

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

北海道大学農学部
静岡県立大学食品栄養科学部
北海道大学大学院農学研究院

増井 昇
望月 智貴・谷 晃
斎藤 秀之・渋谷 正人・小池 孝良

はじめに

植食性昆虫による食害は、森林における新葉生産量の約 15%を占めると言われており⁽¹⁾、増加の一途を辿る地表 0~11km 付近の対流圏オゾン（以下 O₃）や窒素沈着、CO₂濃度等の変動する大気環境下での虫害発生メカニズムの解明は、今後の森林保護管理の上で大きな課題の 1 つである。

北海道大学札幌研究林苗畑では、開放系 O₃暴露施設においてシラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*) の虫害発生を追跡してきた。2013~2015 年度の報告によれば、ハンノキやカンバ類の食害昆虫であるハンノキハムシ (*Agelastica coerulea*) 成虫は、対照区と比べて O₃区の夏葉で食害量が減少した^(6,11)。特に、O₃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⁽⁶⁾。一方、O₃区の葉では二次代謝防御物質量が有意に低下しており、植食者にとって質の高い葉であることが確認されている⁽¹¹⁾。しかし、上記の 2 つの事実は矛盾しており、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、BVOC (Biogenic Volatile Organic Compound: 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⁽²⁾。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と言われている。ハムシ類の 1 種 (*Chrysomela populi*) が特定の BVOC に対して選好性を示すこと⁽³⁾、また O₃暴露によって BVOC の放出が対照区と異なる樹木の事例⁽⁴⁾が確認されてきた。これらの知見から、札幌研究林苗畑の O₃暴露実験においても同様に、ハンノキハムシが感知できる BVOC 放出に O₃区で差が見られるのではないかと考えた。

これまでの樹木の BVOC に関する先行研究では閉鎖系での実験が多く、野外環境下での研究例は乏しい。よって、本研究では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 O₃暴露の影響評価を行うことを目的とした。

材料と方法

対象樹木は、北海道大学札幌研究林苗畑 FACE 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

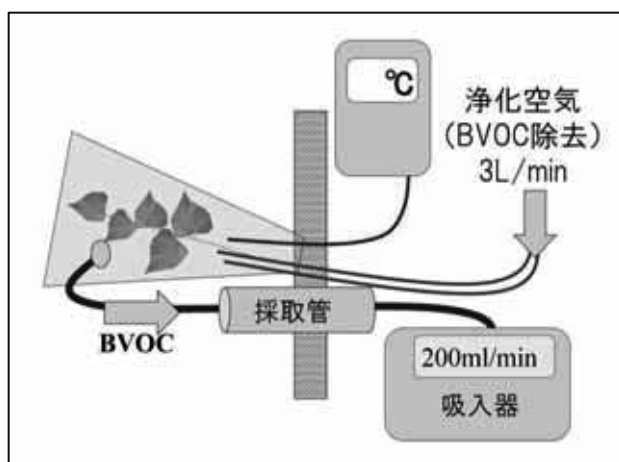


図-1 枝チャンパー法の概略図

区、O₃区ともそれぞれ 2 個体ずつ、3 つの FACE 施設で測定を行った (対照区 6 個体、O₃区 6 個体)。O₃暴露は日中 7:00-19:00、対照区の O₃濃度は 25-35 nmol mol⁻¹ (以下 ppb)、O₃区では約 70ppb であった。

調査時期の 2016 年 7 月中旬 (O₃暴露 3 年目) は当年生幼虫の食害時期にあたり、当年生幼虫はその後、8 月頃に羽化して再び成虫の摂食が始まる⁽¹⁰⁾。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。

予備実験後、測定項目は、主に以下の 3 つとした: 1) 対照区と O₃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。

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、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 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

Noboru MASUI (School of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo 060-8589), Tomoki MOCHIZUKI, Akira TANI (School of Shizuoka Univ., Shizuoka 422-8002), Hideyuki SAITO, Masato SHIBUYA, Takayoshi KOIKE (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ.)

BVOC emissions from leaves of young Japanese white birch under high ozone concentration with special reference to feeding preference of the leaf beetle (*Agelastica coerulea*).

た。また、測定シュートを袋内での環境に馴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、O₃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 Instruments, USA) ガスクロマトグラフィ質量分析計 (GCMS-QP2010 SHIMADZU, Japan) 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、サンプリ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) はシラカンバが放出する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、Guenther *et al* (1993) が提唱したG93モデル⁽⁴⁾を用いて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。

$$\ln E = \beta (T-Ts) + \ln Es$$

ここで、E: 測定放出速度, T: 袋内温度, β : 経験的係数, Ts: 標準化温度 (30°C), Es: 基礎放出速度である。この近似曲線の切片に当たるEs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 β 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^(4,6)。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O₃区の比較を行った。

結果

標準化温度30°Cでの基礎放出速度を算出した (図-2)。その結果、MT, SQTとも、対照区-O₃区間で基礎放出速度に有意差は見られなかった (p>0.1)。

上記の「基礎放出速度における処理区間の有意差はない」、という結果を基に、BVOC放出の放出組成比を比較した (図-3)。図-3BではSQTの α -farneseneの放出比

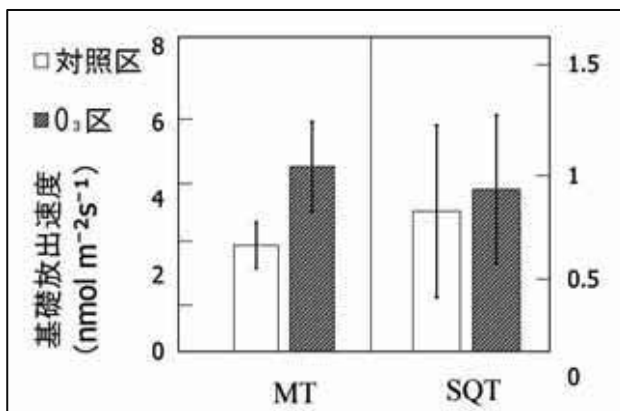


図-2 基礎放出速度の比較: MT及びSQT
エラーバーは標準誤差を表す。

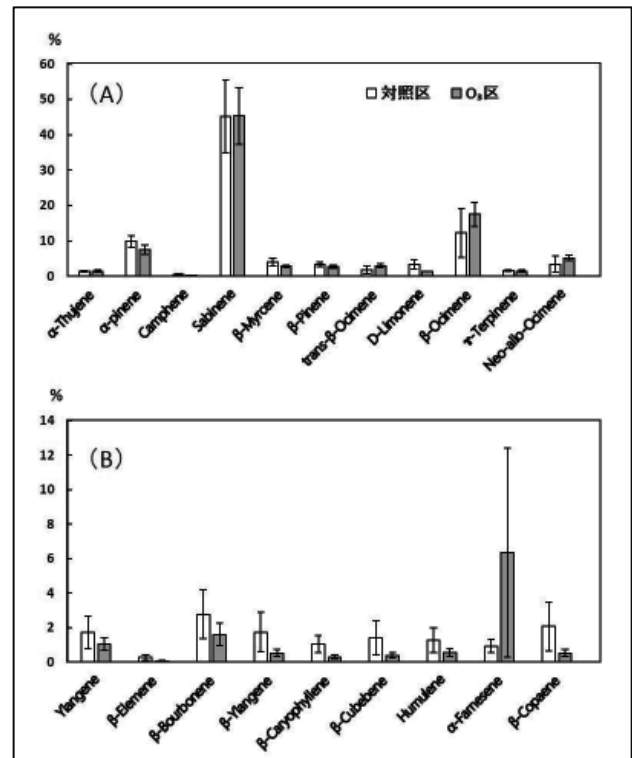


図-3 MT (A), SQT (B) の日中放出平均組成比
MTとSQTの合計値で100%とする。エラーバーは標準誤差を表す。

率が大きく異なって見えるが、これはO₃区の1個体においてのみ顕著な放出が見られた結果である。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・O₃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得られなかった。(p>0.1)

以上の結果から、O₃暴露によるBVOCの放出・組成比の顕著な変化はないと結論付けられる。従って、O₃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、特に本研究で測定対象としたMTやSQTは単独では影響していない可能性が示唆された。

考察

欧州シラカンバ (*Betula pendula*) では、被食後に α -farneseneや(E)- β -ocimene, β -caryophyllene等の特徴的なBVOC放出増加を示すことが確認されている⁽¹²⁾。この様に、 α -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⁽¹¹⁾で放出が大きくなることが予想された。この予想は、結果で述べたようにO₃区の外れ値を除いた場合には一致している。O₃区での1個体が α -farneseneを多く放出した原因は依然不明であり、個体の特性、又はO₃暴露により虫害応答が一時的に高まっていた可能性が考えられる。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⁽²⁾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。

このような問題点は存在するが、本研究における結果は、 O_3 暴露に伴う虫害影響を含んだ上での、将来の自然環境の変化により則したものと考えられる。今後、虫害影響を考慮したより正確な O_3 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、虫害を操作可能な実験系を構築する必要がある。

また、「 O_3 暴露によるBVOC放出の変化がない」という結論を踏まえて、 O_3 区での虫害メカニズムを説明する他の要因を模索せねばならない。1つの可能性として挙げられるのが、大気中で O_3 と反応することによるBVOCの構造変化、つまりは機能変化が起きることである。

キュウリを食害するハムシ (*Acalymma vittatum*) の例では、Y字管選好性試験で O_3 -BVOC反応の効果を検証した研究がある⁽³⁾。この事例では、ハムシが“BVOC vs Clean air”, “BVOC vs BVOC + O_3 ”のいずれにおいてもBVOC単体の空気を選好する、即ち誘因性BVOCが O_3 による機能消失するという効果が示された。 O_3 による機能変化としては、上述したような誘因性の消失、もしくは忌避性の酸化物質の生成、の大きく分けて2通りが考えられる。

枝チャンパー法では葉から放出されてすぐの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_3 区において、BVOCが拡散中に構造変化する可能性は高いと考えられる。

最後に、今回の測定結果ではMTとSQTのみしか検討出来ていないため、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。

また、シラカンバのBVOC放出では温度の他に光への依存性もある⁽⁵⁾ことから、より正確なBVOC放出速度の推定には光強度（PPFD）のデータが必要である。今回は測定機器の不具合により解析に含めることが出来なかったため、今後の課題として検討していきたい。

謝辞

本研究は科学研究費補助金（16K14932：代表・小池孝良）の支援を得た。施設の管理には、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター、特に市川一氏と佐藤冬樹氏の支援を得た。記して感謝する。

引用文献

- (1) Brilli F, Ciccioli P, Frattoni M, Prestinanzi M, Spanedda AF, Loreto F (2009) Constitutive and herbivore-induced monoterpenes emitted by *Populus x euroamericana* leaves are key volatiles that orient *Chrysomela populi* beetles. *Plant. Cell. Environ.* **32**: 542–552.
- (2) Copolovici L, Kännaste A, Rimmel T, Vislap V, Niinemets Ü (2010) Volatile emissions from *Alnus glutinosa* induced by herbivory are quantitatively related to the extent of damage. *J. Chem. Ecol.* **37**:18–28.
- (3) Fuentes J.D., Roulston, T'-H, Zenker J (2013) Ozone impedes the ability of a herbivore to find its host. *Environ. Res. Lett.* **8**, DOI: 10.1088/1748-9326/8/1/014048.
- (4) Guenther A.B., Zimmerman P.R., Harkey P.C., Monson R.K., Fall R (1993) Isoprene and monoterpene emission rate Variability: model evaluations and sensitivity analysis. *J. Geophys. Res. Atmospheres* **98**: 12609-12617.
- (5) Hartikainen K, Riikonen J, Nerg AM, Kivimäenpää M, Ahonen V, Tervahauta A, Kärenlampi S, Mäenpää M, Rousi M, Kontunen-Soppela S, Oksanen E, Holopainen T (2012) Impact of elevated temperature and ozone on the emission of volatile organic compounds and gas exchange of silver birch (*Betula pendula* Roth). *Environ. Exp.Bot.* **84**: 33-43.
- (6) 井上航・Amelie V・崎川哲一・中村誠宏・斎藤秀之・渋谷正人・小池孝良（2015）異なる O_3 濃度及び土壌条件下で生育した落葉広葉樹稚樹の虫害．北森研 **64**: 41-43.
- (7) Lindroth RL (2010) Impacts of elevated atmospheric CO_2 and O_3 on forests: phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. *J. Chem. Ecol.* **36**: 2-21.
- (8) Mochizuki T, Endo Y, Matsunaga S, Chang J, Ge Y, Huang C, Tani A (2011) Factors affecting monoterpene emission from *Chamaecyparis obtusa*. *Geochem. J.* **45**: 15-22.
- (9) Peñuelas J, Llusia J, Gimeno BS (1999) Effects of ozone concentrations on biogenic volatile organic compounds emission in the Mediterranean region. *Environ. Pollut.* **105**: 17–23.
- (10) 林業試験場北海道支場保護部（1985）北海道樹木病虫害図鑑．北方林業会，札幌，223pp.
- (11) Sakikawa T, Nakamura M, Watanabe M, Oikawa M, Satoh F, Koike T (2016) Leaf phenology and insect grazing of Japanese white birch saplings grown under free-air ozone exposure. *J. Agr. Meteorol.* **72**: 70-84.
- (12) Vuorinen T (2005) VOC emissions induced by herbivory, pathogen infection, and O_3 exposure from two silver birch clones and the host-searching behavior of the generalist predator. Kuopio University Publications Co. Ser. Natural and Environmental Sciences **183**: 67-80.