

トビイロウンカおよびツマグロヨコバイに対するアコニット酸  
およびシュウ酸の吸汁阻害作用永田 徹<sup>\*1)</sup>・早川孝彦<sup>\*\*</sup><sup>\*</sup> 農業環境技術研究所<sup>\*\*</sup> 植物工学研究所

Antifeeding Activity of Aconitic Acids and Oxalic Acid on Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) and Green Rice Leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Uhler). Toru Nagata<sup>2)</sup> (National Institute of Agro-Environmental Sciences, Kanonndai, Tsukuba, Ibaraki 305-0836, Japan) and Takahiko Hayakawa (Plantech Research Institute, Kamoshida, Aoba-ku, Yokohama 227-0033, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 42: 115-121 (1998)

**Abstract:** The antifeeding activity of aconitic acids and oxalic acid on the Brown Planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* (Stål) was determined by an improved artificial membrane method. These organic acids were administered to BPH as an aqueous diet containing 2.5% sucrose through an artificial membrane of stretched thin polyethylene film (Searon film<sup>®</sup>) and the excreted honeydew was weighed. The organic acids were administered as free acids or salts neutralized to pH 7 with KOH or Ca(OH)<sub>2</sub>. Oxalic acid was the most active antifeedant administered as free acid or salt, followed by (*E*)-aconitic acid (trans-aconitic acid), which has been reported as an antifeedant for BPH. The concentration (0.007%) of (*E*)-aconitic acid in the phloem sap of Barnyard Grass, *Echinochloa crus-galli* (Linn.) Beauv. var. *oryzicola* (Vasing.) Ohwi, collected by the razor method and determined by HPLC was more than 100 times lower than the concentration (over 1%) inhibiting feeding by the artificial membrane method. This suggests the uncertainty of the existing conclusion attributing the resistance of Barnyard Grass to BPH to the presence of (*E*)-aconitic acid in the plant. Significant feeding stimulation was observed with the salt form of (*E*)-aconitic acid and (*Z*)-aconitic acids (cis-aconitic acid) in a lower concentration range than that inhibiting feeding. Similar stimulation was observed in the Green Rice Leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler with the salt form of (*Z*)-aconitic acid.

**Key words:** *Nilaparvata lugens*, antifeedant, (*E*)-aconitic acid, oxalic acid, *Nephotettix cincticeps*

## 緒 言

トビイロウンカは1970年代から東南アジア全域で大発生を繰り返した重要な水稻害虫である。おりからIRRIがIR-8を用いて推進していた「緑の革命」では本種が第一の障害となり、その対策として耐虫性品種IR-26が育成普及された。しかしながら数年にしてバイオタイプが各地に出現し、それを克服するためにさらに相次いでその他の遺伝子源を用いた耐虫性品種が育成利用されてきた歴史がある。これらの耐虫性品種の耐虫性機構については、それが吸汁阻害によるものであることまでは示されている(Sogawa and Pathak, 1970; 寒川, 1983)。しかし、どのような機構で吸汁阻害が発現するかは明らかにされていない。これら耐虫性品種に含まれるなんらかの物質が耐虫性因子となっていることを想定していくつかの研究がなされたが、これまでのところその物質は明らかではない(Shigematsu et al., 1982; Sogawa, 1982)。Kimらはイネ

の近縁種でありながら、トビイロウンカの寄生を受けないタイヌビエの植物体内成分をイネと比較した結果から、タイヌビエには多く含まれ、稲では存在しない(*E*)-アコニット酸を耐虫性因子となる物質であるとして報告している(Kim et al., 1975, 1976)。

ここでは(*E*)-アコニット酸、(*Z*)-アコニット酸およびシュウ酸のトビイロウンカに対する吸汁抑制作用を人工膜を介した給与法を用いた濃度-吸汁量曲線を用いて詳細に解析した結果、従来と異なる結論を得たので報告する。

## 材 料 と 方 法

## 1. トビイロウンカに対する有機酸の吸汁阻害作用

供試虫は佐賀県佐賀市で採集し、25°C、16時間照明の恒温室でイネ芽だし苗を用いて累代飼育6~15世代のトビイロウンカの羽化後5日以内の成虫を用いた。

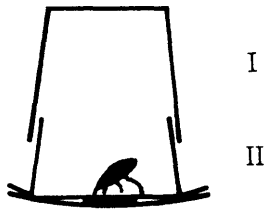
吸汁量測定は以下の方法で行った。雌成虫4頭を炭酸ガスで麻酔し、第1図に示した底直径3 cm、高さ3 cmのプ

<sup>1)</sup> 現在 茨城大学農学部

<sup>2)</sup> Present address: Laboratory of Applied Entomology and Zoology, Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Ibaraki 300-0393, Japan

1997年7月22日受領 (Received 22 July 1997)

1998年2月19日登載決定 (Accepted 19 February 1998)

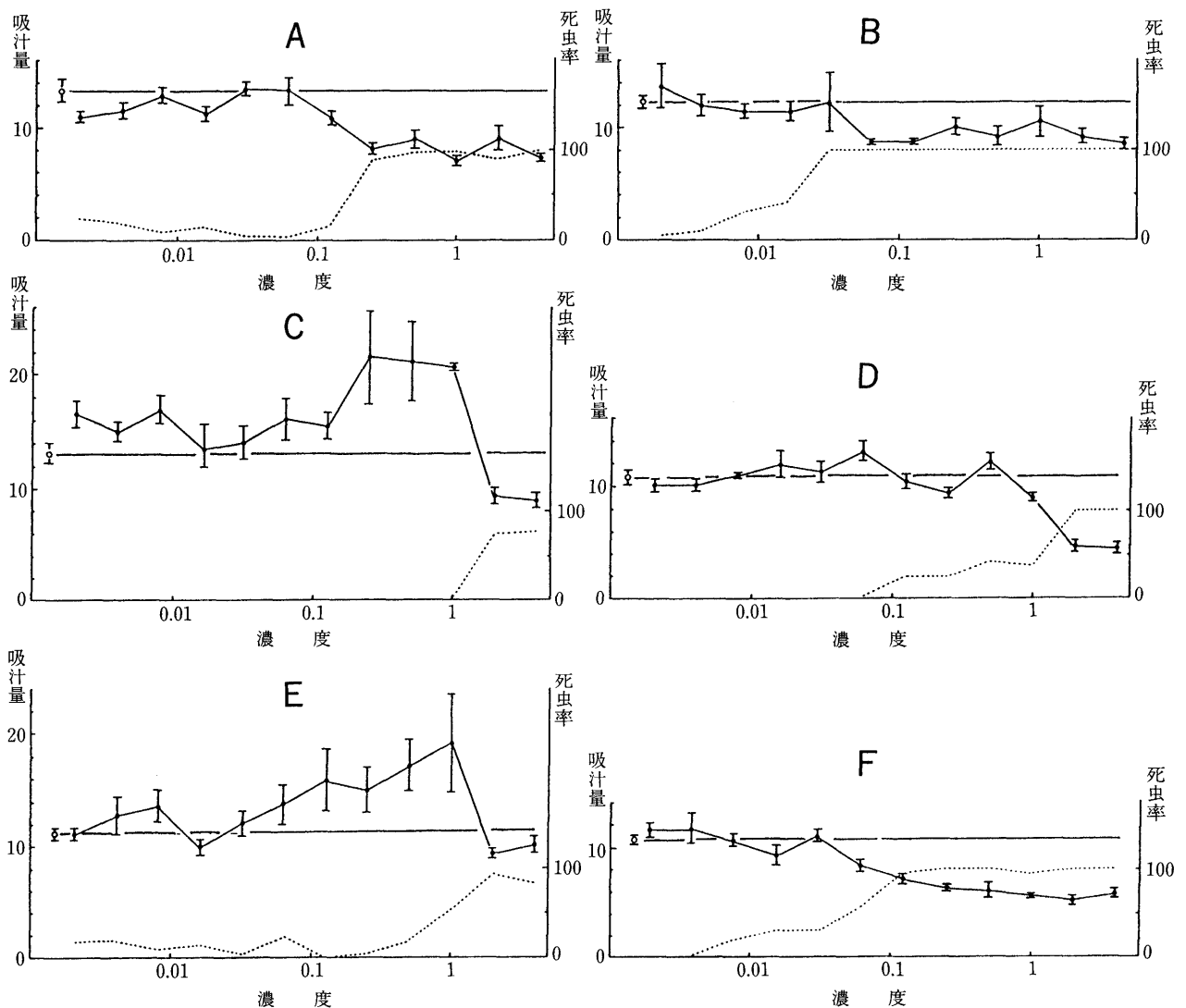


第1図 吸汁量検定容器, 具体的方法については本文参照.

プラスチック容器 (I) に入れ, これに容器 (I) の底を切り取って作ったリング状の容器 (II) を重ねてはめこんだ. 容器 (II) にはあらかじめシーロンフィルム®(富士フィルム製) を伸展してかぶせ, 所定濃度の有機酸を含む 2.5%

のシロ糖液飼料 15  $\mu$ l を滴下したのち, さらにシーロンフィルムで覆い, 精密電子天秤 (メトラー, AE 16-3 型) を用いて 0.1 mg 単位で重量 ( $W_1$ ) を測定しておいた. つぎに 25°C で 24 時間吸汁させたのち, 容器 (II) をとりはずして再秤量し, 得られた重量  $W_2$  から吸汁量 = ( $W_1 - W_2 -$  自然蒸発量) を算出した. ちなみに虫を入れない対照区で得られたフィルムを通しての自然蒸発量は約 6 mg であった. 有機酸としては遊離のシュウ酸, (*E*)-アコニット酸および (*Z*)-アコニット酸およびこれらを水酸化カリウムあるいは水酸化カルシウムを用いて pH 6.8 に中和した中和型を供試した.

生存率の試験では吸汁量測定は行わず, 試料を毎日交換



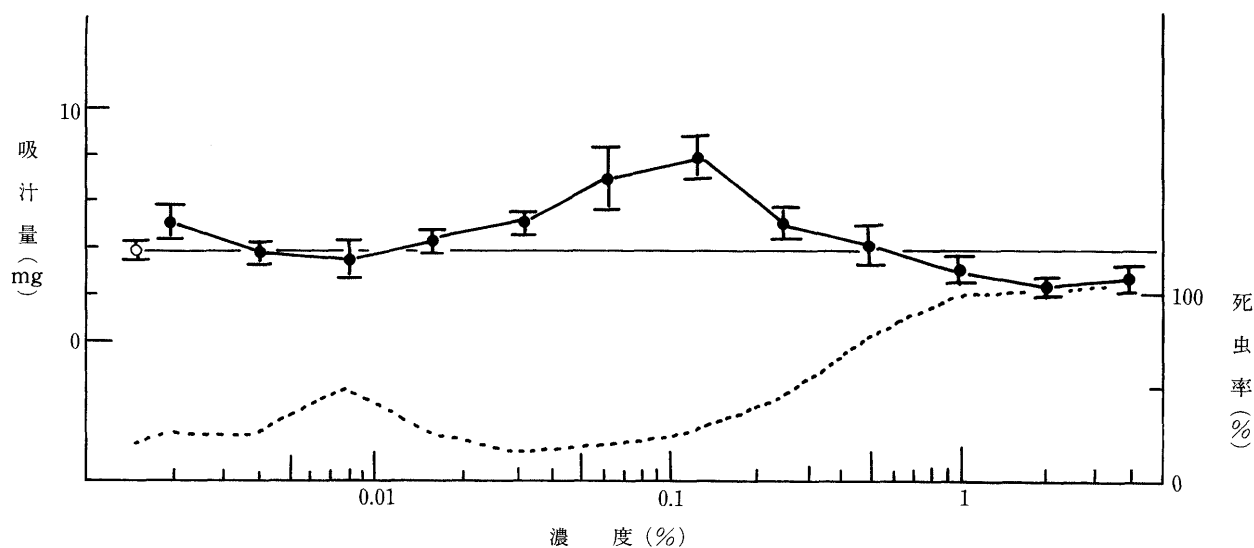
第2図 有機酸のトビロウシカに対する吸汁阻害特性. 吸汁量は (mg: 容器当たり平均値±標準誤差) を示す. いずれのグラフでも左端は対照区 (2.5% シロ糖液のみ) における吸汁量を示す, そのほかは有機酸添加区. 点線は死虫率 (%) を示す. 濃度 (%) は対数目盛. A: シュウ酸 (水酸化カリウムで中和), B: シュウ酸 (遊離), C: (*E*)-アコニット酸 (水酸化カリウムで中和), D: (*E*)-アコニット酸 (遊離), E: (*Z*)-アコニット酸 (水酸化カリウムで中和), F: (*Z*)-アコニット酸 (遊離).

し、生存率を記録した。試験はいずれも5反復で行った。

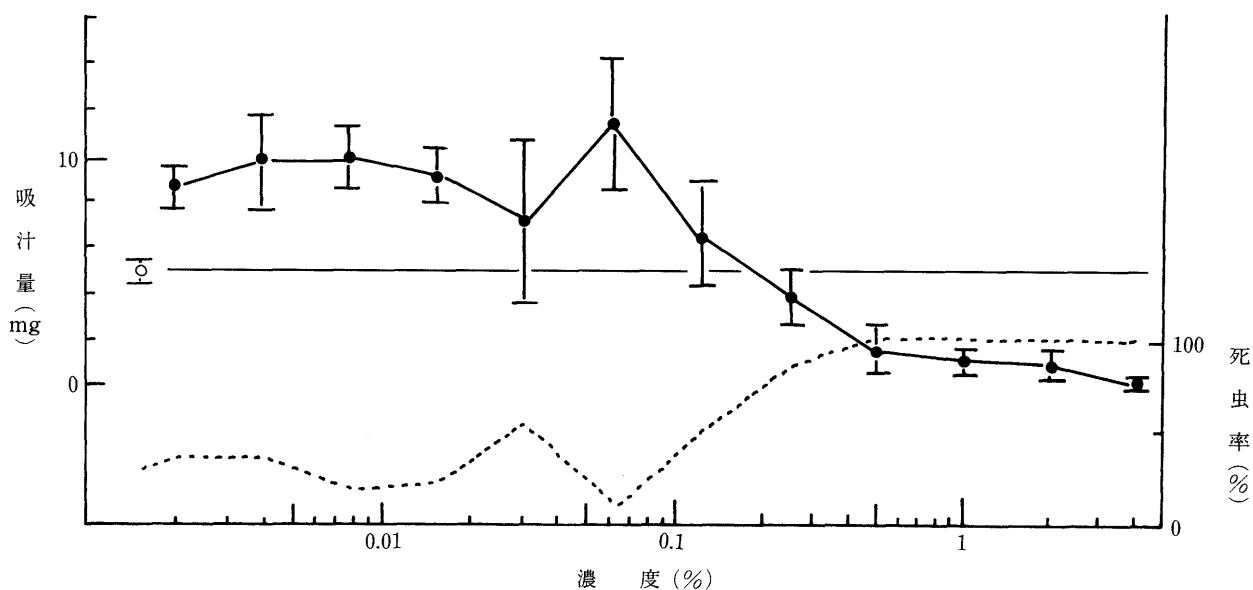
## 2. (E)-アコニット酸含有水耕液で栽培したイネ幼苗の篩管液中に検出される (E)-アコニット酸濃度

供試虫は上記実験に用いたものと同じである。(E)-アコニット酸濃度の測定のためにハイポネクス0.03%を添加した所定濃度の (E)-アコニット酸水溶液にイネ芽出し苗(アキヒカリ)の根部を24時間浸漬し、これらの苗をトビイロウンカに吸汁させた。トビイロウンカはイネの篩管に口吻を挿入してその内部の篩管液を摂取するため、吸汁中に口吻を Kawabe et al. (1980) の方法により、レー

ザーで切断したのち、溢出する篩管液1~6 $\mu$ lを採取した。レーザー発生装置は東芝製、LAY-508、波長1,064 $\mu$ mを用い、照射レーザーはエネルギー0.1J、パルス幅0.2msecとした。いっぽう、水田から採取した出穂しているタイヌビエからもヒメトビウンカを用いて篩管液を同様に採取し、高速液体クロマトグラフ(TRIROTAR-V、日本分光社製)を用いて (E)-アコニット酸を定量した。HPLCには、Partisil Sax 10(サイズ4.6mm $\times$ 250mm)を用いて、2.6mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 2.5)、4%メタノールを溶出液として、2ml/minで溶出し、210nmの吸光度を測



第3図 水酸化カルシウムで中和した (E)-アコニット酸のトビイロウンカに対する吸汁阻害特性、記号は第2図に同じ。



第4図 15%ショ糖液に溶解した (E)-アコニット酸のトビイロウンカに対する吸汁阻害特性、記号は第2図と同じ。

定した。

### 3. ツマグロヨコバイに対する有機酸の吸汁阻害特性

供試虫には、秋田県金浦町で採集し、25°C、16時間照明の恒温室でイネ芽だし苗を用いて6~12世代累代飼育したツマグロヨコバイの羽化後5日以内の雄成虫を用いた。

吸汁量測定実験は2.5%ショ糖液の給与量を100  $\mu$ lとした以外はトビロウンカの場合と同様である。

## 結 果

### 1. 有機酸のトビロウンカに対する吸汁阻害作用

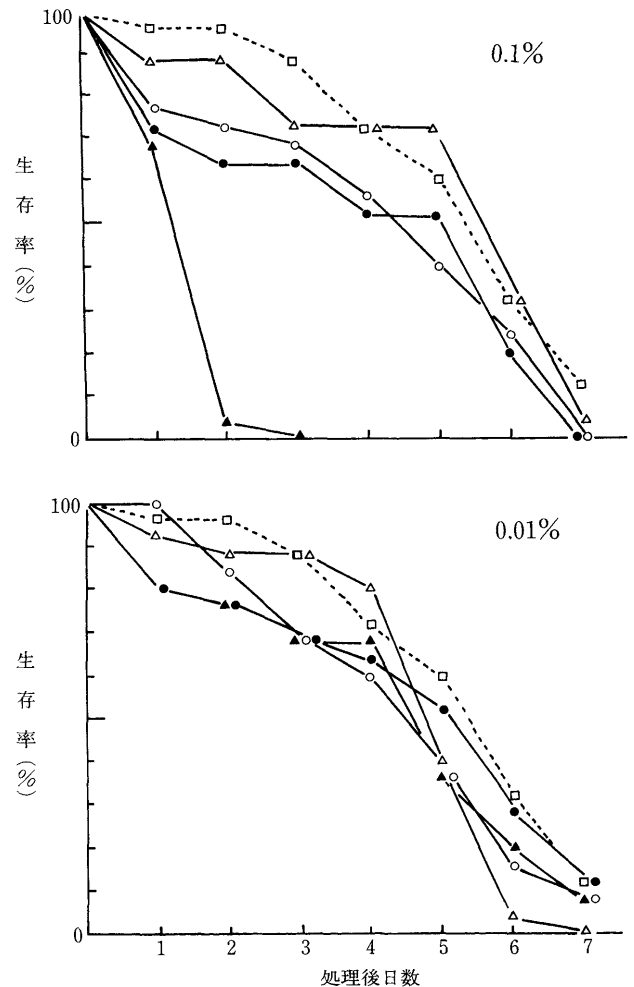
水酸化カリウムで中和した有機酸の中では(第2図)、致死作用はシュウ酸がもっとも強く、約0.3%で致死作用が発現し、これにともなって吸汁量も減少した。致死濃度以下の濃度域では吸汁量の減少は認められなかった。いっぽう、(E)および(Z)-アコニット酸では、致死作用発現にともなう吸汁量減少が2%以上の濃度域で明らかに認められたが、それ以下の濃度では吸汁阻害はまったくみられず、致死作用発現濃度域に近い高濃度域(0.1~1%)ではむしろ吸汁を促進する傾向がみられた。

遊離の有機酸についてみると(第2図)、シュウ酸の致死作用発現濃度は0.03%以上と中和型よりも明らかに低くなり、それらの濃度域では吸汁量も減少した。しかし、(E)および(Z)-アコニット酸では逆に致死濃度域が中和型よりも低下した。致死濃度以下の濃度域においては3種の有機酸とも吸汁阻害を示さなかった。(E)-アコニット酸は致死作用、吸汁阻害作用とももっとも弱かった。

Kimらは(E)-アコニット酸の中和に用いるアルカリについては、カリウムよりもカルシウムが高い吸汁阻害活性を示すとしているので(Kim et al., 1976)、本研究においてもこれを確認するために、水酸化カルシウムを用いて中和した(E)-アコニット酸の吸汁阻害活性を調べた(第3図)。致死作用発現濃度は0.25%以上と水酸化カリウム中和型よりも若干低下した。しかし、致死作用発現濃度以下の濃度域のうち、0.06~0.13%の範囲では水酸化カリウム中和型の場合と同様に吸汁促進効果がみられた。

ショ糖液濃度をKimらの試験条件と同じ15%として水酸化カリウムで中和した(E)-アコニット酸について行った試験では(第4図)、致死作用発現濃度はショ糖液濃度2.5%の場合よりも低下して0.25%となり、それ以上では濃度にもなって吸汁量の減少が認められた。それ以下の濃度ではショ糖液濃度2.5%の結果と同様に対照区よりも明らかに増加しており、吸汁促進効果が認められた。

有機酸のトビロウンカ生存率に与える影響を調べたところ(第5図)、有機酸濃度が0.1%の場合、水酸化カリウムで中和したシュウ酸の生存率への影響がもっとも著しく、これに比べて(E)および(Z)-アコニット酸の作用は弱かった。また(E)および(Z)-アコニット酸の間で



第5図 有機酸のトビロウンカ生存率に与える影響。▲：水酸化カリウムで中和したシュウ酸，○：水酸化カリウムで中和した(E)-アコニット酸，●：水酸化カルシウムで中和した(E)-アコニット酸，△：水酸化カリウムで中和した(Z)-アコニット酸，□：対照区(2.5%ショ糖液のみ)。図中の数字は有機酸の濃度。

は、(E)-アコニット酸が(Z)-アコニット酸よりも影響が著しく、また(E)および(Z)-アコニット酸のいずれでもカリウム塩よりもカルシウム塩の作用の方が強い結果が得られ、これらはいずれもKimらの報告と一致している。しかし、有機酸濃度が0.01%では有機酸間での効果の差は小さく、シュウ酸、水酸化カリウムで中和した(E)-アコニット酸がほぼ同等でしかももっとも著しい生存率への影響を示し、ついで水酸化カルシウムで中和した(E)-アコニット酸、(Z)-アコニット酸の順で作用は低下した。しかし、0.1%の結果と異なり、シュウ酸の生存率への影響がとくに著しいという傾向はみられなかった。

### 2. (E)-アコニット酸含有水耕液で栽培したイネ幼苗の篩管液中に検出される(E)-アコニット酸濃度

第1表に示すように、出穂後のタイヌビエの篩管液中の

第1表 イネおよびタイヌビエ篩管液中の(E)-アコニット酸濃度

	(E)-アコニット酸濃度 (%)	
	水耕液 <sup>1)</sup>	篩管液 <sup>2)</sup>
タイヌビエ <sup>1)</sup>	—	0.007
イネ <sup>2)</sup>	0.25	痕跡
イネ <sup>2)</sup>	0.5	0.005~0.02
イネ <sup>2)</sup>	1.0	0.05

1) 水田から採取した出穂しているタイヌビエからヒメトビウンカを用いて篩管液を採取した。

2) 所定濃度の(E)-アコニット酸含有水耕液に幼苗を24時間浸漬したのち、トビイロウンカを用いて篩管液を採取した。

(E)-アコニット酸濃度は0.007%であった。いっぽう、イネ篩管液中の(E)-アコニット酸濃度は水耕液中の濃度が0.25%では痕跡しか検出されなかった。しかし、水耕液中の濃度の増加に伴う篩管液中の濃度の上昇がみられた。

3. ツマグロヨコバイに対する有機酸の吸汁阻害特性

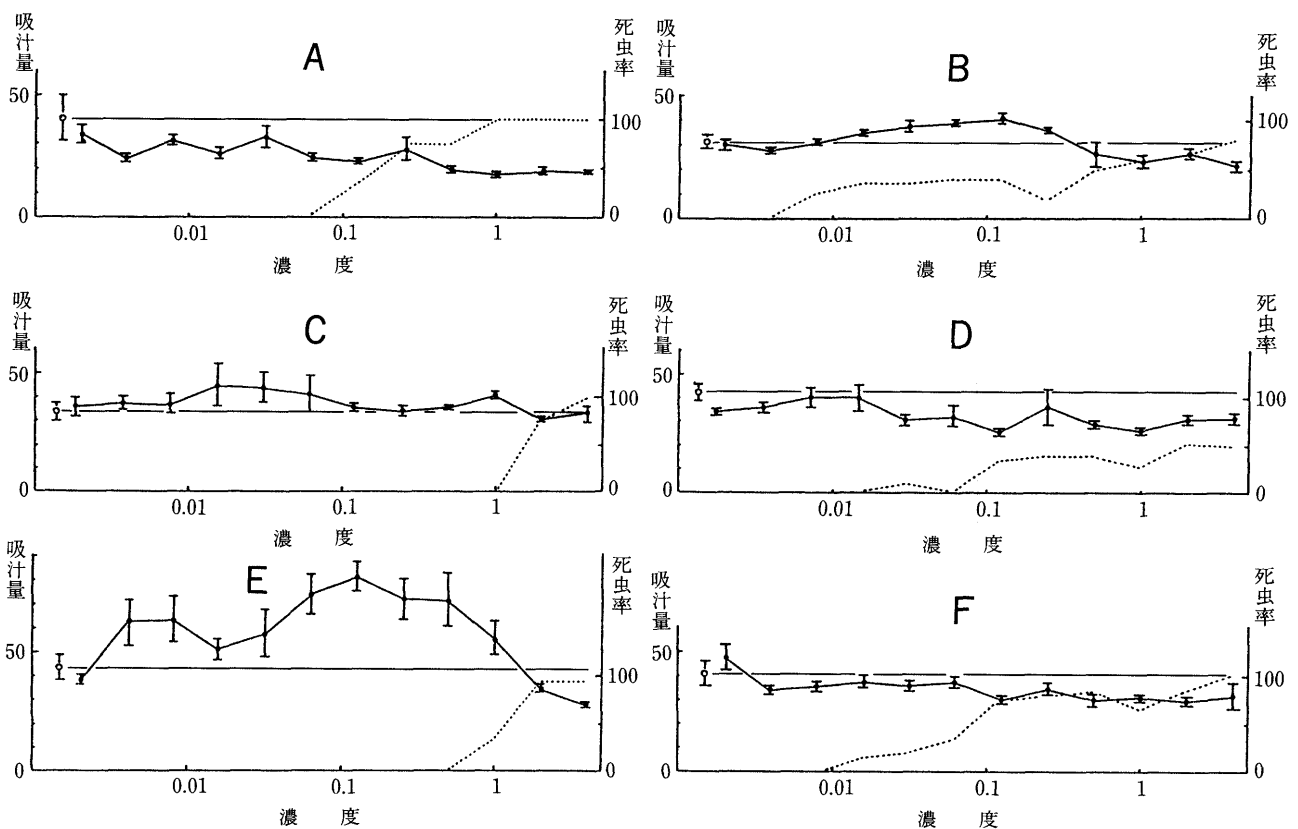
上述のように、トビイロウンカを対象とした人工膜による吸汁量測定実験では(E)-アコニット酸の吸汁阻害作用はとくに強くなかった。さらにこれらの物質の吸汁阻害特性を近縁のイネ吸汁性害虫であるツマグロヨコバイについても解析した(第6図)。

水酸化カリウムで中和した有機酸については、致死作用はシュウ酸がもっとも強く、0.1%以上でその影響が現れているが、(E)-アコニット酸および(Z)-アコニット酸では致死作用がみられたのは1%以上であった。いっぽう、致死濃度域における吸汁阻害作用はシュウ酸がもっとも強かった。致死濃度以下の濃度域では、シュウ酸が若干の吸汁阻害傾向を示したが、(E)-アコニット酸では吸汁阻害作用は認められず、(Z)-アコニット酸は逆に吸汁促進作用を示した。

遊離型の致死作用は中和型よりも全般に強かった。遊離型でも中和型と同様、シュウ酸の致死作用がもっとも強い傾向が認められた。吸汁阻害については(E)-アコニット酸、(Z)-アコニット酸とも0.1%以上の濃度で吸汁が若干抑制される傾向がみられたが、シュウ酸による抑制はそれらよりも高濃度のようにであった。中和型の(Z)-アコニット酸でみられた吸汁促進効果は認められなかった。

考 察

(E)-アコニット酸がトビイロウンカに対して示す吸汁阻害作用については、Kimら(Kim et al., 1975, 1976)はタイヌビエに含まれイネには含まれない物質である(E)-アコニット酸を吸汁阻害物質として指摘した。近縁のセジ



第6図 有機酸のツマグロヨコバイに対する吸汁阻害特性。記号は第2図と同じ。

ロウンカ、ヒメトビウンカがイネ、タイヌビエの両者に吸汁かつ寄生できるにもかかわらず、トビロウンカだけがイネにしか寄生できない関係から得た結論である。しかし、Kim らの実験では (E)-アコニット酸および (Z)-アコニット酸を水酸化カルシウムで pH 7 に調整して 15% ショ糖液に溶解し、人工膜を介して 3 齢幼虫に 7 日間給与し、その生存率曲線をショ糖液のみの対照区と比較して「生存率」を低下させたものを吸汁阻害物質であると結論しており、アコニット酸濃度と吸汁量の関係を測定したわけではない。

いっぽう、シュウ酸についてはイネに含まれており、これが吸汁阻害物質であるとされているシュウ酸のナトリウム塩あるいはカリウム塩が 0.1% 以上でトビロウンカの吸汁を阻害するとの報告 (Yoshihara et al., 1980) と本試験の結果はおおむね一致している。

本研究における水酸化カリウムで中和した有機酸のトビロウンカに対する吸汁試験では、シュウ酸の場合は、0.3% 以上で吸汁はほとんど完全に抑制され、同時に死虫率も 100% となった。しかし、この濃度域に関しては、これが致死作用によって死亡した結果、吸汁が行われなかったのか、あるいは逆に吸汁を忌避したことによる飢餓から死亡したものかはわからない。これに対して、(E)-アコニット酸ではシュウ酸の場合には 0.3% でみられた致死作用発現にともなって生じる吸汁量減少は 2% からであった。それ以下の濃度域では吸汁抑制はまったくみられず、むしろ逆に致死作用発現濃度に近い高濃度 (0.2~1%) では対照区の 2 倍に増加しており、明らかな吸汁促進が認められた。また、(Z)-アコニット酸についても (E)-アコニット酸と同様に致死作用発現濃度は 2% 以上であり、これにともなって明らかな吸汁量の減少が生じているが、1% 以下の濃度域では高濃度ほど吸汁量が多いという (E)-アコニット酸と共通の吸汁促進傾向がみられた。

これらの試験はショ糖液濃度に関しては、対照区における生存率の高い 2.5% で行った。Kim らの試験条件と一致させるために、15% ショ糖液を用いて行った同様な試験では、死虫率はショ糖液濃度 2.5% の場合よりも全般に高くなり、致死作用の発現とそれにともなる吸汁量の減少はショ糖液濃度 2.5% の場合よりも若干低下して (E)-アコニット酸 0.25% 以上となった。それ以下の濃度では 2.5% ショ糖液の場合と同様に対照区よりも吸汁量は明らかに増加しており、吸汁促進作用ははっきりと認められた。したがって、(E)-アコニット酸 0.25% 以上の濃度では吸汁阻害作用を期待できるが、死虫率もこれに平行して高くなっているため、これが致死作用の結果としての吸汁量減少であるか、あるいは吸汁忌避の結果、飢餓によってもたらされた死虫率の増加であるかは判断できない。

有機酸は植物中では一般に中和されてイオンペアー (ま

たは塩) として存在する。しかし、中和型では致死作用発現濃度以下での吸汁阻害はみられなかったので、吸汁阻害活性は致死作用に並行してみられた吸汁阻害濃度から推定するしかない。それは (E)-アコニット酸では水酸化カリウムで中和した場合は 2% 以上、水酸化カルシウムで中和した場合は 1% 以上であった。いっぽう、水酸化カリウムで中和した (E)-アコニット酸の場合、0.1~1% の範囲で吸汁促進がみられるが、別の試験では生存率は 0.1% でも明らかに低下した。この場合の生存率低下は吸汁阻害によるものではなく、吸汁促進によってとりこまれた有機酸の毒作用によるものと考えられる。したがって、吸汁への影響と致死 (抗生) 作用を区別すべきであろう。すなわち、生存率への影響がみられる 0.1% 以上の濃度域でも内容的には 0.1~1% の範囲と 1% 以上の範囲とではその性質が異なる。

ツマグロヨコバイについては、シュウ酸、とくに水酸化カリウムで中和したシュウ酸の吸汁阻害活性がもっとも高かった。ツマグロヨコバイ耐虫性遺伝子源はトビロウンカとはまったく異なるが、シュウ酸はイネに一般に含まれており、また有機酸が植物体中に存在する時は一般に水酸化物によって中和されていることから、中和されたシュウ酸の役割は重要である。しかし、ツマグロヨコバイに対して吸汁阻害作用を示すとされる殺虫剤カルタップについての同様な人工膜を介した試験では 0.001% 程度から顕著な吸汁阻害が認められることと比較すれば (永田, 未発表), ここでみられたシュウ酸の吸汁阻害活性レベルはとくに高いものではない。しかし、水酸化カリウムで中和した (Z)-アコニット酸を給与した結果にみられるように、ツマグロヨコバイに対してもトビロウンカでみられたと同様な吸汁促進作用が認められたことは興味深い。

タイヌビエがトビロウンカに対して示す抵抗性の原因は (E)-アコニット酸による吸汁阻害であるとされてきた (Kim et al., 1975, 1976)。ツマグロヨコバイの幼虫ならびに成虫はタイヌビエで生育できるとされている。

本実験では中和された (E) および (Z)-アコニット酸をショ糖濃度 2.5% で給与した場合、いずれもトビロウンカ、ツマグロヨコバイに対して少なくとも 1% 以上の濃度でなければ、吸汁抑制が認められなかった。ショ糖液濃度を篩管液中のそれに近い 15% として水酸化カリウムで中和した (E)-アコニット酸を給与した場合は、0.25% で明らかな吸汁抑制が認められた。したがって、なんらかの手段で篩管液中の (E)-アコニット酸の濃度をこの程度に高めることができれば、トビロウンカに抵抗性を示すイネが得られる可能性はある。しかし、タイヌビエの篩管液中の (E)-アコニット酸の濃度は 0.007% 程度であり (第 1 表), 人工膜を用いた試験で得られた吸汁抑制作用発現濃度よりも 100 倍以上低い濃度であった。ここでの吸汁阻

害は24時間という短い時間で判定したもので、さらに長い時間でみた場合はわからないが、不適な宿主からの離脱はそれほど長い時間がかかるとは考えにくい。(E)-アコニット酸を耐虫性の原因物質と考えることには再検討の余地がある。

### 摘 要

1. トビイロウンカに対する有機酸の吸汁抑制作用を人工膜を用いた給与法により濃度-吸汁量曲線から解析した。有機酸としてはトビイロウンカの抵抗性原因物質とされている(E)-アコニット酸のほか(Z)-アコニット酸、シュウ酸を対象にそれぞれ遊離酸および水酸化カリウム(一部水酸化カルシウム)で中和した条件で解析した。

遊離酸の場合も中和した場合もともに全般にシュウ酸の吸汁抑制作用がもっとも顕著であった。レーザー法でタイヌビエから採取した篩管液中の(E)-アコニット酸濃度は人工膜給与試験で得られた吸汁抑制発現濃度よりもいちじるしく低く、本物質をタイヌビエのトビイロウンカに対する抵抗性の原因物質とすることについては再検討の必要があると考えられた。

2. 中和した(E)-アコニット酸、(Z)-アコニット酸では吸汁抑制作用発現濃度に近接して吸汁促進濃度域の存在が認められた。ツマグロヨコバイについて行った同様の試験でも類似の傾向が認められた。

### 引 用 文 献

- Kawabe, S., T. Fukumorita and M. Chino (1980) Collection of rice phloem sap from stylets of homopterous insects severed by YAG laser. *Plant Cell Physiol.* 21: 1319-1327.
- Kim, M., H. S. Koh, T. Ichikawa, H. Fukami and S. Ishii (1975) Antifeedant of Barnyard grass against the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 10: 116-122.
- Kim, M., H. S. Koh, T. Obata, H. Fukami and S. Ishii (1976) Isolation and identification of trans-acetic acid as the anti-feedant in barnyard grass against the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 11: 52-57.
- Shigematsu, Y., N. Morofushi, K. Ito, C. Kaneda, S. Kawabe and N. Takahashi (1982) Sterol and asparagine in the rice plant, endogenous factors related to resistance against the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Agric. Biol. Chem.* 46: 2877-2879.
- Sogawa, K. (1982) The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. *Ann. Rev. Ent.* 27: 49-73.
- 寒川一成 (1983) イネウンカ・ヨコバイ類の摂食習性とイネの品種抵抗性. 農学進歩年報 30: 21-26.
- Sogawa, K. and M. D. Pathak (1970) Mechanism of brown planthopper resistance in Mudgo variety of rice (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 5: 145-158.
- Yoshihara, J., K. Sogawa, M. D. Pathak, B. O. Juliano and S. Sakamura (1980) Oxalic acid as sucking inhibitor of the brown planthopper in rice (Delphacidae: Homoptera). *Entomol. Exp. Appl.* 27: 149-155.