

〈原著論文〉

千葉県に自生する6種のランを加害する ハモグリバエ科の同定と被害状況

菅 みゆき¹・福島 成樹²・山下 由美³・
遊川 知久³・徳田 誠¹・辻田 有紀^{1,*}

¹ 佐賀大学農学部

〒840–8502 佐賀市本庄町1

² 千葉県農林総合研究センター森林研究所

〒289–1223 山武市埴谷1887–1

³ 国立科学博物館筑波実験植物園

〒305–0005 つくば市天久保4–1–1

Identification of agromyzid flies infesting six native orchid species in Chiba Prefecture, Japan, and their damage assessment

Miyuki SUGA¹, Shigeki FUKUSHIMA², Yumi YAMASHITA³,
Tomohisa YUKAWA³, Makoto TOKUDA¹ and Yuki OGURA-TSUJITA^{1,*}

¹ Faculty of Agriculture, Saga University,

1 Honjyo, Saga 840–8502, Japan

² Chiba Prefectural Agriculture and Forestry Research Center,

1887–1 Haniya, Sammu, Chiba 289–1223, Japan

³ Tsukuba Botanical Garden, National Museum of Nature and Science,

4–1–1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305–0005, Japan

*E-mail: ytsujita@cc.saga-u.ac.jp

Jpn. J. Ent. (N.S.), 21(3): 167–174, 2018

Abstract. To identify the agromyzid species and to compare the degree of damage among different orchid species, we surveyed infestation by agromyzids on six native orchids in Sammu, Chiba, Japan. To obtain fly specimens, flowers and fruits of the six orchid species were collected from the field. Adult flies collected from the fruits of *Cypripedium japonicum* Thunb. were morphologically identified as *Japanagromyza tokunagai* (Sasakawa). Then flies collected from the six orchid species were molecularly identified by sequencing the mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. In addition, we sequenced the flies collected from March to July to confirm possible seasonal changes in agromyzid species composition. As a result, they were all regarded as *J. tokunagai*. Further, the developmental stage of infesting fly was investigated every two weeks from May to July 2016 in three of the six orchid species. The infestation rates of *Cephalanthera falcata* (Thunb.) Blume and *C. japonicum* were extremely high in this site, and the control of *J. tokunagai* will be required for the conservation of these orchids.

Key words: conservation, *Japanagromyza tokunagai*, Orchidaceae.

緒 言

日本にはおよそ300種（亜種，変種等を含む）のラン科植物が自生しているが，実にその約7割は環境省（2017）が絶滅危惧種に指定している．ランが減少した主な原因は，開発などによる生育地の減少や園芸目的による過剰な人為的採集であるが，近年，里山に自生するランを中心にハモグリバエ科の一種によ

る被害が急速に拡大し、減少に追い打ちをかけている。ハモグリバエに産卵された個体は、果実や花茎の大部分が食害を受けて枯死し、種子が正常に生産されないことが知られている（木村ら 2009）。これらの種を保全するため早急な対策が必要であるが、植物に被害を及ぼすハモグリバエに関する情報は断片的であり、各地の被害状況やハエの生態は未だ不明のままである。

ハモグリバエ科のランミモグリバエ *Japanagromyza tokunagai* (Sasakawa) は、幼虫がランを摂食する害虫として広く知られている。本種は1953年にSasakawaによって山口県産のシュンラン (*Cymbidium goeringii* (Rchb.f.) Rchb.f.) の花茎より得られた標本をもとに *Melanagromyza* 属として記載され、当初はシュンランキモグリバエという和名が付けられていたが、その後Sasakawa & Matsumura (1998) によって *Japanagromyza* 属に移され、和名もランミモグリバエと改称された。本種は、クマガイソウ (*Cypripedium japonicum* Thunb.) (長谷川ら 1987) やキンラン (*Cephalanthera falcata* (Thunb.) Blume) (杉浦 1998; 木村ら 2009; Suetsugu 2015)、エビネ属 (*Calanthe*) (上住 1978; Sugiura 2013; Suetsugu & Fukushima 2014) など様々なランから子房への産卵や果実内の食害が報告されている。一方で、ハネオレバエ科のセマダラハネオレバエ *Chyliza vittata* Meigen も、国内でオニノヤガラ (*Gastrodia elata* Blume) (Kato et al. 2006)、アオスズラン (*Epipactis helleborine* (L.) Crantz var. *papillosa* (Franch. & Sav.) Hashimoto) (Suetsugu 2013) やキンセイラン (*Calanthe nipponica* Makino) (Suetsugu 2016) などいくつかのランの花や葉を食害することが知られている。ランの種、あるいは季節によって被害を及ぼすハエ類が異なる可能性もあるが、詳細な検証は未だなされていない。

本研究では、里山に自生するランの中でもキンランやクマガイソウなど、保全が急務であるランを中心にハエ類の被害状況を調査するため、様々なランが同一地域に多数自生している千葉県山武市の調査地においてランを食害するハエ類の調査を行った。まず、植物の種によって加害するハエの種が異なるかどうかを検証するため、6種のランより果実や花茎を採集し、内部に寄生するハエ類を比較した。次に、季節によってハエの種が異なる可能性を検証するため、ランの開花時期である春（5月）から夏（7月）にかけて採集されたハエ類の比較を行った。

調査方法

千葉県山武市にある千葉県農林総合研究センター森林研究所内に自生するクマガイソウ、キンラン、オオバノトンボソウ (*Platanthera minor* (Miq.) Rchb. f.), エビネ (*Calanthe discolor* Lindl.), ネジバナ (*Spiranthes sinensis* (Pres.) Ames var. *amoena* (M. Bieb.) H. Hara), シュンランの6種のランについて、果実や花茎内部に寄生する昆虫類を調査した。環境省レッドリスト2017年版において、クマガイソウとキンランは絶滅危惧Ⅱ類、エビネは準絶滅危惧種に指定されている。

クマガイソウ、キンランとオオバノトンボソウの3種については、2016年5月7日～7月16日までの間、約2週間おきに果実や花茎を採集した（表1）。キンランとクマガイソウは1株より1果実を採集した。オオバノトンボソウは、結実前に伸長中の花茎が加害されていたため、各株より開花前あるいは開花後の花茎（花・花柄・花序を含む）を採集した。これらを実体顕微鏡下で解剖し、植物組織内部に寄生している卵・幼虫・囲蛹（図1）を採取して、各発育段階に分けて個体数を数え、1果実あたりの平均個体数を算出した（図2）。エビネとネジバナは、果実や花茎を採集し、植物組織内に寄生している幼虫・囲蛹を採集した。シュンランは前年の秋にできた花芽が翌年の早春に開花することから、花芽がハエの越冬場所となっている可能性が考えられる。そこで、12月に9個体のシュンランの花芽を採集した。各種より採集した一部の囲蛹は、プラスチックシャーレに入れ、室温で1～2週間飼育して羽化した成虫を採集した。採集した幼虫と囲蛹は99%のエタノールへ浸漬した状態で、成虫は液体に浸漬せずそのままの状態で冷凍保存し、DNA分析に用いた。クマガイソウの果実より得られた2個体（個体番号D123-4, D123-5）の成虫の同定を笹川満廣博士（京都府立大学名誉教授）に依頼した。これらの標本は、大阪市立自然史博物館に収蔵予定である。DNA分析には標本の破損を防ぐため、これらと同一果実より得られ、標本と形態的に差異

表1. キンラン、クマガイソウとオオバノトンボソウにおけるハモグリバエ調査.

ランの種	供試株数					
	5/7	5/21	6/4	6/18	7/2	7/16
キンラン	6	5	6	5	—	—
クマガイソウ	7	5	2	6	—	—
オオバノトンボソウ	—	—	4	4	6	7

数値は2016年の各採集日に供試した株数. キンランとクマガイソウは1株より1果実を, オオバノトンボソウは各株より花茎を採集し, 発育段階に分けてハエの個体数を計測した. 「—」は調査を行っていないことを示す.

の見られない成虫1個体を用いた.

寄生している昆虫類を分子同定するため, 様々なランより採集した幼虫・囲蛹・成虫より, 大平ら (2016) の手法を用いてDNAを抽出した. プライマー LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.* 1994) あるいは LCO1490/COIA (Funk *et al.* 1995) を用いて昆虫のDNAバーコーディング領域であるミトコンドリアDNAのCOI遺伝子領域をPCR増幅し, 塩基配列を決定した. PCRはMighty Amp DNA Polymerase Ver. 2 (Takara社) を用いて, 付属のマニュアルに準じてPCR反応を行い, 電気泳動で増幅の有無を確認した後, Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (Fast Gene社) を用いて精製した. その後, BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems社) とPCRに使用したプライマーを用いて反応を行い, ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems社) を用いて塩基配列を決定した. 得られた2つの遺伝子型の配列情報はDDBJへ登録した (LC377223: 5月7日採集クマガイソウ由来, LC377224: 6月4日採集クマガイソウ由来).

結 果

キンランとクマガイソウでは, 子房や果実の内部に食害が見られ, 植物組織内より図1bに示すような幼虫が多数見つかった. 未熟種子や胎座がほとんど食害でなくなっている果実が多く見受けられ, 一見果皮が緑色で健全であっても内部は食害によって空洞である果実も見られた. 被害を受けた果実には, 産卵管を挿した跡と思われる小さな褐色のスポットが果皮の表面に多数見受けられた. いずれの種においても, 囲蛹は果皮に食い込むように入っており, 果実の外から透けて見える場合がほとんどであった.

オオバノトンボソウでは, 花序や蕾の内部に食害が見られ, 開花前に花茎上部が枯死している個体が多く見られた. 羽化後は果実に直径1~2ミリほどの脱出孔が確認できた. エビネでは, 若い果実内に幼虫が見られ, 果実に未熟種子や胎座を食害した痕跡が見られた. ネジバナでは花序や蕾の内部が食害され, 花茎は萎凋あるいは枯死しており, 茎内や若い子房部分に幼虫や囲蛹が見つかった. 12月に採集したシュンランの花芽には, 被害は見られず, 卵や産卵管を挿した痕跡として見られる褐色のスポットも見られなかった.

6月4日に採集したクマガイソウ果実より羽化した成虫2個体 (図1d) は, ランミモグリバエと同定された. 本研究で対象としたランより調査期間を通して得られた幼虫・囲蛹・成虫ともに, ほとんどの個体で形態に差異は見られず, すべて同一種であると考えられた.

キンラン, クマガイソウとオオバノトンボソウの3種について, 約2週間おきに果実内のハエの発育段階を調査した結果を図2に示す. 5月に開花するキンランとクマガイソウでは, 5月7日に幼虫の個体数が最も多く, その後個体数は減少していった (図2a, b). 囲蛹の個体数は徐々に増加し, 6月4日に最も多く見られたが, 6月18日にかけて急激に減少した. その一方で, 脱出孔のある囲蛹殻の数は6月4日から18日にかけて増加し, 特にクマガイソウでは顕著に増加が見られた. 6~7月に開花するオオバノトンボソウでは, 幼虫と囲蛹のピークがそれぞれ6月18日と7月2日であり, キンランやクマガイソウと約2週間のずれが見られた (図2c). オオバノトンボソウにおける脱出孔のある囲蛹殻の数は, 6月18日から7月

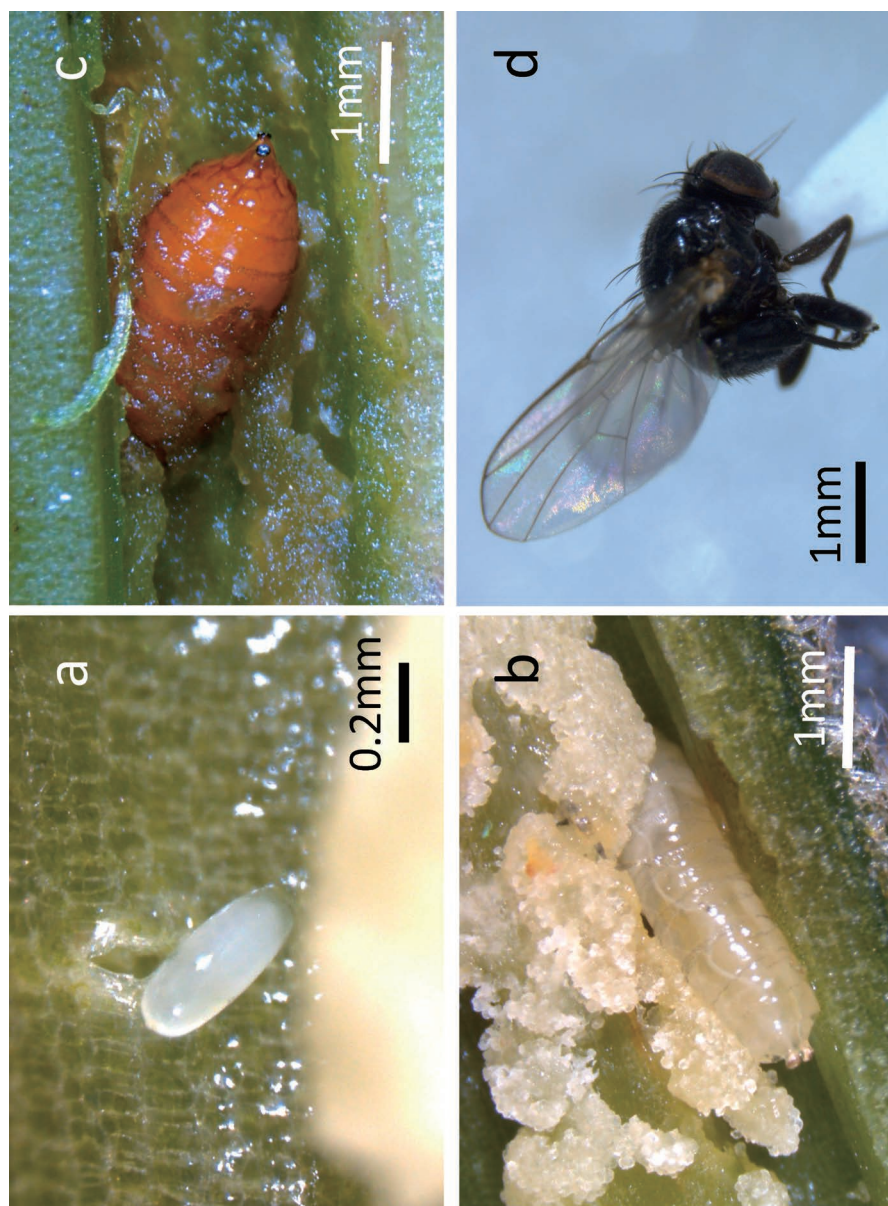


図1. ランの組織内より採取されたハモグリバエ. (a)クマガイソウの果実内に見られた卵 (2016年5月7日採集). (b)クマガイソウの果実内を食害する幼虫 (2016年5月7日採集). (c)キンラン果実内で見られた蛹 (2016年5月21日採集). (d)クマガイソウ果実より羽化した成虫 (2016年6月4日採集, 6月16日羽化).

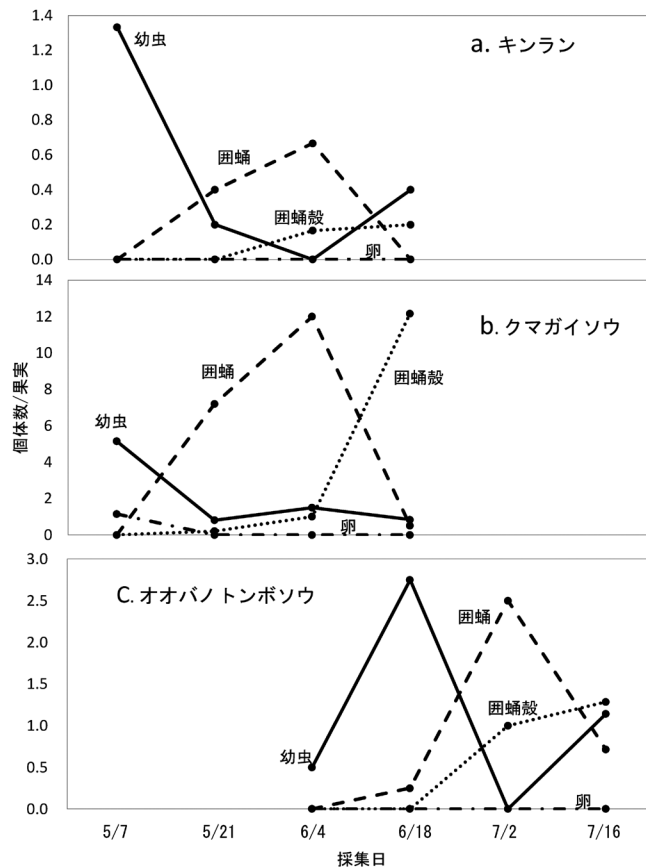


図2. キンラン(a), クマガイソウ(b)とオオバノトンボソウ(c)における1果実(花茎)あたりのハモグリバエの平均個体数. 蛹殻は脱出孔のある蛹殻を指す. キンランとクマガイソウは5月7日から6月18日まで, オオバノトンボソウは6月4日から7月16日まで約2週間おきに果実あるいは花茎を採集し, 発育段階に分けてハエの個体数を計測した.

16日にかけて徐々に増加していた. キンランとオオバノトンボソウでは, 幼虫の個体数が減少した後, 再び増加する現象が見られた. 卵(図1a)は, 果実内で発見するのが難しく, 調査期間を通してどのランでもほとんど発見できなかった.

1果実内(花茎内)で見られた個体数は, ランの種によって大きく異なり, クマガイソウではピーク時の幼虫の個体数が5.1であるのに対し(図2b), オオバノトンボソウでは2.8(図2c), キンランでは1.3であった(図2a). また, クマガイソウでは最も多いときに1果実あたり平均12個体の蛹が見つかった.

6種のランより採取した幼虫・蛹・成虫についてCOI領域を用いて分子同定を行った. まず, ランミモグリバエの塩基配列を決定するため, 標本と同一果実由来で形態的に差異の見られなかった成熟個体1個体を用いてCOI遺伝子領域を決定した. 次に, 各サンプルより得られた配列をこの配列と比較した結果, ほとんどの個体はランミモグリバエと同一の配列を持っていた. これらの配列は593塩基中1塩基(0.16%)のみ二型があり, Aの塩基をもつグループとGの塩基をもつグループの2つの遺伝子型に分かれたが, 両者にはランの種や季節によって偏りは見られなかった(表2). また, 6月4日と6月18日にクマガイソウ果実から採集した幼虫2個体はノミバエ科の1種であり, 7月2日にエビネ果実より採集した幼虫1個体はタマバエ科の1種であった.

表2. ランミモグリバエと分子同定された個体の発育段階と遺伝子型.

ランの種	採集日	発育段階	遺伝子型
キンラン	5/7	幼虫	G
	6/18	幼虫	G
クマガイソウ	5/7	幼虫	A
	5/7	幼虫	A
	5/21	幼虫	G
	6/4	幼虫	G
	6/4	成虫	G
オオバノトンボソウ	6/18	幼虫	A
	7/16	幼虫	G
	7/16	幼虫	G
エビネ	5/21	幼虫	G
	5/21	幼虫	G
ネジバナ	6/18	幼虫	G
	6/23	幼虫	G

考 察

本研究で、クマガイソウより得られた成虫標本は、ランミモグリバエと同定された。分子同定の結果、様々なランより5～7月にかけて採集されたハモグリバエ科のサンプルの配列は、ランミモグリバエの配列と一致するか、0.16%の変異しか見られなかった。このことから、本調査地ではランミモグリバエが様々なランを食害しており、春～夏にかけて季節によりハエの種に変化はないと考えられた。

5月頃に開花するキンラン、クマガイソウとエビネでは、若い果実被害が見られ、6～7月に開花するオオバノトンボソウやネジバナでは、花序や蕾・若い子房部分が食害を受けて花茎が開花・結実前に枯死する様子が見られた。一方、12月にシュンランの花芽を調査したが、食害や産卵した痕跡は見られなかった。エビネの休眠芽では前年の9～10月頃に産卵され、翌年の春に羽化しているのではないかという報告もあり(長野 1979)、越冬場所については今後探索が必要である。

キンラン、クマガイソウとオオバノトンボソウの3種について、果実内に見られたハエの発育段階を約2週間おきに観察した結果、幼虫および囲蛹期間の推移状況が明らかになった。キンランとクマガイソウでは5月、オオバノトンボソウでは6月より幼虫期間から囲蛹期間へ移行しはじめ、羽化はそれぞれ6月上旬と7月上旬頃よりはじまると考えられる。また、キンランとクマガイソウでは、幼虫と囲蛹のピークが約1ヶ月ずれているが、オオバノトンボソウではこのピークのずれが約2週間程度であることから、気温の高い6月以降では囲蛹化までの期間が短縮されると考えられる。

6～7月に開花するオオバノトンボソウでは、幼虫や囲蛹のピークが5月に開花するキンランとクマガイソウより約1ヶ月遅れていた。このことから、春に開花するキンランやクマガイソウで増殖したハエが、オオバノトンボソウなど夏にかけて開花するランを次々と利用している可能性も考えられる。各サンプルより得られた配列には1塩基の二型があり、AとGの2つの遺伝子型があることが明らかになったが、遺伝子型はランの種や採集時期と相関は見られず、ランダムに存在していると考えられた。

1果実内の個体数には、ランの種によって大きく差が見られたが、これはランの果実サイズに相関する可能性がある。最も個体数が多かったクマガイソウの果実は、長さ5～6センチ、幅1～1.5センチ程度と大型であるのに対し、キンランは長さ3～4センチ、幅1センチ程度と小型である。このことから、果実サイズが大きいほど果実内の個体数が増加すると考えられた。オオバノトンボソウは、果実が肥大する前に

花序や蕾が食害されるため、果実サイズとの関係はないものと考えられる。

キンランとオオバノトンボソウでは、幼虫の個体数が減少した後、再び増加する現象が見られた。これは、残っていた健全果実、あるいは被害を受けた果実の健全部分に再びハモグリバエが産卵した可能性や、食害によって枯死した果実内に、別の昆虫類が産卵・孵化した可能性が考えられる。再度増加した6月18日のキンラン果実より得られた幼虫を分子同定した結果、ランミモグリバエが検出されたことから、キンラン果実では前者の可能性が示唆された。一方で、6月4日と6月18日に採集されたクマガイソウ果実は、すでに果実が枯死して褐変しており、果実内から得られたサンプルはハモグリバエではなくノミバエ科であった。このことから、枯死した植物組織を食する昆虫類が2次的に寄生している後者の可能性も考えられる。同様に7月2日に採集したエビネ果実もすでに褐変しており、果実内の幼虫はタマバエ科であった。

本研究では、里山に自生する6種のランについてランミモグリバエによる被害を確認し、ランの種や季節に関わらず同一種が被害を及ぼしていることを明らかにした。木村ら（2009）では東京都町田市のキンラン集団で94%の被害率を報告しているが、本研究の調査地でも自生するキンランのほとんどの果実に被害が見られた。キンランについては、他にも島根県（杉浦 1998）や千葉県（Suetsugu *et al.* 2015）からもランミモグリバエの寄生が確認されており、様々な地域で深刻化している可能性が考えられる。また木村ら（2009）は、オオバノトンボソウが本研究と同様にランミモグリバエの食害により結実に至らなかったことを報告しており、本種の深刻な被害状況が明らかになった。クマガイソウについては、長谷川ら（1987）が香川県で、永松（2011）が鳥取県でランミモグリバエによる被害を報告しており、全国的に被害が拡大している恐れがある。ハモグリバエの寄生によりランの種子生産が正常に行われなければ次世代が残らず、個体数が減少し、急激なボトルネックにより遺伝的多様性が失われてしまう危険性がある。被害が深刻な地域では、袋かけや農薬散布によってハモグリバエを防除するなど早急に対処が必要であると考えられた。

要 約

千葉県山武市の調査地においてラン科植物を食害するハエ類の調査を行った。まず、植物の種によって加害するハエの種が異なるかどうかを検証するため、6種のランより果実や花茎を採集し、内部に寄生するハエ類を比較した。次に、季節によってハエの種が異なる可能性を検証するため、ランの開花時期である春（5月）から夏（7月）にかけて採集されたハエ類の比較を行った。クマガイソウより得られた成虫標本は、ランミモグリバエと同定された。また、ミトコンドリアDNAのCOI遺伝子領域の配列を用いた分子同定の結果、様々なランより5～7月にかけて採集されたハモグリバエサンプルの配列は、ランミモグリバエの配列とほぼ一致した。このことから、本調査地ではランミモグリバエが様々なランを食害しており、季節によりハエの種に変化はないと考えられた。また、本研究では3種のランについて果実内に見られたハエの発育段階を約2週間おきに観察し、幼虫および囲蛹期間の推移状況を明らかにした。キンランとクマガイソウ果実の被害が大きく、個体群維持のため、ランミモグリバエの防除が必要であると考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ランミモグリバエの同定をしてくださった笹川満廣博士、標本作成でお世話になった藤田将平氏、果実の解剖作業をお手伝いいただいた岩田わかな氏、許斐亮氏、檜垣かな氏に厚く御礼申し上げます。本研究は、国立科学博物館総合研究「博物館・植物園資料を活用した絶滅寸前種に関する情報統合解析」の助成を受けて行われた。

引用文献

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cyto-

- chrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**: 294–299.
- Funk DJ, Futuyma DJ, Orti G, Meyer A (1995) Mitochondrial DNA sequences and multiple data sets: a phylogenetic study of phytophagous beetles (Chrysomelidae: Ophraella). *Molecular Biology and Evolution*, **12**: 627–640.
- 長谷川晴・中杉光広・五井正憲 (1987) クマガイソウの採種法. 香川大学農学部学術報告, **38**: 63–70.
- 環境省 (2017) 環境省レッドリスト 2017. 維管束植物. <http://www.env.go.jp/press/files/jp/105449.pdf>
- Kato M, Tsuji K, Kawakita A (2006) Pollinator and stem- and corm-boring insects associated with mycoheterotrophic orchid *Gastrodia elata*. *Annals of the Entomological Society of America*, **99**: 851–858.
- 木村弘明・山崎 旬・安達ゆう・横尾末耶・市川直子 (2009) ハモグリバエ類による野生ラン蒴果への食害調査. *Proceedings of NIOC 2009, Nagoya, Japan*: 31–34.
- 永松 大 (2011) 絶滅危惧種クマガイソウの鳥取県における自生状況. 山陰自然史研究, **6**: 9–15.
- 長野正紘 (1979) ランの病虫害奮戦記. 阜月会別冊らん, **2**: 173–181. 池田書店, 東京.
- 大平 創・兼子伸吾・塘 忠顕 (2016) 小型カニムシ類の付属肢を用いた迅速・安価な DNA 抽出法. *Acta Arachnologica*, **65**: 89–95.
- Sasakawa M (1953) Descriptions and records of dipterous leaf-miners from Japan (Agromyzidae) I. *The Scientific Reports of the Saikyo University, Agriculture*, **4**: 9–22.
- Sasakawa M, Matsumura T (1998) Agromyzidae (Diptera) in Insect Museum National Institute of Agro-Environmental Sciences, with the description of seven new species. *Bulletin of the National Institute of Agro-Environmental Sciences*, **16**: 1–17.
- Suetsugu K (2013) Delayed autonomous self-pollination in two Japanese varieties of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **173**: 733–743.
- Suetsugu K, Fukushima S (2014) Bee pollination of the endangered orchid *Calanthe discolor* through a generalized food-deceptive system. *Plant Systematics and Evolution*, **300**: 453–459.
- Suetsugu K, Naito RS, Fukushima S, Kawakita A, Kato M (2015) Pollination system and the effect of inflorescence size on fruit set in the deceptive orchid *Cephalanthera falcata*. *Journal of Plant Research*, **128**: 585–594.
- Suetsugu K (2016) The autotrophic orchid *Calanthe nipponica* is a potential host plant of Japanese populations of the two-winged fly, *Chyliza vittata* (Diptera: Psilidae). *Entomological News*, **126**: 231–236.
- 杉浦直人 (1998) ランモグリバエ (ハエ目: ハモグリバエ科) の新寄主植物. ホシザキグリーン財団研究報告, **2**: 230.
- Sugiura N (2013) Specialized pollination by carpenter bees in *Calanthe striata* (Orchidaceae), with a review of carpenter bee pollination in orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **171**: 730–743.
- 上住 泰 (1978) エビネの仲間につく病虫害. 原色エビネ写真集. ガーデンライフ別冊, 誠文堂新光社, 東京.

(2018年4月16日受領, 2018年6月5日受理)
(Received April 16, 2018; Accepted June 5, 2018)