

環動昆

原 著

森本正則・太田好則・井原崇視・有馬和弘・福本浩美・ワリンソーンチャバシリ・ 駒井功一郎：タイ国産植物抽出物中のハスモンヨトウ幼虫と ヤマトシロアリに対する摂食阻害活性物質（英文）	1
板倉修司・寒川敏行・田中裕美・榎 章郎： 後腸共生生物のセルラーゼ遺伝子を用いたLAMP法による ヤマトシロアリとイエシロアリの識別	9
上野忠平・小池志乃武・中山幸治・勝田純郎：除虫菊葉における ピレトリン類の生成・挙動に関する研究	17
平林公男・武田昌昭・富岡康浩：廃トンネル内におけるメタアルデヒド粒剤 トラップを用いたチャコウラナメクジの分布調査	23

短 報

Yuliati Indrayani・吉村 剛・今村祐嗣：マイクロ波を用いた小径丸太材中の アメリカカンザイシロアリ活性の探知（英文）	29
---	----

書 評	33
会 報	36
投稿規定	40

Vol. 17

1

日本環境動物昆虫学会

2006

Insect Antifeedants in Thailand Plant Extracts against the Common Cutworm, *Spodoptera litura*, and a Subterranean Termite, *Reticulitermes speratus*

Masanori Morimoto^{1)*}, Yoshinori Ohta¹⁾, Takashi Ihara¹⁾, Kazuhiro Arima¹⁾,
Hiromi Fukumoto¹⁾, Warinthorn Chavasiri²⁾ and Koichiro Komai¹⁾

- 1) Laboratory of Pesticide Chemistry, Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University; Nara 631-8505, Japan
- 2) Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

(Received: September 15, 2005; Accepted: February 9, 2006)

Abstract

Antifeedant activities of 17 Thailand plant species were evaluated by choice disk bioassay against the common cutworm, *Spodoptera litura* F., and a subterranean termite, *Reticulitermes speratus* (Kolbe). A total of 34 extracts obtained by methanol and dichloromethane were prepared in Chulalongkorn University, Thailand. Dichloromethane extracts from *Artocarpus heterophyllus*, *Xylia xylocarpa* and *Pterocarpus macrocarpus* showed insect antifeedant activity against *S. litura*. Three prenylated flavonoids, artocarpin (**1**), cycloartocarpin (**2**) and isocyclomorusin (**3**) and one flavanone, artocarpanone (**4**), were isolated from jackfruit, *A. heterophyllus* (Moraceae), and flavonoids **1** and **3** were newly disclosed as antifeedants with moderate activities against *S. litura* larvae compared with salannin (ED₅₀: 0.066 μmol/cm²). Because *A. heterophyllus* lumber is used for construction and furniture in Thailand, the antifeedant activities of isolated flavonoids (**1**, **2**), natural stilbenes (**8**, **9**) and their derivatives (**10**, **11**) against *R. speratus* were also evaluated. Most of the test compounds showed good antifeedant activity, and artocarpin (**1**) had a fatal effect against *R. speratus* at a dose of 10 μg/disk. The antifeedant activity of the stilbenes appeared stronger than that of the flavonoids.

Key words : Insect antifeedant, *Spodoptera litura*, *Reticulitermes speratus*, *Artocarpus heterophyllus*, flavonoids, Thailand plants

Introduction

Plants and phytophagous insects are closely related, coevolving defense responses and mechanisms to overcome these defense systems, respectively. Some plants have elaborate defense chemicals against phytophagous insects (Morimoto and Komai, 2000), while others have developed various types of physical defense system and seasonal escape mechanisms (Yano, 1994). In tropical regions lacking a winter season, there is strong competition, possibly helping enforce the chemical defense systems of tropical plants against pests. It is well known that most flavonoids act variously between insects and plants (Harborne and Grayer, 1993).

Moraceae produce unique 2'-substituted and prenylated flavonoids (Venkataraman, 1972) that cause the yellow color of the heartwood and act as

tyrosinase inhibitors (Shimizu *et al.*, 2000). Moreover, stilbenes occurring with these flavonoids reportedly have insecticidal activity against malaria (Boonlaksiri *et al.*, 2000) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (Torres *et al.*, 2003). Studies on defensive phytochemicals have disclosed not only as a natural phenomenon but also their applicability in development of agrochemicals such as insect repellents and insecticides (Escoubas *et al.*, 1993b, Morimoto, 2004).

Materials and Methods

General

¹H and ¹³C NMR were measured on a JEOL 270EX (270 MHz) spectrometer using TMS as an internal standard. Mass spectra were taken at 70 eV (probe) in a Shimadzu GCMS 9100-MK. Compounds were separated by column chromatography on silica gel,

*Corresponding author : masanori@nara.kindai.ac.jp

Fuji Silysia Chemical BW-127ZH and BW-300 (Fuji Silysia Chemical Ltd., Japan). TLC was conducted using silica gel plates with a fluorescent indicator (Merck Silica Gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm thickness).

Screening sample preparation

Air dried plant materials were purchased at an herbal pharmacy in Bangkok. All plant materials were extracted by dichloromethane and subsequently methanol in Chulalongkorn University, Thailand (Fig. 1).

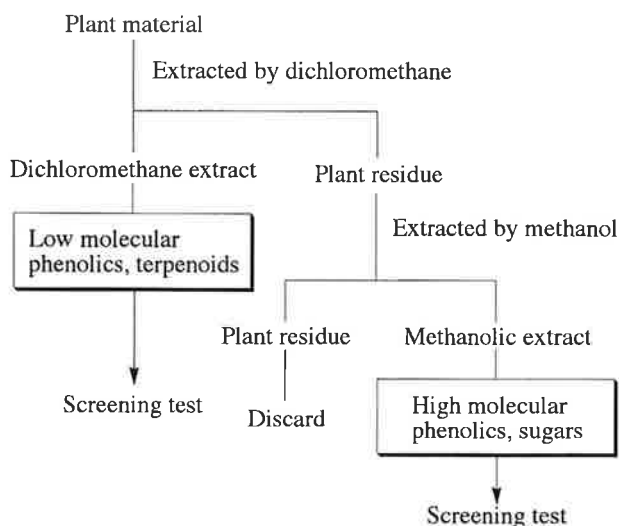


Fig. 1 Preparation of tested extracts from Thailand plant.

Isolation of flavonoids from *A. heterophyllum*

Because the dichloromethane extract of *A. heterophyllum* showed insect antifeedant activity from the first screening, the insect antifeedants were isolated from 900 g of dried plant extract (13.86 g) using dichloromethane (5 L) (yield: 1.54%).

The extract (1.0 g) was chromatographed on a silica gel column (Fuji Silysia Chemical, BW-127ZH; 200 g, 14.0 cm in length, 6.0 cm in diameter). Stepwise eluates of hexane-EtOAc (3:1, 600 ml; 2:1, 830 ml and 1:1, 890 ml) gave artocarpin (1) (yield: 427.1 mg, 42.7%) (Lin *et al.*, 1995), cycloartocarpin (2) (83.4 mg, 8.3%) (Likhitwitayawuid *et al.*, 2000, Lu and Lin, 1994), isocyclomorusin (3) (6.5 mg, 0.65%) (Chen *et al.*, 1993) and artocarpanone (4) (86.9 mg, 8.7%) (Venkataraman, 1972), respectively (Fig. 2). Isolated natural products were confirmed by comparison of literature data or on the basis of their EI-MS and ¹H, ¹³C NMR spectra.

Methylation of flavonoids (1, 2) from *A. heterophyllum* and resveratrol (9)

Two flavonoids (1, 2) and resveratrol (9) were methylated with methyl iodide. Methylated derivatives were confirmed by spectral analyses and their

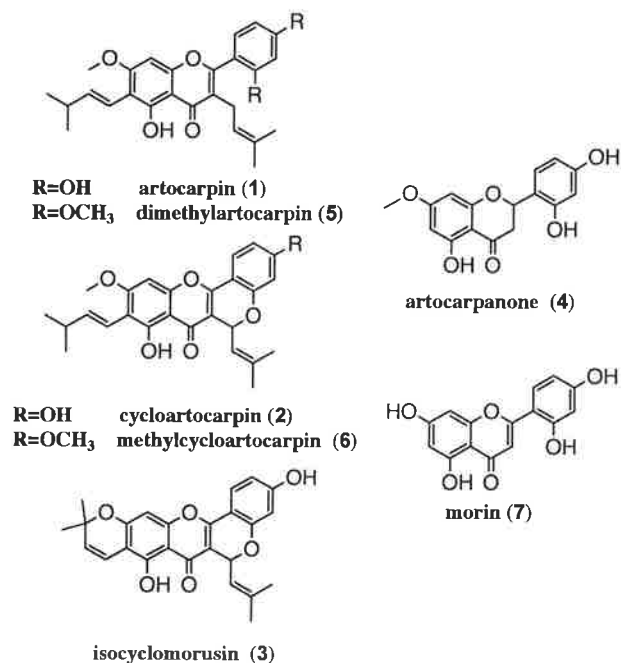


Fig. 2 Isolated flavonoids from Jackfruits, *A. heterophyllum*, its methylated derivatives and morin.

biological activities were compared with parent compounds to examine the effect of methyl capping of hydroxyl groups.

After dissolving each flavonoid (1, 2) or resveratrol (9) in acetone with potassium carbonate, an excess amount of methyl iodide was added to the solution. While monitoring the reaction product by TLC, water was added to the mixture, and the product was extracted with EtOAc. The organic layer was dried with anhydrous sodium sulfate and evaporated to obtain the corresponding methylated products: dimethylartocarpine (5) (yield: 80.6%) (Pinto and Braz-Filho, 1994).

Methylcycloartocarpin (6) (yield: 93.6%). Yellow crystalline, m.p. 210–212°C. EIMS: 448 (M^+ , 18.3%), 406 (13.5), 392 (13.5), 377 (11.0), 349 (45.5), 263 (82.4), 247 (7.2), 203 (100), 95 (82.0), 56 (98.0). ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.11 (6H, d, $J=6.6$ Hz, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.98 (3H, s, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.17 (1H, m, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}$), 3.84 (3H, s, Ar-O-CH₃), 3.94 (3H, s, Ar-O-CH₃), 5.44 (1H, d, $J=9.24$ Hz, $>\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 6.29 (1H, d, $J=9.24$ Hz, (C6') H), 6.46 (1H, s, (C8) H), 6.48 (1H, d, $J=2.31$ Hz, (C3') H), 6.56 (1H, d, $J=17.16$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$), 6.62 (1H, dd, $J=6.92, 2.31$ Hz, (C5') H), 6.73 (1H, dd, $J=16.17, 6.6$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.69 (1H, d, $J=8.9$ Hz, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 13.45 (1H, s, Ar-OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 178.6, 164.5, 162.5, 159.1, 158.0, 155.2 (overlapped), 142.6, 139.2, 124.9, 121.0, 115.6, 110.0, 109.9, 109.0, 108.6, 105.7, 102.2, 89.7, 69.9, 56.0, 55.6, 33.1, 29.7, 25.9, 22.7 (CH₃

s2), 18.7; and methylresveratrol (**11**) (yield: 82.7%) (MacRae *et al.*, 1985).

All derivatives were confirmed by comparison with literature data or on the basis of their EI-MS and ^1H , ^{13}C NMR spectra.

Reference chemicals

Morin (**7**) was purchased from Wako chemical Co. Ltd., resveratrol (**9**) was purchased from LKT Laboratories Inc. (lot #2394710), and chlorophorin (**8**) and tetrahydrochlorophorin (**10**) were a gift from Dr. Shimizu (Kyushu University, Japan). A positive control for antifeedant activity against common cutworm, salannin, was isolated from neem oil (Daiho Koryo, Ltd. Co) and a negative control for antifeedant activity against termites, (+)-catechin, was purchased from Sigma Co. Ltd.

Insect rearing

Common cutworm (*S. litura*): Common cutworm, *S. litura*, was obtained from Sumika Technoservice Co. Ltd. (Takazuka, Japan) and reared on an artificial diet (Insecta LF, Nihon Nosan Kogyo Co., Japan) at 26.5°C and 60% humidity.

Subterranean termite (*R. speratus*): The subterranean termite *R. speratus*, was collected from a pine forest near the Enju coast (Wakayama Pref. Japan, N35°53' 13", E135°07' 51") in 2004, brought to our university, and maintained by feeding with pieces of pine wood in a controlled environment at 26.5°C.

Dual choice type antifeedant test

For the antifeedant test against common cutworm, fresh sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaf disks (2 cm in diameter) were prepared using a cork borer. The plant was cultivated in Kinki University farm (Nara Pref. Japan). Two disks were treated with an appropriate amount of test compounds as an acetone solution and another 2 with acetone as a control. The 4 disks were then set in alternating positions in the same petri dish on moistened filter paper. After completely removing the solvent, 15 common cutworms (3rd. instar) were released into the dish and kept under the rearing conditions with illumination for 5-6 h. (Escoubas *et al.*, 1993a). Partially consumed leaf disks were taped onto paper, photocopied and confirmed to contain no errors, then converted to digital data files with a digital scanner. Digital data analysis was performed on a PC using the NIH Image program (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). For each experiment, the data file of

an intact disk was measured and compared to that of a treated disk. To measure the activity of the extracts, we adopted the antifeedant index (AFI):

$$\text{AFI} = \% \text{ of treated disks consumed} / (\% \text{ of treated disks consumed} + \% \text{ of control disks consumed}) \times 100.$$

Evaluation of test compounds was conducted using the ED₅₀ antifeedant value calculated from the consumed leaf disk area data. A straight line was fitted to the points obtained by bioassay and the ED₅₀ was calculated as the dose midpoint between the complete inhibition and no effect points using the probit method (Finney, 1952). The FI index was then used to indicate the feeding inhibitory rate as follows:

$$\text{FI}(\%) = (50 - \text{AFI}) \times 2.$$

This biological activity rate was converted from AFI to a corresponding 0~100% inhibition range. The 'CDC' index was used to indicate the rate of control disk consumption and is dependent on the vitality of the worm during the test period; that is, feeding of a toxic compound will decrease the CDC value. Messchendorp *et al.* (2000) showed similar behavioral observations with butterfly larvae treated with antifeedant drimans.

Against termites, filter paper disks (Toyo filter paper, No.1; 6 mm in diameter) instead of leaf disks were used for the antifeedant assay. The treated disks were placed on a petri dish (5 cm in diameter) with moistened vermiculite (ca. 2 mm thick). Four paper disks were set in alternating positions in the same petri dish. Twenty *R. speratus* workers from the same colony were then released into the dish and maintained for 2 weeks in darkness at 27°C with occasional spraying with water to avoid dryness.

TLC autobiography for detection of antifeedant

TLC silica gel plates with a fluorescent indicator (Merck Silica Gel 60 F₂₅₄; 0.25 mm thick) were cut into 4 x 10 cm pieces. The sample containing the EtOAc solution was applied as a band, and the plate was developed in an appropriate solvent system for separation. Distilled water was added to the artificial diet of the common cutworms, making a paste, which was then applied to the TLC plate surface. The TLC plate was then placed in a plastic cup with 50 larvae (4th instar) for 1 day at 26.5°C. The location of silica gel or remaining paste was compared with the *R_f* values of the compounds detected on a reference TLC plate developed under the same conditions.

Results and Discussion

Evaluation of Thailand plant extracts for insect antifeedants

Some of the tested Thailand plant extracts showed insect antifeedant activity against *S. litura* larvae (Tables 1, 2). The activity of methanolic extracts was found to be lower compared to that of corresponding dichloromethane extracts (Tables 1, 2). Leguminosae dichloromethane extracts from *Pterocarpus macrocarpus* and *Xylocarpus xylocarpa* showed good antifeedant activity in this first screening (Table 1), and the activity of most Zingiberaceae extracts was high. In line with this, previous reports have documented insect repellent and insecticidal compounds isolated from Zingiberaceae (Dadang *et al.*, 1998, Pandji *et al.*, 1993). The *A. heterophyllum* extract also showed high insect antifeedant activity and reduction in the CDC index due to decreasing insect vitality. No previous report has documented the constituents of *A. heterophyllum*, and thus, further identification and activity evaluation is deemed important (Table 1).

Table 1 Insect Antifeedant activity of Plant Dichloromethane Extracts from Thailand against *S. litura*

Species	Part	FI(%)	CDC(%)
Annonaceae			
<i>Anaxagorea luzonensis</i> Gray.	Heartwood	18.2	100.0
Asclepiadiaceae			
<i>Cryptolepis buchanani</i> Roem.	Heartwood	17.7	100.0
Betulaceae			
<i>Betula alnoides</i> Buch. Ham.	Leaves	inactive	100.0
Cyperaceae			
<i>Cyperus alternifolius</i> Roxb.	Leaves	26.9	100.0
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Tubers	inactive	100.0
Lauraceae			
<i>Cinnamomum subavenium</i> Miq.	Heartwood	inactive	100.0
Leguminosae			
<i>Pterocarpus macrocarpus</i> Kurz.	Heartwood	82.2	83.6
<i>Xylocarpus xylocarpa</i> Taub.	Heartwood	92.9	16.9
Menispermaceae			
<i>Anamirta cocculus</i> (L.)	Heartwood	5.2	100.0
Moraceae			
<i>Artocarpus heterophyllum</i> Lam.	Heartwood	90.5	63.0
Rhamaceae			
<i>Ventilago denticulata</i> Willd.	Heartwood	52.3	100.0
Verbenaceae			
<i>Tectona grandis</i> L. F.	Heartwood	44.7	74.5
Zingiberaceae			
<i>Amomum xanthioides</i> Walls	Rhizome	14.8	69.2
<i>Alpinia galanga</i> (Linn.) Swartz	Rhizome	32.6	85.6
<i>Kaempferia galanga</i> L.	Rhizome	86.5	100.0
<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.	Rhizome	84.6	20.2
<i>Zingiber zerumbet</i> (Linn.) Smith	Rhizome	24.6	100.0

Data show the mean of 2-3 replicates, FI; Feeding Inhibitory rate (%), CDC; Control Disk Consumption (%), Applied dose is 1 mg/leaf disk (2 cm diameter), respectively.

Antifeedant activity of phenolics from *A. heterophyllum* against the common cutworm

Three prenylated flavonoids (1-3) and one flavanone (4) were isolated as insect antifeedants from *A. heterophyllum* dichloromethane extract using TLC autobiography, which monitored the activity against *S. litura* larvae. The autobiography indicated two major active pigments (Fig. 3), later identified as artocarpin (1) and isocyclomorusin (3) (Fig. 2). Among the compounds tested, artocarpin (1) and isocyclomorusin (3) showed moderate antifeedant activity against *S. litura* larvae compared with salannin, the ED₅₀ value of which was 0.066 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$. Cycloartocarpin (2), artocarpanone (4) and their reference chemical morin (7) were almost inactive. It has been reported that most chromenes have good insecticidal and insect antifeedant activity (Isman *et al.*, 1987). However, despite the presence of active chromene moiety, precocenes, isocyclomorusin (3) did not show strong antifeedant activity against *S. litura* larvae (Table 3). In our previous study, we showed that methylation of phenolics and the resulting low

Table 2 Insect Antifeedant activity of Plant Methanolic Extracts from Thailand against *S. litura*

Species	Part	FI(%)	CDC(%)
Annonaceae			
<i>Anaxagorea luzonensis</i> Gray.	Heartwood	ND	ND
Asclepiadiaceae			
<i>Cryptolepis buchanani</i> Roem.	Heartwood	ND	ND
Betulaceae			
<i>Betula alnoides</i> Buch. Ham.	Leaves	inactive	100.0
Cyperaceae			
<i>Cyperus alternifolius</i> Roxb.	Leaves	7.8	100.0
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Tubers	14.8	100.0
Lauraceae			
<i>Cinnamomum subavenium</i> Miq.	Heartwood	inactive	100.0
Leguminosae			
<i>Pterocarpus macrocarpus</i> Kurz.	Heartwood	inactive	100.0
<i>Xylocarpus xylocarpa</i> Taub.	Heartwood	6.3	83.3
Menispermaceae			
<i>Anamirta cocculus</i> (L.)	Heartwood	68.5	46.2
Moraceae			
<i>Artocarpus heterophyllum</i> Lam.	Heartwood	13.9	100.0
Rhamaceae			
<i>Ventilago denticulata</i> Willd.	Heartwood	0.4	88.2
Verbenaceae			
<i>Tectona grandis</i> L. F.	Heartwood	64.8	100.0
Zingiberaceae			
<i>Amomum xanthioides</i> Walls	Rhizome	15.4	49.7
<i>Alpinia galanga</i> (Linn.) Swartz	Rhizome	18.2	100.0
<i>Kaempferia galanga</i> L.	Rhizome	66.3	100.0
<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.	Rhizome	88.6	55.6
<i>Zingiber zerumbet</i> (Linn.) Smith	Rhizome	inactive	100.0

Data show the mean of 2-3 replicates, ND; No data, FI; Feeding Inhibitory rate (%), CDC; Control Disk Consumption (%), Applied dose is 1 mg/leaf disk (2 cm diameter), respectively.

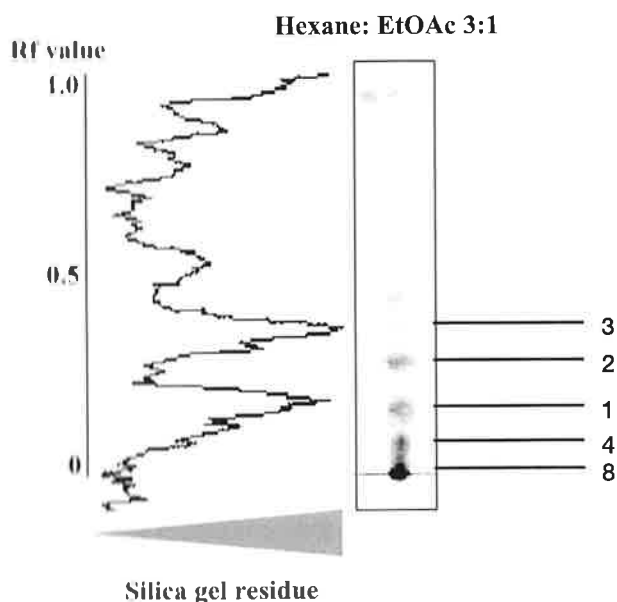


Fig. 3 Autobiography of *A. heterophyllum* dichloromethane extract for identification of insect antifeedants using *S. litura* larvae. Allocation of natural products on the corresponding TLC plate.

Table 3 Insect antifeedant activity of flavonoids in *A. heterophyllum* and their derivatives against *S. litura* larvae

Compound	<i>S. litura</i>	
	M.p. (°C)	ED ₅₀ (μmol/cm ²)
1	157-162	1.57
2	239-244	inactive
3	263-265	64.9%*
4	208-210	inactive
5	153-155	inactive
6	210-212	inactive
7	303-304	inactive
salutarin	oil	0.066

*Inhibitory rate at 0.33 mg (0.79 μmol)/cm² application. Inactive: F1=40% (1 mg/disk).

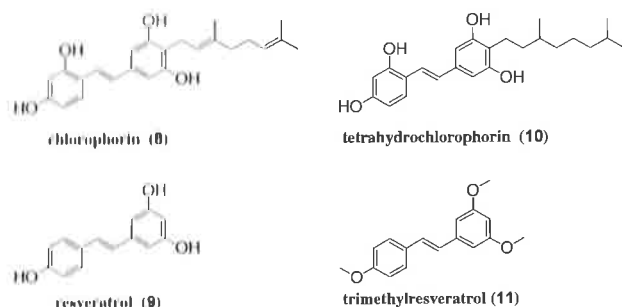


Fig. 4 Chlorophorin, resveratrol and their derivatives for feeding inhibitory test against subterranean termites.

melting point increases antifeedant activity against *S. litura* (Morimoto *et al.* 2003). However, in this study, biological activity did not increase with methylation of artocarpin (**1**) and cycloartocarpin (**2**) (Table 3), indicating that antifeedant activity is not necessarily correlated to the methylation of hydroxyl groups and a low melting point.

Antifeedant activity of phenolics from *A. heterophyllum* against the termite *R. speratus*

Because *A. heterophyllum* is used as lumber for furniture and construction, artocarpin (**1**), cycloartocarpin (**2**), three stilbenes (**8-11**, Fig. 4) and (+)-catechin, as a negative control, were evaluated for their antifeedant activity against the termite *R. speratus*. One stilbene, chlorophorin (**8**), occurred coincidentally in the *A. heterophyllum* dichloromethane extract along with the above flavonoids (Fig. 4); its presence was confirmed by TLC and EIMS analyses. This stilbene, which is also present in African teak (*Chlorophora excelsa*, Moraceae) and *A. incisus* (Moraceae) reportedly shows tyrosinase and 5 α -reductase inhibitory activity (Shimizu *et al.*, 1999, Shimizu *et al.*, 2003). The antifeedant activity of the stilbenes appeared stronger than that of the flavonoids (Table 4). That is, stilbenes 8 and 9 and their derivatives 10 and 11 completely inhibited termite feeding at a dose of 50 μg/disk, whereas the activity of cycloartocarpin (**2**) was only slight. Moreover, the feeding inhibitory activity of stilbenes did not change with methylation of the hydroxyl groups and reduction of geranyl moiety at a dose of 5 μg/disk. Only artocarpin (**1**) showed termicidal activity at a dose of 10 μg/disk.

The antifeedant activity of flavonoids against the

Table 4 Insect antifeedant activity of flavonoids and related stilbenes in *A. heterophyllum* against *S. speratus*

Compound	Applied dose (μg/disk)		
	50	50	50
1	82.1	75.6	----
2	40.6	1.4	----
8	96.3	----	48.9
9	97.8	----	58.9
10	94.7	----	93.9
11	98.7	----	94.4
(+)-catechin*	38.4	----	----

*Negative control for termite antifeedant test, at the 100 μg/disk, Data show the mean of two replicates, ----: Not test

termite *Coptotermes formosanus* has also been reported previously (Ohmura *et al.*, 2000; Boue and Raina, 2003). Since artocarpin (1) was shown to be a major constituent of *A. heterophyllus*, this is possibly an important factor in the low level of termite attack in Thailand.

Acknowledgements

We thank Dr. K. Shimizu (Kyushu University, Japan) for supplying chlorophorin (8) and tetrahydrochlorophorin (10).

References

- Boonlaksiri, C., W. Oonant, P. Kongsaree, P. Kittakoop, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth (2000) An antimalarial stilbene from *Artocarpus integer*. *Phytochemistry* 54 : 415–417.
- Boué, S. M. and A. K. Raina (2003) Effects of plant flavonoids on fecundity, survival, and feeding of the formosan subterranean termite. *J. Chem. Ecol.* 29 : 2575–2584.
- Chen, C.-C., Y.-L. Huang, and J.-C. Ou (1993) Three new prenylflavones from *Artocarpus altilis*. *J. Nat. Prod.* 56 : 1594–1597.
- Dadang, S. Riyanto, and K. Ohsawa (1998) Lethal and antifeedant substance from rhizome of *Alpinia galanga* SW. (Zingiberaceae). *J. Pestic. Sci.* 23 : 304–307.
- Escoubas, P., L. Lajide, and J. Mizutani (1993a) An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. *Entomol. Exp. Appl.* 66 : 99–107.
- Escoubas, P., L. Lajide, and J. Mizutani (1993b) Insecticidal and antifeedant activities of plant compounds. Potential leads for novel pesticides In "ACS Symposium Series" (American Chemical Society ed.), pp. 162–171, Washington, DC.
- Finney, D. J. (1952) Probit Analysis. 2nd ed. pp. 318. Cambridge Univ. Press, London.
- Harborne, J. B. and R. J. Grayer (1993) Flavonoids and insects In "The flavonoids" (Harborne, J.B. ed.) pp. 589–618, Chapman & Hall, London.
- Isman, M. B., P. Proksch, and J.-Y. Yan (1987) Insecticidal chromenes from the Asteraceae: structure-activity relations. *Entomol. Exp. Appl.* 43 : 87–93.
- Likhitwitayawuid, K., B. Sritularak, and W. De-Eknamkul (2000) Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus gomezianus*. *Planta Med.* 66 : 275–277.
- Lin, C.-N., C.-M. Lu, and P.-L. Huang (1995) Flavonoids from *Artocarpus heterophyllus*. *Phytochemistry* 39 : 1447–1451.
- Lu, C.-M. and C.-N Lin (1994) Flavonoids and 9-hydroxytridecyl docosanoate from *Artocarpus heterophyllus*. *Phytochemistry* 35 : 781–783.
- MacRae, W. D. and G. H. N. Towers (1985) Non-alkaloidal constituents of *Viola elongata* bark. *Phytochemistry* 24 : 561–566.
- Messchendorp, L., G. J. Z. Gols and J. J. A. Loon (2000) Behavioural observations of *Pieris brassicae* larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. *Entomol. Exp. Appl.* 95 : 217–227.
- Morimoto, M. (2004) Allelochemicals in plant and their applications for the lead of agrochemicals. *Regulation of Plant Growth & Development* 39 : 214–224.
- Morimoto, M. and K. Komai (2000) Plant secondary metabolites as plant defense systems. *Recent Res. Devel. Phytochem.* 4 : 99–114.
- Morimoto, M., K. Tanimoto, S. Nakano, Y. Ozaki, A. Nakano, and K. Komai (2003) Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. *J. Agric. Food Chem.* 51 : 389–393.
- Ohmura, W., S. Doi, M. Aoyama, and S. Ohara (2000) Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *J. Wood Sci.* 46 : 149–153.
- Pandji, C., C. Grimm, V. Wray, L. Witte, and P. Proksh (1993) Insecticidal constituents from four species of the Zingiberaceae. *Phytochemistry* 34 : 415–419.
- Pinto, A. C. and R. Braz-Filho (1994) Two flavonoids from *Clarisia racemosa*. *J. Braz. Chem. Soc.* 5 : 10–105.
- Shimizu, K., M. Fukuda, R. Kondo, and K. Sakai (1999) The 5*a*-reductase inhibitory components from heartwood of *Artocarpus incisus*: Structure-activity investigations. *Planta Med.* 66 : 16–19.
- Shimizu, K., R. Kondo, and K. Sakai (2000) Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: Structure-activity investigations. *Planta Med.* 66 : 11–15.
- Shimizu, K., S. Yasutake, and R. Kondo (2003) A New stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Chlorophora excelsa*. *Chem. Pharm. Bull.* 51 : 318–319.
- Torres, P., J. G. Avila, A. R. de Vivar, A. M. Garcia, J. C. Marin, E. Aranda and C. L. Cespedes (2003) Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry* 64 : 463–473.
- Venkataraman, K. (1972) Wood phenolics in the

chemotaxonomy of the Moraceae. *Phytochemistry*
11: 1571-1586.

between wild Crucifers and their herbivorous insects.
Plant Species Biol. 9: 137-143.

Yano, S. (1994) Ecological and evolutionary interactions

タイ国産植物抽出物中のハスモンヨトウ幼虫とヤマトシロアリに対する摂食阻害活性物質

森本 正則・太田 好則・井原 崇視・有馬 和弘・福本 浩美・駒井 功一郎 (近畿大学農学部農芸化学科農薬化学研究室)
ワリンソーン チャバシリ (チュラロンコーン大学理学部)

チュラロンコーン大学でタイ国産植物 17 種の植物からそれぞれジクロロメタン抽出物とメタノール抽出物の試料を調製し、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura* F.) 幼虫に対する摂食阻害活性について選択的リーフディスク試験を用いて評価した。その結果、活性はメタノール抽出物よりもジクロロメタン抽出物で高い傾向があり、特に *Artocarpus heterophyllus*, *Xylia xylocarpa*, *Pterocarpus macrocarpus* 由来のジクロロメタン抽出物中にハスモンヨトウ幼虫に対して高い摂食阻害活性を認めた。そこで昆虫忌避活性について未報告のクワ科ジャックフルーツ (*Artocarpus heterophyllu*) を材料とし、活性成分を含む4種のフラボノイドを単離した。単離したプレニル化フラボノイドのうち artocarpin (1) と bicyclomorusin (3) は、ハスモンヨトウ幼虫に対して穏やかな摂食阻害活性を示し、スクリーニング時の活性本体と推察された。さらにタイ国では、ジャックフルーツは材木として利用されることから、ハスモンヨトウ幼虫に摂食阻害活性を示した artocarpin (1) と活性を示さなかった cycloartocarpin (2) およびジャックフルーツに含有される chlorophorin (8) を含む数種のスチルベンについても、併せてヤマトシロアリ職蟻に対する摂食阻害試験を実施した。その結果、供試化合物の全てが摂食阻害活性を示したが、ヤマトシロアリに対する摂食阻害活性は、フラボノイドよりもスチルベンで高活性を示す傾向が認められた。また、artocarpin (1) だけは 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ の処理でヤマトシロアリ職蟻に対して殺蟻活性も示した。

後腸共生生物のセルラーゼ遺伝子を用いたLAMP法による ヤマトシロアリとイエシロアリの識別

板倉 修司・寒川 敏行・田中 裕美・榎 章郎

近畿大学農学部

奈良市中町3327-204

受領：2005年12月30日；受理：2006年2月27日

Identification of *Reticulitermes speratus* (Kolbe) and *Coptotermes formosanus* Shiraki using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method with primers consisting of partial sequences of cellulase genes of hindgut symbionts. Shuji Itakura, Toshiyuki Kankawa, Hiromi Tanaka, Akio Enoki (Department of Agriculture, Kindai University, Nakamachi, Nara 631-8505, Japan)

Abstract

Forward and backward inner and outer primers were designed for the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on partial sequences of DNA encoding a cellulase homologue of the *Reticulitermes speratus* hindgut symbiont and cellulase (endoglucanase 1) of *Holomastigotoides hartmanni* (*H. mirabile*), a symbiont of *Coptotermes formosanus*. LAMP with specific primers for the *R. speratus* hindgut symbiont successfully amplified genomic DNA extracted from the whole gut of *R. speratus*, but failed to amplify genomic DNA from the head of *R. speratus* and *C. formosanus* and whole gut of *C. formosanus*. LAMP with specific primers for *H. hartmanni* successfully amplified genomic DNA extracted from the whole gut of *C. formosanus*, but failed to amplify genomic DNA from the head of *C. formosanus* and *R. speratus* and whole gut of *R. speratus*. Although the LAMP method using both sets of specific primers successfully identified termite species by amplifying genomic DNA extracted from the whole gut, it was not sufficient for amplification of DNA extracted from the galleries constructed by termites.

Key words : LAMP, *Reticulitermes speratus*, *Coptotermes formosanus*, Hindgut symbionts, Cellulase gene

ヤマトシロアリの後腸共生生物のセルラーゼホモログとイエシロアリ共生原生生物 *Holomastigotoides hartmanni* のセルラーゼをコードする遺伝子の部分配列を用いて、LAMP法で用いる特異的プライマーを作成した。ヤマトシロアリ共生生物特異的プライマーを用いたLAMPでは、ヤマトシロアリ共生生物のDNAを鋳型とした場合にDNAが増幅されたが、ヤマトシロアリ頭部とイエシロアリ頭部由来のDNAおよびイエシロアリ共生生物のDNAを鋳型にした場合にはDNAが増幅されなかった。*H. hartmanni* 特異的プライマーによるLAMPでは、イエシロアリ共生生物のDNAを鋳型とするとDNAが増幅されたが、イエシロアリ頭部とヤマトシロアリ頭部由来のDNAおよびヤマトシロアリ共生生物のDNAを鋳型とした場合にはDNAの増幅が起こらなかった。これら2組の特異的プライマーを用いて、蟻道から抽出したDNAのLAMP法による増幅を試みたが、DNAは増幅されなかった。

はじめに

ヤマトシロアリとイエシロアリは、日本における経済的な被害が最も大きい家屋加害害虫である(吉村, 1996)。これらのシロアリ種の同定には兵蟻の頭の形や長さのような形態上の特徴が基準として用いられることが多い(森本, 1994)。職蟻の左大顎の歯の形に基づいてヤマトシロアリとイエシロアリを区別できるが(日本しろあり

対策協会, 1980)、専門的な知識と経験をもつ者以外には職蟻の形態的な特徴だけでこれらのシロアリを正確に同定することは困難である。適切なシロアリ駆除のためには、加害シロアリの兵蟻を捕獲できず職蟻だけを用いて種の同定をしなければならない場合においても、加害種がヤマトシロアリであるかイエシロアリであるか正確に知ることが必要である。また、害虫駆除の担当者だけでなく、家主のような一般の人が簡単な方法で家屋加害

虫の種類を識別できるようにすれば、このシロアリ識別技術と木材腐朽菌の識別技術（杉山ら，2003；Horisawa *et al.*, 2004；田中ら，2004；Suhara *et al.*, 2005）を総合的に用いることで、床下調湿剤などの契約をめぐる種々のトラブル（東京都消費者被害救済委員会，2003）を減少させることができる。

ヤマトシロアリとイエシロアリは蟻道とよばれるトンネル状の構造物を構築しその内側を通過して移動する。この蟻道は土壌、木粉および糞（直腸内容物）を材料として構築される（Noirot and Darlington, 2000）。蟻道の材料として使われる糞のなかに、これらシロアリの後腸内に共生する原生生物が排泄されていれば、原生生物のゲノム DNA を利用して、宿主であるシロアリの種を同定できる。蟻道から抽出した DNA によりシロアリの種類を識別できれば、家屋へのシロアリの侵入履歴を知ることができ、平成14年度に発足した「既存住宅性能保証制度」に特定現況調査として含まれる「腐朽・蟻害」の診断（日本木材保存協会住宅生物劣化診断部会，2004）にも応用できる。糞を用いたシロアリ種の同定に関しては、乾材シロアリの糞に含まれる炭化水素の組成をガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー（GC-MS）で分析した事例が報告されている（Haverty *et al.*, 2005）。また、シロアリの DNA を増幅して地下生息性シロアリを同定する事例（Itakura *et al.*, 2006a, b）も報告されているが、共生生物の DNA を利用した宿主シロアリの識別に関してはこれまで報告されていない。また、我々はシロアリ内在性セルラーゼ遺伝子の部分塩基配列を利用した LAMP（loop-mediated isothermal amplification）法によるヤマトシロアリとイエシロアリの識別について報告したが、蟻道から抽出した DNA を鋳型とした場合にはシロアリの種類を識別することができなかった（Itakura *et al.*, 2006a）。

PCR（polymerase chain reaction）を利用した核酸増幅は担子菌による家屋の腐朽診断法として優れた方法である（杉山ら，2003；Horisawa *et al.*, 2004；Suhara *et al.*, 2005）。しかし PCR では次サイクルの DNA 合成を始める前に鋳型となる 2 本鎖 DNA の熱変性が要求されるため、昇温、冷却、定温保持という正確な温度コントロールが可能な高価なサーマルサイクラーを必要とする。また、場合によっては PCR 増幅産物 DNA の塩基配列を DNA シーケンサーで解析して種を同定することもある（Itakura *et al.*, 2006b）。これに対し、LAMP 法の操作は簡単であり、4 種類の特異的プライマー、予め調製されている反応溶液（Reaction mixture）、DNA ポリメラーゼと鋳型となる DNA を混合し一定温度の恒温槽（ウォーターバスあるいはヒートブロック）で反応させるだけで、目的とする DNA の増幅が起こる。LAMP 法には一定の温度（昇温や冷却を必要としない）で、高効率に目的 DNA を増幅できるという利点がある（Notomi *et al.*, 2000）。

イエシロアリの後腸内に共生する 3 種類の原生生物 *Pseudotrichonympha grassii*, *Holomastigotoides hartmanni*（分子生物学の分野では *H. mirabile* と呼称されている）*Spirotrichonympha leidy* はセルロース分解においてそれぞれ異なる役割を果たしている（吉村，1996）。*P. grassii* と *H. hartmanni* では Glycoside Hydrolase Family（GHF）7（Nakashima *et al.*, 2002；Watanabe *et al.*, 2002），*S. leidy* では GHF 5（Inoue *et al.*, 2005）に属するセルラーゼが発現している。またヤマトシロアリの後腸内に生息する 10 種類の共生原生生物でも GHF 45 に属するセルラーゼホモログが発現していると報告されている（Ohtoko *et al.*, 2000）。

本研究では、BLASTN（<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>）による相同性検索で腐朽菌のセルラーゼと相同性が見られなかった GHF 45 に属するヤマトシロアリ共生生物のセルラーゼホモログの DNA 部分配列（長さ 206 bp）と GHF 7 に属するイエシロアリ共生原生生物 *H. hartmanni* のセルラーゼの DNA 部分配列（長さ 205 bp）を選択し、各 4 種類のプライマー設計ならびに LAMP により増幅される目的配列として用いた。シロアリ腸内共生生物のゲノム DNA 上の目的とする配列のみが LAMP 法で増幅されるヤマトシロアリ共生生物特異的プライマーと *H. hartmanni* 特異的プライマーを設計した。ヤマトシロアリとイエシロアリの蟻道から抽出した DNA を鋳型とし、これらの共生生物特異的プライマーを用いた LAMP 法による目的 DNA の増幅が可能かどうか検討した。

材料と方法

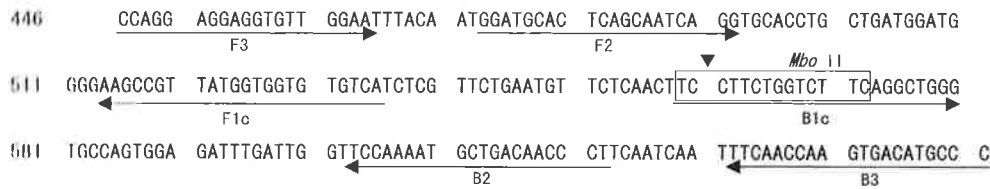
1. シロアリ

和歌山県で採集し研究室で約半年間維持したアカマツ（*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.）被食害材からヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus*（Kolbe）の職蟻を採集した。また、アカマツを餌として研究室で約 6 年間飼育した巣からイエシロアリ *Coptotermes formosanus* Shiraki の職蟻を採集した。

2. シロアリ、共生微生物および蟻道からのゲノム DNA 調製

ヤマトシロアリとイエシロアリの職蟻 20 頭を解剖し、頭と全腸（前腸、中腸、後腸と直腸）を分離した。腸の破損に伴う共生微生物の漏出によるシロアリ組織への共生微生物の混入を防ぐため、頭を切断した後に全腸を摘出した。DNeasy tissue kit（Quiagen）を用いて、製造会社のプロトコルに従って、頭と全腸からシロアリと共生微生物のゲノム DNA を各々抽出した。ヤマトシロアリとイエシロアリにより構築された蟻道（約 0.5 g）から DNeasy tissue kit および ISOIL（日本ジーン）を用いて DNA を抽出した。DNA の定量は、分光光度計を用いて行った（Sambrook *et al.*, 1989a）。

(A)



(B)

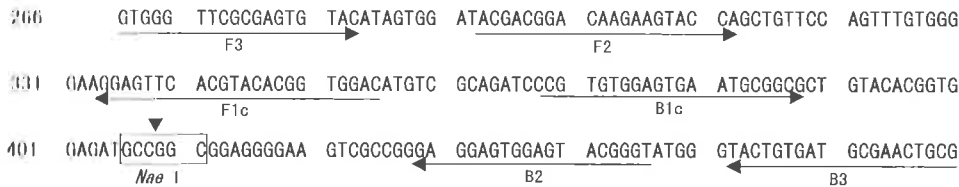


図1 プライマー設計に用いたシロアリ後腸共生生物の DNA 塩基配列。

(A) ヤマトシロアリ後腸共生生物のセルラーゼホモログおよび(B) イエシロアリ共生生物 *H. hartmanni* (*H. mirabile*) セルラーゼの部分配列。左端の番号は(A) ヤマトシロアリ共生生物のセルラーゼホモログ (GenBank accession no. AB045179) と(B) イエシロアリ共生原生生物 *H. mirabile* のセルラーゼ (GenBank accession no. AB071011) の塩基配列位置に相当する。矢印はプライマー設計に用いた DNA 塩基配列を示す。□ は制限酵素 *Mbo* II と *Nae* I の認識配列を、また▼ は切断部位を示す。

表1 共生生物のDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマー
プライマー 配列 (5'→3')

ヤマトシロアリ共生生物	
FIP (Rs)	TGACACACCACCATAACGGCTT-GGATGCACTCAGCAATCAGG
BIP (Rs)	TCCTTCTGGTCTTCAGGCTGGG-AGGGTTGTCAGCAATTTGGA
F3 (Rs)	CCAGGAGGAGGTGTTGGAAT
B3 (Rs)	GGGCATGTCACCTTGGTTGAA
イエシロアリ共生原生生物 <i>H. hartmanni</i> (<i>H. mirabile</i>)	
FIP (Cf)	GTCCACCGTGTACGTGAACTCC-ACGACGGACAAGAAGTACCA
BIP (Cf)	CGTGTGGAGTGAATGCGGCG-ACCCGTACTCCACTCCTC
F3 (Cf)	GTGGGTTCGCGAGTGTAC
B3 (Cf)	CGCAGTTCGCATCACAGTA

プライマー-FIP は F1c 相補鎖と F2 の配列から、プライマー-BIP は B1c と B2 相補鎖の配列から構成される(図1参照)。プライマー F3 は F3 の配列、プライマー B3 は B3 相補鎖の配列(図1参照)。B3:backward outer primer, BIP:backward inner primer, Cf:*Coptotermes formosanus*, F3:forward outer primer, FIP:forward inner primer, Rs:*Reticulitermes speratus*.

3. オリゴヌクレオチドプライマー

LAMP 法によって、ヤマトシロアリ後腸共生生物のセルラーゼホモログをコードするゲノム DNA の部分塩基配列(図1-A, F2 と B2 間の 150 bp)ならびにイエシロアリ共生原生生物 *H. hartmanni* のセルラーゼをコードするゲノム DNA の部分塩基配列(図1-B, F2 と B2 間の 154 bp)を増幅するために、Primer Explorer (<http://primerexplorer.jp/>) を用いて、FIP (forward

inner primer), BIP (backward inner primer), および 2 種類の outer primer (F3 と B3) を設計した(表1)。プライマー FIP は F1c の相補鎖と F2 の配列から、プライマー BIP は B1c と B2 の相補鎖の配列から構成され、プライマー F3 は F3 の配列、プライマー B3 は B3 の相補鎖の配列から構成される。表1に示した 8 種類のプライマーを、オペロンテクノロジー(東京)に依頼し調製した。

4. LAMP法によるゲノムDNAの増幅

表1に示したヤマトシロアリ共生生物特異的プライマー（以後、Rs-SB プライマーと称す）ならびにイエシロアリ共生原生物 *H. hartmanni* 特異的プライマー（以後、Cf-SB プライマーと称す）を用いて、シロアリ頭部より抽出したシロアリのゲノム DNA および全腸から抽出した共生生物のゲノム DNA（全腸にはシロアリの腸組織が含まれているので、シロアリのゲノム DNA も含まれる）を鋳型とし、Cool Thermo Unit CTU-N（タイテック）でLAMP法による増幅を行った。容量 200 μ l の PCR チューブに、12.5 μ l の 2 \times Reaction mixture（栄研化学、2.8 mM dNTP, 1.6 M betaine, 40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 16 mM MgSO₄ および 0.2% Tween 20 の混合溶液）、*Bst* DNA polymerase (8 units), およびプライマー (0.8 μ M FIP, 0.8 μ M BIP, 0.2 μ M F3 と 0.2 μ M B3, いずれも最終濃度) および鋳型 DNA (50 ng) を加えた (全液量: 25 μ l)。ただし、Rs-SB プライマーを用いた LAMP では、非特異的な DNA の増幅を防ぐため、betaine の最終濃度を 0.8 M から 1.05 M へと増加させた。混合溶液に添加する前に、鋳型 DNA を 95 $^{\circ}$ C で 5 分間予備加熱した後 3 分間氷冷した。混合溶液を 63 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後に、80 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し反応を止めた。

5. LAMP増幅産物の分析

LAMP 増幅産物の一部 (10 μ l) を 1% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド (0.1ppm 水溶液) で 20 分間染色した。電気泳動には、iMupidJ ミニゲル泳動槽 (コスモバイオ) を使い、100 V で 40 分間泳動した。また、制限酵素消化のため、25 μ l の LAMP 増幅産物をエタノール沈殿により濃縮し (Sambrook *et al.*, 1989b), 得られた DNA を含む沈殿を 10 μ l の滅菌水に溶解した後、その一部 (3 μ l) を制限酵素ならびに L バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol) とともに、37 $^{\circ}$ C で 3 時間振とうした (全液量: 20 μ l)。Rs-SB プライマーによるヤマトシロアリ共生生物ゲノム DNA (以後、Rs-SB-DNA と称す) の LAMP 法による増幅産物を *Mbo* II (7 units, 東洋紡) で、Cf-SB プライマーによるイエシロアリ共生生物ゲノム DNA (以後、Cf-SB-DNA と称す) の LAMP 法による増幅産物を *Nae* I (10 units, 宝バイオ) で消化した。制限酵素消化産物の一部 (10 μ l) を 1% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。染色したゲルを transilluminator TVC-312R/J (フナコシ) で紫外線を照射し可視化した。

6. 蟻道から抽出したDNAのLAMPによる増幅

DNeasy tissue kit および ISOIL により蟻道から抽出した DNA を鋳型とし、Rs-SB プライマーならびに Cf-SB プライマーを用いて上述の条件に従って LAMP 法

による増幅を行った。また、蟻道にシロアリの腸壁などの組織に由来するシロアリのゲノム DNA が混入し、(共生生物の DNA でなく) シロアリの DNA を検出するために設計されたプライマーで検出できる可能性があるため、シロアリ内在性セルラーゼ特異的プライマー (Itakura *et al.*, 2006a) を用いて LAMP を行った。イエシロアリ内在性セルラーゼ特異的プライマー (FIP (Cf-EG): 5'-ATTGCTATCTGGACCACCCACCAA-TGGAACACGTACAACAGC-3', BIP (Cf-EG): 5'-TGATAGCTACACGGACTCTCG-GCCTGCGTTGTAATCTGTG-3', F3: 5'-GCACCAGCCGTATGTGAC-3', B3: 5'-AGCGACAGCTGATTGGAA-3') あるいはヤマトシロアリ内在性セルラーゼ特異的プライマー (FIP (Rs-EG): 5'-GTTGCTATCTGGACCACCCACCAA-TGGAACACGTACAACAGC-3', BIP (Rs-EG): 5'-CGATAGCTACACGGACGCTCG-GCCAGCGTTGTAATCTGTG-3', F3: 5'-GCACCAGCCGTATGTGAC-3', B3: 5'-AGCGACAGCTGATTGGAA-3') を用いて、60 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた以外は、上述の共生生物特異的プライマーを用いた LAMP (0.8 M betaine, 最終濃度) と同様にして DNA の増幅を行った。

結 果

LAMP 反応の結果、約 150 bp 以上の多くの増幅産物が生成し、アガロースゲル電気泳動で階段状のバンドとして観察された (図2)。Rs-SB プライマーは、Rs-SB-DNA を鋳型としたとき (階段状のバンドとして観察される) 一連の大きさの DNA 増幅に成功したが (図2-A, レーンRs-G)、イエシロアリ頭部とヤマトシロアリ頭部のゲノム DNA (以後、各々 Cf-TM-DNA と Rs-

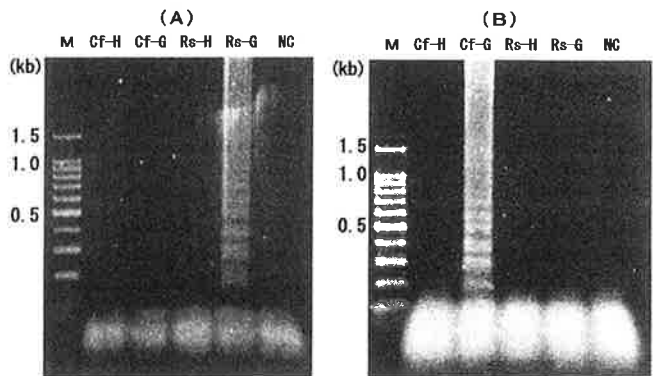


図2 LAMP 増幅産物の電気泳動による解析。

(A) Rs-SBプライマーおよび(B) Cf-SBプライマーによる LAMP。イエシロアリ頭部 (レーンCf-H) および腸内共生生物 (レーンCf-G)、ヤマトシロアリ頭部 (レーンRs-H) および腸内共生生物 (レーンRs-G) から抽出したゲノムDNAを鋳型としたLAMP増幅産物、ネガティブコントロール (レーンNC, DNA 無添加), M:100-bp ladder marker