

## 侵入警戒調査で発見される *Bactrocera* 属 2 種、 ミスジミバエとイシガキミバエの識別法の再検討 ～中間形態を示す個体に関する知見～

北田 真之・木村 亮介<sup>1)</sup>

門司植物防疫所名瀬支所

Revision of the discrimination between two *Bactrocera* fruit flies, *B. scutellata* and *B. ishigakiensis*, found from a monitoring trap for invasive fruit flies –Knowledge of the characteristics of intermediate form– Masayuki Kitada and Ryosuke Kimura<sup>1)</sup> (Naze Sub-station, Moji Plant Protection Station, 1-1 Nagahama, Naze, Amami-shi, Kagoshima, 894-0036 Japan. <sup>1)</sup> Plant Protection Division, Food Safety and Consumers Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* **53**:103-110 (2017).

**Abstract:** The closely related species *Bactrocera scutellata* and *B. ishigakiensis* are native Tephritid fruit flies of Japan. A morphological study and PCR-RFLP of the mitochondrial COII region were applied to 170 specimens collected from 13 localities from Kyushu Island to Ishigaki-jima Island to re-examine the process of identifying the two *Bactrocera* species. As a result, both species were clearly distinguished by the wing patterns and the PCR-RFLP markers with restriction enzyme *Hinf*I in all localities except for Miyako-jima Island. Those distributions based on the result agreed with reference information. However, several wing patterns were detected in the specimens from Miyako-jima Island, namely *B. scutellata*, *B. ishigakiensis* and their intermediate. Meanwhile, wing patterns of several specimens did not conform to the standard PCR-RFLP patterns of each species.

The results of PCR-RFLP analysis of Miyako specimens showed both haplotypes of each species. The results obtained in this study suggest that *B. scutellata* and *B. ishigakiensis* coinstantaneously occur in Miyako-jima Island. On the other hand, the intermediate specimen was distinctly different from related species other than *B. scutellata* and *B. ishigakiensis* based on morphological characters. Intraspecific hybridization may also be listed as possibly causing inconsistency between morphological characters and mtDNA haplotypes in Miyako-jima Island.

**Key Words:** *Bactrocera scutellata*, *Bactrocera ishigakiensis*, PCR-RFLP, Mitochondrial DNA

### 緒 言

日本の南西諸島には、かつて重要害虫のウリミバエ (*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett))、ミカンコミバエ (*B. dorsalis* (Hendel)) が生息し、果実や果菜類の生産に深刻な被害をもたらした。1993年に両種の根絶に成功した後 (Yoshizawa, 1997)、これらミバエ類の再侵入を防ぐため、植物防疫所および都道府県の防疫担当者によって現在も侵入警戒調査が続けられている。当該調査で使用する誘引剤には、これら日本未発生ミバエのほかに、在来種のミスジミバエ (*B. scutellata* (Hendel))；以下、ミスジ) が反応し、頻繁に誘殺される。当該昆虫は、宮古島以北に分布し (屋富祖ら, 2002)、主としてカラスウリ属 (*Trichosanthes* spp.) 雄花に寄生するが、キュウリ果実を加害した事例もある (上野, 1998；大野ら,

2006)。また、石垣島と西表島ではミスジに代わり近縁種のイシガキミバエ (*B. ishigakiensis* (Shiraki))；以下、イシガキ) が分布しており (屋富祖ら, 2002)、ミスジ同様頻繁に誘殺される。

筆者が沖縄県宮古島在勤中、当該警戒調査でミスジのほかにイシガキと酷似した個体や翅の斑紋に両種の間隔的な特徴をもつ個体が複数採集された。両種の識別についてはこれまでに Drew & Romig (2013)、(2016)、Ito (1985)、Shiraki (1968)、Sonda (1972)、高田・一戸 (1982)、照屋ら (1984)、Wang (1996) があるが、中間タイプの存在およびその形態についての記載は一切ない。そのため識別困難なケースがしばしばある。また、沖縄では在来するもの以外の侵入種として、*B. synnephes* (Hendel) や *B. tau* (Walker) が採集されており (それぞれ Ohno & Tamura, 2008 および Ohno *et al.*, 2008)、これら

<sup>1)</sup> 農林水産省消費・安全局植物防疫課

有害ミバエ類と近似する中間タイプについて検証することは必要であろう。

一方で、近年ミバエ類に対する系統分類学の一つとして塩基配列の解読による遺伝子系統解析が行われ、ミバエ類の遺伝的な系統関係が明らかになりつつある。ミスジとイシガキの少数個体についても mtDNA の複数領域で塩基配列の解読が行われ、得られた系統樹から両種がごく近縁であることが示されている (Lim *et al.*, 2012; Nakahara & Muraji, 2008)。また、解読した塩基配列から明らかとなった DNA の多型を利用して、PCR-RFLP 法や Real-timePCR 法による様々なミバエ種の識別法が開発され、有用な成果が報告されている (中原ら, 2005; Yu *et al.*, 2005)。

そこで、今回九州から南西諸島の石垣島までの各地域で採集された個体について、両種の外部形態における既存の情報に照らして確認するとともに、中間タイプの特徴を整理し、形態による識別方法と PCR-RFLP で得られる情報との整合性について検討した。両種の関係性について新たな知見を得ることができれば、侵入警戒調査における種の識別の正確さと作業効率を向上させることが可能になり、ひいては新たな侵入種の迅速な検出にもつながるであろう。

本文に先立ち、ご指導とご助言を賜った門司植物防疫所の田尾政博氏ならびに名古屋植物防疫所の中原重仁氏、宮古島での寄主植物調査にご協力賜った元那覇植物防疫事務所平良出張所長の春原正信氏、供試虫をご提供いただいた門司植物防疫所ならびに那覇植物防疫事務所諸氏に対し厚くお礼申し上げます。

## 材料および方法

### 1. 供試虫

供試虫は、2011 年から 2013 年に九州および南西諸島の各地域で、2 週間ごとに回収されるミバエ類の侵入警戒用トラップ (ユーゲルア: サンケイ化学) に誘殺されたオス成虫 170 個体とし、これらすべてについて外部形態の観察と PCR-RFLP による遺伝子解析を行った。なお、供試虫は供試するまでの間、99.5% エタノール中に浸漬して -20℃ で保管し、DNA を抽出したのち順次標本とした。採集地域および供試個体数を Fig. 1 および Table 1 に示す。

### 2. 外部形態による識別

遺伝子解析を行った供試虫 170 個体について外部形態を観察し、ミスジとイシガキの識別点を調べた。

#### ①観察方法

供試虫は翅をピンセットで切り離し、鶴田・Bandara (1999) に従いカナダバルサムで封入してプレパラート標本とし、残りの虫体は三角台紙にマウントして針刺し標本とした。各形態の観察は実体顕微鏡を用いて行い、翅のプレパラート標本は透過光で観察するとともに、個体ごとに画像を撮影した (カメラヘッド: Nikon-DS-Fi1、撮影装置: Nikon-DSL-2 使用)。

#### ②観察部位

外部形態の観察は、両種の前記載 (ミスジ: Hendel, 1912、イシガキ: Shiraki, 1968) および Drew & Romig (2013)、(2016)、

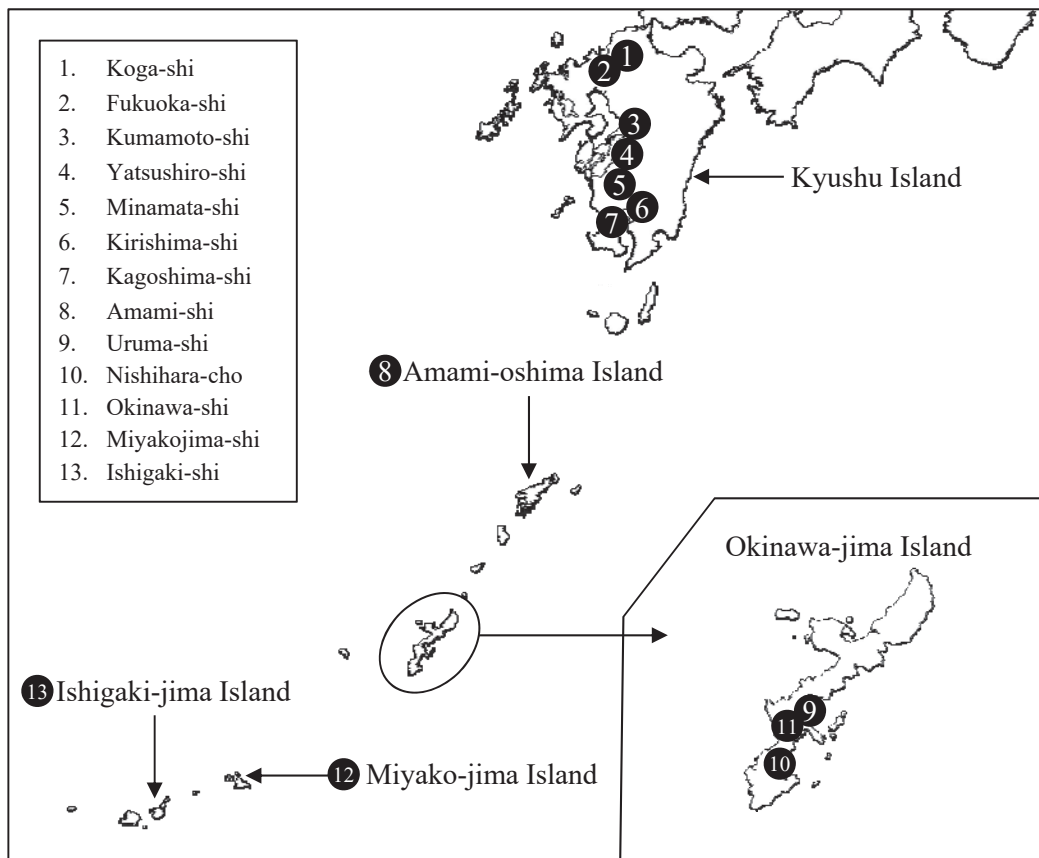


Fig. 1 Map showing localities where specimens were collected.

**Table 1** Specimens used in this study

Collection locality	Date	Number
Kyushu Island (Part of mainland Japan)		
Koga-shi, Fukuoka, Japan	2013.VII.10 - VIII.6	10
Fukuoka-shi, Fukuoka, Japan	2013.VII.15-27	5
Kumamoto-shi, Kumamoto, Japan	2013.VIII.17	5
Yatsushiro-shi, Kumamoto, Japan	2013.VIII.19	5
Minamata-shi, Kumamoto, Japan	2013.VIII.19	5
Kirishima-shi, Kagoshima, Japan	2013.VIII.15	5
Kagoshima-shi, Kagoshima, Japan	2013.VII.15	5
Amami-oshima Island		
Amami-shi, Kagoshima, Japan	2013.VI.13-14	20
Okinawa-jima Island		
Uruma-shi, Okinawa, Japan	2013.VII.11	10
Nishihara-cho, Okinawa, Japan	2013.VII.11	10
Okinawa-shi, Okinawa, Japan	2013.VII.11	10
Miyako-jima Island		
Miyakojima-shi, Okinawa, Japan	2012.IV.10-23	50
Ishigaki-jima Island		
Ishigaki-shi, Okinawa, Japan	2011.V.12 - 2012.II.2	30

Ito (1985)、Wang (1996) に基づき、頭部、胸部（脚部および翅を含む）、腹部について行うべく検討したが、翅の斑紋以外に両種の有効な識別点を見つけれなかった。そこで、本調査では *r-m* 脈および Costal band 先端の斑紋の状態について観察し、種の識別を行った。両種の斑紋の特徴を Fig. 2 に示す。

また、宮古島で採集された個体には Fig. 3 に示すように、Costal band と *r-m* において両種間の特徴を併せ持つ中間タイプ (Fig. 3b, c) が含まれていた。

Costal band 先端は、既報のミスジ：斑紋状 (Fig. 2a)、イシガキ：中脈 (M) へ広がる (Fig. 2a') に加え、宮古島の個体からは3段階程度の中間的な変異がみられた。そこで、Fig. 4 のとおり5段階に整理し、a、bを斑紋状 (Oval)、c、d、eを広がるもの (Expanded) とした。

一方、*r-m* の斑紋は、ミスジ：斑紋なし (Fig. 2b)、イシガキ：斑紋あり (Fig. 2b') であるが、宮古島の個体は斑紋のないものから斑紋の顕著なものまで連続した変異がみられた。斑紋の目視によるランク分けは困難であることから、Nikon-DSL-2 を用いて斑紋の幅を測定し、その程度により Fig. 5 のとおり5段階に分けた。そして、斑紋の幅が200 $\mu$ m未満のa、bを斑紋なし (Absent) とし、それ以上のc、d、eを斑紋あり (Present) とした。

*r-m* と Costal band による分類の結果、*r-m* に斑紋がなく、Costal band 先端が拡大する個体 (Fig. 3b)、あるいは、*r-m* に斑紋を有し、Costal band 先端が斑紋状の個体 (Fig. 3c) のように、両種間の特徴を併せ持つ個体を中間個体 (Intermediate) とした。そして、それら中間個体については、Drew & Romig (2013)、(2016)、Ito (1985)、Tseng *et al.* (1992)、Wang (1996) を参考にその他の種の可能性についても検討した。

### 3. 遺伝子診断法

供試虫 170 個体について、中原ら (2005) の方法を参考に、mtDNA の CO II 領域を対象として PCR-RFLP を実施し、種ごとのハプロタイプ (2 種制限酵素によるバンドパターンの組み合わせ) を比較した。

#### ① DNA 抽出および PCR 増幅

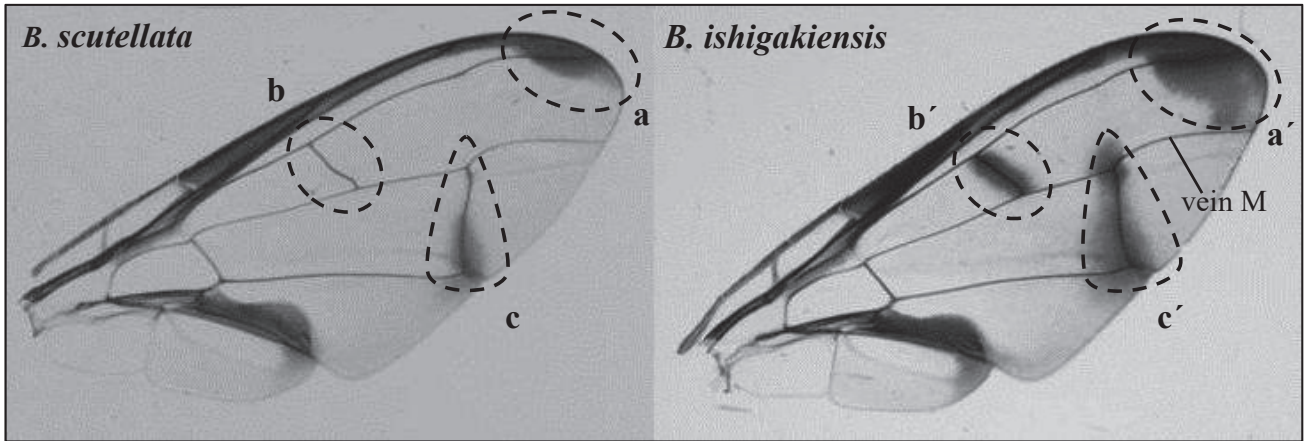
DNA 抽出は、供試虫の脚 1~2 本を用い、Osakabe *et al.* (2002) の方法に準じて行った。試料の磨砕にはビーズ式多検体細胞破碎装置シェイクマスターオート (パイオメディカルサイエンス) を用い、得られた DNA は個体ごとに 200  $\mu$ l の滅菌蒸留水に溶解した。

PCR による DNA 増幅は次のとおりである。反応容量は 20  $\mu$ l とし、1 反応ごとに鋳型 DNA 溶液 1  $\mu$ l、Ex Taq DNA Polymerase (タカラバイオ) 0.15  $\mu$ l、dNTP Mix (2.5mM) 1.6  $\mu$ l、10 $\times$ Ex Taq Buffer 2.0  $\mu$ l (20mM)、PCR プライマー (10pmol/ $\mu$ l) 各 0.5  $\mu$ l および滅菌蒸留水 14.25  $\mu$ l を加えた。なお、PCR プライマーは中原ら (2005) により設計された BCO2F1 および BCO2R を用いて行った。

PCR 反応は、サーマルサイクラー GeneAtlas S02 (アステック) を用いて行い、90 $^{\circ}$ C 5 分の加熱後、熱変性 (90 $^{\circ}$ C 30 秒)、アニーリング (47 $^{\circ}$ C 30 秒) および伸長 (65 $^{\circ}$ C 90 秒) の各ステップを 1 サイクルとして 40 回繰り返し、さらに 65 $^{\circ}$ C で 5 分の伸長反応を行った後、4 $^{\circ}$ C で保存した。

#### ② RFLP 解析

PCR で増幅した DNA は、制限酵素 TaqI (認識配列：TCGA) および HinfI (認識配列：GANTC) によって断片化し、電気泳動によって得られるバンドパターンを中原ら (2005) で報告された両種のバンドパターン (ミスジ：Taq I :



**Fig. 2** Typical wing markings of *B. scutellata* (Left) and *B. ishigakiensis* (Right).

a: Apex of costal band like an oval.

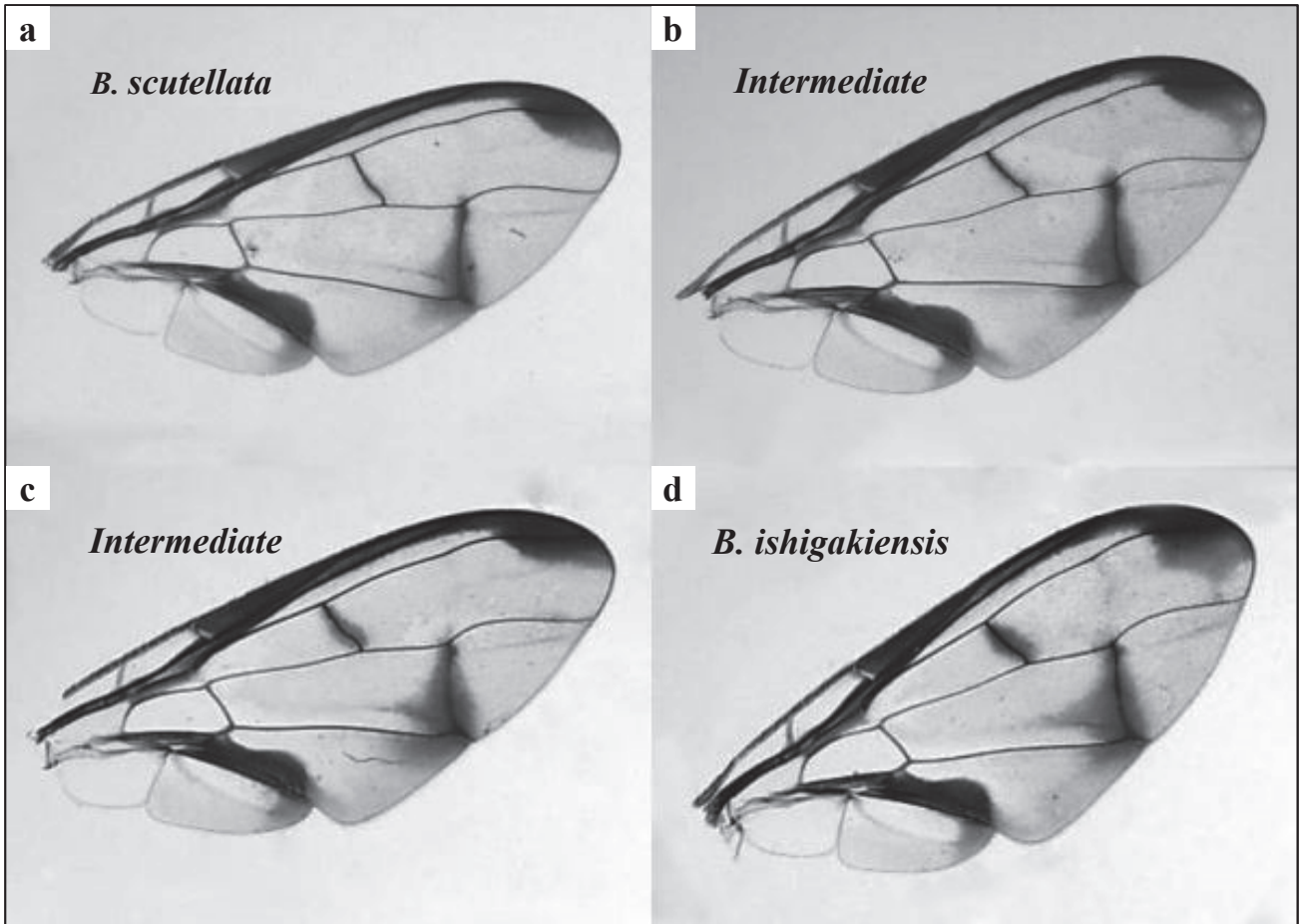
b: Dark spot on vein *r-m* absent.

c: Dark marking on vein *dm-cu* interrupted anteriorly or present. South of Okinawa-jima Island rather conspicuous and continuing.

a': Apex of costal band expanded to vein M.

b': Dark spot on vein *r-m* present.

c': Dark marking on vein *dm-cu* conspicuously continuing.



**Fig. 3** Intermediate wing markings between *B. scutellata* and *B. ishigakiensis* based on the specimens collected from Miyako-jima Island.

a: Costal band oval, *r-m* spot absent.

c: Costal band oval, *r-m* spot present.

b: Costal band expanded, *r-m* spot absent.

d: Costal band expanded, *r-m* spot present.

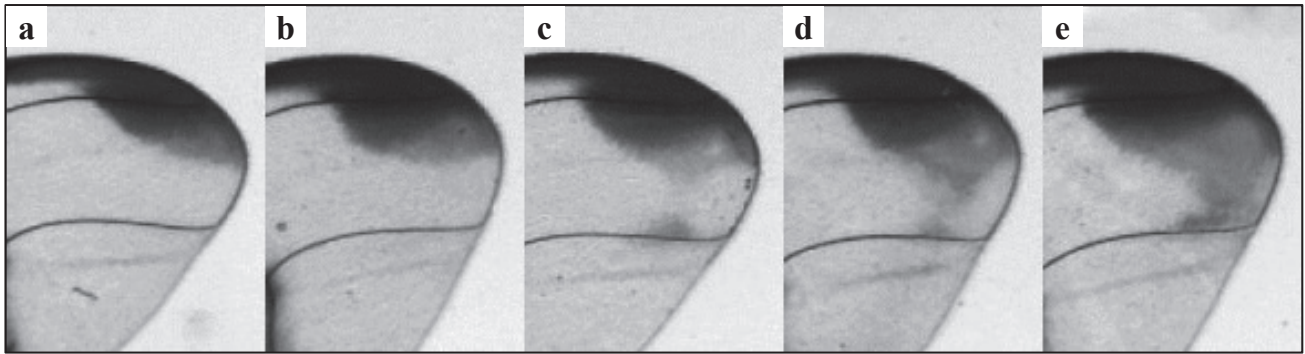


Fig. 4 Patterns of the apex of costal band as seen in the specimens of Miyako-jima Island.

a - b: Oval. c - e: Expanded.

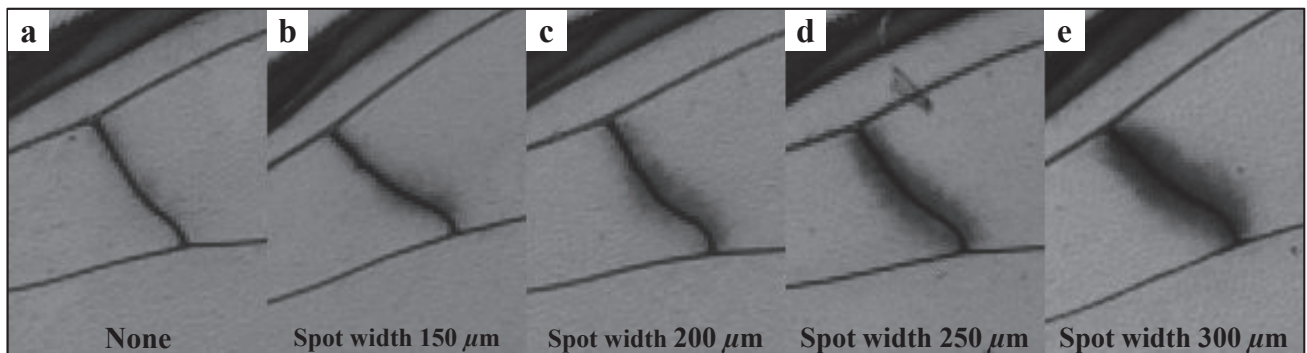


Fig. 5 Patterns of the dark spot on vein *r-m* as seen in the specimens of Miyako-jima Island.

Under 200  $\mu\text{m}$  (a, b): Dark spot absent. Over 200  $\mu\text{m}$  (c, d, e): Dark spot present.

429, 182, 6 (bp)、*HinfI* : 334, 243, 40 (bp)、イシガキ : *TaqI* : 429, 182, 6 (bp)、*HinfI* : 334, 212, 40, 31 (bp) と比較した。

いずれの制限酵素処理も反応容量は 10  $\mu\text{l}$  とし、1 反応ごとに 0.2ml PCR チューブを使用した。*TaqI* の処理では、滅菌蒸留水 5.0  $\mu\text{l}$ 、10 $\times$ Buffer 1.0  $\mu\text{l}$ 、10 $\times$ BSA 0.5  $\mu\text{l}$ 、制限酵素 10U (タカラバイオ)、PCR 増幅産物 3.0  $\mu\text{l}$  を、*HinfI* の処理では、滅菌蒸留水 5.5  $\mu\text{l}$ 、10 $\times$ Buffer 1.0  $\mu\text{l}$ 、制限酵素 10U (タカラバイオ)、PCR 増幅産物 3.0  $\mu\text{l}$  を加え、サーマルサイクラーを用いて、*TaqI* は 65 $^{\circ}\text{C}$ 、*HinfI* は 37 $^{\circ}\text{C}$  でそれぞれ 3 時間以上保温した。得られた試料は 25bp ラダーマーカー (ライフテクノロジー) とともに、DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (島津製作所) を用いて電気泳動を行った。

## 結 果

### 1. 外部形態による種の識別

供試虫の翅の斑紋を観察し、その大きさにより 5 段階で評価した結果を Table 2 に示す。

宮古島と石垣島を除く地域の個体はすべて Costal band (Fig. 4) が a または b に、*r-m* (Fig. 5) も a または b に分けられ、これらはミスジミバエと判断された。一方、石垣島の個体は、Costal band が c、d、e に、*r-m* は d または e に分けられ、イシガキミバエと判断された。このことは、概ね既報にある両種の分布と一致した。一方、宮古島の個体では調査した 50 個体

のうち、ミスジタイプ (Fig. 3a) 29 頭、イシガキタイプ (Fig. 3d) 10 頭のほか、*r-m* に斑紋がなく、Costal band 先端が拡大する個体 (Fig. 3b) 5 頭、*r-m* に斑紋を有し、Costal band 先端が斑紋状の個体 (Fig. 3c) 6 頭の間個体計 11 頭 (22%) が確認された。

また、これら中間個体については、過去に南西諸島へ侵入した記録のある *B. symmephes*、*B. tau* や南西諸島に分布記録がある *B. arisanica* (Shiraki) (Wang, 1996) 等文献上記録のある近縁種と翅およびその他の形質を比較したが、一致する種はなかった。

### 2. 遺伝子診断

#### ① *TaqI* の解析結果

中原ら (2005) によれば、両種は *TaqI* で同じバンドパターン (429, 182, 6 (bp)) を示すことが報告されている。本調査においても、供試した 170 頭のうち 167 頭は同じバンドパターン (Fig. 6a) を示し、両種における基本的なバンドパターンであると考えられたが、残りの 3 頭はそれぞれこれとは異なる 3 種のバンドパターン (Fig. 6b, c, d) を示した (Table 3)。なお、異なるバンドパターンを示した 3 頭の外部形態はすべてミスジと一致した。

#### ② *HinfI* の解析結果

中原ら (2005) によれば、両種は *HinfI* で種ごとに異なるバンドパターン (ミスジ : 334, 243, 40 (bp)、イシガキ : 334,

**Table 2** Results of discrimination based on two wing characters for two *Bactrocera* species collected from Kyushu Island to Ishigaki-jima Island

Collection locality	Number	Apex of costal band		<i>r-m</i> spot		Species		
		Oval	Expanded	Absent	Present	<i>B. scutellata</i> <sup>*1</sup>	<i>B. ishigakiensis</i> <sup>*2</sup>	Intermediate <sup>*3</sup>
Kyushu Island	40	40		40		40		
Amami-oshima Island	20	20		20		20		
Okinawa-jima Island	30	30		30		30		
Miyako-jima Island	50	35	15	34	16	29	10	11
Ishigaki-jima Island	30		30		30		30	

<sup>\*1</sup> *B. scutellata* is basically with apex of costal band oval and *r-m* spot absent.

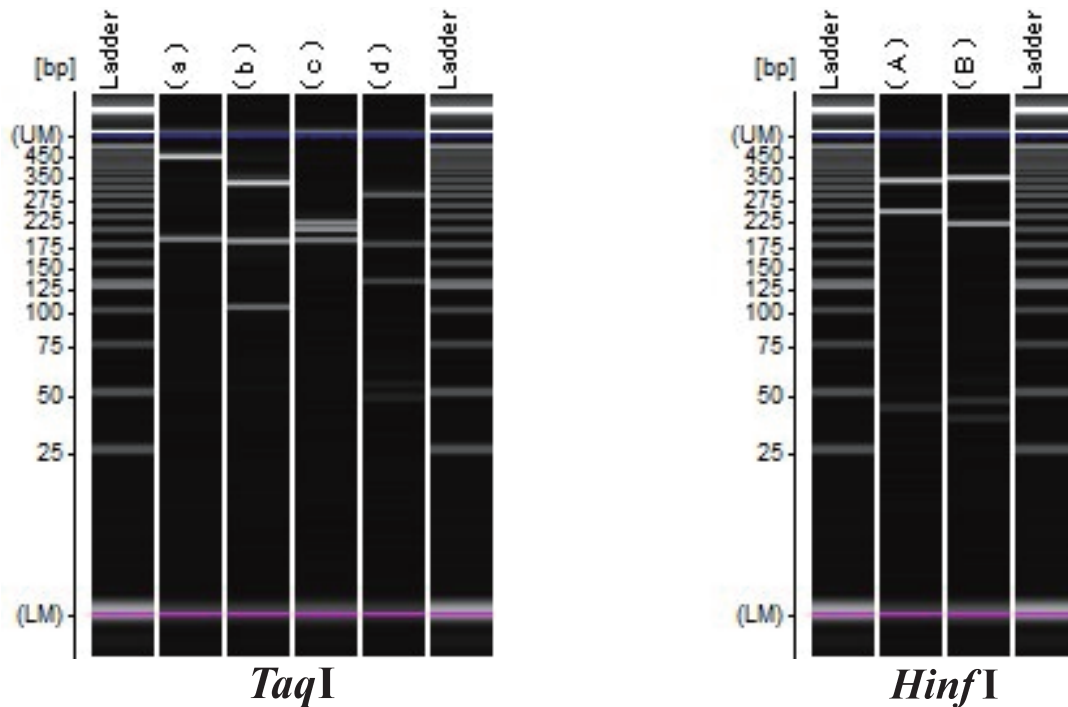
<sup>\*2</sup> *B. ishigakiensis* is basically with apex of costal band expanded and *r-m* spot present.

<sup>\*3</sup> Intermediate crosses these wing characters between two species.

212, 40, 31 (bp)) を示すことが報告されている。本調査においても、供試した 170 頭はいずれか一方のバンドパターン (Fig. 6A, B) を示した。それぞれの個体が示すバンドパターンから種を識別した結果は Table 3 のとおりであった。翅の斑紋でミスジと識別した九州、奄美大島、沖縄本島 (沖縄本島以北) の個体は、バンドパターンもすべてミスジを示し、また翅紋でイシガキと識別した石垣島の個体は、1 頭を除き、バンドパターンもすべてイシガキを示した。例外であった 1 頭は、ミスジのバンドパターンを示した。

一方、宮古島の個体からは、ミスジとイシガキ両種のバンド

パターンが確認されたが、それぞれの割合は、イシガキ 12 頭と比較してミスジ 38 頭の方が約 3 倍多かった (Table 3)。HinfI のバンドパターンと翅紋による識別結果を比較した結果は Table 4 のとおり、両種のバンドパターンは、翅の斑紋によりミスジまたはイシガキに区別された個体および中間個体のいずれからも確認された。しかし、翅紋とバンドパターンは必ずしも一致せず、宮古島の個体は、翅紋による識別結果と HinfI による遺伝子型が一致しない個体が相当数含まれていた。



**Fig. 6** Gel image of MultiNA for DNA markers of mtDNA COII gene digested by *TaqI* (Left) and *HinfI* (Right) in comparison between *B. scutellata* and *B. ishigakiensis*.

a: Typical banding pattern of *B. scutellata* and *B. ishigakiensis*.

b - d: Intraspecific variations detected from Kyushu and Miyako and each value measured by MultiNA as follows: (b) 327, 190, 112 (bp), (c) 221, 208, 190 (bp), (d) 279, 177, 131 (bp).

A: Typical banding pattern of *B. scutellata*.

B: Typical banding pattern of *B. ishigakiensis*.

UM: Upper marker. LM: Lower marker. Ladder: 25bp ladder marker.

**Table 3** Banding patterns of PCR-RFLP analysis performed by two restriction enzymes for discriminating between *B. scutellata* and *B. ishigakiensis*

Collection locality	Number	<i>TaqI</i>		<i>HinfI</i>	
		429, 182, 6 (bp) <sup>*1</sup>	Intraspecific variations	334, 243, 40 (bp) <sup>*1</sup>	334, 212, 40, 31 (bp) <sup>*1</sup>
Kyushu Island	40	38	2 <sup>*2</sup>	40	
Amami-oshima Island	20	20		20	
Okinawa-jima Island	30	30		30	
Miyako-jima Island	50	49	1 <sup>*3</sup>	38	12
Ishigaki-jima Island	30	30		1	29

<sup>\*1</sup> Fragment size referred to Nakahara *et al.* (2005).

*TaqI* (429, 182, 6 (bp)): common to both species, *HinfI* (334, 243, 40 (bp)): *B. scutellata*, *HinfI* (334, 212, 40, 31 (bp)): *B. ishigakiensis*.

<sup>\*2</sup> Two specimens of Kyushu showed different banding patterns 327, 190, 112 (bp) or 221, 208, 190 (bp) detected from electrophoresis of RFLP products.

<sup>\*3</sup> One specimen of Miyako showed different banding patterns 279, 177, 131 (bp) detected from electrophoresis of RFLP products.

**Table 4** Comparison between morphological characters and RFLP markers of Miyako specimens

Species <sup>*1</sup>	Number	RFLP marker <sup>*2</sup>	
		<i>B. scutellata</i>	<i>B. ishigakiensis</i>
<i>B. scutellata</i>	29	24	5
<i>B. ishigakiensis</i>	10	7	3
Intermediates	11	7	4

<sup>\*1</sup> Discrimination results among Miyako specimens referred to Table 2.

<sup>\*2</sup> Typical RFLP marker of two species was determined according to the result of *HinfI* analysis.

## 考 察

本調査の結果、宮古島にはミスジのほかにイシガキも発生しており、また、両種の間個体はそれら2種に由来する個体と考えられた。以下にその論拠を述べる。

九州から石垣島までの間に採集された供試虫を翅紋により識別した結果、沖縄本島以北の個体はミスジであり、石垣島の個体はすべてイシガキであった (Table 2)。種を分かつそれぞれの特徴 (Fig. 2) は非常に安定しており、これら地域の個体は基本的に翅紋により両種を識別できると考えられた。

また、PCR-RFLPの結果も、これら地域のほとんどの個体はそれぞれの種のハプロタイプ (Fig. 6a と Fig. 6A または B) を示し、翅の識別結果と一致した (Table 2 および Table 3)。一部、九州の2頭 (5%) で既報のものとは異なるハプロタイプ (Fig. 6b または c と Fig. 6A) を示したが、これら個体は、外部形態からそれぞれミスジの種内変異と推測された。

一方、石垣島の1頭 (3%) と宮古島の多くの個体で形態と遺伝子の識別結果が一致しなかった。特に、宮古島の個体では、翅の特徴において、ミスジとイシガキのほかに11頭 (22%) が両種の間形態 (Fig. 3b, c) を示した (Table 2)。これら宮古島の個体のPCR-RFLPの識別結果は、1頭 (2%) で異なる新たなハプロタイプ (Fig. 6d と Fig. 6A) が確認されたが、それ以外は、いずれか一方の種のハプロタイプを示した (Table 3)。しかし、ミスジあるいはイシガキの形態を示す個

が、必ずしもそれぞれの種のハプロタイプを示すことはなく、12頭 (24%) では両識別法による結果が交差し、中間個体には両種のハプロタイプが混在していた (Table 4)。これら形態と遺伝子が一致しない個体がミスジとイシガキ以外の近縁種である可能性は極めて低いことから、石垣島と宮古島において、両種間で何らかの生態的要因による変異が生じているのではないかと考えられる。

従来、イシガキは、石垣島を含む八重山群島の限られた地域にのみ分布し、宮古島に分布の報告はない (Sonda, 1972; 高田・一戸, 1982; 屋富祖ら, 2002)。このことは、那覇植物防疫事務所 (1988) のウリミバエの駆除確認調査におけるトラップ調査の結果とも一致する。当該調査は、ミスジとイシガキを誘引するキュウルアを用いて宮古島全島でトラップ調査を行い、採集されるすべてのミバエ類について識別しているにもかかわらず、イシガキの記録はない。しかし、筆者は供試虫の採集以降も、同島のケカラスウリ (*Trichosanthes ovigera* Blume) 雄花から、イシガキ、ミスジおよび中間個体を得ている (Miyako Is., Okinawa, Japan, 30. VI - 1. VII. 2015, M. Kitada leg., em. 16 - 22. VII. 2015, *B. scutellata*: 5 ♂, 2 ♀, *B. ishigakiensis*: 5 ♂, 5 ♀, Intermediate: 12 ♂, 4 ♀)。これらことから、イシガキは1988年以降に宮古島に分布を拡大したと考えられるが、侵入・定着が、いつ、どのようにして起きたかについては、現時点では不明である。

外部形態とミトコンドリア分子マーカーの不一致および中間型の存在は、同所的に生息する両種の交雑によって説明されるかもしれない。実際に、近縁ミバエ類の交雑と形態の変異に関する報告はいくつかある。Pike *et al.* (2003) の *B. tryoni* と *B. neohumeralis* を用いた交雑試験の結果は、双方向で繁殖可能な子孫を生産し、交雑種の形態の一部に両種の間隔的な特徴が現れることを示している。また、Santos *et al.* (2001) の *Anastrepha* 属3種を用いた交雑試験の結果も、雑種第1代は繁殖可能な子孫を生産し、交雑種は両親種の間隔的な形態を示すことを報告している。ミスジとイシガキについては、mtDNA配列から得られた系統樹から、ごく近縁であることが既に明らかとなっており (中原ら, 2005; Nakahara & Muraji, 2008; Lim *et al.*,

2012)、交雑も可能性の一つとして考えられる。しかし、このことを検証するためには本調査結果は不十分であり、今後の課題としたい。

本調査の結果から、中間個体が侵入種である可能性はないと考えられたが、それらを両種いずれかに識別する方法、中間個体が何故生じるのかその詳細については、はっきりとした知見は得られなかった。一方、イシガキの宮古島への分布は本報告が初めてであり、同種の分布を再考するきっかけになるのではなかろうか。ミスジとイシガキは植物検疫上の重要害虫ではないが、ミカンコミバエやウリミバエ、その他日本未発生の近縁種をいち早く発見しなければならない侵入警戒調査においては、数多くの誘殺虫を正確かつ迅速に識別する必要があり、効率的に調査を実施するためにも同時に誘殺される在来ミバエ類の形態的・生態的知見の蓄積が不可欠である。今後も両種ミバエと中間個体の関係解明に向けて詳細な分布や交雑の可能性についての情報蓄積に努めていく必要があるだろう。

### 引用文献

- Dos Santos, P., K. Uramoto, and S. R. Matioli (2001) Experimental hybridization among *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae): production and morphological characterization of F<sub>1</sub> hybrids. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **94**(5): 717-725.
- Drew, R. A., and M. C. Romig (2013) Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia. CABI, Wallingford UK: 653pp.
- Drew, R. A., and M. C. Romig (2016) Keys to the tropical fruit flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia. CABI, Wallingford UK: 487pp.
- Hendel, F. (1912) H. Sauter's Formosa Ausbeute: Genus *Dacus* (Dipt.). *Suppl. Entomol.* **1**: 13-24.
- Ito, S. (1985) Die Japanischen Bohrfliegen. Maruzen, Osaka Japan: 352pp.
- Lim, P. E., J. Tan, I. W. Suana, P. Eamsobhana, and H. S. Yong (2012) Distinct genetic lineages of *Bactrocera caudata* (Insecta: Tephritidae) revealed by CO I and 16S DNA sequences. *PLoS ONE*. **7**(5): e37276.
- 那覇植物防疫事務所 (1988) 宮古群島におけるウリミバエ駆除確認調査の記録. 那覇植物防疫事務所 沖縄 日本: 59pp.
- 中原重仁・石田龍顕・土肥野利幸・水庭慎一郎・金田昌士・村路雅彦 (2005) ミトコンドリア DNA COII 塩基配列による *Bactrocera* 属ミバエ 12 種の系統解析と分子分類. 植防研報 **41**: 15-23.
- Nakahara, S., and M. Muraji (2008) Phylogenetic Analyses of *Bactrocera* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) Based on Nucleotide Sequences of the Mitochondrial CO I and CO II Genes. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* **44**: 1-12.
- 大野豪・原口大・小濱継雄 (2006) 南西日本におけるミスジミバエの寄主・分布新記録, および沖縄本島におけるキュウリ果実への寄生例. 昆虫 (ニューシリーズ) **9**(1): 7-9.
- Ohno, S., Y. Tamura, D. Haraguchi, and T. Kohama (2008) First detection of the pest fruit fly, *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae), in the field in Japan: evidence of multiple invasions of Ishigaki Island and failure of colonization. *Appl. Entomol. Zool.* **43**(4): 541-545.
- Ohno, S., and Y. Tamura (2008) First detection of the fruit fly *Bactrocera synnephes* (Diptera: Tephritidae) on Iriomote Island, south-western Japan. *J. Entomol. Sci.* **11**(1): 105-110.
- Osakabe, M., T. Hirose, and M. Satô (2002) Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Appl. Entomol. Zool.* **37**(3): 399-407.
- Pike, N., W. Y. S. Wang, and A. Meats (2003) The likely fate of hybrids of *Bactrocera tryoni* and *Bactrocera neohumeralis*. *Heredity.* **90**(5): 365-370.
- Shiraki, T. (1968) Fruit flies of the Ryukyu Islands. *Bulletin/US National museum. Smithsonian institution.* **263**: 1-104.
- Sonda, M. (1972) Fruit Flies Caught in Plastic Traps Baited with Cue-lure in Okinawa. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* **10**: 28-32.
- 高田昌稔・一戸文彦 (1982) 誘引剤に集まるミバエの簡易識別法 (2). 植物防疫 **36**(5): 237-240.
- 照屋匡・田尾政博・西村真 (1984) 沖縄群島および奄美群島に産するミバエ科 *Dacus* 属の亜属および種の簡易同定法. 沖縄農業 **19**(1・2): 15-21.
- Tseng, Y. H., C. C. Chen, and Y. I. Chu (1992) The fruit flies, genus *Dacus* Fabricius of Taiwan (Diptera: Tephritidae). *J. Taiwan Mus.* **45**: 15-91.
- 鶴田賢治・H. M. J. Bandara (1999) スリランカ産 *Bactrocera dorsalis* 種群 3 種の判別分析による識別. 植防研報 **35**: 43-49.
- 上野貴美恵 (1998) キュウリ生果実に寄生が確認されたミスジミバエの調査. 那覇植物防疫情報 **112**: 551.
- 屋富祖昌子 (2002) 琉球列島産昆虫目録 増補改訂版 (東 清二 監修, 屋富祖昌子・金城政勝・林 正美・小濱継雄・佐々木健志・木村正明・河村太 編). 沖縄生物学会 西原 沖縄 日本: 570pp.
- Yoshizawa, O. (1997) Successful Eradication Programs on Fruit Flies in Japan. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* **33**: 1-10.
- Yu, D. J., Z. L. Chen, R. J. Zhang, and W. Y. Yin (2005) Real-time qualitative PCR for the inspection and identification of *Bactrocera philippinensis* and *Bactrocera occipitalis* (Diptera: Tephritidae) using SYBR Green assay. *Raffles Bull. Zool.* **53**(1): 73-78.
- Wang, X.-J. (1996) The fruit flies (Diptera: Tephritidae) of the East Asia Region. *Acta Zootaxonomica Sinica.* **21**(Suppl.): 1-419.