

リンゴシンクイ *Grapholita inopinata* HEINRICH 雌成虫の生産する性フェロモンの同定

田中道典*・阿部清文**・安藤 哲¹⁾・Le Van Vang^{1)***}

横浜植物防疫所調査研究部

¹⁾ 東京農工大学大学院生物システム応用科学研究所

Identification of the Sex Pheromone Secreted by Females of *Grapholita inopinata* HEINRICH (Lepidoptera: Tortricidae). Michinori Tanaka,* Kiyofumi Abe,** Tetsu Ando¹⁾ and Le Van Vang¹⁾ (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10 Shin-yamashita, Naka-ku, Yokohama 231-0801, Japan. ¹⁾ Graduate School of Bio-Applications and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 43: 17-22 (2007).

Abstract: The sex pheromone of *Grapholita inopinata* HEINRICH (Lepidoptera: Tortricidae) taken from fruits of *Malus toringo* in Nagano Prefecture, Japan, was studied for gas chromatography (GC) using an electroantennographic (EAG) detector (GC-EAD) and a GC-mass spectrometer (GC-MS). As a result of the analyses, (Z)-8-dodecenyl acetate (Z8-12:OAc), (E)-8-dodecenyl acetate (E8-12:OAc), dodecenyl acetate (12:OAc) and dodecan-1-ol (12:OH) in a ratio about 4:1:4:4, were identified from the pheromone gland extract of female moths. From the results of field tests using lures impregnated with synthetic acetates (Z8-12:OAc, E8-12:OAc and 12:OAc) identified from the females and lures of Pherocon[®] OFM (commercial synthetic pheromone for monitoring of *Grapholita molesta* are supplied by TRÉCÉ, Inc.), Pherocon[®] OFM were extremely effective in attracting males.

Key words: *Grapholita inopinata*, sex pheromone, GC-EAD, GC-MS, Z8-12:OAc

緒 言

リンゴシンクイ *Grapholita inopinata* HEINRICH (チョウ目：ハマキガ科) については、日本では 1952 年に福島県においてマルバカイドウ *Malus prunifolia* var. *ringo* の寄生が確認され、その後リンゴへの被害も若干確認された（駒井，1976；奥，2003）が、以後、被害拡大の兆候はまったくなく（奥，2003）、現在まで約 50 年間リンゴでの被害は報告されていない。しかしながら、当該生果実を本種の未発生国に輸出しようとするとき、輸入禁止等の植物検疫措置を講じられ、輸出できない場合がある。このため、本種の野生寄主植物であるズミ *Malus toringo* の自生地等を対象に、2002 年から発生状況に関する野外調査を行ってきた。調査の過程で、本種雄成虫が、市販のナシヒメシンクイ *Grapholita molesta* 用の性フェロモン剤（フェロコン[®] OFM: TRÉCÉ 社製）を用いたトラップに誘殺されることが判明した（田中ら，2005）が、本種の性フェロモンに関する研究報告については、野外試験において合成品の Z8-12:OAc ((Z)-8-ドデセニルアセテート) に本種が誘引されたとの報告 (ANDO, *et al.*, 1977) 以外にはないことから、2004～2005 年、長野県内で得られた本種雌成虫を用い、詳細な性フェロモンの分析・同定を行うこと

とした。また、分析結果に基づく野外での誘引試験を行うこととした。本報告は、これらの結果について取りまとめたものである。

本報告に当たり、現地調査及びハマキガ科の同定にご協力いただいた大阪芸術大学 駒井古実准教授に厚くお礼申し上げる。

材料及び方法

供試虫の採集及び野外試験は、2004 年から 2005 年に長野県伊那市のリンゴシンクイが発生しているズミ自生地で行い、誘引源の調整（信越化学工業社製合成性フェロモンを使用）及び本種の性フェロモンの分析・同定は、東京農工大学大学院生物システム応用科学研究所にて行った。

1. 性フェロモンの分析・同定

フェロモン成分の生物検定法として電気生理学的な手法、すなわち、触角電位図 (electroantennogram, EAG) が利用されている。それをガスクロマトグラフィー（以下 GC と略称）の検出器にした GC-EAD (gas chromatography equipped with an electroantennographic detector: GC 直結触角電位検出器) (Struble and Arn, 1984) は増幅器の改良により著しく高感度となり、通常の FID (flame ionization detector: 水素炎イオン化型検出器) でピークが認められない超微量成分も検出できるほどになってきた（安藤，2001）。

また、蛾類性フェロモンは揮発性物質であり、その構

* 現在、横浜植物防疫所塩釜支所

** 現在、農林水産技術会議事務局技術安全課

*** 現在、カントー大学 (Department of Plant Protection, Cantho University, Cantho City, Vietnam)

造決定には GC に直結した質量分析計 (mass spectrometer: 以下 MS と略称)、GC-MS (ガスクロマトグラフ質量分析計) が有効である。マススペクトルから炭素数と末端官能基の種類及び二重結合の数は決定可能であるが、直接二重結合位置を決定することは難しい。このため、二重結合の位置を調べるために、Type 1 (末端に官能基を有するもので、そのほとんどは、炭素数 10~18 で二重結合を 1~2 個含む直鎖状の 1 級アルコールとそのアセテートあるいはアルデヒド誘導体であり、Z8-12:OAc も含まれる) でのモノエン化合物では、通常 dimethyl disulfide (DMS) 誘導体化し、その GC-MS データから行っている (Buser, *et al.*, 1983)。ただし、フェロモン含量の低い小蛾類の場合にはかなり大量な処女雌の性フェロモン腺からの抽出物が必要である (安藤, 2001)。

上記の GC-MS と GC-EAD の組み合わせにより、性フェロモン腺の構成成分は詳細に分析される (安藤, 2001) ことから、リンゴコシンクイ性フェロモンの分析・同定についても両分析法により、Vang, *et al.* (2005) の手法に従い以下のとおり実施した。

(1) 供試虫の採集及び飼育・性フェロモン成分の抽出

8 月中旬、長野県伊那市の調査地においてズミ生果実を無作為に採果し (2004 年: 1,479 果, 2005 年: 1,336 果)、16L・8D・20℃ の条件下で保管調査を行い、幼虫が脱出した (2004 年: 166 頭、2005 年: 173 頭; 寄生率: 12.0%) 後も同条件下で飼育を続行した。その後、性フェロモン分析用の処女雌成虫を得るため、蛹化時にこれらのうち 20 頭 (2004) 及び 141 頭 (2005) を 1 頭ずつ小型のプラスチック容器に小分けした。9 月下旬から 10 月下旬にかけて羽化した成虫 (2004 年: 7♀・5♂, 2005 年: 35♀・45♂) のうち、雌成虫についてはフェロモン腺を暗期 (消灯 2~3 時間後) に切断し、ヘキサンにて 15 分間抽出した。

(2) GC-EAD による分析

羽化した雄成虫の一部については、それらの触角を GC-EAD による測定に供試した。GC の分析条件は、DB23 (0.25 mm×30 m) キャピラリーカラムを用い、カラム温度のプログラムを 80℃ (1 min)→8℃/min→210℃ (10 min) とし、カラムからの流出物が FID と EAD に分かれるようにした (Inomata, *et al.*, 2004)。当該検出器により、リンゴコシンクイ雌成虫のフェロモン腺からの天然抽出物 (2004 年に各 1 雌分の抽出物を使用し、2 回測定) 及び合成フェロモン (合成標品): ①Z8-12:OAc 及びそのアルコール (Z8-12:OH) とアルデヒド (Z8-12:Ald)、②(Z) 体の異性体である (E) 体の E8-12:OAc ((E)-8-ドデセニルアセテート) 及びそのアルコール (E8-12:OH) とアルデヒド (E8-12:Ald)、③12:OAc (ドデセニルアセテート) 及びそのアルコール (12:OH) とアルデヒド (12:Ald) の EAG 活性について、

同条件にて測定・比較を行った。

(3) GC-MS による分析

上記 GC-EAD と同じ GC の条件で、GC-MS により天然抽出物 (2004 に 3 雌分、2005 年に 21 雌分の抽出物を使用) 及び合成標品 (上述のアセテート及びアルコール) の測定・比較を行った。

2. 野外試験

(1) 誘引効果の比較試験

2004 年に実施したフェロモンの分析結果を基に、当該調査地の各数 km~数十 km 離れた 5 地点において 7 月 21 日~9 月 15 日の期間、6 種類の誘引源 (No. 1~6, フェロコン® OFM 及び合成標品 [Z8-12:OAc, E8-12:OAc 及び 12:OAc の単体及び混合物] を使用) を用い、リンゴコシンクイ雄成虫の誘引数を調査した。1 調査地点当たり 7 個のファネルトラップ (6 種類の誘引源を 1 種類 1 個ずつ及びトラップのみの対照区 1 個) を 20 m 以上の間隔で設置 (田中, 1993) し (合計 35 個)、2~3 週間おきに誘殺虫の回収及び各調査地点内でのトラップのローテーションを実施した。また、トラップ設置 1 カ月後に誘引源を染み込ませた担体 (ゴムキャップ) の交換を行った。

(2) フェロモン剤の有効範囲に関する試験

フェロコン® OFM 及び粘着板式トラップをリンゴコシンクイが発生しているズミの樹下、当該樹から 5 m 離れた場所、以下同一方向にそれぞれ、10 m, 15 m 及び 20 m 離れた場所に 1 個ずつ設置し、当該フェロモン剤の本種に対する誘引の有効範囲に関する予備的な調査を行うこととした。調査は 8 月 23 日~9 月 15 日の期間、当該調査地の 1 地点 (樹下及び 5 m 離れた場所) についてはさらにもう 1 地点) において実施し、最終日に誘殺虫を回収した。なお、当該樹以外には、周辺 (設置トラップから最低 20 m の範囲内) に他のズミが存在しない場所を選んだ。

結果及び考察

1. 性フェロモンの分析・同定

果樹などの害虫を多く含むハマキガ科は、ハマキガ科亜科とノコメハマキガ亜科などに細分化されるが、後者の性フェロモンは炭素数 12 のモノエン化合物で、特に 8-12 を共通成分としている (安藤, 2002; Ando, *et al.*, 2004)。ナシヒメシンクイやリンゴコシンクイ等の *Grapholita* 属は後者に属し、本属の多くの種において性フェロモンが報告されている (Witzgall, *et al.*, 2004)。また、野外においてリンゴコシンクイ雄成虫が、市販のナシヒメシンクイ用の性フェロモン剤あるいは合成品の Z8-12:OAc に誘引されるとの報告 (田中ら, 2005; ANDO, *et al.*, 1977) があったことから、分析に先立ちある程度本種の性フェロモンの成分を絞ることができた。

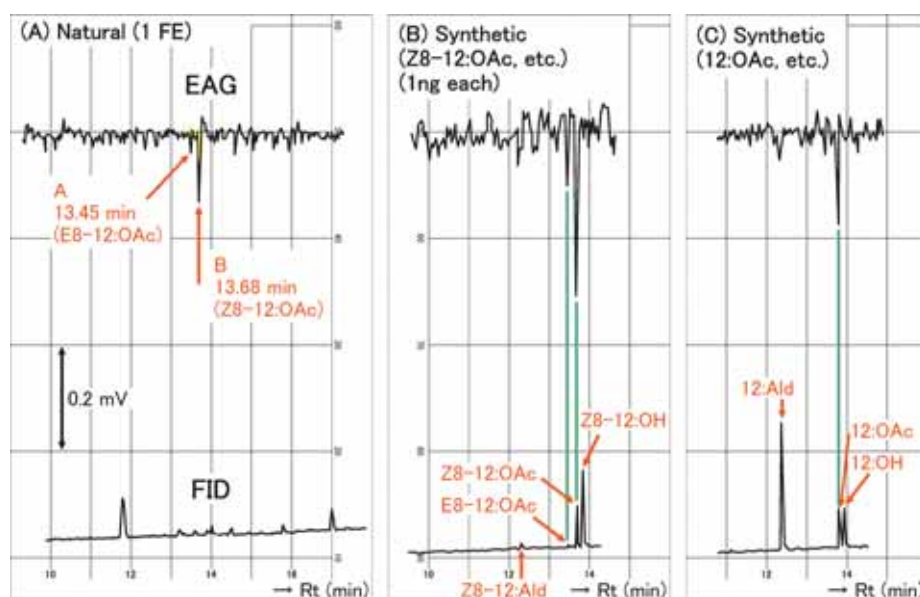


Fig. 1. Analyses of the sex pheromone components of *Grapholita inopinata* by GC-EAD. (A) GC-EAD of the pheromone extract (1 FE) conducted with a flame ionization detector (FID) and an electroantennographic detector (EAD). (B) GC-EAD of synthetic standards (Z8-12:OAc, Z8-12:OH, Z8-12:Ald and E8-12:OAc, 1 ng each). (C) GC-EAD of synthetic standards (12:OAc, 12:OH and 12:Ald, 1 ng each).

GC-EAD により、リンゴコシキイ雌成虫の性フェロモン腺からの天然抽出物 (1 雌分) を用いて測定を実施した結果、2 つの EAG 活性ピーク (A: 13.45 min 及び B: 13.68 min) が見られ、前者のピークは弱く、後者のピークは強かった (Fig. 1A)。これら 2 つのピークは、平行して実施した合成標品の GC-EAD の結果、前者が E8-12:OAc の Rt (min) と一致し、後者が Z8-12:OAc の Rt と一致した (Fig. 1B)。また、合成標品のアセテート (Z8-12:OAc, E8-12:OAc 及び 12:OAc) には EAG 活性が見られた (Fig. 1B 及び 1C) が、これらアセテートのアルコール及びアルデヒド誘導体には活性がなかった。以上の結果、リンゴコシキイ雌成虫の性フェロモンの主成分は Z8-12:OAc であり、E8-12:OAc も含まれていることが示唆された。また、FID では検出できないことから、1 雌の保有量は 1 ng 以下と推測された。

GC-MS による 21 雌分の天然抽出物の測定結果のうち TIC (total ion chromatogram: 全イオンクロマトグラム) 及び抽出物中の Z8-12:OAc (11.043 min) の質量スペクトル (mass spectra) は Fig. 2A のとおりである。平行して実施した合成標品の GC-MS の結果、アセテートの Rt (12:OAc→10.50 min, E8-12:OAc→10.80 min 及び Z8-12:OAc→11.03 min) (Fig. 2B) 及びアルコールの Rt (12:OH→10.64 min, E8-12:OH→10.96 min 及び Z8-12:OH→11.19 min) を確認するとともに、 m/z (質量/電荷) 67, 69, 82, 83 等のマスキロマトグラム (mass chromatogram) で検出可能であることを確認したが、天然抽出物の TIC 及びマスキロマトグラム (Fig. 2C) において、これらの Rt と一致する 12:OAc, 12:OH, E8-12:OAc 及び Z8-12:OAc の存在が示唆

された。しかし、未知物質が多く含まれているため、TIC ではこれらの混合比は推定不能であった (Fig. 2A 上)。なお、抽出物中の Z8-12:OAc については、良好なスペクトル (分子イオン (m/z 226) は観測されず、M-60 (m/z 166) が特徴的) を測定することができた (Fig. 2A 下)。さらに、マスキロマトグラムにおける m/z 67, 82, 96 のイオン強度比から、Z8-12:OAc, E8-12:OAc, 12:OAc 及び 12:OH が約 4 : 1 : 4 : 4 で存在していることが示唆された (Fig. 2C)。また、主成分 Z8-12:OAc の含量は約 1 ng/21 FE (約 0.05 ng/♀) と推定された。

これまで、市販のナシヒメシキイ用性フェロモン剤 (フェロコン® OFM) がリンゴコシキイのリンゴ園でのモニタリングに有効である (田中ら, 2005) ことは分かっていたが、以上の分析結果から、本種の性フェロモンの主成分が、当該剤の主成分でもある Z8-12:OAc であることが実際に確認・裏付けされた。本種の性フェロモンの分析・同定についての報告はこれまでなく、初めてのことである。

2. 野外試験

誘引効果の比較試験の結果、No. 1 (フェロコン® OFM) に 12 頭と最も多くのリンゴコシキイ雄成虫が誘殺され (Table 1)、他の誘引源とは有意差が認められた。他の誘引源では、No. 4 (Z8-12:OAc と E8-12:OAc の 95 : 5 の混合品) に 4 頭誘殺されたのが最高であった。有意差の要因としては、誘引源 No. 1 については、Z8-12:OAc, E8-12:OAc 及び Z8-12:OH を 85.5 : 5.5 : 9 の混合比で担体当たり 0.11 mg 染み込ませてあり、誘引源 No. 2~No. 6 については 1 mg を染み込ま

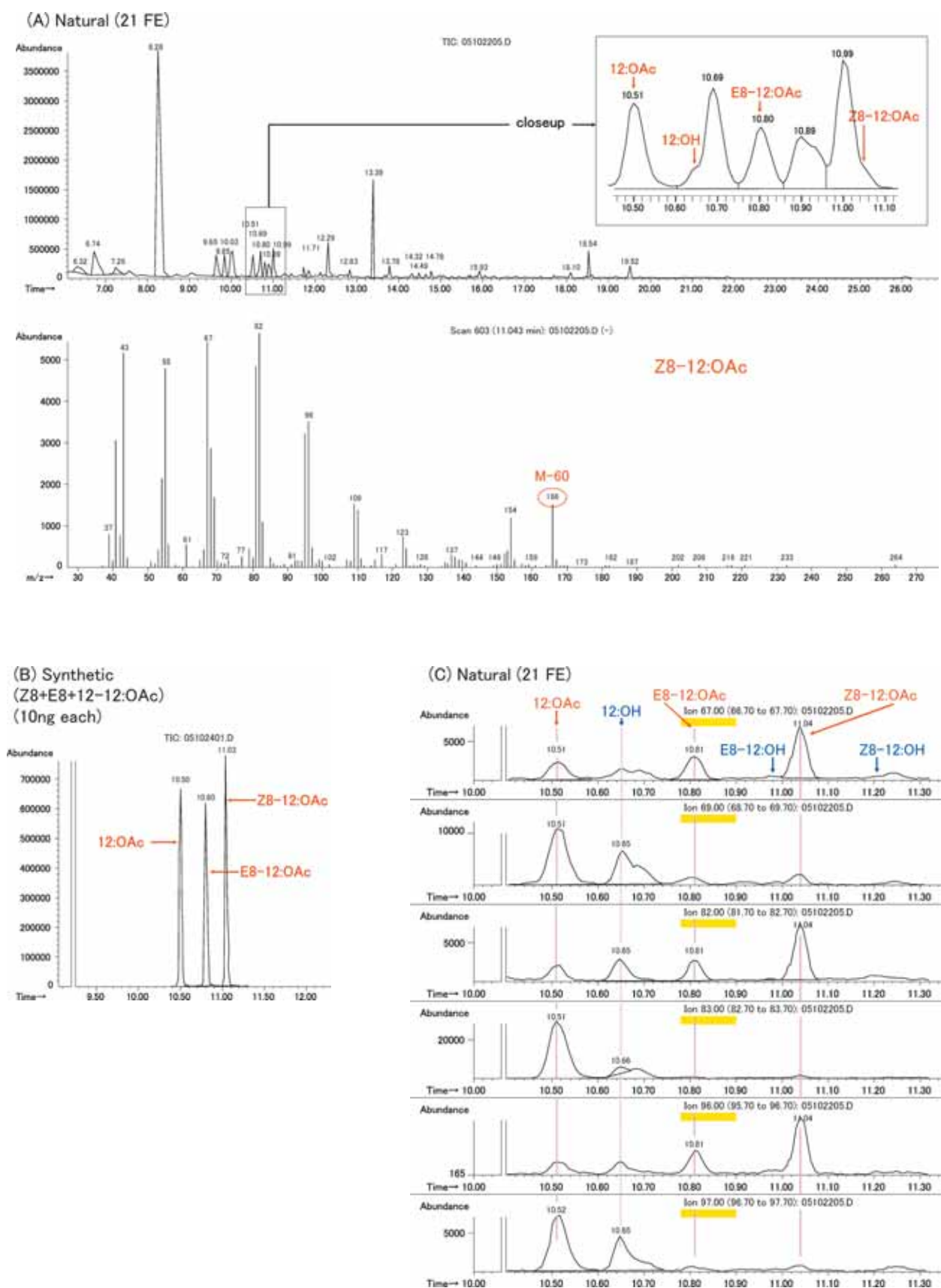


Fig. 2. Analyses of the sex pheromone components of *G. inopinata* by GC-MS. (A) GC-MS analysis of the extract (21 FE); total ion chromatogram (TIC) and mass spectra of Z8-12:OAc in the pheromone extract (21 FE). (B) GC-MS analysis of synthetic standards (12:OAc, E8-12:OAc, and Z8-12:OAc). (C) Mass chromatograms monitoring the diagnostic ions at m/z 67, 69, 82, 83, 96 and 97 for 12:OAc, 12:OH, E8-12:OAc, E8-12:OH (not detected), Z8-12:OAc, and Z8-12:OH (not detected).

Table 1. Field attraction of *Grapholita inopinata* males by lures impregnated with synthetic acetates (Z8-12:OAc, E8-12:OAc, and 12:OAc) identified from the females and lures of Pherocon® OFM in Ina-city, Nagano Pref. from Jul. 21 to Sep. 15 in 2005.

Period of pheromone trap survey	Lure No.	Lure components (mg/rubber septum)				Captured males of <i>G. inopinata</i> /trap						
						Points ²⁾						
		Z8-12:OAc	E8-12:OAc	12:OAc	Z8-12:OH	A	B	C	D	E	Total	
I (From July 22 to August 9 in 2005)	1 ¹⁾	0.094	0.006	0	0.01	0	3	1	0	0	4	
	2	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	1.00	0.10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	1.00	0.05	0	0	0	2	1	0	0	3	
	5	1.00	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	1.00	0.05	0.05	0	0	0	0	0	0	0	
	Cont.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
II (From August 9 to August 23 in 2005)	1	0.094	0.006	0	0.01	2	0	2	0	2	6	
	2	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	1.00	0.10	0	0	1	0	0	0	0	1	
	4	1.00	0.05	0	0	0	0	1	0	0	1	
	5	1.00	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	1.00	0.05	0.05	0	0	0	0	0	0	0	
	Cont.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
III (From August 23 to September 15 in 2005)	1	0.094	0.006	0	0.01	1	0	1	0	0	2	
	2	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	1.00	0.10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	1.00	0.05	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	1.00	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	1.00	0.05	0.05	0	0	0	0	0	0	0	
	Cont.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total												Other Olethreutinae ⁴⁾
	1	0.094	0.006	0	0.01	3	3	4	0	2	12 ³⁾	7
	2	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	3	1.00	0.10	0	0	1	0	0	0	0	1	41
	4	1.00	0.05	0	0	0	2	2	0	0	4	11
	5	1.00	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	6	1.00	0.05	0.05	0	0	0	0	0	0	0	5
Cont.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

¹⁾ Lure No. 1 is Pherocon® OFM (TRÉCÉ, Inc.) impregnated with 0.11 mg of Z8-12:OAc, E8-12:OAc and Z8-12:OH in a septum in a ratio of 85.5 : 5.5 : 9.

²⁾ Points of survey: A: Hashimoto Lodge, Todai (Garden). B: North of Todai River (Forest). C: West of Ogro River (Forest). D: East of Ogro River (Forest). E: Mt. Nyugasa (Pasture).

³⁾ The Value is significantly different at $P < 0.05$ by Turkey's test.

⁴⁾ Number of captured males of other Olethreutinae spp. were *Grapholita dimorpha*—50 males, *G. tenebrosana*—5 males and *Pammene nemorosa*—14 males.

せて試験を実施したことから、濃度の差が影響を与えた可能性はある。また、誘引源 No. 1 と No. 4 の Z8-12:OAc と E8-12:OAc の混合比が近似であることから、両成分の当該混合比が有効であることが推測される。ただし、同様の混合比 (91 : 4.5) の誘引源 No. 6 には本種の誘殺はなかったことから、12:OAc が阻害因子となった可能性がある。なお、誘引源 No. 1 に含まれる Z8-12:OH については、GC-EAD では活性が認められず、GC-MS でも存在が示唆されなかったことから、誘引効果には関係ないものと思われる。今後、フェロモン剤の有効性をさらに高めるためには、Z8-12:OAc, E8-12:OAc, 12:OAc 及び 12:OH が約 4 : 1 : 4 : 4 という本種の性フェロモン分析結果に基づき、野外試験及び室内試験

Table 2. Results of pheromone trap survey to evaluate effective attracting area of Pherocon® OFM on *G. inopinata* (August 23–September 15 in 2005).

Points of survey ¹⁾	Captured males/trap by the distance from <i>M. toringo</i> tree infested with <i>G. inopinata</i>				
	0 m	5 m	10 m	15 m	20 m
B	28	12	—	—	—
D	7	4	3	0	3

¹⁾ See Table 1.

を行っていく必要があると考えられる。

フェロモン剤の有効範囲に関する予備的な試験の結果、本種が発生しているズミの樹から 10 m 以上離れる

と誘引頭数は減少するが、20 m でも3頭の誘引があったことから、最低でも20 m までは誘引可能な範囲であることが判明した (Table 2)。当該データは、モニタリングのためのトラップ設置の参考になると考えられるが、反復試験及び発生源から20 m 以上に設置した場合の試験を行う必要があると思われる。

引用文献

- 安藤 哲 (2001) 昆虫フェロモン研究の到達点と展望. 日本農薬学会誌 26: 300-304.
- 安藤 哲 (2002) 昆虫フェロモンの多様性と受容機構. *Aroma Research (Journal of Aroma Science and Technology)* 9(3(1)): 26-33.
- Ando, T., S. Yoshida, S. Tatsuki, and N. Takahashi (1977) Sex Attractants for Male Lepidoptera. *Agric. Biol. Chem.* 41(8): 1485-1492.
- Ando, T., S. Inomata, and M. Yamamoto (2004) Lepidopteran Sex Pheromones. *Topics in Current Chemistry* 239: 51-96.
- Buser, H.-R., H. Arn, P. Guerin, and S. Rauscher (1983) Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts. *Anal. Chem.* 55: 818-822.
- Inomata, S., A. Watanabe, M. Nomura, and T. Ando (2004) Mating Communication Systems of the Plusiinae Species Distributed in Japan: Identification of the Sex Pheromones and Field Evaluation. *J. Chem. Ecol.* 31(6): 1429-1442.
- 駒井古実 (1976) モモ, リンゴ, ナシの果実に食入するシンクイムシ類の見分け方. 植物防疫 30(6): 245-252.
- 奥 俊夫 (2003) 日本農業害虫大事典 (梅谷献二・岡田利承編). 全国農村教育協会, 東京: 451-452.
- Struble, D. and H. Arn (1984) Combined Gas Chromatography and Electroantennogram Recording of Insect Olfactory Responses, pp. 161-178, in H. E. Hummel and T. A. Miller (eds.). *Techniques in Pheromone Research*. Springer-Verlag, New York.
- 田中福三郎 (1993) ナシヒメシンクイ. 性フェロモン剤等使用の手引き. 日本植物防疫協会, 東京: 35-37.
- 田中道典, 阿部清文, 齊藤 薫, 佐藤肅也, 久高 充, 開米啓三, 岡崎一博 (2005) 青森, 福島及び宮城県の一部地域におけるリンゴコシンクイ *Grapholita inopinata* (HEINRICH) の発生調査. 植防研報 41: 25-30.
- Vang, L. V., S. Inomata, M. Kinjo, F. Komai, and T. Ando (2005) Sex Pheromones of Five Olethreutine Species (Lepidoptera: Tortricidae) Associated with the Seedlings and Fruits of Mangrove Plants in the Ryukyu Islands, Japan: Identification and Field Evaluation. *J. Chem. Ecol.* 31(4): 859-878.
- Witzgall, P., T. Lindblom, M. Bengtsson, and M. Tóth (2004) The Pherolist. (online), available from <<http://www-pherolist.slu.se/pherolist.php>>, (accessed 2006-07-31).