特集：ユスリカ多様性研究を DNA バーコーディングにより進化させる

短 報 [Note]

日本産ユスリカ科昆虫普通種における形態分類単位と
分子系統単位との不一致

上野隆平¹⁾・高村健二¹⁾・今藤夏子¹⁾・奥田しおり¹⁾・大林夏湖^{1,2)}

**Morphospecies does not match DNA barcoding results in a some common Japanese
chironomid species**

Ryuhei UENO¹⁾, Kenzi TAKAMURA¹⁾, Natsuko I. KONDO¹⁾, Shiori OKUDA¹⁾, Kako OHBAYASHI^{1,2)}

Abstract

The family Chironomidae is a very abundant group of benthic macroinvertebrates in freshwater environments. In Japan, 1206 morphospecies of Chironomidae have been recorded. We have determined DNA barcodes for 74 species. Among them, 13 species were excluded from discussion, because they were represented by only a single specimen. In 61 species, the morphospecies matched a single species unit in the phylogenetic tree of partial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) DNA sequences. However, a morphospecies was divided into two species units in three species and two morphospecies were united into a single species unit. These species are commonly found in ditches, ponds, or lakes, so may bias biodiversity monitoring in these water bodies. We have to redefine these species based on morphological as well as molecular phylogenetic features.

Keywords: *Chironomus kiiensis*, *Cricotopus sylvestris*-group, *Cricotopus*, morphology, taxonomy

摘 要

ユスリカは陸水環境において底生動物相の主要な構成員であり、現在までに形態に基づいて日本国内から少なくとも 1206 種が記録されている。しかし、形態の違いが種の違いを反映しているかどうか疑わしい例もあり、DNA バーコーディングの活用が望まれている。我々は 74 形態種の COI DNA 塩基配列を決定し、その内、分析した標本が 1 個体のみの 13 種を除く 61 形態種のユスリカについて分子系統関係との一致を調べた。その結果、57 形態種では一致したが、4 形態種では不一致が見られた。その中には多くの水域で優占種となる種が含まれているため、これらの水域での多様性観測に誤差をもたらしている可能性がある。これらの種については、形態的特徴と分子系統学的特徴にもとづいて種を再記載する

¹⁾ 国立研究開発法人国立環境研究所生物・生態系環境研究センター 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2 Center for Environmental Biology and Ecosystem Studies, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

²⁾ 東京大学大学院総合文化研究科 〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1 Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo. 3-8-1 Komaba, Meguro, Tokyo 153-8902, Japan

必要がある。

キーワード：ウスイロユスリカ，ヨドミツヤユスリカ群，ツヤユスリカ属，形態学，分類学

(2016 年 6 月 3 日受付；2016 年 10 月 5 日受理)

はじめに

ユスリカ科昆虫の幼虫は、あらゆる陸水環境において底生動物相の主要な構成員となる重要な生物群である。ユスリカ類における日本での分類学的研究は 1930 年代以降大きく進展し、現在までに日本国内から少なくとも 1206 種が記録されるに至っている（山本・山本，2014）。これほど多様なユスリカ類だが、ほとんどが雄成虫の記載しか無いため、幼虫が主体となる陸水生態の研究では種レベルの検討は困難であり、十分に活用されない状態が続いてきた。しかし、近年の DNA 解析技術の普及により、ユスリカについても世界中で DNA バーコーディングが試みられ、種に固有の塩基配列情報がデータベース化されつつある（Carew et al., 2007; Pfenninger et al., 2007）。このことにより、野外で採集されたユスリカについて、幼虫・成虫を問わず種レベルの解析ができるようになることが期待される。

こうした研究では、形態同定の結果と DNA 塩基配列で判定した結果とが一致しない例が認められており、誤同定を防ぐために、どの種に不一致が見られるか明らかにしておく必要がある。国立環境研究所を中心に進行中の「ユスリカ DNA バーコーディング」プロジェクトでは、ユスリカ標本 DNA データベースを作成しており（国立環境研究所，2016），これまでに 74 種（ツバル産の 2 種を含む）の形態種についてデータを公開してきた（Table 1）。しかし、系統樹の作成等により系統関係を確認したところ、形態種と一致しない例が認められた。現時点では標本数が少なく断片的なデータではあるが、不一致が見られた種がいずれも広く分布する一般的な種であったことから、重要な知見であると考えられるため注意喚起の意味で報告する。

材料と方法

ユスリカ類のサンプルは、成虫を捕虫網で採集するか幼虫を飼育して羽化させ採集した。サイズやサンプルの状態により、①標本全体、②頭部・交尾器・翅など同定に必須な部分を除いた部分、③成虫の左右片側の脚一組

のいずれかを DNA 抽出用に用い、②や③では残った部分、①では抽出後の標本を形態同定に用いた。各標本の採集地等の情報は、「ユスリカ標本 DNA データベース」（国立環境研究所，2016）の標本番号（Dxxxx, Hxxxx 等）または国際塩基配列データベースの Accession No. を用いてそれぞれのデータベースで確認することができる。

形態同定は上記②や③の場合では、定法（Sasa and Kikuchi, 1995）に従い KOH 処理までを行い、グリセリン封入のプレパラートを作製し、顕微鏡で観察した。①の場合は DNA 抽出処理を経て、すでに透明になっているので KOH 処理は行わず、グリセリン封入のプレパラート標本を作製して観察した。観察が済んだ標本からは DNA が再抽出できる可能性があるので 99.5% エタノールに移し保存した。同定には主に Sasa and Kikuchi (1995), Langton and Pinder (2007) の検索表を用い、属や種群のモノグラフが出版されている場合はそれらも用いた（例えば *Cricotopus* における Hirvenoja (1973) のモノグラフなど）。

DNA の抽出およびミトコンドリア遺伝子 COI のシーケンス分析法については、本特集の今藤ら (2017) で詳細に述べられたいずれかの方法で行った。得られた 658bp の塩基配列のうち、ユスリカ標本 DNA データベース（国立環境研究所，2016）において公開されている 74 形態種について分子系統樹を推定した（2016 年 5 月 10 日時点）。分子系統樹は、MEGA6（Tamura et al. 2013）を用いて近隣結合法によって推定した。また、特に *Cricotopus sylvestris*, *Cricotopus trifasciatus*, *Cricotopus tricoloratus* の 3 種については、*Cricotopus bimaculatus* を外群とした分子系統樹を作成した。

この分子系統樹上で、形態同定に基づいた形態分類単位と塩基配列情報に基づいた分子系統単位との間で矛盾がないかを精査した。

結果と考察

DNA バーコーディングのための塩基配列情報が形態種 74 種について得られた（Table 1）。この内、サンプルが 1 個体のみの 13 形態種を除く 61 形態種について、分

日本産ユスリカ科昆虫普通種における形態分類単位と分子系統単位との不一致

Table 1. Seventy-four chironomids whose COI sequences are presented in the “Chironomid DNA Barcode Database”. ¹⁾ A specimen that morphologically identified as *Cricotopus trifasciatus* (ID: D0156) and several *C. sylvestris* specimens have identical COI sequences (AB838601).

表 1. 「ユスリカ標本 DNA データベース」で COI 遺伝子塩基配列情報を公開している 74 種のユスリカ. ¹⁾ 当所 *Cricotopus trifasciatus* と同定された 1 個体 (標本番号: D0156) の塩基配列は *C. sylvestris* の塩基配列 (AB838601) と同一.

Species	Sample size	Haplotype accession no.
Tanypodinae		
<i>Ablabesmyia monilis</i>	1	AB838638
<i>Ablabesmyia prorasha</i>	3	AB838637
<i>Tanypus kraatzi</i>	14	LC050911,LC050912,LC050913,LC050914,LC050915,LC050916,LC050917,LC050918
<i>Tanypus nakazatoi</i>	4	AB838639,AB838640
<i>Tanypus neopunctipennis</i>	4	AB838641
<i>Trissopelopia longimana</i>	2	LC096195
Telmatogetoninae		
<i>Telmatogeton japonicus</i>	1	LC050959
Orthocladinae		
<i>Brillia japonica</i>	2	LC050964,LC050965
<i>Cricotopus bicinctus</i>	2	AB838598,AB838599
<i>Cricotopus bimaculatus</i>	1	AB838600
<i>Cricotopus metatibialis</i>	2	LC050960,LC050961
<i>Cricotopus montanus</i>	3	LC050922,LC050923
<i>Cricotopus sylvestris</i> ¹⁾	38	AB838601,AB838602,AB838603,AB838604,AB838605,AB838606,AB838607,AB838608,AB838609,AB838610,AB838611,AB838612,LC050929
<i>Cricotopus triannulatus</i>	4	LC050962,LC050963
<i>Cricotopus tricinctus</i>	11	AB838613,AB838614,AB838615,AB838616,AB838617,AB838618,AB838619,LC050927,LC050928
<i>Cricotopus yatabensis</i>	7	LC096181,LC096182,LC096200,LC096201,LC096202,LC096203
<i>Limnophyes minimus</i>	6	AB838620,AB838621
<i>Limnophyes tamakitanoides</i>	1	AB838622
<i>Nanocladius asiaticus</i>	11	AB849480,AB849481,AB849482,AB849483,AB849484,AB849485
<i>Nanocladius shigaensis</i>	12	AB849486,AB849487,AB849488,AB849489,AB849490,AB849491,AB849492,AB849493,AB849494
<i>Nanocladius tamabicolor</i>	5	LC050919,LC050920
<i>Parametriochnemus stylatus</i>	1	AB838623
<i>Paratrichocladus rufiventris</i>	1	LC050926
<i>Propiloscerus akamusi</i>	12	AB838624,AB838625,AB838626,AB838627,AB838628,AB838629,AB838630,AB838631,LC050921
<i>Psectrocladius yunoquartus</i>	7	LC096185,LC096186,LC096187,LC096188
<i>Pseudosmittia tuvaluensis</i>	4	AB769378,AB769379,AB769380
<i>Rheocricotopus chalybeatus</i>	3	AB838636,LC050924,LC050925
<i>Smittia pratorum</i>	3	LC096189,LC096190
Chironominae: Chironomini		
<i>Benthalia dissidens</i>	6	AB838654,LC050934
<i>Chironomus biwaprimus</i>	1	AF110166
<i>Chironomus circumdatus</i>	2	LC050935
<i>Chironomus claggi</i>	3	AB740233,AB740234
<i>Chironomus flavipilum</i>	12	AB740235,AB740236,AB740237,AB740238,AB740239
<i>Chironomus javanus</i>	1	DQ648203
<i>Chironomus kienstis</i>	10	AB740240,AB740241,AB838642,AB838643,AB838644,AB838645,AB838646
<i>Chironomus longipes</i>	2	AB838655,AB838656
<i>Chironomus nippondorsalis</i>	11	AB740242,AB740243,AB740244,AB740245,LC050905
<i>Chironomus nipponensis</i>	20	AB740246,AB740247,AB740248,AB740249,AB740250,AB740251,AB740252,AB838647,DQ648206,LC050931,LC050932,LC050933,LC096172,LC096173,LC096174,LC096175,LC096176,LC096177,LC096178
<i>Chironomus plumosus</i>	59	AB740253,AB740254,AB740255,AB740256,AB740257,AB740258,AB740259,AB838648,LC050898,LC050899,LC050900,LC050901,LC050902,LC096179,LC096180
<i>Chironomus salinaris</i>	4	AB838649,LC050903,LC050904
<i>Chironomus sp. Tuvalu</i>	2	AB769382
<i>Chironomus yoshimatsui</i>	5	AB740260
<i>Dicrotendipes inouei</i>	3	AB838652,LC050939
<i>Dicrotendipes pelochloris</i>	6	AB740264,AB838653
<i>Endochironomus pekanus</i>	11	AB838657,AB838658,AB838659,AB838660,AB838661
<i>Endochironomus tendens</i>	4	LC050955,LC050956,LC050957
<i>Glyptotendipes tokunagai</i>	8	AB838662,AB838663,AB838664,AB838665
<i>Harnischia japonica</i>	1	LC050936
<i>Kiefferulus umbraticola</i>	6	AB838666,AB838667,LC050906
<i>Lipiniella moderata</i>	6	AB838668,AB838669,AB838670,LC096199
<i>Microchironomus tener</i>	1	AB838671
<i>Microtendipes tamaogouti</i>	1	LC050958
<i>Nilodorum tainanus</i>	5	AB838672,DQ648225
<i>Parachironomus arcuatus</i>	2	LC050937,LC050938
<i>Parachironomus monochromus</i>	3	AB838673,AB838674
<i>Polypedilum asakawaense</i>	1	AB838675
<i>Polypedilum convexus</i>	4	LC050953,LC050954
<i>Polypedilum cultellatum</i>	17	AB838676,AB838677,AB838678,AB838679,AB838680,AB838681,AB838682,AB838683,LC050908
<i>Polypedilum japonicum</i>	2	AB838684,LC050952
<i>Polypedilum kyotoense</i>	4	AB838687,LC050949,LC050950,LC050951
<i>Polypedilum masudai</i>	2	LC050947,LC050948
<i>Polypedilum nubifer</i>	7	AB838685,AB838686,LC050946
<i>Polypedilum sordens</i>	4	LC096196,LC096197,LC096198
<i>Polypedilum tigrinum</i>	18	AB838688,AB838689,AB838690,AB838691,AB838692,AB838693,AB838694,AB838695,AB838696,AB838697,AB838698,AB838699,AB838700,AB838701
<i>Polypedilum unifascia</i>	2	LC050909,LC050910
<i>Stictochironomus pictulus</i>	3	AB838702,AB838703
<i>Stictochironomus sticticus</i>	12	LC050941,LC050942,LC050943,LC050944,LC050945
Chironominae: Tanytarsini		
<i>Biwatendipes tsukubaensis</i>	1	LC050940
<i>Cladotanytarsus vanderwulpi</i>	3	AB838650,AB838651
<i>Micropectra kamiseconda</i>	2	LC050907
<i>Paratanytarsus intricatus</i>	3	LC096183,LC096184
<i>Tanytarsus oscillans</i>	2	LC096191,LC096192
<i>Tanytarsus oyamai</i>	6	AB838704,AB838705,AB838706,AB838707,AB838708
<i>Tanytarsus takahashii</i>	3	LC096193,LC096194

分子系統関係を推定したところ、57 形態種については分子系統単位との間に矛盾が無かった。しかし形態種 1 種が、分子系統解析においては単系統群を構成せずに、2 つ以上の遺伝系統群に分化しているケースが 3 例認められた：ウスイロユスリカ *Chironomus kiiensis* Tokunaga, ヤマトユスリカ *Chironomus nipponensis* Tokunaga, カスリモンユスリカ *Tanytus kraatzii* Kieffer。一方、形態種 2 種が分子系統樹上では区別できないケースも認められた：ヨドミツヤユスリカ *Cricotopus sylvestris* (Fabricius) とミツオビツヤユスリカ *Cricotopus trifasciatus* (Meigen in Panzer)。これらの 4 例はいずれも日本国内に広く分布し多産するユスリカであった。すなわち、これらの種の産地となる水域での多様性観測にあたっては少なからぬ誤りが生じる恐れがあり、分類学的な解決が望まれる。ここでは、ウスイロユスリカとヨドミツヤユスリカ類について詳細な報告を行う。なお、ヤマトユスリカについては、山本 (2010) が指摘したように高地産と低地産の標本が別種である可能性が分子系統解析によって示されており (Kondo et al., 2016), カスリモンユスリカについては、形態的差異を検討するに足る十分な標本の収集がないため報告できる段階にはない。

(1) ウスイロユスリカ *Chironomus kiiensis*

本種は、水田や湖沼沿岸の水草帯などで普通に見られるユスリカである。翅に斑紋をもつ種は国内の *Chironomus* 属では本種のみであるとされ、その雲状紋の特徴的な形態から、実体顕微鏡下でも直ちに本種と同

定される (Sasa and Kikuchi, 1995; 山本, 2010)。

分析に用いた標本の翅の写真を Fig. 1 に示す。いずれも日本産で、酷似した斑紋をもち典型的なウスイロユスリカの翅とみなされる。ところが、分子系統解析では上段の 2 個体 (a, b) と下段の 2 個体 (c, d) はそれぞれ同種とは認めがたい別グループに属した (Kondo et al., 2016)。すなわち、それぞれのグループ内の遺伝的距離は 1% 程度なのに対し、クレード間の遺伝的距離は 10% を超えた。ウスイロユスリカまたは近縁種の *C. striatipennis* はアジアや外来生物として南米からも記録されており、これらの地域で形態上ウスイロユスリカと同定されるユスリカには、分子系統解析によると複数種が含まれることが指摘されている (Martin, 2015; Amora et al., 2015)。日本産の 2 つのグループについて各部の形態を比較検討しているが、今のところこれらのグループを明確に区別できる形態的特徴は見つかっていない。

(2) ヨドミツヤユスリカ及び近縁種 *Cricotopus sylvestris*-group

このグループのヨドミツヤユスリカ *C. sylvestris* とモグロミツオビツヤユスリカ *C. tricinctus* は主に止水域で、ミツオビツヤユスリカ *C. trifasciatus* は主に流水域でよく見られるユスリカである (Moller Pillot, 2013)。これら 3 種の形態は非常によく似ており、同定が困難なグループといわれている。形態による分類では、腹部の斑紋における黄色と黒の分離の明瞭さや盾板後半部の中央に黒紋があるかどうかでキーにされ、Fig. 2 の通

Fig. 1. Dark-clouded wings of *Chironomus* cf. *kiiensis*. A specimen number (upper) and an accession number of COI sequence (lower) are shown for each wing.

図 1. 暗色斑のあるウスイロユスリカの翅。各翅に標本番号 (上段) および COI 塩基配列に対応するアクセッション番号 (下段) が示されている。

Fig. 2. Spot patterns of thoraxes and abdomens of *Cricotopus sylvestris*-group. (dorsal view); a: *C. trifasciatus*, b: *C. tricinctus*, c: *C. sylvestris*. Left: males, right: females. Scales are in 1 mm units. Arrows indicate scuta. The color of posteromedian area of scutum is a diagnostic character between *C. trifasciatus* and *C. tricinctus*.

図2. *Cricotopus sylvestris*-groupの胸部及び腹部の背面斑紋。a: ミツオビツヤユスリカ, b: モモグロミツオビツヤユスリカ, c: ヨドミツヤユスリカ。左: 雄, 右: 雌。目盛は1 mm 単位。ヨドミツヤユスリカ(c)は腹部体節の黄と黒の色分けが不明瞭な点で他の2形態種(b, c)から識別され, ミツオビツヤユスリカ(a)は盾板(矢印)後半の中央部に黒紋がないことでモモグロミツオビツヤユスリカ(b)から識別される。特に右列の雌で顕著である。

り, 雄よりも雌の方が違いが明瞭である。形態同定により, これら3種に該当するものが採集されたが, 塩基配列を調べたところ, ヨドミツヤユスリカとモモグロミツオビツヤユスリカは別種と見なされたが, ミツオビツヤユスリカはヨドミツヤユスリカと同じグループに含まれた (Fig. 3)。すなわち, 分子系統樹においてはヨドミツヤユスリカとミツオビツヤユスリカは別種とは見なされなかった。ツヤユスリカ属のこのグループについて

は, 形態上の2種が分子系統樹では1種になってしまう例が海外でも報告されており (Sinclair and Gresens, 2008; Gresens et al., 2012), 特に, Gresens et al. (2012) では北米および北欧産の標本について, 我々の例と同じく, 形態でヨドミツヤユスリカとミツオビツヤユスリカに同定されたものが, 分子系統樹では同じグループに属することが報告されている。ヨドミツヤユスリカの色彩が出現時期の違いなどにより大きく変化することはよく知られているが (Hirvenoja, 1973), ミツオビツヤユスリカとされてきたものがヨドミツヤユスリカの種内変異の一部であると結論づけるためには, ヨドミツヤユスリカの色彩変異の規則性などを明らかにする必要がある。Cranston (1982) によれば, ヨドミツヤユスリカとミツオビツヤユスリカは幼虫でも擬脚にある爪の形態で区別可能であり, 現時点では形態的特徴に関してはヨドミツヤユスリカとミツオビツヤユスリカを同種として扱う根拠は見つからない。

形態種と分子系統樹上の種との間に不一致が生じる原因は, 形態同定に用いているキーキャラクターの選択に問題があったか, そもそも識別可能な形態の差異が無い姉妹種だったか, 形態的な種内多型を異種と見なしているか, あるいは遺伝子浸透により異種間で COI 領域の配列が一致しているかのいずれかであろう。

たとえば, ウスイロユスリカやヨドミツヤユスリカ類については, 我々が検出したのと同様の問題が海外でも指摘されていることを先に述べたが, いずれの場合も, 形態同定が翅や腹部の“特徴的”な斑紋のみに強く依存している。特にツヤユスリカの場合, ユスリカ科分類において通常重要なキーとされる雄交尾器の形態に明瞭な違いが見られないため, 世界的に斑紋がキーに採用され, 同定が行われている。ウスイロユスリカの翅の斑紋は国内ではウスイロユスリカに固有とされるが, 国外に目を向けると *C. calipterus*, *C. striatipennis*, *C. strenzkei* (Fittkau, 1968; Chaudhuri et al., 1992; Andersen and Mendes, 2010) など多くの種がウスイロユスリカによく似た斑紋を持っており, それほど特徴的ともいえなくなる。Pramual et al. (2016) は斑紋以外の特徴を再検討し, ウスイロユスリカとされているもののうち, 日本産と韓国産では触角比(触角の末端節の長さ末端節を除く部分の長さの比)に違いがあることを示した。日本でウスイロユスリカとされている2つのグループの実体についても形態同定の詳細な見直しで解決できる可能性がある。ツヤユスリカ属については, 体の斑紋よりも交尾器の形態と剛毛の分

Fig. 3. Neighbor-joining tree of *Cricotopus sylvestris*-group estimated using 658-bp of COI sequences. Accession number of sequence is in square brackets.

図3. *Cricotopus sylvestris*-groupのCOI遺伝子塩基配列による近隣結合法系統樹. カッコ内はアクセッション番号.

布を重視した検索表も提案されており (Oliver and Dillon, 1988), *sylvestris*-group の種についても体の各部の比率や剛毛の長さや分布, 見分けが付かないといわれる交尾器の形態を詳細に再評価してみる必要がある。また, 形態では区別されるのに DNA バーコーディングからは区別できない場合は, 遺伝子浸透により異種間で COI 領域の配列が一致している可能性もあるため, 浸透の起こりにくい核 DNA 領域の解析を併用する必要もある。

ウスイロユスリカのように隠蔽種の疑いがある場合, 手始めに生殖隔離に直接関わる交尾器の形態, 群飛行動に関わる翅の形態や触角比などから精査し直すことになるが, それで差異が見出せない場合は属内で種の検索に用いられている形質について網羅的に検討する必要がある。成虫の形態では識別が困難な場合に, 他のステージの形態で識別できる場合もあり, 例えば, 成虫では識別困難な *Chironomus plumosus* の姉妹種において, 蛹の形

態では2つの型が見分けられ, 2種とされた例も報告されている (Hirvenoja, 2006)。ただ, この方法では一頭ずつ個別に飼育する労力が必要であり, 成虫だけ採集しても同定できないという問題がある。さらに, 姉妹種と思われるものが種分化の途上にあるような場合, 形態での識別はより困難なものとなるかもしれない。

これまでに研究した種は日本産のものに限っても一部であり, 今後も多くの不一致が見つかり, 解決の努力が必要となるであろう。一方, 分類学者にとっては, 形態同定の不備を再検討するためのチャンスであり, 大きなメリットでもある (Andersen et al., 2013)。また, 最終的に形態では識別できない場合は種の同定のために DNA の解析が必須になるであろう。今後 DNA 塩基配列の違いのみで新種記載する報告も出てくるものと予想される。

以上, ユスリカの形態分類単位と分子系統単位との間に不一致が存在し, 普通種の一部に解決すべき問題があ

ることを述べたが、これらが解決され、すべての普通種の形態同定と塩基配列に一对一の対応が付いた後は、DNA バーコーディングを利用した種同定が捕食性動物の餌選好性解析や環境 DNA の研究などに広く応用されることが期待される。

謝 辞

国立環境研究所の及川康子、花ヶ崎紀子、進藤朋実の各氏には標本整理と分析でご協力いただいた。厚くお礼申し上げる。本研究は JSPS 科研費 24241078 の助成と国立環境研究所重点研究生物多様性プログラム予算の支給を受けたものである。

引用文献

- Amora, G., N. Hamada, L. M. Fusari and V. Andrade-Souza (2015): An Asiatic chironomid in Brazil: morphology, DNA barcode and bionomics. *ZooKeys*, 514: 129-144.
- Andersen, A. M. and H. F. Mendes (2010): Order Diptera, family Chironomidae (with the exception of the tribe Tanytarsini). In: Van Harten, A. (ed.): *Arthropod fauna of the UAE*, 3: 564-598.
- Andersen, A. M., E. Stur and T. Ekrem (2013): Molecular and morphological methods reveal cryptic diversity and three new species of Nearctic *Micropsectra* (Diptera: Chironomidae). *Freshwater Science*, 32(3): 892-921.
- Carew, M. E., V. Pettigrove, R. L. Cox and A. A. Hoffmann (2007): DNA identification of urban Tanytarsini chironomids (Diptera: Chironomidae). *Journal of the North American Benthological Society*, 26(4): 587-600.
- Chaudhuri, P. K., S. K. Das and J. E. Sublette (1992): Indian species of genus *Chironomus* Meigen (Diptera: Chironomidae). *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere*, 119: 1-51.
- Cranston, P. S. (1982): A key to the larvae of the British Orthocladiinae (Chironomidae). *Freshwater Biology Association, Scientific Publication*, (45): 152 pp. + 1 plate.
- Fittkau, E. J. (1968): *Chironomus strenzei* n. sp. (Chironomidae, Dipt.), ein neues Laboratoriumstier. *Zeitschrift für Morphologie der Tiere*, 63: 239-250.
- Gresens, S. E., E. Stur and T. Ekrem (2012): Phenotypic and genetic variation within the *Cricotopus sylvestris* species-group (Diptera, Chironomidae), across a Nearctic-Palaeartic gradient. *Fauna norvegica*, 37: 137-149.
- Hirvenoja, M. (1973): Revision der Gattung *Cricotopus* van der Wulp und ihrer Verwandten (Diptera, Chironomidae). *Annales Zoologici Fennici*, 10: 1-363.
- Hirvenoja, M. (2006): Contributions to the taxonomy and ecology of the *Chironomus plumosus* sibling species aggregate (Diptera: Chironomidae): the brackish water populations of Tvärminne area, Finland. *Entomologica Fennica*, 17: 373-380.
- 国立環境研究所 (2016): ユスリカ DNA データベース. <http://www.nies.go.jp/yusurika/index.html>. Accessed 15 January 2016
- 今藤夏子・奥田しおり・大林夏湖・上野隆平・高村健二 (2017): DNA バーコーディングを目的としたユスリカ DNA 抽出方法の比較. *陸水学雑誌*, 78: 13-26.
- Kondo, N., R. Ueno, K. Ohbayashi, V. V. Golygina and K. Takamura (2016): DNA barcoding supports reclassification of Japanese *Chironomus* species (Diptera: Chironomidae). *Entomological Science*, 19(4): 337-350.
- Langton, P. H. and L. C. V. Pinder (2007): Keys to the adult male Chironomidae of Britain and Ireland. Volume 1: Introductory text, keys, references, checklist and index. Volume 2: Illustrations of the hypopygia. *Freshwater Biological Association, Scientific Publication*, No. 64, Volume 1: 240 pp. Volume 2: 168 pp.
- Martin, J. (2015): Morphology and Cytology of Oriental *Chironomus* species. v. December 2015. <http://www.chironomidae.net/Martin/SEACHironfile/OrientalChironomusV1215.pdf>. Accessed 28 April 2016
- Moller Pillot, H. K. M. (2013): *Chironomidae Larvae, III. Biology and Ecology of the Aquatic Orthocladiinae*. KNNV Publishing, Zeist, the Netherlands, 320 pp.
- Oliver, D. R. and M. E. Dillon (1988): Review of *Cricotopus* (Diptera: Chironomidae) of the Nearctic arctic zone with description of two new species. *Canadian Entomologist*, 120: 463-496.
- Pfenninger, M., C. Nowak, C. Kley, D. Steinke and B. Streit (2007): Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Molecular Ecology*, 16(9): 1957-1968.
- Pramual, P., K. Simwisat and J. Martin (2016): Identification and reassessment of the specific status of some tropical freshwater midges (Diptera: Chironomidae) using DNA

- barcode data. Zootaxa, 4072(1): 39-60.
- Sasa, M. and M. Kikuchi (1995): Chironomidae (Diptera) of Japan. University of Tokyo Press, Tokyo, 333 pp.
- Sinclair, C. S. and S. E. Gresens (2008): Discrimination of *Cricotopus* species (Diptera: Chironomidae) by DNA barcoding. Bulletin of Entomological Research, 98: 555-563.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013): MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.
- 山本優 (2010): ユスリカ亜科 Chironominae. 図説日本のユスリカ, 日本ユスリカ研究会 (編):158-259. 文一総合出版, 東京.
- 山本優・山本直 (2014): ユスリカ科. 日本昆虫目録 第8巻 双翅目第1部 長角亜目－短角亜目無額囊節, 日本昆虫目録編集委員会 (編): 237-362. 権歌書房, 福岡.