

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14759

研究課題名(和文) 絵かき虫の多様化を可能にした葉内微環境と樹木-昆虫間の生理的相互作用の解明

研究課題名(英文) Microenvironment in mine inducing biodiversity of leaf-miner and physiological interaction between tree and insect

研究代表者

池田 武文 (Ikeda, Takefumi)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50183158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：リーフマイナーが潜入した葉の組織解剖並びに生理的反応について検討した。マイナー形成と細胞の状況 葉が緑のとき、マイナー形成による葉の細胞組織の活性への影響は認められない。細胞の防御反応 マイナーの褐変化した箇所に傷害周皮の形成がみられ、その外側にはリグニンが蓄積したカルスやスベリン化した柵状組織が見られた。光合成活性の評価 葉が緑でも、光合成活性は低下。これは最大蛍光Fmの低下が原因であり、光化学系IIの酸素発生系が異常。マイナー内の空気成分の分析 マイナー内のCO2濃度と水蒸気量は外気のそれらには影響を受けずに独自の濃度を示し、マイナー内はマイナー外と比較して安定した環境を保っている。

研究成果の概要(英文)：Histology, anatomy and physiology in leaf-miner attacked foliage. Leaf-miner is an endophagous insect infiltrating into live foliage and making a micro-cavity as a mine following feeding on mesophyll cells. <Anatomy> mine without leaf browning: no change of cell activity. mine with leaf browning: defensive reaction such as deposition of tannin, suberin and lignin as chemicals. Non browning leaf; no remarkable denaturation and necrosis of cells. decrease in Fv/Fm --> decrease in photosynthetic activity. remarkable decrease in Fm --> inhibition of oxygen transmission system PSII. Browning leaf; remarkable decrease in Fv/Fm --> palisade cells were fed. Decrease in Fo and Fm in mine part of leaf --> empty space of mine reduce light intensity reaching mesophyll cells. Mine is a separate space from outside and stable environment for leaf-miner. Gas concentration of air in mine might depend on a cuticle gas permeability.

研究分野：樹木生理学

キーワード：リーフマイナー 葉の組織・解剖 光合成活性 非破壊検査

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫学の視点から：ノグルミの葉の表面にアリのような模様が見られる(写真)。この葉の中には昆虫の幼虫が潜っており、この模様はその幼虫が葉内部の柔細胞を食べ、葉表面を覆うクチクラが際立った痕である。この模様の下には幼虫が生活する微細な空洞(マイン)ができています。このような生活を送る「潜葉性昆虫」は、葉の中に潜って柔細胞を摂食し、様々な模様を作り出すため「絵かき虫(リーフマイナー)」と呼ばれている(広渡 2011)。絵かき虫は鱗翅目、膜翅目、双翅目、甲虫目の4つの目で見られ、多様な進化をとげている。特に、鱗翅目の絵かき虫では葉に潜るといった生活様式が進化のかなり初期に獲得されたことが明らかになりつつある(Kristensen et al., 2007; Nieukerken et al., 2011)。



(2) 絵かき虫が潜入した葉の組織・解剖学と生理学の視点から：絵かき虫が潜り込んだ葉の解剖特性は Hering (1951) によって記載されているが、電子顕微鏡等を用いた微細構造の記載は非常に少ない。葉の生理に関しては、光合成や植物ホルモンに関する若干の研究例のみである(Giron et al., 2013)。一般に昆虫が葉を摂食するとその箇所の細胞は褐変し壊死する。ところが、絵かき虫が潜り込んだ葉は摂食により傷つけられているにもかかわらず、ほとんど場合、葉の緑は維持され、壊死することはない。

本研究ではこの現象を次のようにとらえた。絵かき虫が摂食することで葉の細胞が壊死する、あるいは細胞が絵かき虫に対する防御反応をとると、それは虫の餌がなくなる、あるいは餌の質低下を招くことになり、虫にとっては避けたい変化である。本研究では絵かき虫の生活の場であるマイン内の微環境を組織・解剖学的に調べ、マインができたことによる葉の生理反応との関係に焦点を絞ることとした。

## 2. 研究の目的

「植物を食べる昆虫類では餌とする植物への適応が昆虫の進化・多様化を促進した」と考えられているが、そのメカニズムはまだ十分に解明されていない。本研究では、葉に潜り込み葉の柔細胞を摂食する「潜葉性昆虫(絵かき虫、リーフマイナー)」に着目し、葉の内部という新たなニッチの利用を可能にした昆虫と植物間の生理的相互作用に迫る。

まず、葉内の微環境を外部環境と比較することで絵かき虫にとって葉に潜入すること

の意義を探り、次に絵かき虫の潜入が葉の組織解剖と生理に与える影響を調べる。これらの知見を統合することで、葉の内部という特殊な微環境が作り出されるメカニズムを昆虫と植物の両面から解明し、膨大な種数を誇る潜葉性昆虫の多様化の謎に迫る。

## 3. 研究の方法

(1) マインの空間構造と葉の柔細胞の組織・解剖学：

絵かき虫がつくるマインは虫の生活環境として適した構造となっていることが予想される。まず、顕微鏡でマインの構造を詳細に観察する。これまで平面的なものとしてとらえられてきたマインの立体構造を、走査電子顕微鏡を用いて細胞レベルで把握した。

(2) マインが形成された葉の生理学：

一般に葉は、絵かき虫以外の植食性昆虫による摂食や物理的な傷がつくと、細胞が褐変し壊死する。しかし、絵かき虫に摂食されても葉は枯れることがない(例外として、ヨーロッパでは一部の樹種で絵かき虫の加害により葉の枯死が報告されているが、日本においては皆無である)。摂食された葉の生理に関する研究は少数である(Giron et al. 2013)。本研究では以下の点について検討した。

X線撮影による非破壊検査：この現象を把握するために、本研究ではまず、X線GOSシンチレータを用いたFPDを用いた葉の非破壊診断を行なった。X線撮影では、対象物の物質密度の差異を検出できる。この実験は当初計画では予定していなかったが、工学分野でこのような手法が考案されていることを知り、生物材料にも適用できるのではないかと考え、試みた。つまり、昆虫や微生物のアタックに対して、植物は防御反応として細胞に高分子物質を蓄積することが知られている。その蓄積箇所は周囲より物質密度が高くなっていると考えられるので、X線画像では濃淡に差が認められる可能性がある。

組織の活性と防御反応の評価：顕微化学的手法(サフラニン・ファストグリーン二重染色、フロログリシノール、スダンブラック、硫化鉄II)を用いて絵かき虫の摂食に対する防御反応も含めた細胞レベルでの生理的変化をとらえた。

光合成活性の評価：葉の柔細胞の多くは柵状組織と海綿状組織という光合成を行う細胞で占められているため、それらが絵かき虫に摂食されることで葉の光合成作用への影響が考えられたので、クロロフィル蛍光特性の測定から、柔細胞の光合成活性を評価した。

(3) 絵かき虫の生活空間であるマイン内の空気成分：外気と直接接触しないマイン内の空気成分組成は、絵かき虫と葉の柔細胞の代謝に深くかわり、虫にとっても葉にとっても適切な状態が保たれているものと予想さ

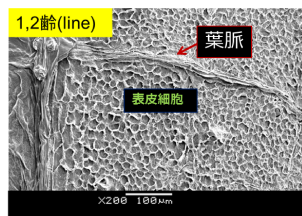
れる。マイン内の空気組成は葉の光合成と呼吸、蒸散および虫の呼吸との関係で決まると考えられる。そこで、マイン内空気の水蒸気、二酸化炭素の定量をおこなった(GCMS)。また、葉からの水分蒸散は蒸散に加えて葉の表面からの蒸発(クチクラ蒸散)によってもおこる。そこで、蒸散量の多少により変化する葉の温度を赤外線サーモグラフィで測定した。

研究材料として、リーフマイナーを恒温室内で人工飼育している2種(カシグルミとヤマハギ(Ohshima 2005))と野外で採取した8種(アラカシ、クズ、フジ、アキグミ、ツワブキ、ヌルデ、ヤブニッケイ、ネズミモチ)を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) マイン形成と細胞の状況

葉が緑の状態に保たれているとき、マイン形成による葉の組織の活性への影響はないと考えられた。リーフマイナーの摂食様式や植物の葉の組織構造などの特徴が種ごとに異なっていることにより、マイン形成に対する葉の反応が異なると考えられた。



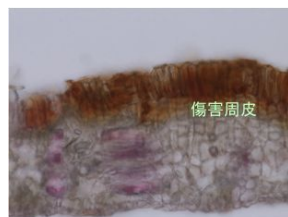
1、2 齢幼虫の摂食部

表皮細胞が摂食されて形成されるマインでは、マインを覆うクチクラに人為的に傷をつけることで、褐変がおこった。このことから、クチクラ層が破損されることで、葉肉細胞が空気にさらされて乾燥が促進され、葉の褐変が進むと考えられた。

摂食された痕跡の走査電子顕微鏡観察の結果、摂食された細胞の細胞壁はわずかに残っていた。また、葉脈は摂食されていなかった。

##### (2) 細胞の防御反応

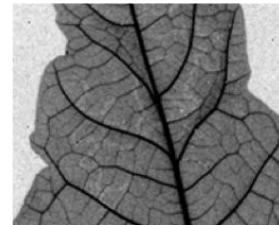
まず、褐変が認められない葉では、組織に明瞭な変化はみられなかった。さらに、褐変していないマインでは X 線画像としては周囲に比べて



アラカシの褐変したマイン部

密度が低いことを示し、この低下は細胞が摂取されたことによるものであった。防御物質等の蓄積は考えられなかった。一方、褐変した葉のうち、ネズミモチの葉では、マインの褐変した箇所に傷害周皮の形成がみられた。傷害周皮の形成は、マインの損傷によ

るマイン面からの乾燥が原因の二次的な反応と考えられた。また、傷害周皮の外側にリグニンが蓄積したカルスの存在が確



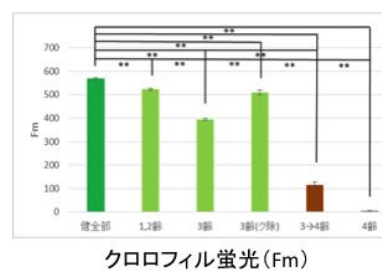
マイン部が白く見える

認された。アラカシでは、カルスの形成は確認できなかった。アラカシのマインの褐変していない箇所では、柵状組織のマイン付近に沿ってスペリンの蓄積が確認された。アラカシのマインの褐変した箇所では傷害周皮の形成がみられ、傷害周皮の外側の柵状組織が変性しスペリン化していることが確認された(上図)。

以上より、植物種ごとに葉の構造や性質が異なることによって、リーフマイナーの摂食に対する防御反応が異なり、組織の褐変箇所は防御物質の蓄積や傷害周皮の形成を伴うことが示された。しかし、今回の X 線画像では、スペリン化やリグニンの蓄積が認められた部分が周辺の組織より高密度であることは確認できなかった。今後、詳細な X 線画像による解析を要する。

##### (3) 光合成活性の評価(クロロフィル蛍光特性の測定)

葉が緑の状態に保たれている場合においても、マイン部の光合成活性は Fv/Fm, Fo, Fm 共に低下した。マインを覆うクチクラ層を剥ぎ取り、



クロロフィル蛍光(Fm)

70~

80%程度であり、マイン内は光強度が低下し葉内の光環境が変化することが示された。ここで葉内の葉肉細胞への光の伝わり方として、マインが形成されていない通常の場合は、クチクラ層が直接表皮細胞に付着して入るので、外光は葉内で空気の層を通過することなく表皮細胞から柵状組織に到達するが、マイン形成により、クチクラ層と葉肉細胞の間に空間ができたことで、葉肉細胞に到達する光量が 20~30%低下する。そのためにマイン部の Fo が低い値を示したと考えられた。

そこで、マイン部を覆うクチクラ層を取り除いてクロロフィル蛍光を測定すると、Fo は低下しないが、Fm は低下したので、マイン部の光合成活性の低下は主に最大蛍光 Fm の低

下が原因であった。このことは、マイン部の光合成活性の低下は、光化学系 II の酸素発生系に異常が生じていることが要因となっていると考えられた。

マインの褐変化した箇所ではさらに光合成活性の低下が顕著であり、光合成を行う柵状組織の摂食が原因であると考えられた。また、マイン内の光強度が低下して入ることは、リーフマイナーにとってマイン内で生活することの利点として「太陽光への過度の暴露を減らせる (Hespenheide, 1991)」ということが挙げられているが、それに見合う結果となつた。

#### (4) マイン内の空気成分の分析

マイン内の CO<sub>2</sub> 濃度と水蒸気量は外気のそれらとは相関がなく、外気の影響を受けずに独自の濃度を示し、さらに、CO<sub>2</sub> 濃度と水蒸気量との間では正の相関が認められた。この測定時の葉への光強度は低く、葉の気孔は閉鎖していたことが想定される。以上から、マイン内の空気成分の濃度は、マイン内の幼虫の活動と葉の柔細胞の活性の結果であると考えられた。

これらの濃度は、マイン内がマイン外と比較して安定した環境であると考えられ、幼虫が生活する上で好都合な条件となっていることが示唆された。

#### まとめ

外観的に褐変がみられないマイン部の細胞には変性や防御物質の蓄積は認められなかったことから、絵かき虫は宿主である葉に何ら影響とおよぼさないと考えられた。これは幼虫の齢が初期段階での結果であり、絵かき虫の摂食が柵状組織におよぶと、褐変はおきないが、光合成系 II の酸素発生系には異常が生じてきた。しかし、この程度の影響であれば、葉肉細胞が絵かき虫の食料としての質低下を招くほどではないと考えられた。稀にマイン部で褐変が起こるが、これはマイン部を覆うクチクラ層にできた傷からの外気の侵入によることが考えられた。以上の結果は、これまで報告されておらず、昆虫(絵かき虫)と植物との相互関係に関する新たな知見であり、本領域の研究の進展に貢献できる成果である。

#### <引用文献>

Giron et al. (2013) *Funct. Ecol.* 27: 599;  
Kristensen et al. (2007) *Zootaxa* 1668: 699;  
広渡俊哉編 絵かき虫の生物学 北隆館  
2011; Hering(1951) *Biology of the Leaf Miners*. Uitgeverij Dr W.Junk; Hespenheide (1991) *Bionomics of leaf-mining insects*. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 535-560; Nieukerken et al. (2011) *Zootaxa* 3148: 212; Ohshima (2005) *Entomol. Sci.* 8:227

#### 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)

[学会発表](計 2件)

薬師川穂、大島一正、池田武文、リーフマイナー潜入葉の組織と光合成活性、日本昆虫学会近畿支部 2016 年度大会、2016, 12, 17、大阪市立自然史博物館(大阪府・大阪市)

薬師川穂、池田武文、大島一正、リーフマイナー潜入葉の解剖学的特性、第 127 回日本森林学会大会、2016, 3, 28、日本大学生物資源科学部(神奈川県・藤沢市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

池田武文 (IKEDA Takefumi)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50183158

##### (2) 研究分担者

大島一正 (OHSHIMA Issei)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：50466455

米田 稔 (YONEDA Minoru)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40182852