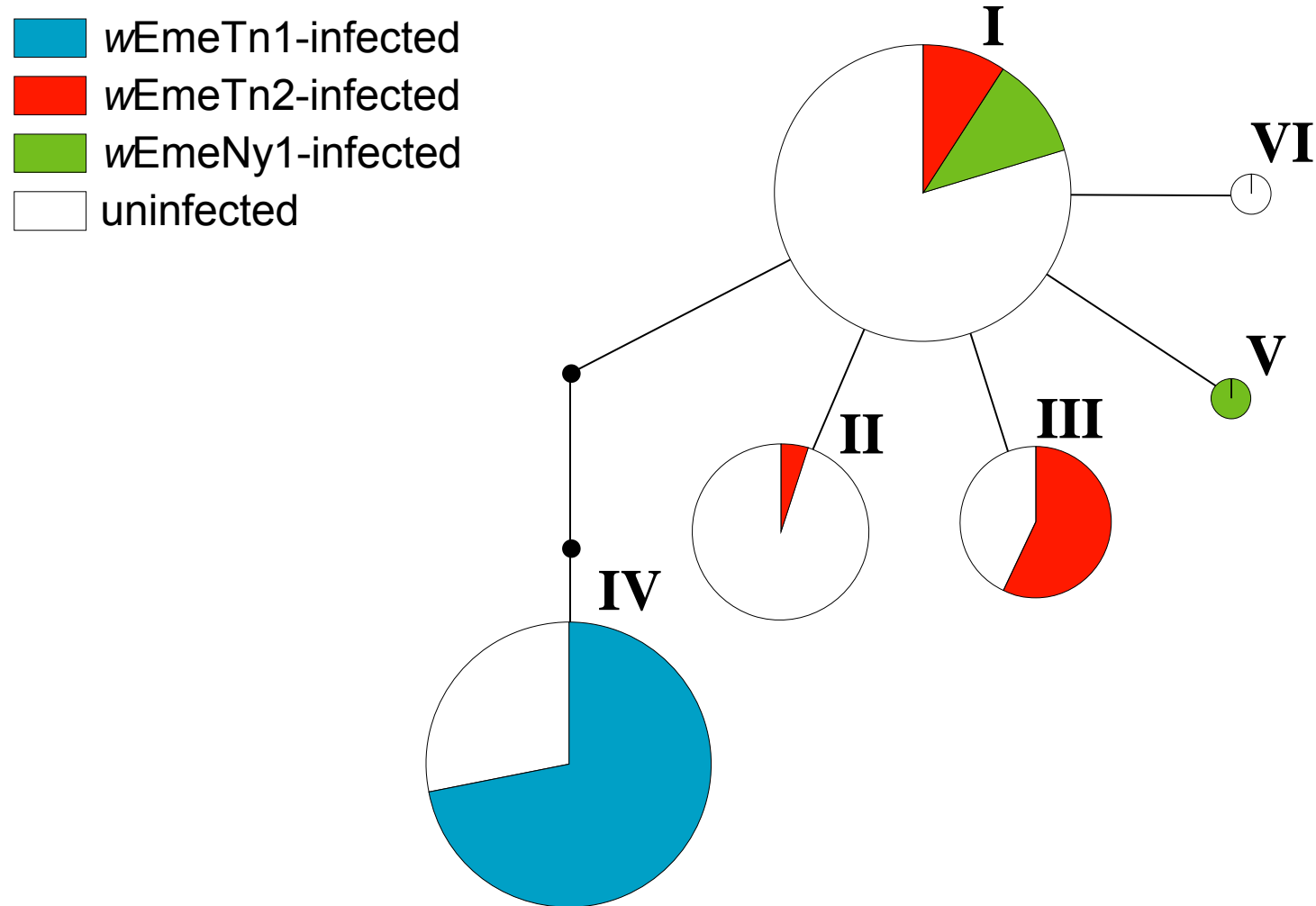


Fig. D-1. Haplotype network on the basis of the *ND5 + COI* gene sequences (1490 bp) of *Z. emelina*. A network with 95% connection limit is shown, where the size of each of the circles reflects the number of individuals with each of the haplotypes, respectively. Each haplotype is shaded according to the proportion of individuals classified by *Wolbachia* infection status.

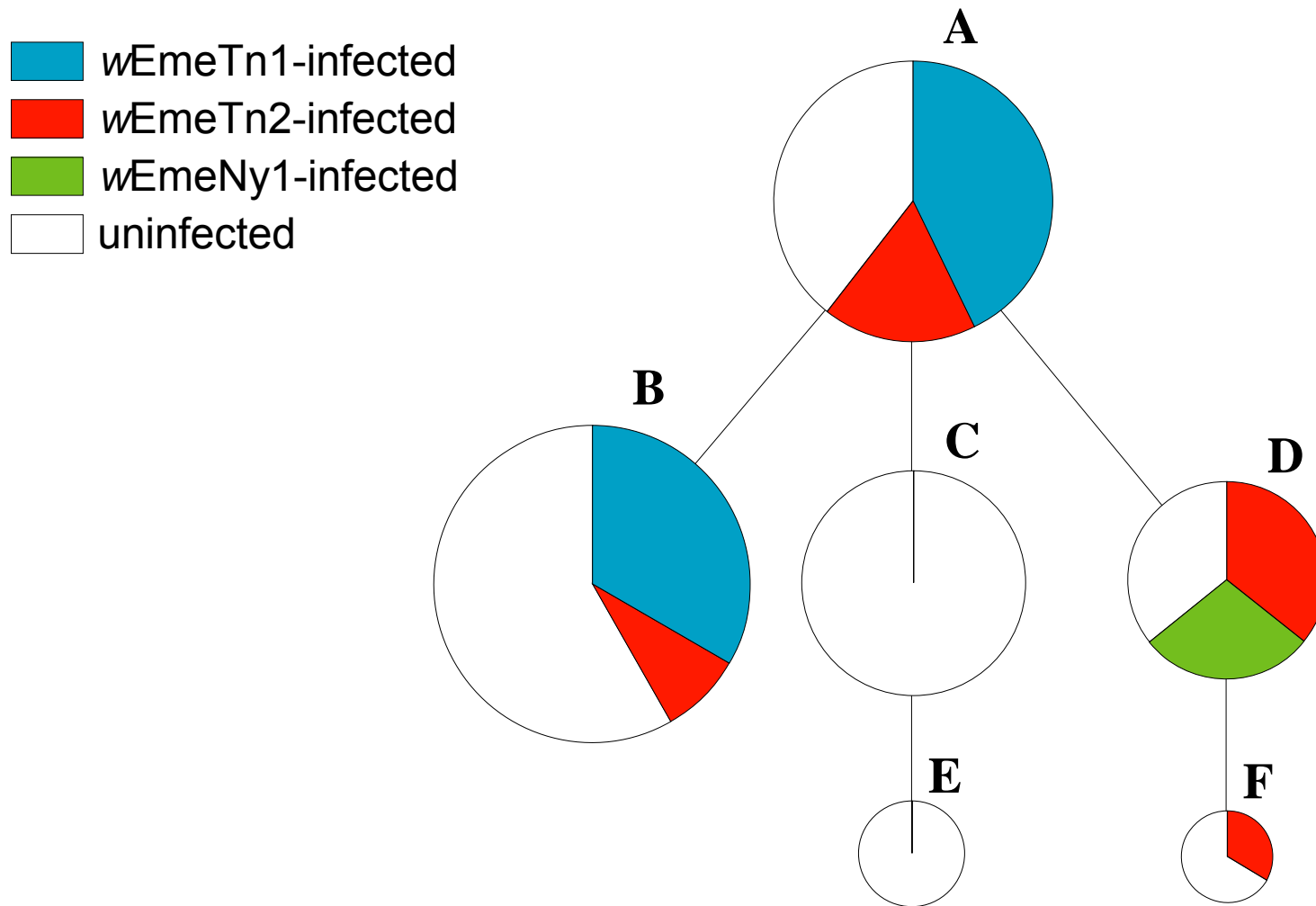


Fig. D-2. Haplotype network on the basis of the *Tpi* gene sequences (355-360 bp) of *Z. emelina*. A network with 95% connection limit is shown, where the size of each of the circles reflects the number of individuals with each of the haplotypes, respectively. Each haplotype is shaded according to the proportion of individuals classified by *Wolbachia* infection status.

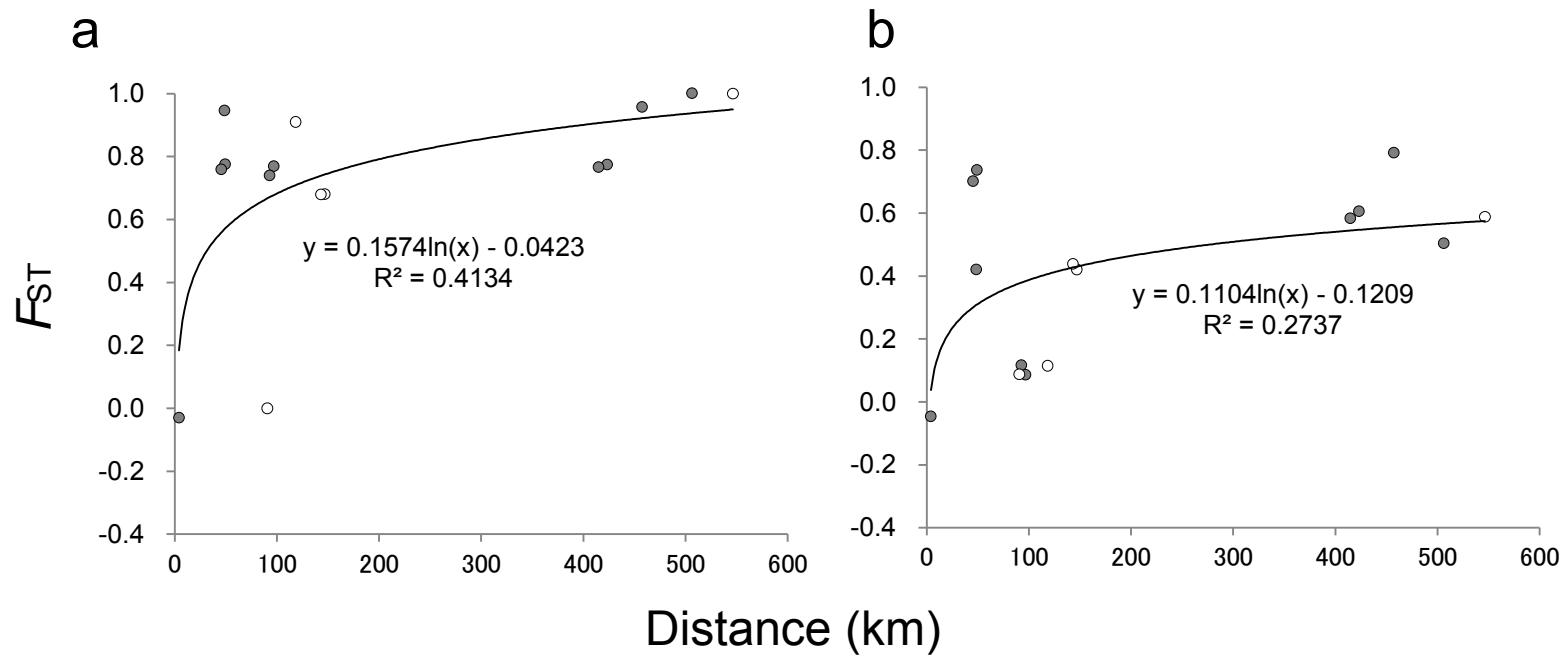


Fig. D-3. Relationship between genetic differentiation F_{ST} and geographical distance among populations in Honshu, Japan. Geographic distance was measured as a straight line distance between sites. Each point represents a pair of populations. Solid lines indicate logarithmic regression lines between F_{ST} and distance. Separated and not separated by sea are shown as open and closed plots.

a: mitochondrial genetic differentiation, b: nuclear genetic differentiation

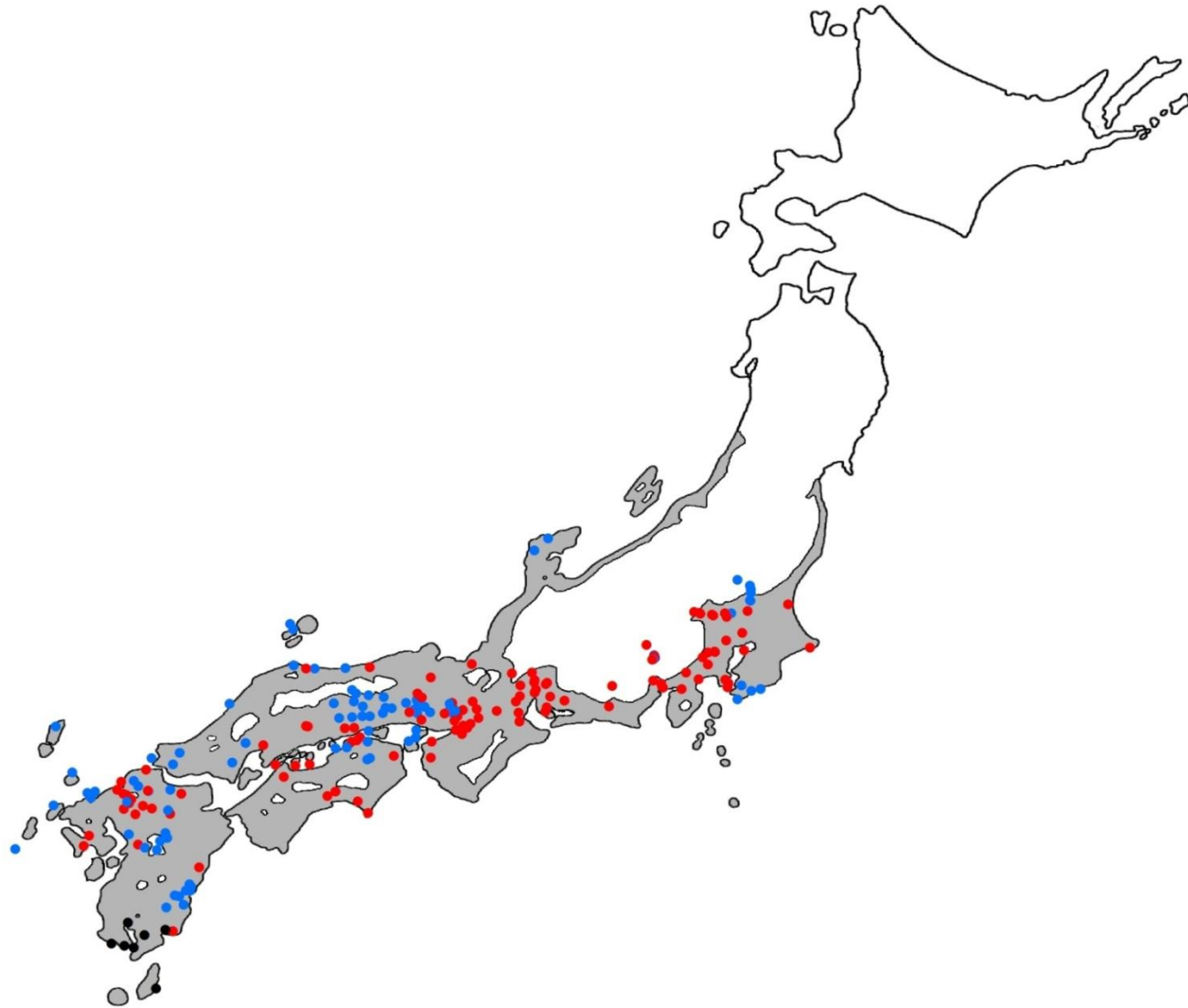


Fig. D-4. The map of evergreen broad-leaved forest zones (shaded) and distribution of *Z. emelina* (closed circles) in Japan drawn by Editorial staff of Cho-ken Salon (2005) and Mano and Fujii (2009). The blue, red and black closed circles indicate extant, extinct and data deficient.

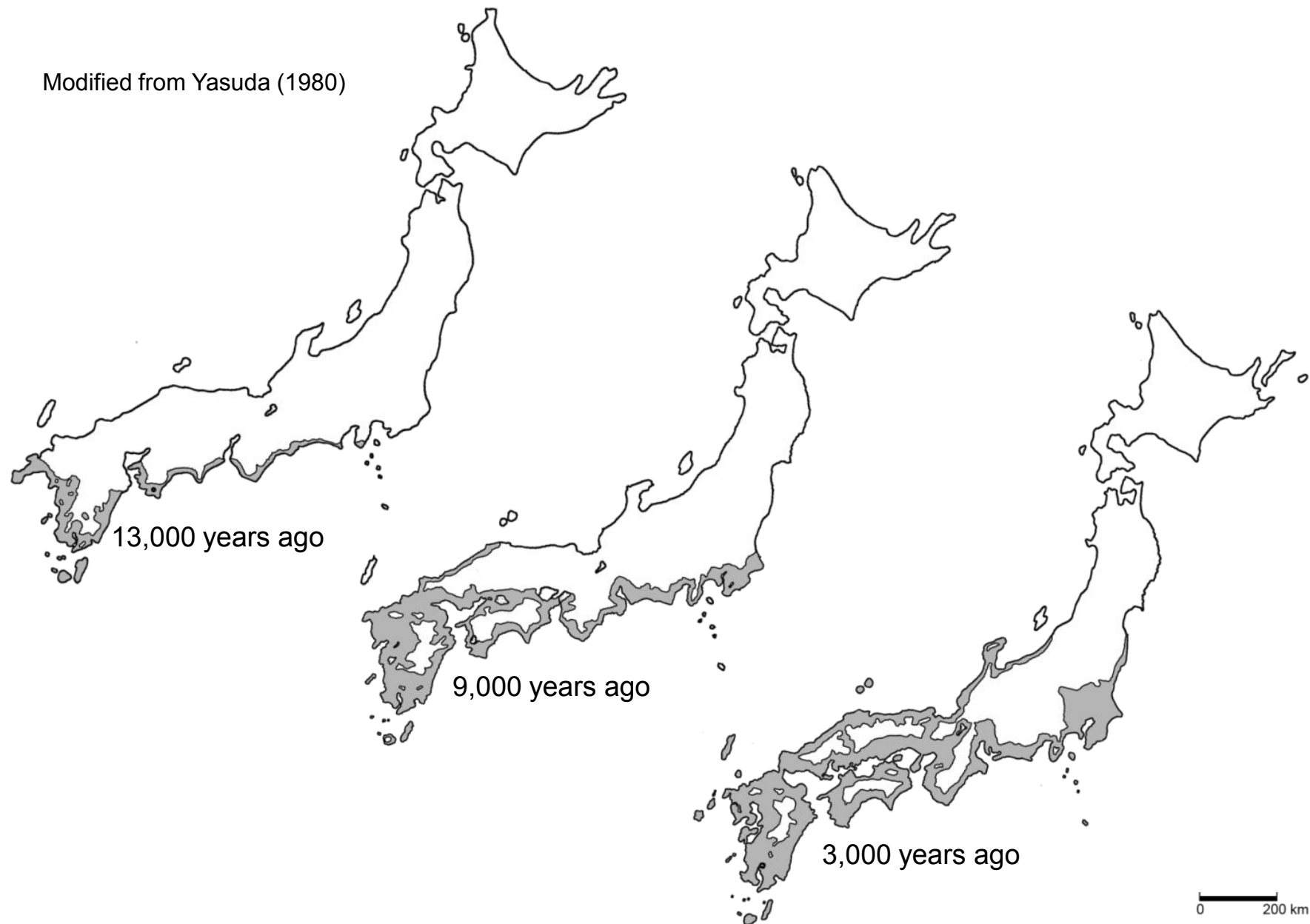


Fig. D-5. The paleogeographic map and transition of the evergreen broad-leaved forest zone (shaded) after the last ice age.

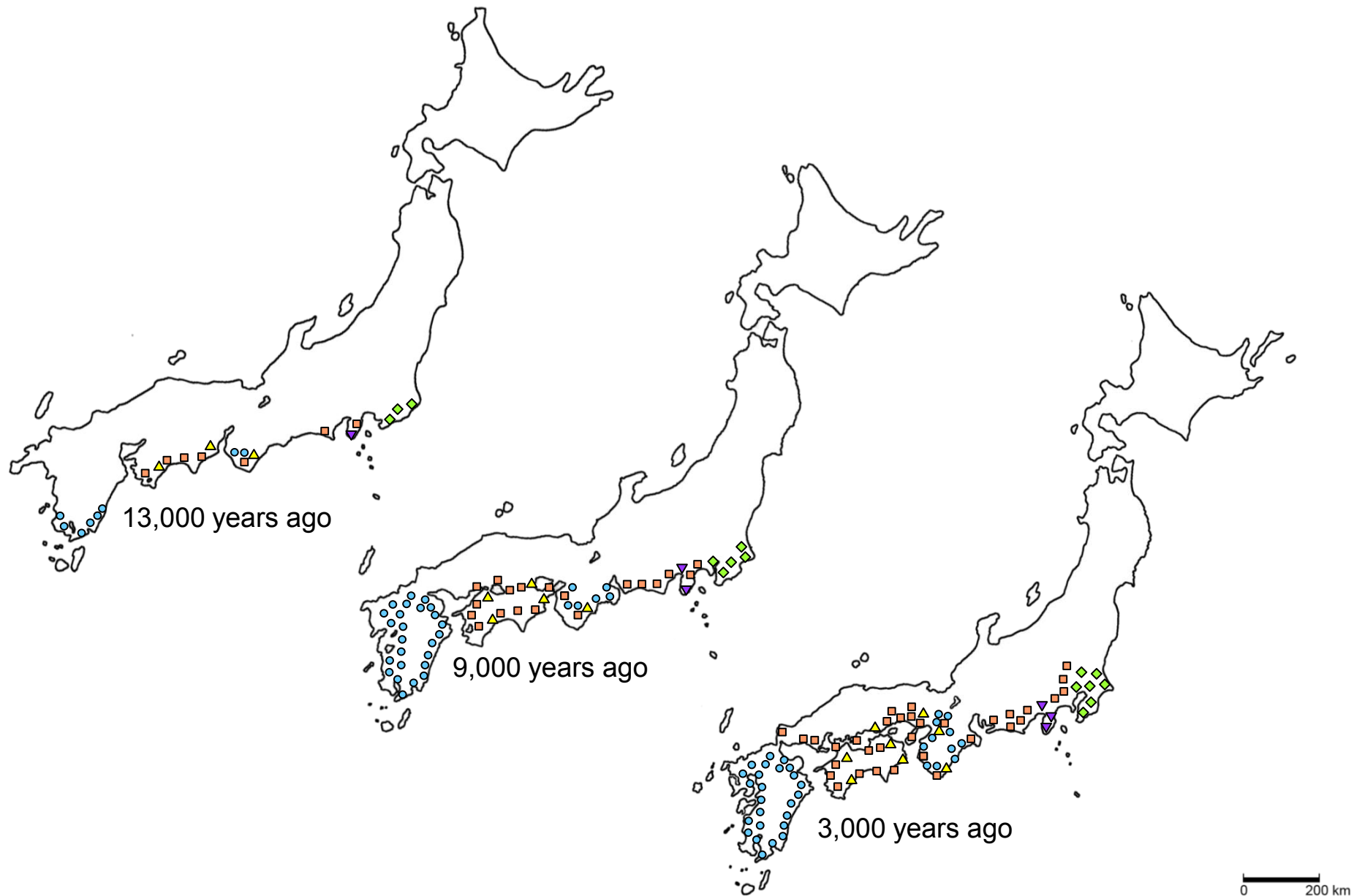


Fig. D-6. An evolutionary hypothesis on the spread of *Z. emelina* by estimation from the results of DNA haplotypes in the formation process of the Japanese Archipelago with postglacial warming.

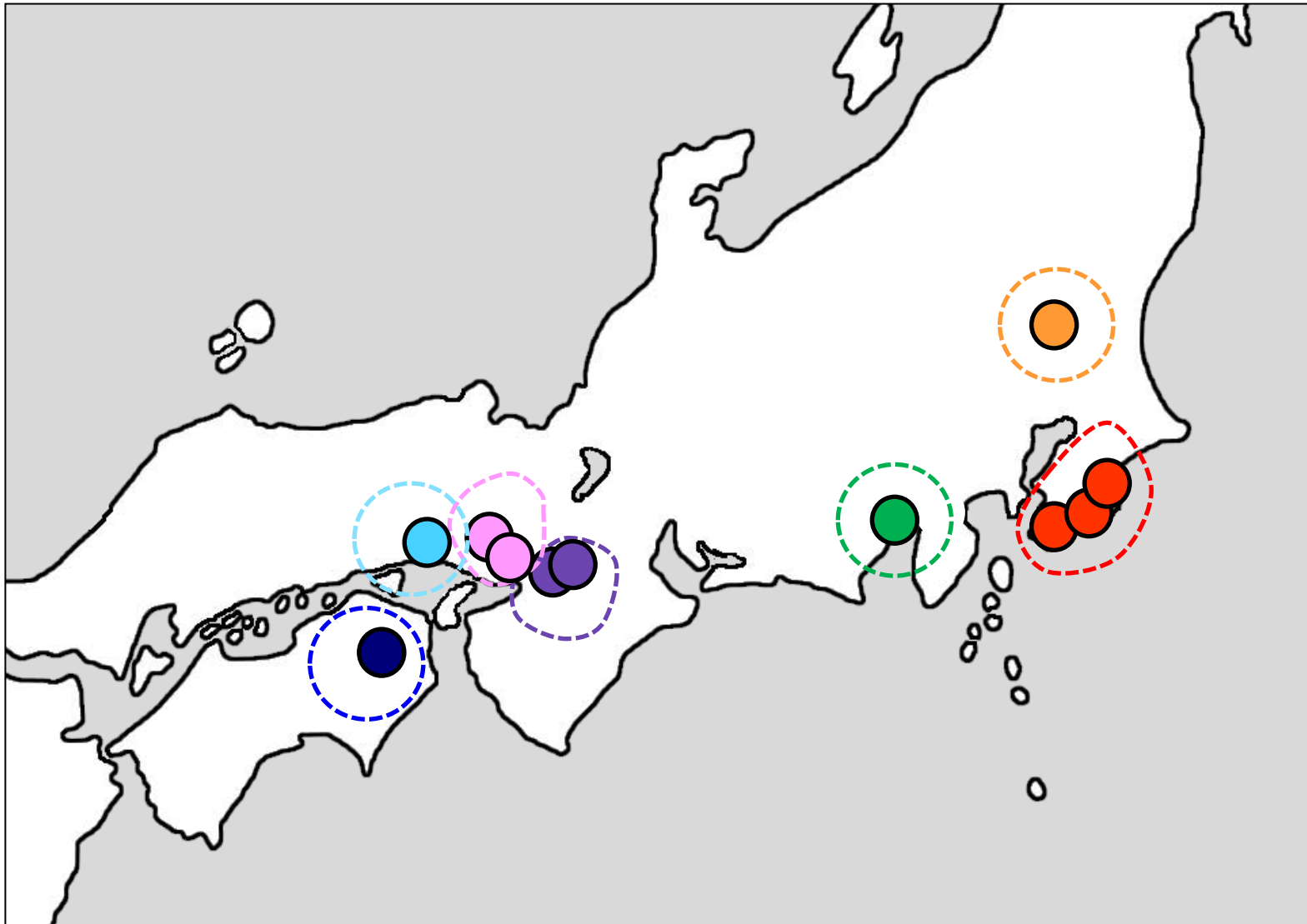
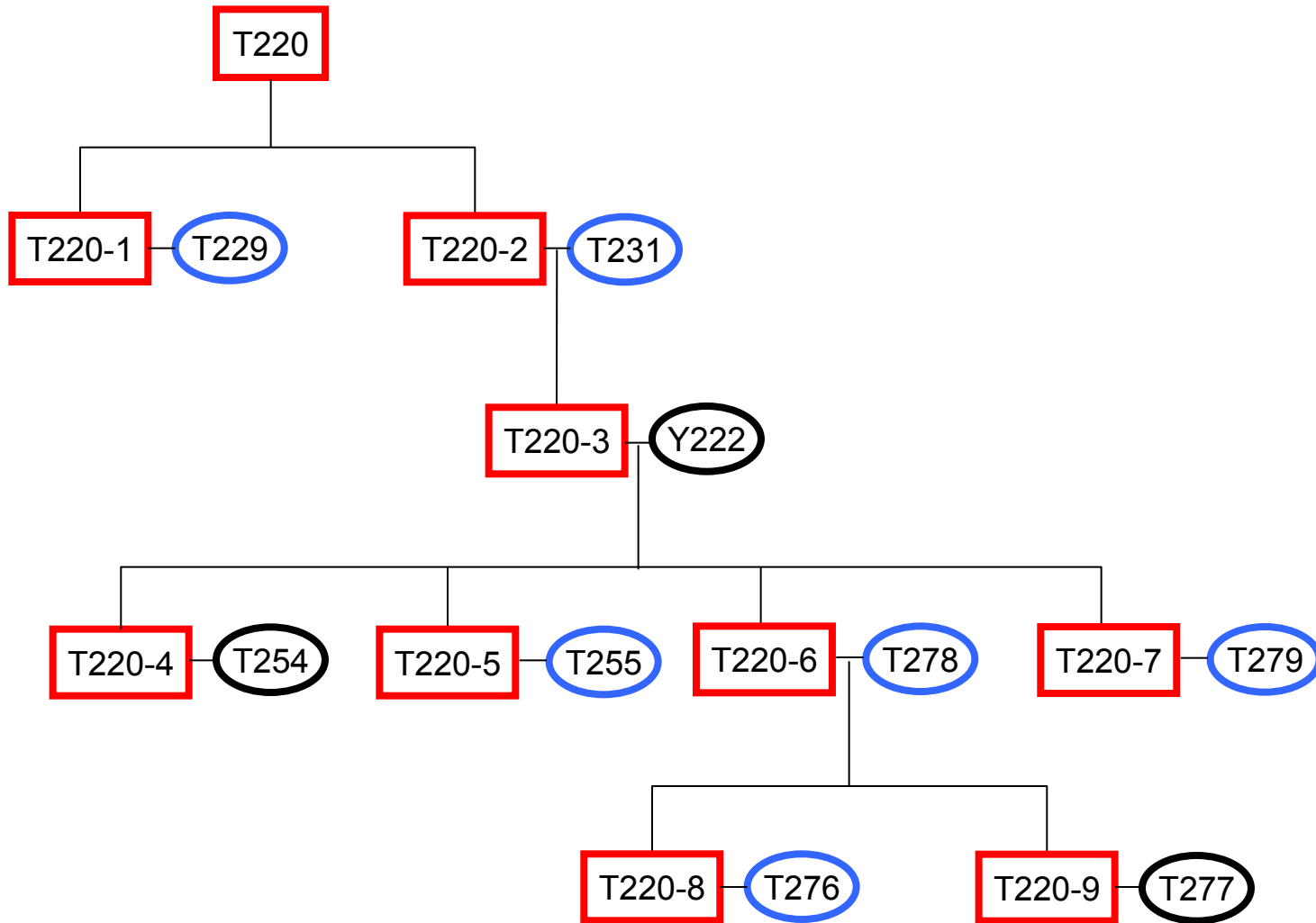


Fig. D-7. Conservation units for *Z. emelina* in Japan. Each color indicates the different unit.

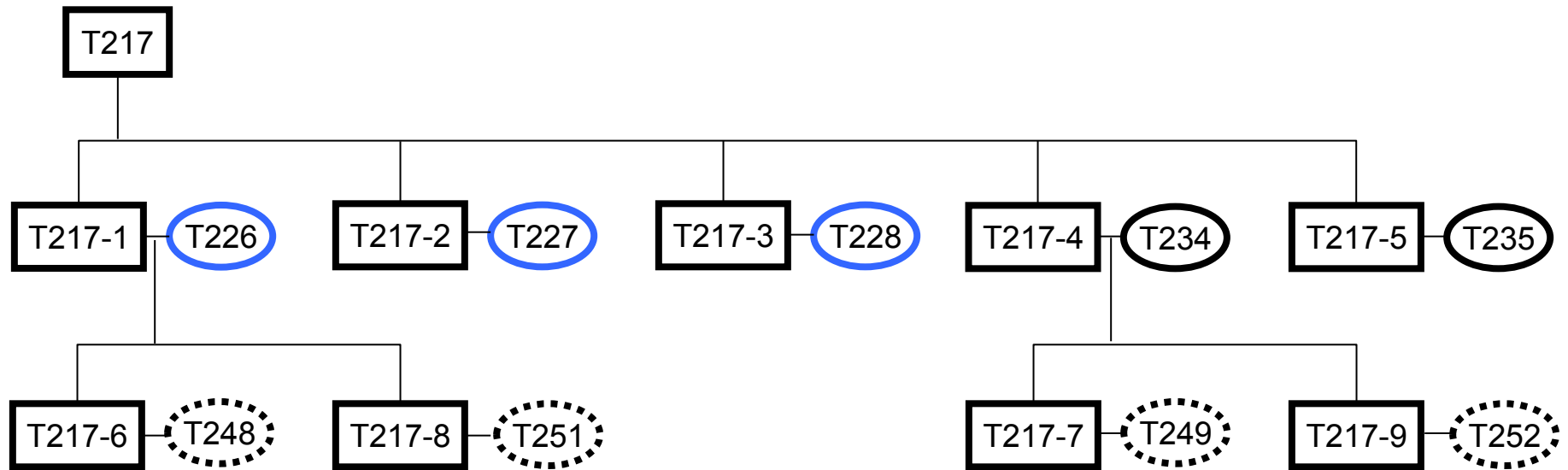


Appendix 1. A maternal tree of T220 collected from the Kinki-1 population.

Square and circle indicate female and male, respectively.

The first letters 'T' and 'Y' in male indicate the collection sites, the Kinki-1 and Kinki-2 populations, respectively.

Blue, red and black indicate *wEmeTn1*-infected, *wEmeTn2*-infected and uninfected individuals, respectively.



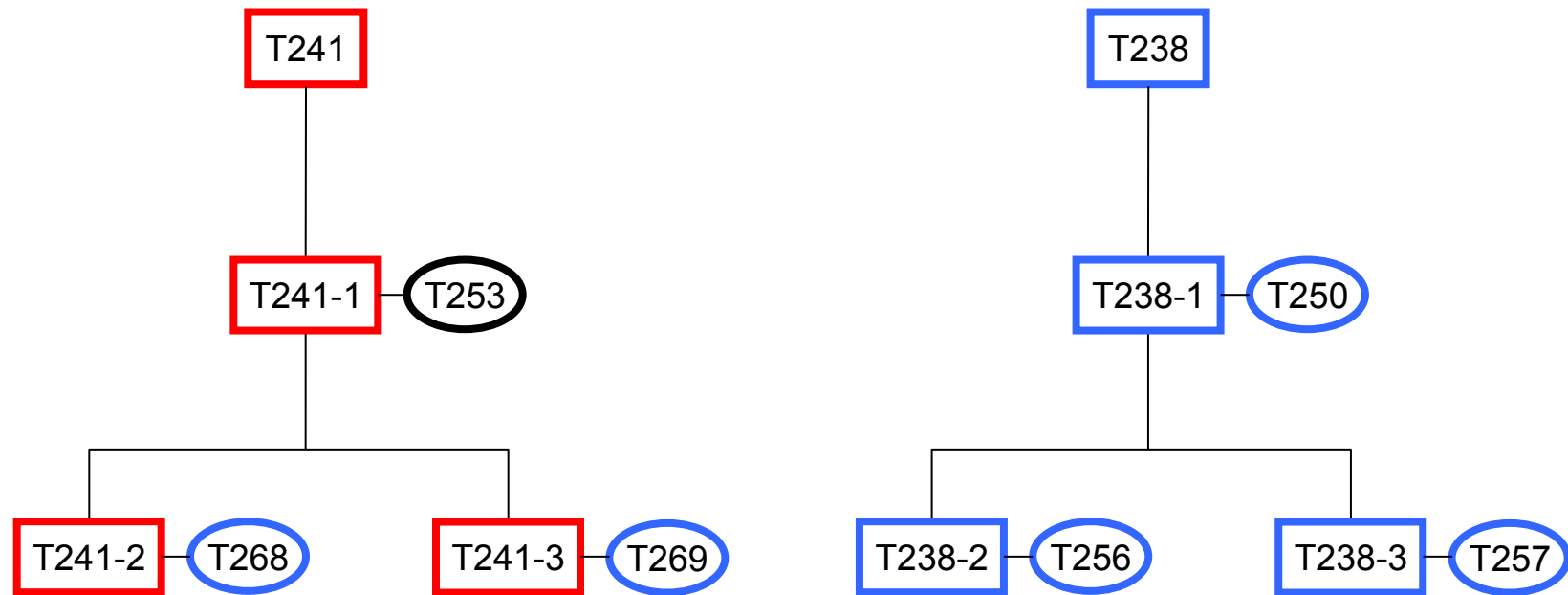
Appendix 2. A maternal tree of T217 collected from the Kinki-1 population.

Square and circle indicate female and male, respectively.

The first letters 'T' indicates the collection site, the Kinki-1 population.

Blue and black indicate *wEmeTn1*-infected and uninfected individuals, respectively.

Dashed line indicates "not examined" about *Wolbachia* infection.

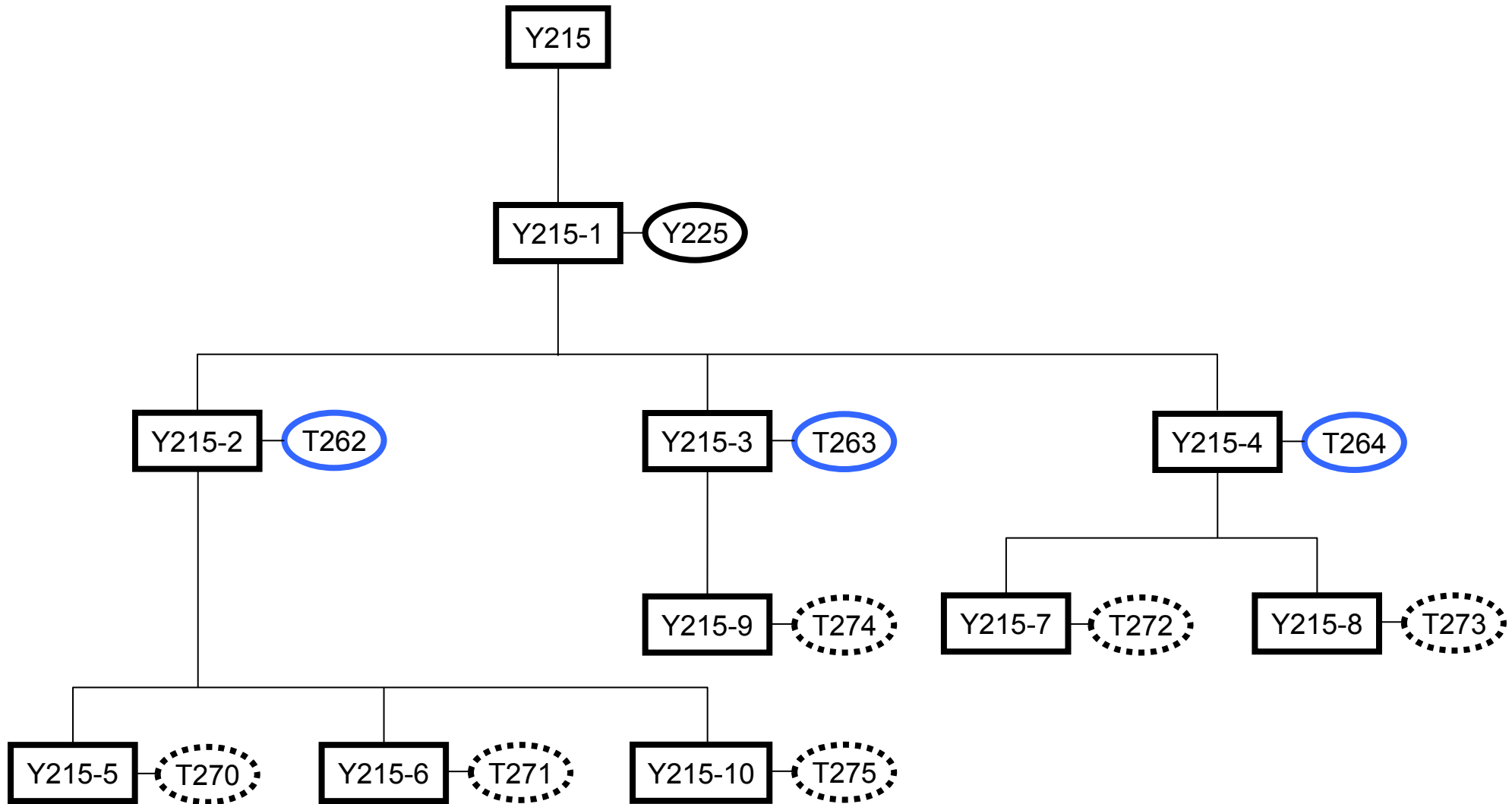


Appendix 3. Maternal trees of T241 and T238 collected from the Kinki-1 population.

Square and circle indicate female and male, respectively.

The first letters 'T' indicates the collection site, the Kinki-1 population.

Blue, red and black indicate *wEmeTn1*-infected, *wEmeTn2*-infected and uninfected individuals, respectively.



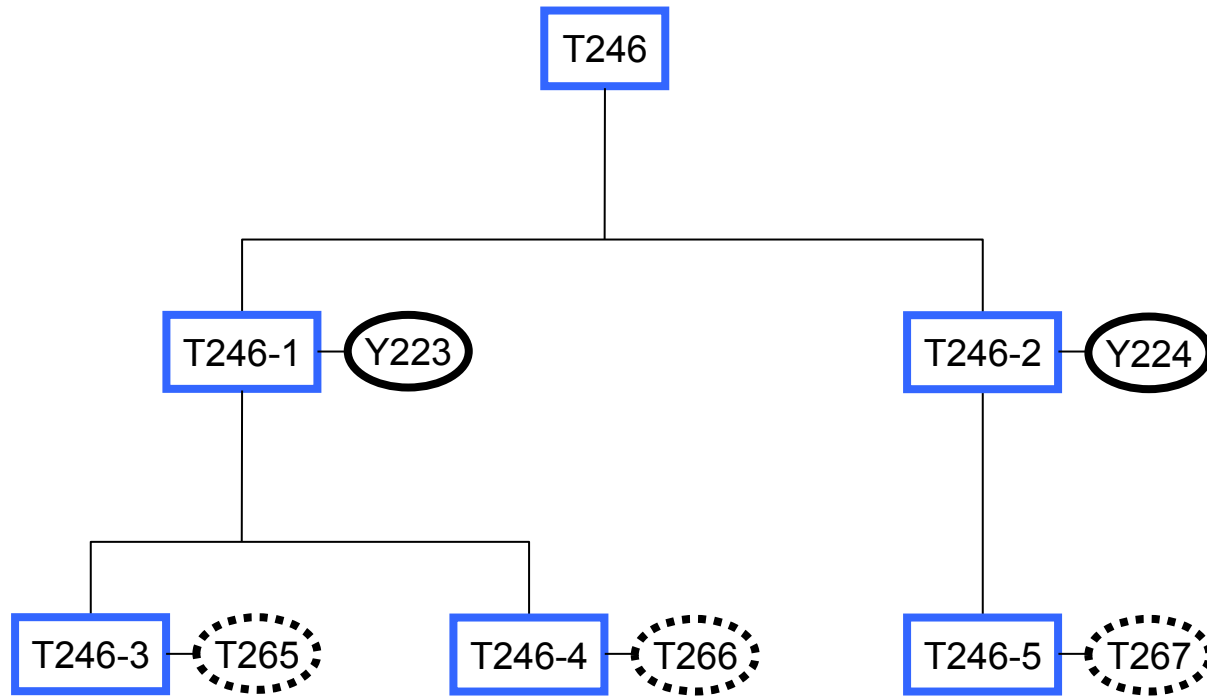
Appendix 4. A maternal tree of Y215 collected from the Kinki-2 population.

Square and circle indicate female and male, respectively.

The first letters 'T' and 'Y' in male indicate the collection sites, the Kinki-1 and Kinki-2 populations, respectively.

Blue and black indicate *wEmeTn1*-infected and uninfected individuals, respectively.

Dashed line indicates "not examined" about *Wolbachia* infection.



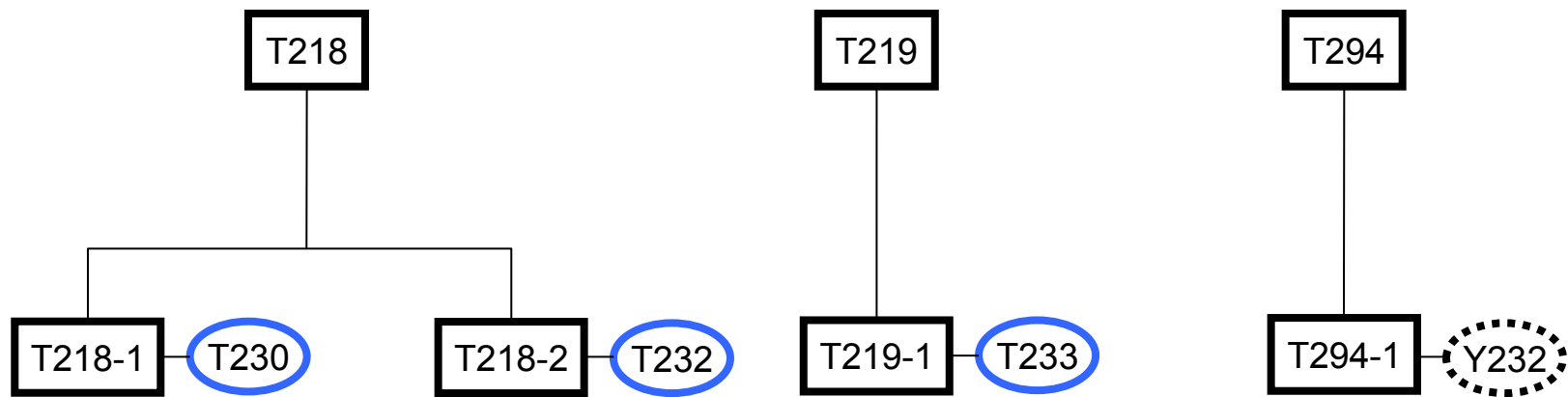
Appendix 5. Maternal trees of T246 collected from the Kinki-1 population.

Square and circle indicate female and male, respectively.

The first letters 'T' and 'Y' in male indicate the collection sites, the Kinki-1 and Kinki-2 populations, respectively.

Blue and black indicate *w*EmeTn1-infected and uninfected individuals, respectively.

Dashed line indicates "not examined" about *Wolbachia* infection.



Appendix 6. Maternal trees of T218, T219 and T294 collected from the Kinki-1 population.

Square and circle indicate female and male, respectively.

The first letters 'T' and 'Y' in male indicate the collection sites, the Kinki-1 and Kinki-2 populations, respectively.

Blue and black indicate *wEmeTn1*-infected and uninfected individuals, respectively.

Dashed line indicates "not examined" about *Wolbachia* infection.