

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380031

研究課題名(和文) 斑点米カメムシのイネ加害過程における各行動を制御している物質群の解明

研究課題名(英文) Rice plant compounds regulating infestation behaviors of rice-ear bugs

研究代表者

堀 雅敏 (Hori, Masatoshi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70372307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：斑点米カメムシへの水田侵入要因となっているイネ香気成分はイネの生育だけでなく、1日の中でも大きく変化していることが明らかになった。斑点米カメムシの主要種、アカヒゲホソミドリカスミカメ、アカスジカスミカメはどちらも昼夜行性種であるが、前者は昼に、後者は夜に活発であることも明らかになり、両種の水田への侵入は加害活動の日周性とイネ香気の1日の中の変化の両方に影響を受けると考えられた。また、水田侵入後にはイネ穂の複数の味覚成分がカメムシの各吸汁行動段階を制御していることも示唆された。加害行動に關与する一連の物質群を制御できれば加害抑制も可能になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Composition of rice plant volatiles which cause invasion of rice-ear bugs into paddy fields changed during a day as well as rice development. Although both *Trigonotylus caelestialium* and *Stenotus rubrovittatus* were nocturnal-diurnal insects, the former was more active in the photophase than in the scotophase and the latter was more active in the scotophase than in the photophase. Therefore, invasion of the bugs into paddy fields may be influenced by changes of volatile composition from rice during a day and diurnal infestation activities of the bugs. In addition, it was suggested that each step of feeding behavior of bugs was regulated by several rice compounds. Therefore, regulating active compounds which play roles in infestation behaviors of the bugs may lead to prevent infestation of rice by the bugs.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：害虫 斑点米カメムシ イネ 水田 寄主選択 摂食刺激物質 誘引物質 吸汁行動

1. 研究開始当初の背景

(1) 斑点米カメムシ類はイネの子実を吸汁することで斑点米を生じさせる。斑点米は着色粒として扱われ、米の等級落ちの大きな原因となっており、甚大な経済的被害を与えている。斑点米カメムシはイネの出穂を契機に周辺のイネ科雑草地や牧草地から水田に侵入するが、その理由は未解明であった。

(2) 斑点米カメムシの主要種であるアカヒゲホソドリカスミカメ(アカヒゲ)とアカスジカスミカメ(アカスジ)を用い、イネ香気の誘引性を調査した。その結果、前者は開花期イネ穂香気に、後者はこれに加え、成熟期イネ穂や水田雑草イヌホタルイの開花期穂香気にも誘引されることを明らかにした。

(3) イネ香気が生育に伴って変化し、幼穂形成期や開花期穂で放出割合が特異的に多くなる *-caryophyllene* がアカヒゲの雌に誘引性をもつことを明らかにした。さらに、雄に対しては *decanal* が誘引性をもつことも明らかにした。

(4) アカヒゲではイネ開花穂の主要成分である *geranyl acetone*、*-caryophyllene*、*-elemene*、*decanal*、*methyl salicylate*、*methyl benzoate*、*tridecene* の7成分混合物が雌雄に対してイネ開花穂と同程度の誘引性を有していることを、アカスジでは上記混合物から *methyl benzoate* を除いた6成分混合物が雌に対してイネ開花穂と同程度の誘引性を有していることを明らかにした。

(5) イヌホタルイ開花穂香気的主要成分も *-caryophyllene* であり、イヌホタルイのアカスジに対する誘引性にも *-caryophyllene* と *-elemene* が関与していることを明らかにした。

(6) 開花期のイネ穂や水田雑草穂の香気の水田への侵入の主な要因の一つであることを解明したのは我々の研究が初めてであり、さらに誘引因子の物質レベルでの解明に成功した点でも、斑点米カメムシ類の水田への侵入機構の解明に大きく貢献したといえた。

(7) しかし、上記研究成果はサンプリングした切った植物体から捕集した香気に対する虫の反応に基づくものであり、実際の野外水田から放出されている香気ブレンドに対する反応を捉えたものではなかった。斑点米カメムシ類の水田への侵入における香気役割をさらに明確にするには、実際の水田から放出されている香気について調査する必要があると考えた。

(8) カメムシのイネ植物体への到達には香気が重要な役割をしていることは解明されてきたが、その後の連続吸汁に至るまでの各

行動パターンや各行動を制御している物質については明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) 斑点米カメムシの主要種であるアカスジおよびアカヒゲに関して、実際の野外水田での侵入に関与している物質を特定するため、水田から実際に放出される香気物質組成がイネの生育や時刻に伴いどのように変化しているか明らかにする。

(2) 水田のイネから実際に放出されている香気物質に対する斑点米カメムシの嗅覚応答を電気生理学的に明らかにする。

(3) 植物体到達後、吸汁に至るまでの行動パターンおよび移動、吸汁行動といった加害行動の日周性を明らかにする。

(4) 連続吸汁に至るまでの各行動(定着、口針挿入、探針、吸汁開始、連続吸汁など)を制御している物質群を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 水田のイネから放出されている香気組成の時刻および生育に伴う変化:

水田で生育中のイネ(あきたこまち)香気を5~6葉期、6~7葉期、最高分けつ期、幼穂形成期、開花期、糊熟期、成熟期の各生育期に捕集した。捕集時刻は7、10、13、16、19時の計5回(糊熟期、成熟期は19時を除く計4回)とし、各1時間、水田で捕集した。ポリフッ化ビニリデン性のガス捕集用袋でイネ地上部を袋掛けし、開口部をエニーロック®で閉じた。香気はポータブルパイロライザー(キューリーポイントインジェクター)用のTenax®カートリッジに捕集した。Tenax®カートリッジは捕集袋に設けられたコックに取り付け、Tenax®カートリッジを経由して袋内部の空気をエアサンプラーで吸引することにより(流量:0.3 l/min)香気物質をTenax®に吸着させた。香気を吸着させたTenax®は窒素ガスで10分間パーズ後(0.6 l/min)ポータブルパイロライザーで吸着させた香気物質をGC-MSに直接注入し、香気成分を分析した。分析は各3反復行った(6~7葉期は10時が2反復でその他は1反復)。

(2) イネ香気物質に対する斑点米カメムシの触角電位応答:

GC-EADを用いてイネ香気物質に対するアカヒゲの触角電位応答を調査した。実験系の確立のため、まず、性フェロモン成分に対するアカヒゲ雄の応答を調査した。応答が得られる触角の設置法を確立した後、水田のイネから放出されていることが上記(1)で明らかになった *decanal*、*-caryophyllene*、(*Z*)-3-hexenol、*linalool*、*nonanal* の標品および水田の開花期イネ穂香気に対する応答を調査した。標品はヘキサンで1%に希釈し

たものを GC-EAD に注入し、イネ香気成分は上記(1)と同様の方法で捕集したものをキューリーポイントインジェクターで GC-EAD に注入した。

(3) 植物体到達後連続吸汁に至るまでの行動パターン：

吸汁行動測定装置 (EPG) を用い、小麦幼苗に対する吸汁行動を記録した。記録した波形パターンから、過去の知見と照合し、どのような行動がみられるか解析した。

(4) 加害行動の日周期性：

加害に關与する行動としてアカヒゲとアカスジの移動行動および吸汁行動の日周期性を調査した。移動行動はビデオに記録した映像より解析し、吸汁行動は EPG の波形データより解析した。両行動とも雌雄別々に、16L8D の明暗周期における行動を調査し、データ記録は暗期スタートとした。いずれも、明暗コントロールができる簡易暗室内で、 25 ± 1 の条件で行った。移動行動はプラスチックケース (138 × 64 × 17 mm) に小麦幼苗と一緒に 4~5 日齢の成虫 1 頭を入れ、行動を 24 時間、ケース上方からビデオで記録し、各 1 時間当たりにおける移動行動時間を解析した。0.5 mm/ms 以上の移動がみられた行動を移動行動と定義した。吸汁行動は小麦幼苗に対する 4~5 日齢の成虫の行動を EPG で記録、解析した。上記(3)の実験より分類された吸汁行動の各ステップのうち、探針、穿孔、試食、連続吸汁の時間を吸汁時間とし、各 1 時間当たりの吸汁時間を解析した。両行動とも明期と暗期の 1 時間当たりの行動時間の割合を求め、これを $\arcsin(x)^{0.5}$ で変換した後、明期と暗期における行動時間の違いを標本内因子、雌雄、交尾経験の違いを標本間因子として、対応のある多元配置分散分析により統計解析した。両種とも雌雄それぞれで、交尾経験の有無別に 8 反復ずつ試験した。未交尾個体は終齢段階から雌雄別々に飼育することで得、既交尾個体は雌雄一緒に飼育し、交尾を確認することで得た。

(5) 摂食刺激物質の探索：

アカヒゲ成虫を用いて、イネ穂抽出物およびデンブンに対する摂食試験を行った。水田で栽培した糊熟期のイネ穂 (あきたこまち) をヘキサンで 30 秒間浸漬抽出した後、抽出残渣をメタノールで 72 時間浸漬抽出した。メタノールは 24 時間毎に新しいものと交換した。メタノール抽出は穂をそのまま浸漬した抽出法 (抽出物 A) とミキサーで粉碎後に浸漬した抽出法 (抽出物 B) の 2 つの抽出法で行った。各抽出液はロータリーエバポレーターで減圧乾固し、試験に用いた。抽出物は寒天または含水脱脂綿に処理して与え、それらに対するアカヒゲの摂食行動を EPG で測定、解析した。ヘキサン抽出物およびメタノール抽出物 A は寒天に処理し、メタノール抽出物 B

は寒天および含水脱脂綿の両方に処理して与えた。ヘキサン抽出物の試験では、シャーレ (33 mm) に入れた寒天 (3% アガロース) 3 g をヘキサン抽出物を塗布したコアレスラップ (20 mm) を通して摂食させた。ヘキサン抽出物はイネ穂 1 g 当量あたりヘキサン 10 μ l に溶かし、30 μ l をコアレスラップに塗布して風乾した。対照区はヘキサンのみを処理して風乾した。メタノール抽出物は寒天または蒸留水を含水させた脱脂綿 (脱脂綿 0.2 g; 蒸留水 2.8 g) にイネ穂 3 g 当量を添加した。メタノール抽出物の試験では、パラフィルム (20 mm) を通して摂食させた。デンブンに対する摂食試験では、デンブン 0.75 g を先と同様の含水脱脂綿に添加し、パラフィルム越しに摂食させた。メタノール抽出物とデンブンの混合試験では、前者をイネ穂 3 g 当量、後者を 0.75 g、含水脱脂綿に添加し、同様に与えた。供試虫には羽化後 4~5 日の成虫を用い、雌雄別に解析した。試験時間は寒天を用いた試験では 6 時間、含水脱脂綿を用いた試験では 2 時間とし、各試験区とも 8 反復行った。吸汁行動は EPG 波形より探針、穿孔、試食、連続吸汁、休止の 5 つに分類し、計測時間内に見られた各行動の合計行動時間、行動回数を調査、解析した。行動回数は $\log_{10}(x + 0.5)$ で変換後、統計解析した。寒天を用いたメタノール抽出物の活性試験およびデンブンを用いた試験では Tukey による多重比較検定を行い、ヘキサン抽出物、含水脱脂綿を用いたメタノール抽出物の試験では、*t* 検定を行った。

4. 研究成果

(1) 水田のイネから放出される香気組成の時刻および生育に伴う変化：

本研究により、水田で生育中のイネから実際に放出されている香気、時刻および生育に伴う変化を初めて明らかにすることができた。さらに、香気を Tenax® に捕集して分析することにより、定量的なデータを得ることができた。SPME を用いた開花期のイネ切り穂の以前の研究データから、開花穂では *-caryophyllene* の放出割合が多いことが示されていたが、本研究から、実際の水田のイネでも、開花期のイネでは *-caryophyllene* の放出割合が多いことが示された (図 1)。

しかし、本研究から、*-caryophyllene* 放出割合は 6~7 葉期から徐々に増え始め、幼穂形成期で最大に達することが明らかになった。以前の研究で、*-caryophyllene* がアカヒゲ、アカスジの誘引に重要な働きをしていることを示してきたが、本研究により *-caryophyllene* と他の物質との割合がきわめて重要と考えられた。例えば、*-caryophyllene* とは逆に、(*E*)-および(*Z*)-3-hexenol は 5~6 葉期に最も多く、その後、徐々に減少し、開花期になると急減してほとんど放出されなくなることが明らかになった (図 2)。アカヒゲやアカスジに対する

イネの生育段階と誘引の有無との関係には、 β -caryophyllene と 3-hexenol の量比が重要な役割をしている可能性が考えられた。糊熟期以降も 3-hexenol はほとんど放出されないが、 β -caryophyllene もほとんど放出されなくなるため、アカヒゲ、アカスジは糊熟期以降のイネに誘引されにくくなると考えられる。開花期のイネ香気成分のその他の特徴として、2-heptanone および 5-methyl-2-hexanol の放出割合が、この時期だけ比較的多いことも明らかになった。

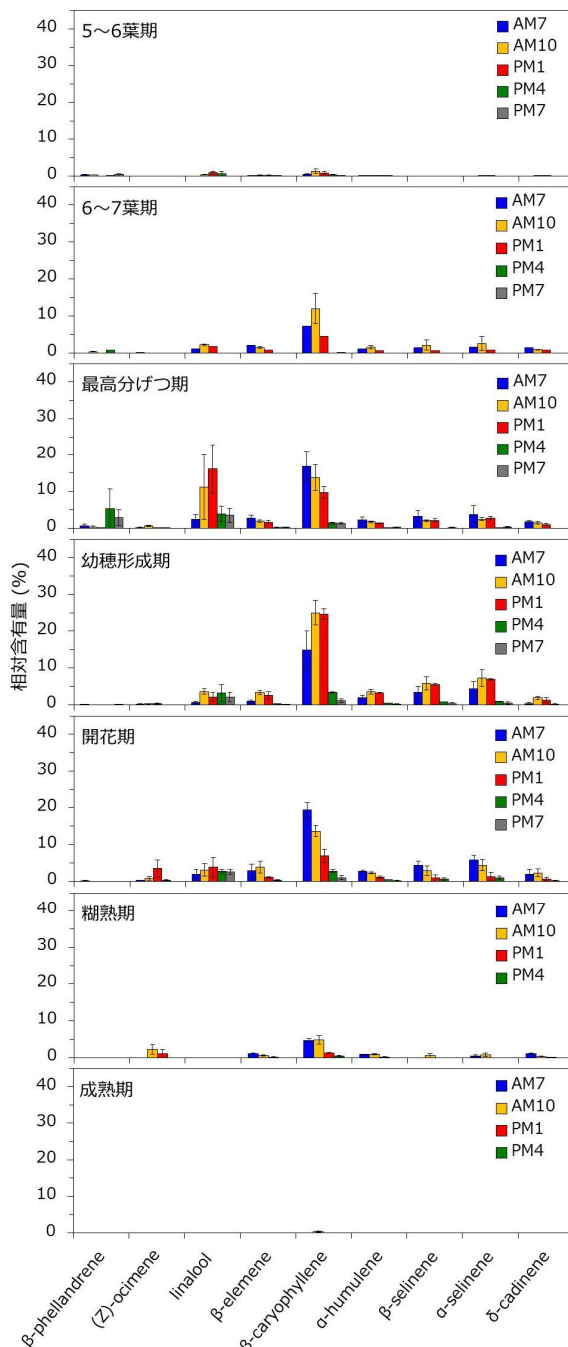


図1 イネ香気成分の時刻、生育に伴う変化 (主なテルペン化合物)

また、イネの香気成分組成は1日の中で大きく変化することが明らかになった。 β -caryophyllene は朝~日中に放出量が多く、夕方~夜は少ないのに対して、3-hexenol は

日中に少なく、夕方~朝にかけて多いことが明らかになった。今後は、1日におけるイネ香気成分の変化に伴い、斑点米カメムシのイネ香気に対する応答も変化するのか調べることで、水田への侵入のメカニズムのさらなる詳細が明らかになることが期待される。

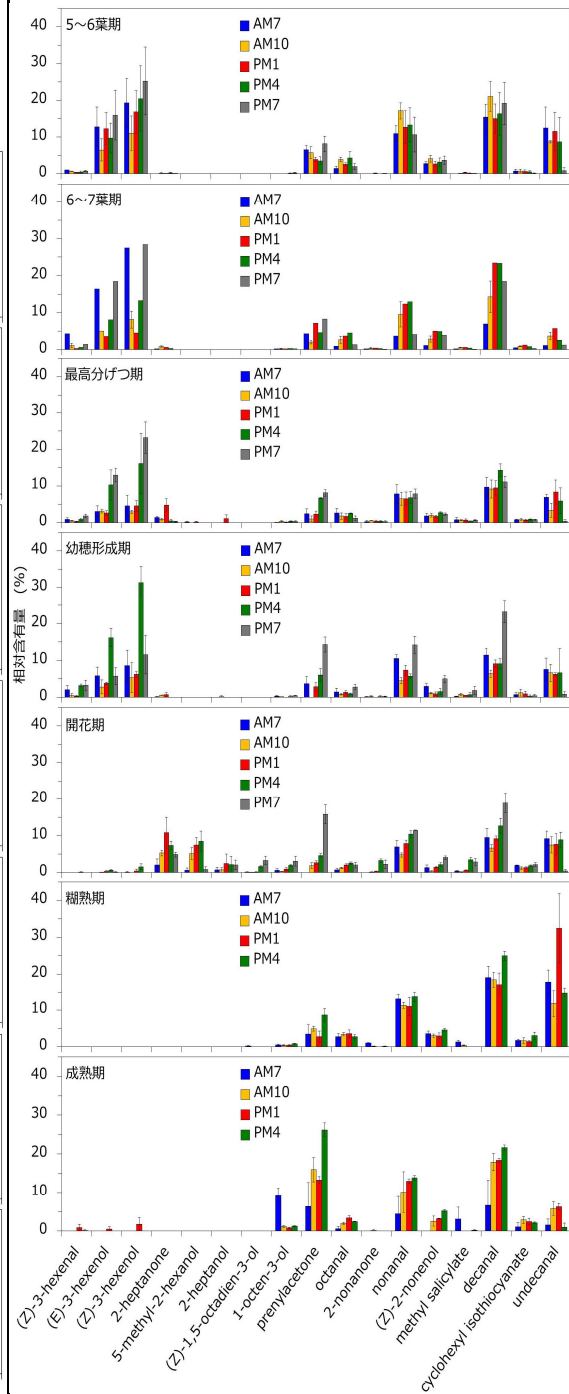


図2 イネ香気成分の時刻、生育に伴う変化 (テルペン以外の化合物)

(2) イネ香気物質に対する斑点米カメムシの触角電位応答:

decanal にのみ触角電位応答がみられ、 β -caryophyllene を含めた他の物質およびGCで分離された開花期イネ穂香気成分では、いずれも応答が得られなかった。このことから、decanal の触角電位応答は他の物質に比べ、

きわめて高いことが明らかになった。

(3) 植物体到達後連続吸汁に至るまでの行動パターン：

EPG 波形より吸汁行動には探針（口針を刺して吸汁箇所を確認）、穿孔（餌の可溶化のための唾液の注入）、試食（味の確認）、連続吸汁の各行動段階があることが明らかになった。また、連続吸汁の途中には休止が入ることも稀にあった。

(4) 加害行動の日周期性：

移動行動：アカヒゲの移動行動は暗期前半と明期後半に活発な傾向がみられた（図3）。また、雌雄の別や交尾経験の有無にかかわらず、暗期よりも明期のほうが有意に活発であった。雌雄間および交尾経験間には活動性の有意な違いはみられなかった。

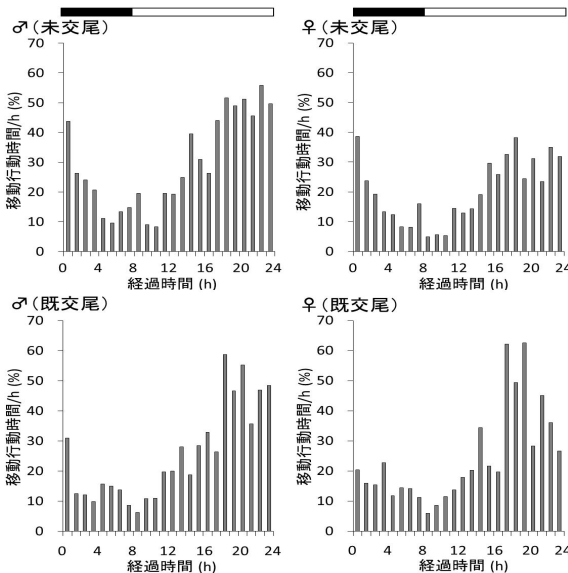


図3 アカヒゲの移動行動の日周期性

黒/白の横棒は暗期/明期を示す(以後の図も同様)

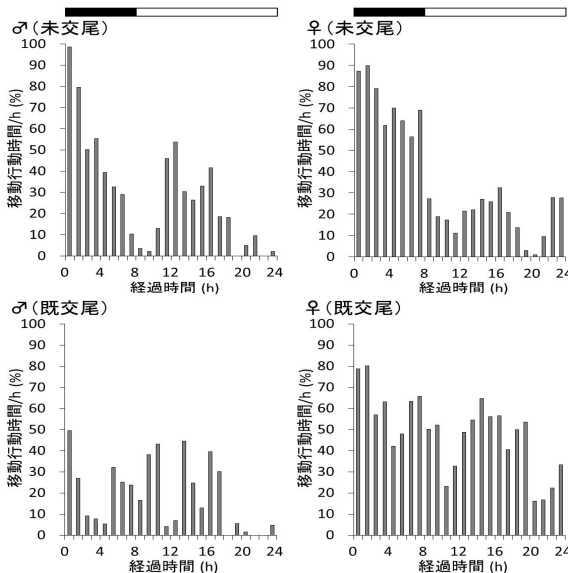


図4 アカスジの移動行動の日周期性

アカスジの移動行動は暗期前半と明期中頃に活発な傾向がみられた（図4）。雌雄とも

に、暗期の移動行動は明期よりも有意に活発であった。また、雌は雄よりも有意に活発であった。

吸汁行動の日周期性：アカヒゲの吸汁行動は既交尾雄を除き、明期後半に活発になる傾向がみられた（図5）。既交尾雄の吸汁行動は1日中、常に活発であった。吸汁行動は暗期よりも明期のほうが有意に活発であり、また、既交尾成虫のほうが未交尾成虫よりも有意に活発であった。

アカスジの吸汁行動の活動性は雌雄と明暗の間および雌雄と交尾経験の間に有意な相互作用がみられた。既交尾雄の吸汁行動は暗期前半に活発であった（図6）。また、未交尾雌は1日中活発であったのに対して、未交尾雄と既交尾雌の活動性は常に低かった。

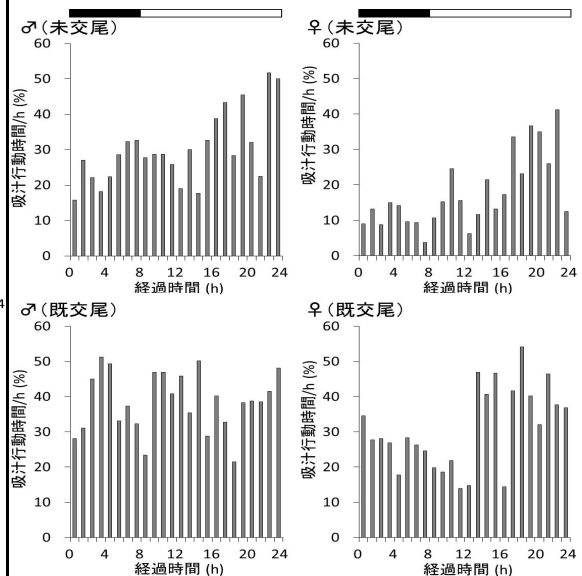


図5 アカヒゲの吸汁行動の日周期性

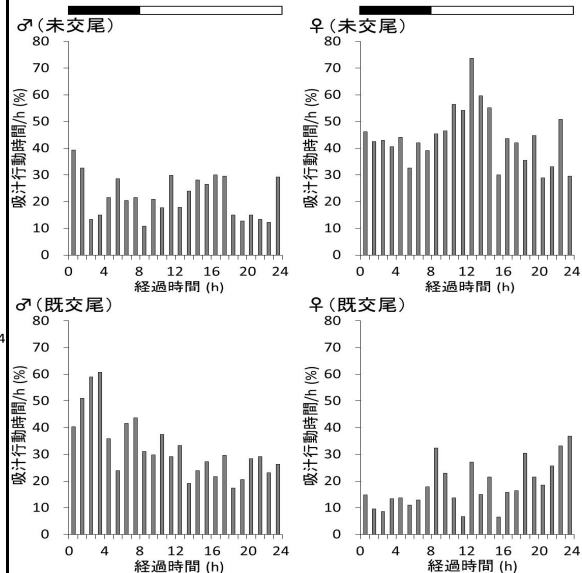


図6 アカスジの吸汁行動の日周期性

移動および吸汁行動の日周期性調査から、アカヒゲは昼に、アカスジは夜に活動がやや活発な昼夜行性種であることが明らかになった。以前の研究で、アカヒゲは -

caryophyllene の純物質に誘引されるが、アカスジは純物質には誘引されず、 α -caryophyllene を含む混合物に誘引されることが明らかになっている。また、(1)の成果から、イネからの α -caryophyllene の放出量は日中多く、夜間に少ないことが明らかになっている。本研究でアカヒゲの加害行動は夜よりも昼に活発であることが示されたことから、アカヒゲは開花期の日中にイネからの放出量が多い α -caryophyllene を重要な嗅覚情報として利用していると考えられる。これに対して、アカスジは夜の活動性が高いため、夜は放出量が少なくなる α -caryophyllene だけを重要な情報として利用するのではなく、 α -caryophyllene を含めた複数化合物の混合物をより重要な情報として利用しているのかもしれない。

(5) イネ穂に含まれる摂食刺激物質：

糊熟期イネ穂のヘキサノール抽出物を処理しても、探針、穿孔、試食、連続吸汁のいずれの行動時間も変化することはなかった。行動回数に関しても、試食回数が有意に減少した以外は、特に変化はみられなかった。これらのことから、ヘキサノール抽出物はアカヒゲの吸汁行動に影響を与えることはないと考えられた。

メタノール抽出物は、穂を粉碎してから抽出した抽出物 B が抽出物 A よりも刺激活性が高く、また、寒天への処理よりも含水脱脂綿への処理のほうが、明瞭な活性がみられた。含水脱脂綿に処理したメタノール抽出物 B の摂食試験の結果から、メタノール抽出物は探針や穿孔といった吸汁の初期段階の行動回数を増加させることが示され、雄では有意な活性が、雌でも有意差は得られなかったものの増加させる傾向がみられた(図7)。行動時間については、いずれの行動でも対照区との間に有意な差はみられなかった。

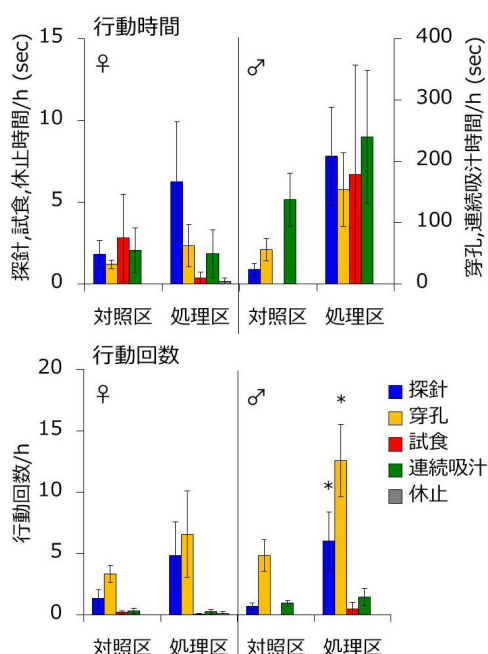


図7 糊熟期イネ穂メタノール抽出物がアカヒゲの吸汁行動に与える影響

デンプンにはアカヒゲの吸汁行動に対する刺激活性はみられなかった。デンプンとメタノール抽出物との混合物にも活性は認められなかった

以上の結果から、イネの香気に誘引されて水田に侵入し、植物体に到達したアカヒゲはイネに含まれる味覚物質により吸汁行動が刺激されることが明らかになった。また、吸汁の初期段階の行動にはメタノールに可溶性物質が関与していることが明らかになったが、その後の安定した吸汁には、それとは異なる物質が必要であることも示唆された。ヘキサノール抽出物には摂食刺激活性がないこと、メタノール抽出物にも連続吸汁を刺激する活性がないことから、安定した連続吸汁の要因となる物質は極性物質である可能性が高いと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Suzuki, Y. and Hori, M., Diurnal locomotion and feeding activities of two rice-ear bugs, *Trigonotylus caelestialium* and *Stenotus rubrovittatus* (Hemiptera: Heteroptera: Miridae), Applied Entomology and Zoology, 査読有, 2014, 49: 149-157
DOI:10.1007/s13355-013-0234-y

〔学会発表〕(計2件)

鈴木雄介・堀雅敏, 吸汁行動測定装置とビデオによるアカヒゲホソミドリカスミカメとアカスジカスミカメの行動の日周性解析, 第57回日本応用動物昆虫学会大会, 2013年3月27-29日, 日本大学(神奈川県藤沢市)

Suzuki, Y. and Hori, M., Diurnal locomotion and feeding behaviors of rice-ear bugs measured by electrical penetration graph and video camera. XXIV International Congress of Entomology. August 19-25, 2012. Daegu, Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 雅敏 (HORI, Masatoshi)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 70372307

(2) 研究分担者

長澤 淳彦 (ATSUHIKO, Nagasawa)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 60616431