

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：81101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450068

研究課題名(和文) リンゴ果実における対モモシクイガ化学防御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Chemical defense mechanisms of apple fruits against the peach fruit moth, *Carposina sasakii*

研究代表者

石栗 陽一 (Ishiguri, Yoichi)

地方独立行政法人青森県産業技術センター・農林部門・研究管理員

研究者番号：80502963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：モモシクイガはリンゴ果実を加害する重要害虫であり、新しい防除法の開発が課題である。果実に本来備わる化学的防除メカニズムの解明を試み、食害果実で誘導される化合物として3-oxo-TA、クロロゲン酸、p-クマロイルキナ酸を同定した。これらの化合物は幼虫の死亡率が高いリンゴ品種‘ふじ’および‘春明21’でより多く誘導されることが明らかになった。一方、成虫の産卵抑制のために使用されるコート剤(炭酸カルシウム水和剤)の防除メカニズムも検討した。EAG及びGC-EADを用いたアッセイの結果、コート剤に展着剤として配合されるTxibが雌成虫の触覚に受容され、産卵行動を抑制している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The peach fruit moth, *Carposina sasakii* Matsumura, is a serious insect pest of apple fruits, and effective management is urgently required in Japan. This project explored the intrinsic chemical defense mechanisms in apple, and identified 3-oxo-TA, chlorogenic acid, and p-coumaroylquinic acid as defensive chemicals that were induced in young fruits infested with the insects. These defensive compounds were induced to a greater degree in the fruits of the two resistant cultivars, “Fuji” and “Shunmei 21”, in which larval mortality was higher. We also examined the mechanism of the ovipositional deterrent effect of spraying calcium carbonate wettable powder on apple trees. Using EAD and GC-EAD, we found that Txib, a spreading agent in the powder, elicited a clear antennal response in the female moths, which may function as an oviposition inhibitor.

研究分野：植物保護科学

キーワード：リンゴ モモシクイガ 植物-昆虫間相互作用 誘導抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

モモシクイガはリンゴの果実を加害する重要害虫であり、近年の果実輸出の増加とともに検疫害虫としての重要性も増している。野外における本種成虫の発生期間は約3か月にもわたり、この期間中、生産現場では定期的な殺虫剤の散布が行われている。殺虫剤の多用は、本種以外の害虫の薬剤抵抗性を発達させる原因にもなっており、殺虫剤に依存しない防除法が求められていた。本種の性フェロモンを利用した交信攪乱剤も開発されているが、効果が安定せず殺虫剤による補充防除が必要なことから、生産現場への普及率は低く、新しい防除法の開発が課題であった。

### 2. 研究の目的

(1) リンゴ果実に食入したモモシクイガ幼虫の生存率が自然条件下で極めて低いことは報告されていた (Kim et al., 2002)。研究代表者らは、枝から切り離れたリンゴ果実 (摘果) ではモモシクイガ幼虫の生存率が樹上の果実 (着果) と比べ高まることを発見した (Ishiguri and Toyoshima, 2006)。また、着果で发育した幼虫には顕著な发育遅延が見られたが、摘果では发育遅延は起こらなかった。これらのことから、樹上の果実では何らかの防御応答が働き、誘導性の发育阻害物質が産生したと考えられた。本研究では、モモシクイガ幼虫の食害によってリンゴ果実に誘導される发育阻害物質の同定及び誘導メカニズムの解明を目的の一つとする。

(2) モモシクイガ雌成虫は、夜間に寄主植物の果実のみに産卵することから、視覚情報ではなく何らかの化学情報をもとに産卵対象となる果実を探索していると考えられる。生石灰液などのアルカリ性水溶液を散布すると、本種による果実被害が減少することは経験的に知られていた (宮下ら, 1952) が、どのようなメカニズムで果実被害が抑制されるのかは未だ解明されていない。そこで、近年、モモシクイガに対する被害抑制効果が確認され、農薬登録を取得した炭酸カルシウム水和剤が、モモシクイガ雌成虫の産卵に及ぼす影響を調査し、果実被害を抑制するメカニズムや雌成虫が果実を定位する際に利用する産卵刺激物質の解明を本研究の第二の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 幼虫の食害によって果実に誘導される化合物の同定

リンゴ品種‘ふじ’の果実を用いて、自然状態の着果と、樹から切り離れた状態の摘果で、それぞれモモシクイガの被害果と健全果を作成した。これらの果実サンプルから切り出した果肉を等量のメタノールで破碎抽出後、上清を LCMS で分析し、食害によって誘導される物質の探索を行った。食害によって果実に誘導された化合物のいくつかは、

Sep-pak C18 (35 cc) 及び HPLC で分取精製し、 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ -及び各種2次元 NMR 測定により構造決定を行った。

また、果実における誘導メカニズムを明らかにするために、リンゴ品種‘春明 21’の被害果を用いて、幼虫食害部付近の果肉を約 3 mm 角の賽の目状に細かく切り分け、誘導される化合物の分布を調べた。

(2) 異なるリンゴ品種の果実における幼虫の发育

果実内で发育する幼虫の生存率にリンゴの品種によって違いがあるか検討した。1年目はリンゴ品種‘ふじ’、‘春明 21’及び‘千雪’を供試し、2年目は‘恵’、‘メロー’、‘東光’、‘彩香’及び‘初恋ぐりん’と、対照品種として‘ふじ’を加えた6品種を供試した。

ふ化直前の卵が付着したパラフィン紙を果実に接着して幼虫を食入させた。果実表面の食入痕を数えて、幼虫食入数を調査した後、果実にナイロンゴースの袋をかぶせ、发育を完了して果実を脱出し、袋に落下した老熟幼虫を毎日計数した。各品種の収穫時期に果実を採取し、果実を解体しながら内部に残っている生存幼虫を計数し、脱出幼虫数とあわせて生存率を求めた。また、ふ化幼虫の果実食入から老熟幼虫の果実脱出までの日数を幼虫期間とし、发育遅延の程度を調査した。

また、幼虫の食害によって果実に誘導される化合物の量を、‘ふじ’、‘春明 21’、‘千雪’の3品種を用いて比較し、幼虫の发育阻害の程度と各種化合物の誘導量との関係を調べた。

(3) 炭酸カルシウム水和剤の散布が産卵に及ぼす影響

殺虫剤無散布の‘ふじ’の樹を用いて、果実のみ、あるいは樹全体に炭酸カルシウム水和剤 50 倍希釈液を散布し、果実に産みつけられた卵数を無散布樹の果実における産卵数と比較した。

また、モモシクイガの雌成虫が、傷をつけたる紙に産卵する習性を利用して、果実を用いない方法で炭酸カルシウム水和剤の効果を検証した。直径 7 cm のろ紙に手術用のメスの背で傷をつけて、炭酸カルシウム水和剤 50 倍希釈液に浸漬したものと、水道水に浸漬したものを、成虫雌雄 5 個体を入れた同一容器 (縦 24 cm×横 16 cm×高さ 5 cm) に置き、産みつけられた卵数を比較した。

リンゴ果実に対する炭酸カルシウム水和剤処理の効果が室内でも再現されるか検討するため、横径約 4 cm のリンゴ幼果を炭酸カルシウム水和剤 50 倍希釈液または水道水に浸漬処理し、30 cm 角の網かごにぶら下げた。かごにモモシクイガの成虫を放飼し、炭酸カルシウム水和剤処理果と水道水処理果に産みつけられた卵数を比較した。

(4) 炭酸カルシウム水和剤を処理した果実の香气成分

炭酸カルシウム水和剤 50 倍希釈液を散布した‘ふじ’の果実と無散布の果実にそれぞれ

PVDF バッグをかぶせ、ポンプで活性炭を通した空気を流し、香氣成分をフィルター (Heyesep-Q) に捕集した。ヘキサンで抽出後、GCMS で分析を行い、炭酸カルシウム水和剤を処理した果実における香氣成分の変化を調べた。炭酸カルシウム水和剤処理の有無で異なる成分が検出された場合には、NMR 測定で構造を推定した。

(5) 雌成虫触角の各種香氣成分に対する応答  
炭酸カルシウム水和剤 50 倍希釈液に浸漬したリンゴ果実と無処理の果実から、SPME (固相マイクロ抽出) 法により、香氣成分を捕集し、GC-EAD (触角電位検出器付きガスクロマトグラフィー) で各種揮発成分に対する雌成虫触角の応答を調査した。また、EAG (触角電図) を用いて、同様にリンゴ果実由来の揮発物質や炭酸カルシウム水和剤由来の揮発物質に対する応答を調査した。

#### 4. 研究成果

(1) 幼虫の食害によって果実に誘導される化合物の同定

モモシクイガ被害果と健全果のメタノール抽出物を LCMS で分析した結果、健全果では見られず被害果で見られる複数のピークが検出された。そのうち一つの化合物を分取し、NMR 測定を行った結果、トリテルペン の 一種  $2\alpha,19\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid (3-oxo-TA、図 1) と同定された。3-Oxo-TA の誘導は果実に針を刺しただけでも認められ、幼虫による食害だけでなく、果実が傷害を受けただけで誘導されると考えられた。また、着果だけでなく摘果でも誘導が確認されたことから、3-oxo-TA はモモシクイガ幼虫の発育阻害に直接関連する物質ではないと考えられた。

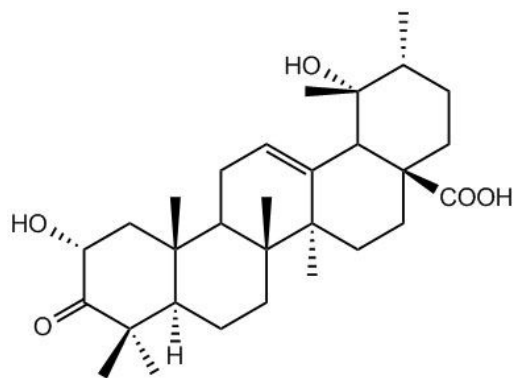


図 1 リンゴ果実より同定した 3-oxo-TA

3-Oxo-TA の他に、モモシクイガ幼虫による被害で果実に誘導される化合物として、4 つの未知化合物、A (m/z 409)、B (m/z 361)、C (m/z 559)、D (m/z 520) が検出された。このうち化合物 C は、NMR 測定の結果、既知のリンゴ果実内成分であるクロロゲン酸と同定された。また、化合物 B については、クロロゲン酸の dehydroxy 体である p-クマロイルキナ酸と推定された。p-クマロイルキナ酸の

誘導は、摘果よりも着果に多く認められたことから、モモシクイガ幼虫の発育阻害に関連する物質である可能性が示唆された。

モモシクイガ幼虫の食害部付近の果肉を齧の目状に切り分けて、各種化合物の分布を調べた結果、3-oxo-TA は食害部のごく近傍のみに存在し、局在性が高かった。p-クマロイルキナ酸及びクロロゲン酸は食害部周辺に分布し、局在性がやや低かった。未知化合物 D は果皮に多く含まれるが、果肉では食害部に誘導されていた。3-oxo-TA と化学構造が似ているウルソール酸は、果肉の食害部にもわずかに分布するが、多くは果皮に分布し、3-oxo-TA よりも化合物 D に近い分布を示した。

(2) 異なるリンゴ品種の果実における幼虫の発育

‘ふじ’、‘春明 21’及び‘千雪’の 3 品種の着果に食した幼虫の生存率は、それぞれ 5.7%、13.1%及び 69.3%で、‘千雪’における幼虫生存率が他の 2 品種に比較して高かった。また、‘ふじ’、‘春明 21’及び‘千雪’の着果における幼虫期間は、それぞれ平均 92.0 日、68.1 日及び 27.9 日で、‘千雪’の幼虫期間が他の 2 品種に比較して短く、‘千雪’は幼虫の発育阻害が起こりにくい品種であると考えられた。いずれの品種も摘果における幼虫生存率は 92.1~100%、幼虫期間は 13.9~16.1 日と短く、発育阻害は認められなかった。

‘恵’、‘メロー’、‘東光’、‘彩香’及び‘初恋ぐりん’の 5 品種の果実における幼虫生存率はそれぞれ 17.0%、27.0%、15.4%、34.0%及び 6.4%、幼虫期間はそれぞれ 43.4 日、51.0 日、48.4 日、47.5 日及び 34.0 日であった。対照品種とした‘ふじ’の生存率及び幼虫期間がそれぞれ 13.8%及び 39.1 日であったことから、程度の差はあるがいずれの品種も発育阻害が発現していたと考えられた。

発育阻害が起こりにくい品種である‘千雪’と発育阻害が起こる‘ふじ’及び‘春明 21’を用いて、モモシクイガの食害によって果実に誘導される化合物の量を比較した結果、‘ふじ’や‘春明 21’に比較して‘千雪’では 3-oxo-TA、未知化合物 A 及び p-クマロイルキナ酸の誘導量が少なかった。

(3) 炭酸カルシウム水和剤の散布が産卵に及ぼす影響

モモシクイガ多発リンゴ園で、樹全体あるいは果実のみに炭酸カルシウム水和剤を散布した結果、モモシクイガの産卵数が無散布樹の果実に比較して著しく減少することを確認した。本剤による被害抑制は、雌成虫の産卵が減少することによるものであることが明らかになった。

室内で炭酸カルシウム水和剤を処理したる紙と、水道水を処理したる紙の両方を置いた容器に成虫を放飼したところ、炭酸カルシウム水和剤処理の有無にかかわらず、どちらの紙にも産卵が見られた。また、炭酸カルシウム処理果と水道水処理果の両方をばら

下げたかごに成虫を放飼したところ、両者に産みつけられた卵数に差は認められなかった。これらの結果から、室内試験のような狭い空間では炭酸カルシウム水和剤の効果は認められず、雌成虫が産卵場所にたどり着くことができれば、ろ紙の傷や果実の凹凸のような物理的的刺激で産卵が行われるものと考えられた。野外で炭酸カルシウム水和剤の効果が認められるのは、遠隔化学刺激として働く揮発物質の変化による影響ではないかと推察される。

### (3) 炭酸カルシウム水和剤を処理した果実の香気成分

炭酸カルシウム水和剤を散布した果実と無散布の果実の香気成分を野外でフィルターに吸着させて捕集し、GCMSで分析したところ、炭酸カルシウム水和剤を散布した果実に特異的な化合物とその類縁体が検出された。この化合物は炭酸カルシウム水和剤の製剤自体からも検出されたことから、本剤に由来する揮発成分であると考えられた。この化合物を同定するため、炭酸カルシウム水和剤のジクロロメタン抽出物を、シリカゲルカラムで分画し、NMRによって構造を推定した。その結果、化合物は 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (Txib、図2)と同定され、炭酸カルシウム水和剤に展着剤として含まれている成分と考えられた。

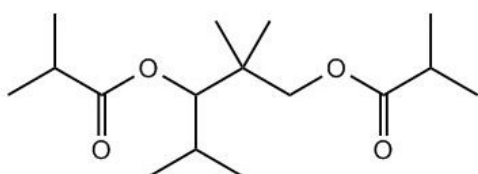


図2 炭酸カルシウム水和剤より同定したTxib

### (4) 雌成虫触角の各種香気成分に対する応答

GCMSでリンゴ果実由来の主要な香気成分として、nonanal、decanalなどが検出され、いずれもGC-EADによってモモシクイガ雌成虫触角の応答が認められた。また、炭酸カルシウム水和剤を処理したリンゴ果実から特異的に検出されたTxibに対しても雌成虫触角の応答が認められた。

一方、EAGではGC-EADと同様にnonanal及びdecanalに対する雌成虫の応答が認められたが、Txibを含む炭酸カルシウム水和剤の揮発成分に対する応答は認められなかった。リンゴの果実から抽出した香気成分に対しては強い応答が認められるが、リンゴの香気成分に炭酸カルシウムの揮発成分を混合すると、反応が弱まることを確認した。

### <引用文献>

Kim, D.-S. and J.-H. Lee (2002) Egg and larval survivorship of *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae) in apple and

peach and their effects on adult population dynamics in orchards. *Environ. Entomol.* 31:686-692

Ishiguri, Y. and S. Toyoshima (2006) Larval survival and development of the peach fruit moth, *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae), in picked and unpicked apple fruits. *Appl. Entomol. Zool.* 41:685-690

宮下揆一、川村英五郎(1952)モモシクイガに対する石灰液散布の効果に就いて、北海道農業試験場彙 63:113-116

### 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)

石栗陽一、吉永直子(2015)モモシクイガのリンゴ果実への産卵に及ぼす炭酸カルシウム水和剤の影響、北日本病害虫研究会報、査読有、66:144-147

[学会発表](計7件)

風間春菜、手島伸、田中真史、吉永直子、高梨琢磨、所雅彦、石栗陽一、森直樹(2017)モモシクイガ雌成虫に対する炭酸カルシウム水和剤の化学的効果、日本農芸化学会2017年度大会、京都府京都市(京都女子大学)

鐵本夕貴、吉永直子、石栗陽一、森直樹(2017)昆虫による食害でリンゴ果実に誘導される化合物群の分析と同定、日本農芸化学会2017年度大会、京都府京都市(京都女子大学)

石栗陽一(2016)モモシクイガの食害に対するリンゴ果実の防御反応と生活史に及ぼす影響、2016年度日本生物工学会北日本支部弘前シンポジウム、弘前大学(青森県・弘前市)

森田沙代、吉永直子、石栗陽一、森直樹(2016)リンゴ果実に昆虫による食害で誘導される化合物群の動態の比較、日本農芸化学会2016年度大会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

石栗陽一、吉永直子、森田沙代、森直樹(2016)異なる品種のリンゴ果実におけるモモシクイガの幼虫発育、日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会・合同大会、大阪府立大学(大阪府・堺市)

森田沙代、吉永直子、森直樹、石栗陽一(2015)リンゴ果実に傷害により誘導されるトリテルペン 2a,19a-dihydroxy-3-oxo-

12-ursen-28-oic acid の同定、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学（岡山県・岡山市）

石栗陽一、吉永直子、(2015) モモシンクイガの産卵に対する炭酸カルシウム水和剤の影響、第 68 回北日本病害虫研究発表会、山形国際ホテル（山形県・山形市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石栗 陽一 (ISHIGURI, Yoichi)  
地方独立行政法人青森県産業技術センターりんご研究所・研究管理員  
研究者番号：80502963

### (2) 研究分担者

吉永 直子 (YOSHINAGA, Naoko)  
京都大学・農学研究科・助教  
研究者番号：40456819

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者