リンゴコカクモンハマキの性フェロモンの再検討

杉江 元*・玉木佳男*・白崎将英**・北村泰三***¹⁾

* 農業環境技術研究所

** 青森県リンゴ試験場

*** 長野県果樹試験場

Further Studies on the Sex Pheromone of the Summer Fruit Tortrix Moth, *Adoxophyes orana fasciata*. Hajime SUGIE, Yoshio TAMAKI (National Institute of Agro-Environmental Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan), Shoei SHIRASAKI (Aomori Apple Experiment Station, Kuroishi, Aomori 036-03, Japan) and Taizo KITAMURA²⁾ (Nagano Fruit Tree Experiment Station, Suzaka, Nagano 382, Japan). *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **28**: 156-160 (1984)

The sex pheromone of the summer fruit tortrix moth (*Adoxophyes orana fasciata*) was extracted from 22,000 virgin females and the attractiveness of fractionated samples was tested in a field cage. The two components, (Z)-9- and (Z)-11-tetradecenyl acetate, which were reported as the sex pheromone of this insect accounted for the whole attractiveness of the crude extract and no other compounds increased the attractiveness of the two-component mixture. In field tests, the two-component mixture (1 mg in a plastic capsule) was as attractive as three virgin females. Moreover, the attractiveness of the two-component mixture was not improved by the addition of (E)-11-tetradecenyl acetate and (Z)-11-hexadecenyl acetate which were detected in the female extract. (Z)-9- and (Z)-11-tetradecenols, the reported sex pheromone components of the European subspecies (*Adoxophyes orana*), and 10-methyldodecyl acetate and (Z)-9-dodecenyl acetate which were present in the females of the smaller tea tortrix moth (*Adoxophyes* sp.) had no effect on male trapping. However the addition of more than 0.3% of (E)-9-teradecenyl acetate inhibited the attractiveness of the two-component mixture.

緒 言

リンゴコカクモンハマキ (*Adoxophyes orana fasciata* F. VON R.) の性フェロモンはすでに TAMAKI et al. (1971 b) によって (Z)-9-tetradecenyl acetate と (Z)-11-tetradecenyl acetate からなることが報告されている。この構造決定は、フラスコ内での雄蛾の興奮を調べるという生物検定法を用いて行われた。同様の生物検定法を用いて本種の近縁種であるチャノコカクモンハマキ (*Adoxophyes* sp.) の性フェロモンも上記の2種の化合物であることが明らかにされていたが (TAMAKI et al., 1971 a), その後、再検討によりこの性フェロモン微量成分として (E)-11-tetradecenyl acetate と 10-methyldodecyl acetate が上記の主成分に加えて構造決定された (TAMAKI et al., 1979)。チャノコカクモンハマキの場合、主成分にこの2成分を加えることにより野外試験において誘引活性は

5~70 倍強くなる (TAMAKI et al., 1979)。一方、リンゴコカクモンハマキの場合は誘引活性が弱かったり (伊藤・中沢, 1973), 精製した物質では誘引活性が強まる (本間, 1976) など、誘引性が安定しない傾向が見られる。また、用いた生物検定法がチャノコカクモンハマキの初期の研究と同じで、雄蛾の興奮のみに基づいたものであり、フェロモン成分の一部を見落としている可能性が考えられることから、リンゴコカクモンハマキについてもその性フェロモン成分の再検討が必要であると考えられた。そこで、チャノコカクモンハマキの微量成分の検定に用いられた、野外網室に雄蛾を放ち試料の誘引力を調べる生物検定法を用い、リンゴコカクモンハマキの性フェロモンの再検討を行った。また、ヨーロッパに分布する別亜種 (*Adoxophyes orana* F. VON R.) で報告された物質の誘引活性に対する影響についても検討した。

1) 現在 長野県南信農業試験場

2) Present address: Nanshin Agricultural Experiment Station, Takamori-machi, Shimoina-gun, Nagano 399-31, Japan.
1984年4月5日受領 (Received April 5, 1984)

材料と方法

1. 昆虫

リンゴコカクモンハマキは人工飼料 (TAMAKI, 1966) により 25°C, 16 時間明期-8 時間暗期という条件で飼育した。さなぎの段階で雌雄を分け、羽化容器 (直径 22 cm×13 cm) に入れ、それぞれの条件で羽化させた。

2. 性フェロモンの抽出

20°C で 16 時間明期-8 時間暗期という条件で雌を羽化させ、2~3 日目の明期の始まる直前にクロマト管 (内径 4 cm) に入れ、エーテルを注ぎ込み約 2 分間浸漬した後、濾過して抽出物を得た。抽出物は使用するまで冷蔵庫中に保存した。

3. 生物検定

野外網室 (5.5×10.5×2 m) に野外条件下で羽化させた 2~3 日目の雄を 200~700 頭放飼した。50 雌当量分の各画分を 1 mg の tripalmitin とともにしみ込ませた綿ローブを粘着板を用いたトラップ (25×40×5.5 cm, 武田薬品工業 (株)) にのせ、夕方に設置し、翌朝誘殺された雌蛾の数を調べた。一つの試料に 3 トラップを用い、最大 12 個のトラップを野外網室に地上 1 m の高さに設置した。

4. カラムクロマトグラフィ

フロリシル (100 mesh) を用いたカラムクロマトグラフィを CARROLL (1961) の方法に従って行った。高速液体クロマトグラフィ (HPLC) ゲル濾過カラムとして Shodex GPC A-801 (8 mm×50 cm) を 2 本用いクロロホルムを溶媒として 1 ml/min の流速で溶出した。シリカゲルカラムとして Silicapack HP-250 (2.5 mm×25 cm, 昭和電工 (株)) を、硝酸銀シリカゲルカラムは HEATH et al. (1975) の方法により作ったものを用いた。前者は 0.5% エーテル/ヘキサンにより 0.5 ml/min, 後者は 3% エーテル/ヘキサンにより溶出した。

5. ガスクロマトグラフィ (GC)

FID の備わった島津 GC-5A ガスクロマトグラフを用いた。CHDMS をコーティングしたガラスキャピラリーカラム (WCOT, 0.25 mm i.d.×120 m) を 180°C, 10% Thermon 1000 (Chromosorb W AW HMDS, 80-100 mesh) を 200°C のカラム温度で用いた。また、スプリット比は 100:1 として、窒素を 16 cm/秒の線速度で流した。

6. 質量分析 (GC-MS)

島津 LKB-9000 ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた。ガラスカラム (3 mm i.d.×1 m) に 10% Thermon

1000, 1% OV-1 (Chromosorb W AW HMDS, 80-100 mesh) をそれぞれ 210, 190°C のカラム温度で用いた。ヘリウムをキャリアーガスとした。セパレーター部、イオン源の温度はそれぞれ 250, 270°C で、イオン化電圧は 70 eV とした。分析はマスプロットグラフィにより 6 秒間隔で行った。

7. 野外試験

青森県と長野県のリンゴ園においてリンゴコカクモンハマキの誘引試験を行った。合成品のヘキサノール溶液をプラスチックキャップ (8 mm i.d.×17.8 mm, YK-1, 安元化成 (株)) にしみ込ませたものを誘引源として、生物検定と同様の粘着トラップを使った。

8. 合成品

(Z)-9-tetradecenyl acetate (Z9-14Ac), (E)-9-tetradecenyl acetate (E9-14Ac), (Z)-11-tetradecenyl acetate (Z11-14Ac), (E)-11-tetradecenyl acetate (E11-14Ac) は硝酸銀シリカゲルカラムによりベンゼン・石油エーテルの溶媒系により精製した。純度は CHDMS キャピラリーカラムを用いた GC 分析により、99.9% 以上であることを確認した。(Z)-11-hexadecenyl acetate (Z11-16Ac) には 3% の E 体が含まれていた。また、ヨーロッパ亜種で報告されている (Z)-9-tetradecenol (Z9-14OH), (Z)-11-tetradecenol (Z11-14OH) はそれぞれの酢酸エステルを加水分解して調整した。チャノコカクモンハマキの性フェロモン類緑化合物として報告されている (Z)-9-dodecenyl acetate (Z9-12Ac) (野口ら, 1982) は信越化学 (株) から、チャノコカクモンハマキの性フェロモン成分である 10-methyldodecyl acetate (10me-12Ac) は武田薬品 (株) からそれぞれ提供されたものを使用した。Z9-12Ac には 3% の E 体が含まれていた。

結 果

1. 活性成分の精製

22,000 頭分の処女雌抽出物を無水硫酸ナトリウムで脱水したのちロータリーエバポレーターを用い 35°C 以下で濃縮した。これをフロリジルカラムにかけ、ヘキサン, 5% エーテル/ヘキサン, 15% エーテル/ヘキサン, 25% エーテル/ヘキサン, 2% メタノール/エーテル, 4% 酢酸/エーテルで溶出した。5% エーテル/ヘキサン溶出画分に強い活性がみられ、他の画分をこれに加えても誘引力は変わらなかった (Table 1A)。この画分をゲル濾過カラムを用いた HPLC により二つの画分に分けた。トリグリセリドを含む高分子画分とそれ以後に溶出される低分子画分である。このうち、後者にのみ誘引性

Table 1. Attractiveness of fractions of female extract to summer fruit tortrix males in a field cage

Test	Fraction	No. of males caught/trap/night (mean±standard deviation)
A	Florisil column	
	5% ether/hexane	16.7±10.7
	All	11.0± 8.2
B	GPC HPLC	
	Small molecules	27.3±22.5
	Large molecules	2.3± 0.6
	Whole	22.0±17.1
C	Silica gel HPLC	
	B	8.7± 3.5
	Whole	6.3± 3.8
D	AgNO ₃ -silica gel HPLC	
	F-3	15.7± 7.4
	Whole	13.3± 8.5
	Crude extract	8.0± 6.0
	F-3	20.3± 7.4
	Z9-14Ac+Z11-14Ac (82 : 18)	22.3± 4.1
	Crude extract	19.0± 2.6

See text for details.

がみられた (Table 1B)。次いで、シリカゲルカラムを用いた HPLC で精製を進めた。このカラムから methyl myristate と dodecyl acetate (12Ac) はそれぞれ 9～11.5 分および 14～17 分のあいだに溶出されたので、A 画分として 0～12 分、B 画分として 12～36 分に溶出される 2 画分に分けたが、B 画分に誘引活性がみられた (Table 1C)。これを硝酸銀シリカゲルカラムによる HPLC にかけた。tetradecyl acetate (14Ac), E11-14Ac, Z11-14Ac はそれぞれ 5～8, 12～14, 21～33 分に溶出されたので、飽和、E 体、Z 体を含む F-1, F-2, F-3 の 3 画分として 0～10.5 分, 10.5～19.5 分, 19.5～42 分の間の溶出液を集めた。3 番目の画分のみに活性がみられた (Table 1D)。

2. 活性成分の同定

この活性画分をキャピラリーカラムを用いた GC で分析したところ 26.70, 27.95, および 49.23 分にピークが検出され、これらはそれぞれ Z9-14Ac, Z11-14Ac, Z11-16Ac の溶出時間に一致した。また、Z9-14Ac と Z11-14Ac の比は 83.7 : 16.3 で合計量は 1 頭当たり 7 ng と計算され Z11-16Ac の量はその 1.6% であった。主成

Table 2. Attractiveness of the two-component mixture (Z9-14Ac : Z11-14Ac=82 : 18, total 1 mg) of the summer fruit tortrix moth pheromone and effect of addition of their geometrical isomers on trapping of males in the field

Test	Lure	No. of males caught/trap/night*			
		Aomori		Nagano	
A		June 9-14, 1982			
	3 virgin females	4.3	a	—	
	Two-component mixture	7.1	a	—	
B		June 7-14, 1979		May 23-June 6, 1979	
	Two-component mixture	10.1	a	4.1	a
	+E11-14Ac (1 μ g)	9.6	a	3.0	a
	+E11-14Ac (3 μ g)	10.6	a	3.4	a
	+E11-14Ac (10 μ g)	8.7	a	7.0	a
	+E11-14Ac (30 μ g)	7.0	a	3.7	a
	+E9-14Ac (1 μ g)	8.3	a	3.8	a
	+E9-14Ac (3 μ g)	6.4	a b	2.1	b
	+E9-14Ac (10 μ g)	4.4	b	1.1	b
	+E9-14Ac (30 μ g)	1.3	c	1.9	b
	+E11-14Ac (1 μ g)+E9-14Ac (1 μ g)	6.5	a	5.4	a
	+E11-14Ac (3 μ g)+E9-14Ac (3 μ g)	6.7	a	2.2	b
	+E11-14Ac (10 μ g)+E9-14Ac (10 μ g)	3.7	b	1.1	b
	+E11-14Ac (30 μ g)+E9-14Ac (30 μ g)	1.9	c	0.4	b
C		June 4-17, 1982			
	Two-component mixture	8.8	a	—	
	+Z11-16Ac (30 μ g)	3.8	a	—	
	+Z11-16Ac (100 μ g)	1.8	a	—	
	+Z11-16Ac (300 μ g)	4.3	a	—	

* Means followed by the same letters are not significantly different from each other at the 5% level with DUNCAN's new multiple range test. Data were transformed to $\sqrt{x+0.5}$ for analysis.

Table 3. Effect of several related compounds added to the two-component mixture (Z9-14Ac: Z11-14Ac=82:18, total 1 mg) on the trapping of summer fruit tortrix males in the field (Aomori)

Lure	No. of males caught/ trap/night ^{a)}
Aug. 25-Sep. 9, 1979	
Two-component mixture	4.7
+10me-12Ac (3 μ g)	3.8
+10me-12Ac (10 μ g)	5.1
+10me-12Ac (30 μ g)	5.3
+10me-12Ac (100 μ g)	3.4
+10me-12Ac (3 μ g)+E11-14Ac (3 μ g)	5.2
+10me-12Ac (10 μ g)+E11-14Ac (10 μ g)	5.7
+10me-12Ac (30 μ g)+E11-14Ac (30 μ g)	4.6
+10me-12Ac (100 μ g)+E11-14Ac (100 μ g)	3.0
June 4-17, 1982	
Two-component mixture	8.8
+Z9-14OH (3 μ g)	2.5
+Z9-14OH (10 μ g)	2.4
+Z9-14OH (30 μ g)	2.0
+Z11-14OH (3 μ g)	2.5
+Z11-14OH (10 μ g)	2.0
+Z11-14OH (30 μ g)	2.5
+Z9-12Ac (3 μ g)	2.3
+Z9-12Ac (10 μ g)	4.2
+Z9-12Ac (30 μ g)	7.1

* Values are not significantly different from each other at 5% level with DUNCAN's new multiple range test. Data were transformed to $\sqrt{x+0.5}$ for analysis.

分の量を 0.35 μ g に一定して、粗抽出物、合成品、F-3 の誘引活性を比較するとこれらの間での差はみられず、F-3 の活性は Z9-14Ac と Z11-14Ac の 2 成分で説明できると考えられた (Table 1D)。

キャピラリーカラムによる F-2 画分の分析から主成分の 2.2% の E11-14Ac が検出されたが、E9-14Ac は検出されなかった。GC-MS による分析の結果から F-1 に 1.0% の hexadecyl acetate, 1.4% の 14Ac, 0.6% の 12Ac の存在が推定されたが、チャノコカクモンハマキに存在した 10 me-12Ac と Z9-12Ac は検出されなかった。この場合の検出感度は主成分の約 0.2% である。

3. 野外誘引試験

処女雌と 2 成分混合物との比較では誘引性に差がみられなかった (Table 2A)。処女雌抽出物中に検出された E11-14Ac と Z11-16Ac, また Z9-14Ac の幾何異性体の E9-14Ac を 2 成分の 82:18 の混合物に濃度を変えて加えた場合、E11-14Ac は誘引に影響を与えないが、E9-14Ac は濃度に比例した誘引阻害効果を与えた (Table 2B, C)。10 me-12Ac, Z9-12Ac, Z11-16Ac, Z9-14OH お

よび Z11-14OH のいずれにも、これらの添加によって 2 成分混合物の誘引性に影響は見られなかった (Table 3)。

考 察

リンゴコカクモンハマキの性フェロモンは網室内での各画分の誘引試験の結果と野外での 2 成分混合物と処女雌との誘引力の比較の結果から、すでに報告されている以外の成分としては誘引性を増加させるものはないと考えられた。そして、リンゴコカクモンハマキの発生予察用性フェロモン剤中の Z9-14Ac に含まれる E 体の含有量を常に 0.3% 以下にすることが安定した誘引性のためには重要なことであることが示された。すなわち E9-14Ac は微量存在するだけで誘引阻害性を示すことが明らかとなり、本間 (1976) の用いた合成品は精製により E9-14Ac を除いたことで活性が強まり、伊藤・中沢 (1974) の場合にはそれが存在していて誘引力が弱かったとすると説明できる。

チャノコカクモンハマキとリンゴコカクモンハマキは野外条件下でいずれの処女雌も同種の雄に対して種特異的な誘引性を示す (HOMMA and TAMAKI, 1976)。この種特異性は両種の性フェロモン成分である Z9-14Ac と Z11-14Ac の混合比の違いや両種の交尾時刻の違いだけでは十分な説明ができず、上記成分以外の付加成分の存在が推定されていた (SATO and TAMAKI, 1977)。チャノコカクモンハマキの微量性フェロモン成分である 10 me-12Ac をリンゴコカクモンハマキの雌がもっていないという点から、チャノコカクモンハマキの雄がリンゴコカクモンハマキの雌にほとんど誘引されないことは説明できる。しかし、リンゴコカクモンハマキの雄がチャノコカクモンハマキの雌にほとんど誘引されない点については、さらに検討を要する問題として残っている。

ヨーロッパに分布するリンゴコカクモンハマキでは、12Ac, Z9-12Ac, 14Ac, Z11-16Ac が性フェロモン類縁化合物として、E11-14Ac, Z9-14OH, Z11-14OH が微量な性フェロモン成分として報告されているが (GUERIN et al., 1982)、日本に分布するリンゴコカクモンハマキの場合これらの物質が誘引活性に影響しないことは、両種が別亜種であることを性フェロモンの面からも裏づけたものとなろう。

摘 要

リンゴコカクモンハマキ処女雌抽出物からその性フェロモンを誘引性を指標とする生物検定法により再検討し

た。すでに性フェロモン成分として報告されている (Z)-9-および (Z)-11-tetradecenyl acetate 以外に誘引性に関与する成分は検出されなかった。また野外条件下でこの2成分混合物は処女雌に匹敵する誘引性を示した。抽出物から検出された (E)-11-tetradecenyl acetate, (Z)-11-hexadecenyl acetate, ヨーロッパ亜種の性フェロモン成分として報告されている (Z)-9-および (Z)-11-tetradecenol として、チャノココカモンハマキに含まれる 10-methyldodecyl acetate と (Z)-9-dodecenyl acetate のいずれにも誘引性に影響を与えるものはなかった。しかし、(E)-9-tetradecenyl acetate が2成分混合物の0.3%以上の濃度で含む場合強い誘引阻害性を示したところから、(Z)-9-tetradecenyl acetate の純度の高いことが、リンゴココカモンハマキの強い誘引性のために必要であることが明らかとなった。

引用文献

- CAROLL, K.K. (1961) Separation of lipid classes by chromatography on Florisil. *J. Lipid Res.* **2** : 135—141.
- GUERIN, P.M., H. ARN, H.R. RUSER and P.J. CHARMILLOT (1982) The sex pheromone of *Adoxophyes orana*—preliminary findings from a reinvestigation. *Med. chim., Versailles*, 16-20 Nov., 1981, *Les Colloquies de l'INRA* **7** : 267—269.
- HEATH, R.R., J.H. TUMLINSON, R.E. DOOLITTLE and A.T. PROVEAUX (1975) Silver nitrate-high pressure liquid chromatography of geometrical isomers. *J. Chromatogr. Sci.* **13** : 380—382.
- 本間健平 (1976) 合成性フェロモンによるリンゴココカモンハマキの誘引効力。「害虫の総合的防除法に関する研究」推進会議資料。農林水産技術会議, pp. 107—110.
- HOMMA, K. and Y. TAMAKI (1976) Isolating factors between the smaller tea tortrix and the summer fruit tortrix (Lepidoptera : Tortricidae) II. Sexual isolation. *Appl. Ent. Zool.* **11** : 202—208.
- 伊藤喜隆・中沢 斉 (1974) フェロモン利用に関する研究. 昭和49年度 フェロモンに関する試験成績. 日本植物防疫協会編, pp. 84—86.
- 野口 浩・杉江 元・玉木佳男・大政義久 (1982) コカモンハマキ2種の処女雌が放出する性フェロモンおよび関連化合物. 第26回応動昆虫大会 p. 26 [講要].
- SATO, R. and Y. TAMAKI (1977) Isolating factors between the smaller tea tortrix and the summer fruit tortrix (Lepidoptera : Tortricidae) IV. Role of the pheromonal components, (Z)-9- and (Z)-11-tetradecen-1-ol acetates. *Appl. Ent. Zool.* **12** : 50—59.
- TAMAKI, Y. (1966) Mass rearing of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes orana* FISHER VON RÖSLERSTAMN, on a simple artificial diet for successive generations (Lepidoptera : Tortricidae). *Appl. Ent. Zool.* **1** : 120—124.
- TAMAKI, Y., H. NOGUCHI, T. YUSHIMA and C. HIRANO (1971 a) Two sex pheromones of the smaller tea tortrix : Isolation, identification, and synthesis. *Appl. Ent. Zool.* **6** : 139—141.
- TAMAKI, Y., H. NOGUCHI, H. SUGIE, R. SATO and A. KARIYA (1979) Minor components of the female sex-attractant pheromone of the smaller tea tortrix moth (Lepidoptera : Tortricidae) : Isolation and identification. *Appl. Ent. Zool.* **14** : 101—113.
- TAMAKI, Y., H. NOGUCHI, T. YUSHIMA, C. HIRANO, K. HOMMA and H. SUGAWARA (1971 b) Sex pheromone of the summer fruit tortrix : Isolation and identification. *Kontyû* **39** : 338—340.