

平成30年6月7日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14932

研究課題名(和文) オゾン増加環境での落葉樹の植物起源揮発性有機化合物と食葉性昆虫の動態解明

研究課題名(英文) Analysis of BVOC emission of white birch and grazing traits by insect herbivore under elevated ozone

研究代表者

小池 孝良 (Koike, Takayoshi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：10270919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：北大札幌研究林の野外開放系O<sub>3</sub>;暴露施設(対照区40ppb、O<sub>3</sub>区80ppb)を用いたシラカンバの虫害調査からは、摂食実験ではシラカンバ狭食者であるハンノキハムシ(以下、ハムシ)はO<sub>3</sub>区の葉をより選好する傾向を示すが野外O<sub>3</sub>区の食害率は抑制された。そこで、植物の香り成分BVOC(Biogenic Volatile Organic Compound)に着目した。多くの昆虫種は宿主植物の探索にBVOCを利用しているが、BVOCは大気中のO<sub>3</sub>との反応によって、その機能・寿命を変化させる。大気中O<sub>3</sub>濃度の上昇はBVOCを介した植食性昆虫の誘因作用が低下することをY字管BVOC選好性試験から示唆した。

研究成果の概要(英文)：Ground-level Ozone (O<sub>3</sub>) decreased defense leaf capacity because of suppression of photosynthesis. We found severe grazing damages of leaf beetle on a crown of White birch at elevated O<sub>3</sub>. Contrary to this, choice and non-choice style of feeding experiments showed that leaves exposed to elevated O<sub>3</sub> were preferred by leaf beetles because of lower defensive chemicals production. To clarify this phenomenon, we suggested possibility of BVOC (Biogenic Volatile Organic Compounds) as signal chemicals for insects to locate their host plants. BVOCs were roughly sorted into two groups: one was monoterpene (MT), the other was sesquiterpene (SQT). MT and SQT had no significant difference in the basic-emission rate regardless of O<sub>3</sub> exposure. Therefore, BVOC emission in itself did not work as a factor of changing grazing activity of leaf beetles although the brand ratio of BVOC should be considered. At high O<sub>3</sub>, we should study BVOC dynamics through reaction with O<sub>3</sub> after emitted in the atmosphere.

研究分野：森林生理生態学

キーワード：生物起源揮発性炭素化合物 対流圏オゾン 被食防衛物質 食害耐性 狭食者 BVOCブレンド比 BVOC  
滞在時間 紫外線

### 1. 研究開始当初の背景

開放系 オゾン (O<sub>3</sub>) 付加施設にてシラカンバの虫害発生を追跡してきた。そこでは、ハンノキやカンバ類の食害昆虫であるハンノキハムシ成虫は、対照区と比べて O<sub>3</sub> 区の夏葉で食害量が減少した。特に、O<sub>3</sub> 区ではハンノキハムシの産卵及び幼虫もほとんど見られなかった。一方、O<sub>3</sub> 区の葉では被食防衛物質量が有意に低下しており、植食者にとって好ましい葉であった。しかし、上記の 2 つの結果は矛盾しており、被食葉の形質以外によって虫害パターンが制御されている可能性が考えられる。

そこで本研究では、被食葉の形質以外の要因として O<sub>3</sub> の前駆物質でもある BVOC (生物起源揮発性有機化合物) という植物の放出する“香り成分”に着目した。植物は花や葉から種特異的な BVOC を放出し、植食者である昆虫はこの成分を感知することで宿主植物の位置を知ることが出来る。ハムシ類の 1 種が特定の BVOC に対して選好性を示すこと、また O<sub>3</sub> 暴露によって BVOC の放出が対照区と異なる樹木の事例が確認されてきた。これらの知見から、ハンノキハムシが感知できる BVOC に O<sub>3</sub> の効果の差が見られるのではないかと考えた。このために Y 字管試験を用いて BVOC 誘因性に関する実験も合わせて実施した。

### 2. 研究の目的

開放系施設を用いることで、野外環境下でのシラカンバの BVOC 放出に対する高 O<sub>3</sub> 環境の影響をハンノキハムシに注目した生物検定を行なうことで評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) BVOC サンプルングと分析

北大札幌研究林苗畑の O<sub>3</sub> 付加施設の褐色森林土に生育するシラカンバ 4 年生の幼樹で、対照区、O<sub>3</sub> 区とも 2 個体ずつ、3 つの付加施設での反復と処理を行った (対照区 6 個体、O<sub>3</sub> 区 6 個体)。O<sub>3</sub> 暴露は日中 7:00-19:00、対照区の O<sub>3</sub> 濃度は 25-35 nmol/mol (以下 ppb)、O<sub>3</sub> 区では約 70ppb であった。調査時期の 2017 年 7 月中旬 (O<sub>3</sub> 暴露 3 年目) は当年生幼虫の食害時期で幼虫はその後、8 月頃に羽化して再び成虫の摂食が始まる。本研究では、8 月の成虫が出現する前の時期に注目して、上記の測定時期とした。

測定項目は、1) 対照区と O<sub>3</sub> 区におけるシラカンバ葉の BVOC 放出、2) サンプルング袋内温度、3) 被食面積を除いた測定シュート葉面積合計の測定。BVOC の測定方法には、1 つのシュートをテフロン製の袋で覆い、袋内に放出される BVOC を採取管へ吸着させる“枝チャンパー法”(図 1) を用いた。

袋内への浄化空気の通気は 3L/min、採取管への吸着は 200ml/min とし、9:00 - 16:00

の間で各 30 分×6 回の測定を行った。なお、

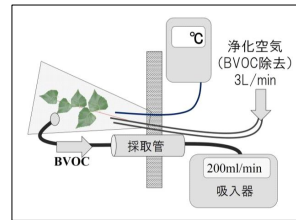


図 1 .BVOC のサンプルング法

通気には周辺大気を電動ポンプで吸引、白金触媒 (400 加熱) によって、測定したシュート以外の BVOC の影響を排除した空気を使用した。採取管には Tenax TA (GL Science, Japan) と Carbotrap (Supelco, USA) が充填されている。

測定シュートは同じ程度の高さに位置するシュートを個体当たり 1 つずつ選び (計 12 シュート)、“おんどとり TR-51i”でサンプルング袋内温度の変化を経時測定した。また、測定したシュートを袋内での環境に馴染らすため前日夕方から袋掛けを行い、浄化空気を通気した。なお、測定は対照区では 7 月 8、12、21 日、O<sub>3</sub> 区では 7 月 13、14、22 日の、いずれも天気が晴れか曇りの日に行った。採取管へ吸着した BVOC は、熱脱着装置付き (Turbo Matrix ATD650, Perkin Elmer, USA) ガスクロマトグラフィ質量分析計 (GCMS QP2010 Shimadzu, 日本) を用いて定性・定量分析にかけた。その後、各採取管で検量されたトルエン-d8 濃度による補正を経て、通気速度、濃縮量 (吸入量)、測定シュート葉面積合計、サンプルング袋内温度から放出速度を算出した。

BVOC の中でも、モノテルペン (以下 MT) はシラカンバの放出する BVOC の主要化合物群、セスキテルペン (以下 SQT) は昆虫ホルモンと構造が酷似した化合物群である。両化合物群とも昆虫に対して誘因性、あるいは忌避性を示す可能性が高いことから、本研究では MT 及び SQT の放出量・比率に注目した。BVOC 放出速度の比較をする上で、一定温度下での標準化を行った。測定放出速度 E と標準化温度との温度差 T-Ts の相関を対数グラフに取ると、G93 モデルに従う次の線形近似曲線式が得られる。

$$\ln E = (T-T_s) + \ln E_s,$$

ここで、E: 測定放出速度、T: 袋内温度、 $\alpha$ : 経験的係数、T<sub>s</sub>: 標準化温度 (30 °C)、E<sub>s</sub>: 基礎放出速度である。この近似曲線の切片に当たる E<sub>s</sub> は標準化温度 30 °C における値であり、近似曲線の傾きに当たる  $\alpha$  は経験的係数として補正される。MT は 0.09、SQT は 0.22 として計算した。対照個体の内部的ばらつきは母樹を揃えた材料であることから、独立 t 検定によって対照区と O<sub>3</sub> 区の比較を行った。

#### (2) Y 字管試験

実験方法に Y 字管 BVOC 選好性試験を採用した (図 2)。Y 字管 BVOC 選好性試験は、両チャンパーから Y 字管へ同流量で供給される別々の組成気体に対し、ハンノキハムシ

がどちらの気体を選ぶか(Y字管のどちら側の“腕”へ行くか)を検証するものである。後述する実験項目の場合、野外の同じ個体から採集した同枚数の葉を持つシラカンバシュートの入った2つのチャンバーに、それぞれ浄化空気区とO<sub>3</sub>区を再現した。

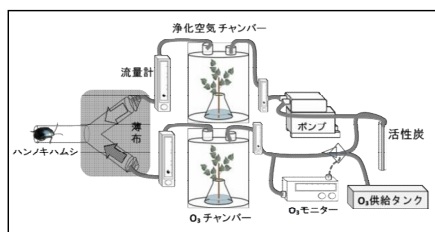


図2 Y字管 BVOC 選好性試験：概略図

Y字管への流量は、いずれも0.5L/minとした。本研究は嗅覚情報の検証を行うため検証時には視覚情報(薄布による被覆)、空間情報(2個体検証ごとにY字管の方向を180°回転)の遮断を行った。なお、各ハムシ個体の選好性検定は最大5分間とし、選好性の判断基準として「片側気体1分間の連続滞在」、または「検証時間内の訪問頻度の高い側」を設定した。

実験項目は以下の3項目である：O<sub>3</sub> vs 浄化空気、BVOC vs 浄化空気、BVOC vs BVOC + O<sub>3</sub>。各項目における検証個体数は、20個体、30個体、40個体であった。O<sub>3</sub>濃度はモニター(Model-202, 2Bテクノ, USA)によって80, 40, 120ppbの3段階を設定し、においては、半分の20個体の検証でO<sub>3</sub>暴露のシュートを入れ替えた。また、浄化空気は活性炭に通すことで生成した。

実験項目の内、は「ハシロキハムシに対するO<sub>3</sub>単体の忌避性の有無」を検証するものである。加えて、ではBVOCの誘因性を検証した。の検証後、本研究における仮説である「O<sub>3</sub>混合下におけるBVOCの誘因性低下」を検証した。但し、本研究ではがそれぞれ、「O<sub>3</sub>単体の忌避性無し」、「BVOCの誘因性有り」を前提条件としている。しかし、で忌避性が確認される場合、仮説以前の問題として、ハシロキハムシの食害低下の原因がO<sub>3</sub>単体の直接的な効果に由来することになる。また、でBVOCの誘因性が得られない場合、ハシロキハムシが植物を認識する要素には、いわゆる嗅覚情報は含まれないと結論付けることが出来る。

統計解析には、各O<sub>3</sub>濃度設定値の処理間比較において、2検定を用いた(理論分布0.5:0.5, R ver3.2.1)。

#### 4. 研究成果

##### (1) BVOCの放出

標準化温度30での基礎放出速度を算出したところ、MT, SQTとも、対照区とO<sub>3</sub>区間で基礎放出速度に有意差は見られなかった。上記の「基礎放出速度における処理区間の有意差はない」を基にBVOC放出の放出組成比を比較した。SQTの-farneseneの放出比

率が異なって見えたが、これはO<sub>3</sub>区の1個体においてのみ顕著な放出が見られたためである。当個体を外れ値として、これを除いて計算した場合、対照区の方が放出は平均放出量・比率とも大きかった。しかし、当個体の有無に関わらずBVOCの放出は対照区・O<sub>3</sub>区とも概ねMT:SQT=9:1となり、MT及びSQT各種成分の放出比率でも有意な差はなかった。以上の結果から、O<sub>3</sub>暴露によるBVOCの放出・組成比の顕著な変化はなかった。O<sub>3</sub>区におけるシラカンバの虫害には、シラカンバの葉が放出するBVOC、特にMTやSQTは単独では影響しないと示唆された。

検出された-farneseneは虫害後に放出増加する物質であり、幼虫の摂食選好性、食害率の高かった対照区で放出が増加することが予想された。事実、O<sub>3</sub>区の外れ値を除いた場合には一致している。調査には虫害の少ない葉を選んで測定を行ったが、虫害影響が一時的なBVOC放出増加として表れることを考慮しても、本研究の測定結果に虫害影響が含まれている可能性は否定出来ない。

今後、虫害影響を考慮したより正確なO<sub>3</sub>影響評価を行うためには、測定葉の虫害が起こった時期を把握する、あるいは強制的に植食者を投入(排除)する等、虫害の操作可能な実験系を構築する必要がある。また「O<sub>3</sub>暴露によるBVOC放出の変化がない」という結論を踏まえると大気中でO<sub>3</sub>と反応することによるBVOCの構造変化、つまりは機能変化：誘因性の消失、もしくは忌避性の酸化物質の生成の2通りが考えられる。本試験では葉から放出された直後のBVOCを採取することになるが、実際に自然環境下で昆虫が感知するまでには、ある程度の距離をBVOCが大気中へ拡散されていく状況が想定される。よって、高濃度O<sub>3</sub>区において、BVOCが拡散中に構造変化する可能性は高い。今回の測定結果ではMTとSQTのみしか検討出来ないため、他成分(アルデヒド類やアルコール類)の検量も進める必要がある。

##### (2) Y字管試験

Y字管BVOC選好性試験の結果から、材料と方法の項目では、6月、8月ともに、全てのO<sub>3</sub>濃度段階(40, 80, 120ppb)においてO<sub>3</sub>単体による選好性の差は見られなかった。また、実験項目では、6月、8月ともに、有意にBVOC側を選択する傾向があり、8月に特にその傾向が顕著に表れた。実験項目では、6月、8月ともに、40ppb(先行研究の虫害調査時における対照区O<sub>3</sub>濃度)では選好性に差はかった。80ppbでは、6月に有意差は確認なかったが、40ppbと比較して選好性の低下する傾向が得られた。また、8月にも同様に選好性の低下が確認でき、その差は有意であった。

実験項目から、ハシロキハムシに対して「O<sub>3</sub>単体の直接的効果(忌避性)無し」、「BVOCの誘因性有り」であることが判明し、仮説の前提条件は満たされていた。実験項目

の結果から、 $O_3$ 濃度の増加によって、ハンノキハムシの BVOC 探索能力が低下し、野外においてシラカンバへの訪問頻度が低下していたと考えられる。なお、BVOC は葉の直接傷害によって特異的な放出 (HIPV: Herbivore Induced Plant Volatile) を見せるので、この点を検証することが課題である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

増井昇・小池孝良: ハンノキハムシの行動選択に及ぼす対流圏オゾンの影響

BVOC (生物起源揮発性有機化合物) と食害行動の関係性. 北方森林学会 66:47-50 (2018) 査読有

Abu ElEla, S. A, Agathokleous E. and Koike T.: Growth and nutrition of *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae changed when fed with leaves obtained from an  $O_3$ -enriched atmosphere. Environmental Science and Pollution Research, <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1683-1> (2018) 査読有

Agathokleous E, Sakikawa T, Abu ElEla S.A, Mochizuki T, Nakamura M, Watanabe M, Kawamura K, Koike T.: Ozone alters the feeding behavior of the leaf beetle *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Chrysomelidae) into leaves of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*).

Environmental Science and Pollution Research, DOI

10.1007/s11356-017-9369-7. (2017) 査読有

増井昇・望月智貴・谷晃・齋藤秀之・渋谷正人・小池孝良: 高オゾン濃度環境下におけるシラカンバの BVOC 放出ハンノキハムシ食害傾向との関係性に迫る. 北方森林学会 65: 23-25 (2017) 査読有

[学会発表](計5件)

Koike T., Sakuma A, Watanabe M: Forest declining of mountain birch in northern Japan: Examination of effect of the elevated ozone on birch. Changing environment, plant stress and their ecological implications, 65th Ecological Society of Japan, 北海道・札幌市・札幌コンベンションセンター (2018)

増井昇・望月智貴・谷晃・小池孝良・佐藤冬樹: 高濃度オゾン環境下におけるシラカンバの食害動向と BVOC の関係性, 第 129 回日本森林学会大会, 高知県・高知市・高知大学朝倉キャンパス, (2018) Masui N, Mochizuki T, Tani A, Koike T.: BVOC emitted from Japanese white birch under high ozone level -

Relationship between insects and trees - Changing environment, plant stress and their ecological implications, 第 65 回日本生態学会, 北海道・札幌市・札幌コンベンションセンター (2018) 増井昇・小池孝良: ハンノキハムシの行動選択に及ぼす対流圏オゾンの影響(予報)~ BVOC(生物起源揮発性有機化合物)と食害行動の関係性~, 第 66 回北方森林学会, 北海道・札幌市・札幌コンベンションセンター(2017)

Masui N, Mochizuki T, Tani A, Satoh F, Koike T.: BVOC emission from shoots of young Japanese white birch stands under elevated ozone concentration, Sustainable Forest Ecosystems under Air Pollution and Climate Change IUFRO Tokyo, 東京都・府中市・東京農工大学農学部 (2017)

[図書](計1件)

Watanabe M, Hoshika Y, Koike T., Izuta T.: Effects of ozone on Japanese trees. Air pollution impacts on plant in East Asia (Izuta T. ed.), Springer Japan, Tokyo, 73-100. DOI: 10.1007/978-4-431-56438-6\_5, (2017)

[産業財産権] なし

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等;なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

小池 孝良 (KOIKE, Takayoshi)

北海道大学・大学院農学研究院・特任教授  
研究者番号: 10270919

(2)研究分担者

佐藤 冬樹 (SATO, Fuyuki)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授  
研究者番号: 20192734

中村 誠宏 (NAKAMURA Masahiro)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授  
研究者番号: 80545624

宮崎 雄三 (MIYAZAKI Yuzo)

北海道大学・低温科学研究所・助教  
研究者番号: 60376655

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし