

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780027

研究課題名（和文） アブラナ科植物のモンシロチョウ誘引成分の同定との生物間相互作用の解明

研究課題名（英文） Identification of *Pieris rapae* attractant components in Brassicaceae plants and elucidation of biological interaction both *P. rapae* and Brassicaceae plants.

研究代表者

池浦 博美（IKEURA HIROMI）

明治大学・農学部・助教

研究者番号：10440158

研究成果の概要（和文）：

アブラナ科植物の重要害虫であるモンシロチョウの誘引トラップの開発を目指し、モンシロチョウメス成虫の誘引成分を特定すること、ならびにその生物間相互作用を解明することを目的とした。メス成虫は5種のアブラナ科植物中キャベツを最も好むことが判明し、そのキャベツ抽出液に含まれる4誘引成分を推定した。また、1日のキャベツ揮発性成分放出時間およびメス成虫最大飛来時間はほぼ同時間帯であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

I focused on the knowledge needed to develop a control method against a destructive insect, *Pieris rapae* crucivora, which is a major pest of the Brassicaceae family that includes many economically important vegetable crops, and elucidation of biological interaction both *P. rapae* and Brassicaceae plants. Adult females were preferred cabbage to other 4 kinds of Brassicaceae plants. In addition, 4 attractants in cabbage extract were estimated. Moreover, it was clarified that time emitted maximum volatile concentration from cabbage was almost same as maximum preference percentage of *P. rapae*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：モンシロチョウ、揮発性成分、誘引成分

1. 研究開始当初の背景

食の安全や環境問題への関心が高まる中、化学農薬や化学肥料の使用による健康阻害と環境汚染が危惧されるようになり、無農薬・有機栽培、減農薬栽培への方向性が強ま

っているが、これらの農法は病害虫による被害が発生しやすく、特に、キャベツ、ハクサイ、ダイコンなどの主要野菜が多く含まれるアブラナ科植物では、モンシロチョウが大きな被害をもたらす害虫として問題となっ

いる。モンシロチョウメス成虫は、アブラナ科植物を特異的に探索・産卵し、その幼虫が同植物を食害することが知られている。これまでに、モンシロチョウに関する研究は、メス成虫に対するアブラナ科植物の産卵刺激物質および幼虫に対する摂食刺激物質や天敵昆虫の誘引成分などの研究が多くなされているが、メス成虫が産卵のためにアブラナ科植物を多くの植物の中からどのように探し出しているのか（探索機構）は未だ解明されていない。本研究は、申請者がメス成虫は寄主植物が揮散している揮発性成分を感知し、同植物を認識していることを見出したことから、揮発性成分を介したアブラナ科植物とモンシロチョウの直接的なコミュニケーションシステムの存在を想定させるものとなり、これを解明することは、化学生態学の領域への発展に大きく貢献するとともに、環境や人体に負荷のかからない生態防除法の開発に繋がるものと期待される。

2. 研究の目的

将来的に環境や人体に配慮した生物農薬の開発を目的とし、これまでの成果からモンシロチョウメス成虫を誘引するキャベツの揮発性成分を同定し、その選好強度を評価する。さらに、アブラナ科植物とモンシロチョウのコミュニケーションシステムを解明するために、キャベツが生育期間中に放出する揮発性成分の組成と放出量の変動とモンシロチョウの飛来選好性を調査する。以下の3項目について検討する。

1. アブラナ科植物のモンシロチョウメス成虫誘引成分の同定。
2. アブラナ科植物キャベツが生育期間中に放出する揮発性成分の組成並びに量的変動とモンシロチョウメス成虫の飛来選好性との相互関係の解析。
3. アブラナ科植物のモンシロチョウメス成虫揮発性誘引成分の品目間差異。

3. 研究の方法

1. アブラナ科植物のモンシロチョウメス成虫誘引成分の同定。
 - (1) アブラナ科植物キャベツのモンシロチョウ揮発性抽出物の分取ガスクロマトグラフィーを用いた分画
モンシロチョウの誘引効果を示したキャベツ揮発性抽出物を分取ガスクロマトグラフィーを用いて分画し、その分画物に対するモンシロチョウの誘引強度を測定することによって、誘引成分が含まれる分画を絞り込む。
 - (2) モンシロチョウの誘引効果を示した分画における誘引成分の同定
分取ガスクロマトグラフィーを用いた誘引効果を示した分画を、窒素气流ふきつけによ

って濃縮し、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて成分の同定を行う。さらに、その標準品を用いて誘引性を評価する。

- (3) モンシロチョウの誘引効果を有する成分の標準品混合液での誘引効果確認
誘引効果を有する成分の標準品混合液を用いて、キャベツ抽出液と同様の誘引効果を確認し、さらに、混合する濃度や組成比を検討することによって、最適濃度および最適組成を調査する。

2. アブラナ科植物キャベツが生育期間中に放出する揮発性成分の組成並びに量的変動とモンシロチョウメス成虫の飛来選好性との相互関係の解析。

- (1) アブラナ科植物キャベツの生育期間中の揮発性成分放出量の変動解析
明治大学圃場にアブラナ科植物キャベツを生育し、栽培期間中（定植期～収穫期）の一定期間毎のモンシロチョウメス成虫が活発に産卵行動を行う時間帯（8時～14時）にキャベツの揮発性成分を、揮発性成分吸着剤 Tenax TA 等で回収し、ジエチルエーテルで揮発性成分を溶出させた後、ガスクロマトグラフ質量分析計で定量および定性する。同時に、モンシロチョウメス成虫の飛来数および産卵数を計測する。

3. アブラナ科植物のモンシロチョウメス成虫揮発性誘引成分の品目間差異。

- (1) アブラナ科植物のモンシロチョウ揮発性誘引成分品目間差異の検討
キャベツを含めた主要なアブラナ科野菜、キャベツ、ブロッコリー、ハクサイ、チンゲンサイ、ダイコン5品種をポット栽培し、定植後から開花期まで10日毎のモンシロチョウメス成虫の産卵行動が活発となる時間帯（8時～14時）に各品目が放出する揮発性成分を回収する。
回収方法は、明治大学圃場にアブラナ科植物5品目を生育し、栽培期間中（定植期～収穫期）のモンシロチョウメス成虫が活発に産卵行動を行う時間帯（8時～14時）にアブラナ科植物5品目の揮発性成分、揮発性成分吸着剤 Porapak Q で回収し、ジエチルエーテルで揮発性成分を溶出させた後、ガスクロマトグラフ質量分析計で定量および定性する。同時時間帯に、モンシロチョウメス成虫の飛来数および産卵数を計測する。

4. 研究成果

1. アブラナ科植物のモンシロチョウメス成虫誘引成分の同定。
 - (1) アブラナ科植物キャベツのモンシロチョウ揮発性抽出物の分取ガスクロマトグラフィーを用いた分画
分取 GC 前のキャベツ揮発性抽出物処理区と

分取 GC 後の全捕集液処理区では雌成虫は、両処理区をそれぞれほぼ 50%と同程度選好した。また、全捕集液処理区と対照区（エーテル）では、雌成虫は、全捕集液を 75.0%と高く選好し、分取 GC によって捕集された捕集液中にキャベツ揮発性抽出物と同様の雌成虫揮発性誘引成分が含まれていることと、分取 GC 分画捕集によっても捕集前と同等の誘引効果が維持されたことが確認された。キャベツ揮発性抽出物の GC クロマトグラムを図 1 示した。

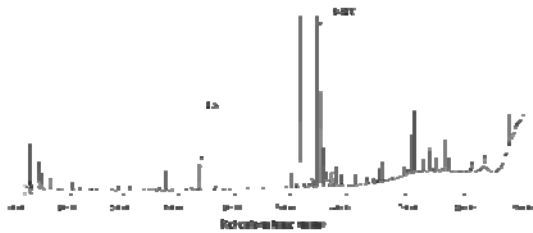


図 1 キャベツ抽出物の GC クロマトグラム

図 1 のクロマトグラムと保持時間をもとにキャベツ揮発性抽出物を I ~ III に 3 分割し、それぞれの分画に含まれる揮発性成分を、分取 GC を用いて捕集した。

雌成虫は、対照区 30% 前後に比べ分画液 I および II を、それぞれ 68.5%および 70.2%と高く選好した。分画 III は、対照区と同等の選好性を示したことから、この分画には雌成虫の誘引成分は存在せず、分画 I および II に誘引成分の存在が確認された。さらに、この分画 I および II をそれぞれ 4 つずつ A~D および E~H に分画し、各分画に含まれる揮発性成分を、分取 GC を用いて捕集した。分画 I をさらに分画した A、B、C および D の内、C および D の選好割合は、それぞれ 68.3%および 69.1%となり、雌成虫の選好性が認められたが、A および B では対照区とほぼ同等となり選好性は認められなかった。また、分画 C および D はそれぞれ分画 I に対する選好強度、とほぼ同水準で誘引効果を示し両分画に同等の活性強度をもつ成分が含まれていることが示唆された。分画 II を分画した E、F、G および H の内、E および G の選好割合が、それぞれ 68.1%および 65.0%となり雌成虫の選好性が認められたが、F および H では対照区とほぼ同等の選好強度となり選好性は認められなかった。また、分画 E および G の選好強度は分画 II に比べ低下したことから、両分画に含まれる誘引成分は共存することによる協力的効果を示す可能性が窺われた。これら選好性が認められた 4 分画 (C、D、E および G) をさらにそれぞれ 2 分画 (α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η および θ) し、各分画に含まれる揮発性成分を分取 GC で捕集し、雌成虫の選好性を調査した (図 2)。分画 C を 2 分画した α および β の選好性は、それぞれ

58.4%および 56.4%と対照区よりも若干高くなる傾向を示したものの、有意差は認められなかった。しかしながら、分画 C には高いモンシロチョウの選好性 (68.3%) が確認されていることから、両分画に含まれる誘引成分は共存することによって協力的に誘引効果を示すものと考えられる。分画 D を 2 分画した γ および δ の選好性は、それぞれ 60.8%および 66.8%であり、特に分画 δ で高い選好性が認められ、その値は分画 D とほぼ同水準であった。次に、分画 E を 2 分画した ϵ および ζ の選好性は、66.5%および 52.6%と、分画 ζ では誘引効果は無かったが、分画 ϵ での選好強度は高く、分画 E とほぼ同等の誘引効果を示した。分画 G を 2 分画した η および θ の選好性はそれぞれ 55.5%および 54.8%であり、両分画とも選好性は認められなかった。分画 G には比較的高い選好性 (65.0%) が認められていることから、 η および θ に含まれる誘引成分も分画 α および β と同様に共存することによって協力的に誘引効果を示すものと判断される。以上の結果から、分画 δ および ϵ に強い誘引成分が含まれること、また、 α および β 分画と δ および ϵ 分画に協力的に作用する誘引成分が含まれること、 γ 分画に誘引性が弱い成分が存在することが判明した。

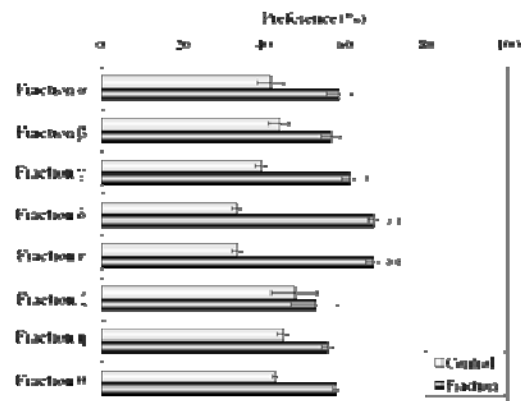


図 2 分取 GC による揮発性分画 $\alpha \sim \theta$ に対する雌成虫の選好性

(2) モンシロチョウの誘引効果を示した分画における誘引成分の同定

次にモンシロチョウメス成虫の高い選好性を示した分画 δ および ϵ に含まれるキャベツ揮発性成分を GC-MS で同定・定量し、対照区としたレタス揮発性成分と比較した (表 1)。

モンシロチョウの高い選好性を示した分画 δ および ϵ に含まれるキャベツ揮発性成分は、それぞれ 6 成分 (hexanenitrile、methylformate、(Z)-3-hexenyl- acetate、6-methyl-5-heptene-2-one、AITC、dimethyl trisulfide) および 6 成分 ((Z)-3-hexen-1-ol、

nonanal、3-methoxy-3-methylbutanol、3-butenyl isothiocyanate、(E,E)-2,4-heptadienal、acetic acid)であった。ここで、対照区としたレタスにはなくキャベツのみに含まれる成分を挙げると、4,4-dimethyl-3-oxopentanenitrile、4-methylpentanenitrile、methylthiocyanate、methylcyanide、hexanenitrile、6-methyl-5-heptene-2-one、allyl isothiocyanate、dimethyltrisulfide、3-methoxy-3-methylbutanol、3-butenyl isothiocyanateの10成分となり、これらの成分のいずれかが誘引効果を示す可能性を有すると判断された。

表1 キャベツ揮発性抽出液分画δおよびεと同分画のレタス揮発性成分

分画	RT ^z	Compounds	Concentration (ng) ^y	
			cabbage	lettuce
δ	29.0	hexanenitrile	173.1	n.d. ^x
	29.3	tridecane	n.d.	1
	29.8	methylformate	199.4	n.d.
	30.1	(Z)-3-hexenyl-1-acetate	145.1	n.d.
	30.1	2,3-octanedione	n.d.	5.7
	31.1	6-methyl-5-heptene-2-one	37.6	n.d.
	31.6	1-hexanol	n.d.	0.4
	31.8	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone	n.d.	4.9
	32.1	allyl isothiocyanate	332.8	n.d.
	33.1	dimethyltrisulfide	1735.4	n.d.
ε	33.5	(Z)-3-hexen-1-ol	248.8	66.3
	33.8	n-nonanal	223.1	12.5
	33.6	(E,E)-2,4-hexadienal	n.d.	1.5
	35.3	2-isopropyl-3-methoxypyrazine	n.d.	1
	35.8	3-methoxy-3-methylbutanol	1054.2	n.d.
	36.6	3-butenyl isothiocyanate	196.3	n.d.
	37.0	(E,E)-2,4-heptadienal	166.6	n.d. ^x
	37.1	acetic acid	1137	127.8

^zRetention time on DB wax.

^yConcentration of volatile compounds in cabbage and lettuce leaves.

^xNot determined.

(3) モンシロチョウの誘引効果を有する成分の標準品混合液での誘引効果確認
入手可能な標準品7成分混合液に対する雌成虫の選好性を図3に示した。混合液に対する雌成虫の選好割合は、66%と高く選好したが、分画δおよびεの選好性と比べ、ほぼ同水準の選好性を有することから、これら7成分がモンシロチョウメス成虫の誘引成分である可能性が高いことが示唆された。

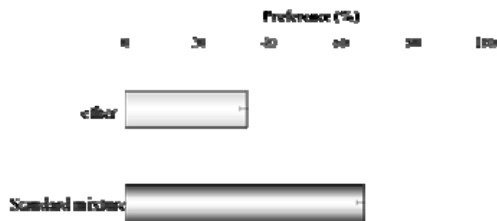
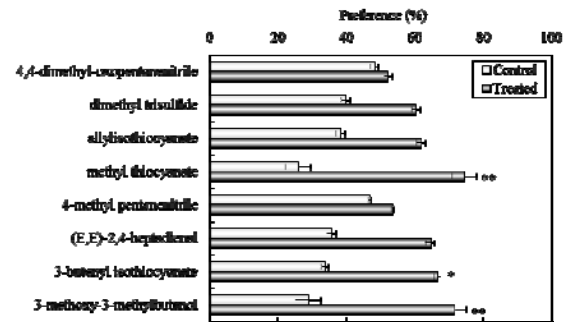


図3 標準品混合液に対する雌成虫の選好性

さらに、各標準品におけるメス成虫の選好性を検討するため、各標準品のキャベツ中含有濃度における選好性を調査した(図4)。各標準品に対する雌成虫の選好割合は、4,4-dimethyl-oxopentanenitrileで52%、dimethyl trisulfideで60%、allyl isothiocyanateで62%、methyl



thiocyanateで74%、4-methyl pentanenitrileで54%、(E,E)-2,4-heptadienalで64%、3-butenyl isothiocyanateで66%および3-methoxy-3-methylbutanolで71%であった。

図4 標準品7成分のキャベツ含有濃度におけるモンシロチョウメス成虫の選好性

特に、モンシロチョウメス成虫は、methyl thiocyanate、3-butenyl isothiocyanate、および3-methoxy-3-methylbutanolの3成分を有意に高く選好した。以上の結果よりキャベツ揮発性抽出液を最終的に32分画したのち、最も選好性の高かった分画は、分画δおよびεの2分画であった。この分画液をGC-MSによって同定・定量し、さらに対照区としたレタス揮発性成分を比較し、標準品で誘引性を評価したところ、3成分(methylthiocyanate、3-methoxy-3-methylbutanol、3-butenyl isothiocyanate)がモンシロチョウメス成虫誘引成分であることが判明した。

2. アブラナ科植物キャベツが生育期間中に放出する揮発性成分の組成並びに量的変動とモンシロチョウメス成虫の飛来選好性との相互関係の解析。

(1) アブラナ科植物キャベツの生育期間中の揮発性成分放出量の変動解析

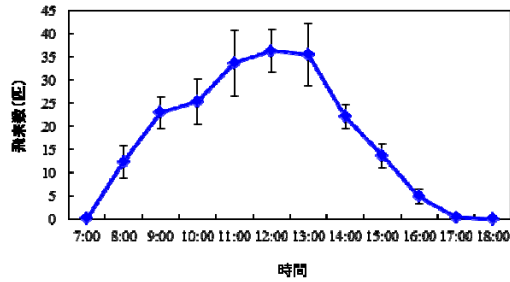


図 5 1 日におけるモンシロチョウのキャベツへの飛来数の推移

1 日におけるモンシロチョウメス成虫の選好性を図 5 に示す。1 時間ごとのメス成虫の飛来数は、朝 7 時で 0 匹であり、それ以降増加し、13 時で最大となり、13 時以降減少し、18 時では 0 匹となった。この結果から、1 日の中での飛来数は、大きく変動し、昼 13 時でピークを示すことが明らかとなった。

次に、1 日におけるキャベツ放出揮発性成分の総濃度の変動を図 6 に示す。1 日におけるキャベツの放出揮発性成分総濃度は、4 時 30 分から徐々に増加し、8 時 30 分で最大となり、それ以降減少し、18 時 30 分には早朝の 4 時 30 分と同レベルまで減少した。

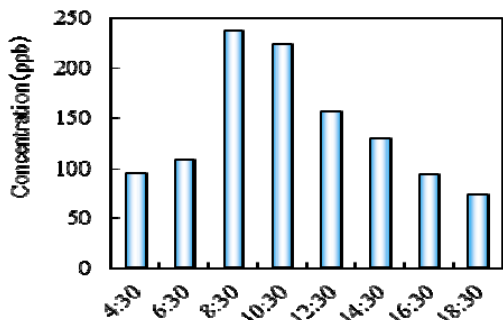


図 6 1 日におけるキャベツ放出揮発性成分総濃度の変動

さらに、各時間における放出揮発性成分に対するモンシロチョウの誘引性を図 7 に示す。

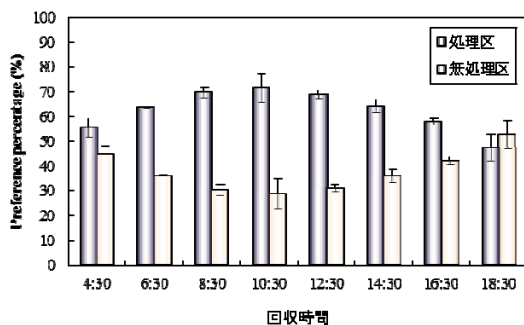


図 7 各時間に回収したキャベツ放出揮発性

回収液に対するモンシロチョウメス成虫の選好性

メス成虫の選好性は、無処理区と比較して 4 時 30 分の揮発性回収液では選好が認められなかったが、6 時 30 分から 14 時 30 分の揮発性回収液を有意に選好し、10 時 30 分の揮発性回収液で最大となることが明らかとなった。各時間における放出揮発性成分回収液には、モンシロチョウメス成虫の誘引成分が含まれていることが推察される。また、これらの結果から、キャベツ放出揮発性成分のピークが 10 時 30 分ごろであり、その揮発性成分を鍵にしてモンシロチョウメス成虫はキャベツを探索することによって、モンシロチョウの飛来割合が 12 時前後でピークを迎えることが示唆される。

3. アブラナ科植物のモンシロチョウメス成虫揮発性誘引成分の品目間差異。

(1) アブラナ科植物のモンシロチョウ揮発性誘引成分品目間差異の検討

キャベツとカラシナ・ハクサイ・ダイコン・ブロッコリー間の比較では、メス成虫はカラシナ間で 59%、ハクサイ間で 58%、ダイコン間で 61%、ブロッコリー間で 57%とキャベツを有意に選好した。カラシナとダイコン・ブロッコリー・ハクサイ間での比較では、メス成虫はハクサイ間で 66%、ダイコン間で 62%、ブロッコリー間で 61%とカラシナを有意に選好した。ダイコンとブロッコリー間での比較では、メス成虫はダイコン間で 65%、ブロッコリー間で 55%とハクサイを有意に選好し、ダイコンとブロッコリーの組み合わせでは、ダイコンを 65%と有意に選好した。

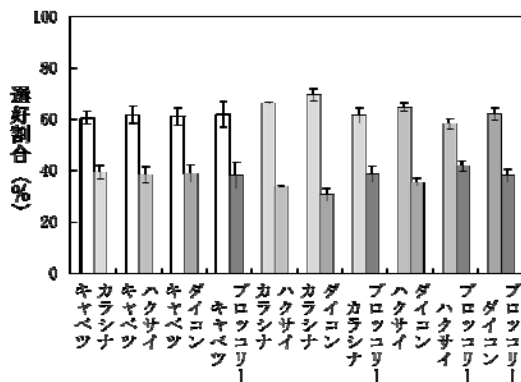


図 8 アブラナ科植物 5 種の揮発性回収液に対するモンシロチョウメス成虫の選好性

飛来選好実験から、各アブラナ科植物の選好強度に差が認められ、モンシロチョウの選好性は、キャベツ>カラシナ>ハクサイ>ダイコン>ブロッコリーの順となった。

次に、アブラナ科供試植物 5 種が有する揮

発性成分を分析した。キャベツでは 65 成分、カラシナ 43 成分、ハクサイ 51 成分、ダイコン 52 成分、およびブロッコリー 56 成分が検出された。そのうちアブラナ科供試植物 5 種に共通して検出されたのは nonane、isopropyl alcohol、(Z)-3-hexenyl acetate、6-methyl-5-hepten-2-one、4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone、propanoic acid、linalool、1-nonanol、nonanoic acid、*o*-menthan-8-ol、tridecyl 2-propenoate の 11 成分で、またアブラナ科供試植物 5 種の特有揮発性成分はキャベツ 19 成分、カラシナ 9 成分、ハクサイ 6 成分、ダイコン 18 成分およびブロッコリー 11 成分であった。これら成分がモンシロチョウメス成虫誘引成分の候補となる可能性が高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Hiromi Ikeura, Fumiya Kobayashi and Yasuyoshi Hayata, Optimum extraction method for volatile attractant compounds in cabbage to *Pieris rapae*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 40, 2012, 201-207, DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2011.09.015>

[学会発表] (計 1 件)

① Hiromi Ikeura, Tomoka Takamura, Fumiya Kobayashi and Yasuyoshi Hayata, Volatile attractants in Brassicaceae plants attract *Pieris rapae*, 28th International Horticultural Congress & Exhibition Abstracts 28th International Horticultural Congress & Exhibition, pp. 666, 2010, Lisboa, August 24.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池浦 博美 (IKEURA HIROMI)

明治大学・農学部・助教

研究者番号: 10440158