

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

北海道大学大学院農学院
北海道大学大学院農学研究院

増井 昇
小池 孝良

はじめに

近年、地表 0~11km にある対流圏オゾン (以下、O₃) の、東アジアにおける増加が特に注目されている⁽⁷⁾。O₃ は、植物の葉の気孔から内部に取り込まれ、光合成活性の低下や各種代謝系の阻害を引き起こす^(7,13)。また、このような葉の機能変化は、葉の質的变化と密接に結びついているため、植食性昆虫に対する餌資源の変化に直結している。我が国においても、今後の大気中 O₃ 濃度の将来的な増加傾向が懸念される中で、高 O₃ 環境に伴う餌資源の質の変化が植食性昆虫の食害パターンに影響すると考えられた。

上記の O₃ 環境-虫害動向の調査の一環として、北海道大学札幌研究林苗畑において、街路樹などに多用されるシラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*) を用いた野外開放系 O₃ 暴露実験が行われてきた。この実験では、O₃ 濃度が対照区、O₃ 区でそれぞれ 30~40ppb, 80ppb であり、該当する食害昆虫はハンノキやカンバ類を特異的に食害するハンノキハムシ (*Agelastica coerulea*) であった。研究報告⁽¹⁾によれば、実験室での摂食実験において、ハンノキハムシ成虫は O₃ 区の葉を選好し、また O₃ 区の葉では二次代謝防御物質量が有意に低下していた。これらの実験室の結果からは、O₃ 濃度の増加に伴いハンノキハムシによる食害が激化すると予想される。しかし、実験室の結果に反し野外の食害調査では、対照区と比較すると O₃ 区で食害率が減少する傾向を示した。ここで、実験室と野外調査における傾向の矛盾を解明するため、本研究で着目したのが BVOC である。

BVOC (Biogenic Volatile Organic Compound) は、イソプレネユニット (C₅H₈) を基本骨格とする揮発性の有機化合物の総称である。植物体の葉や花から種特異的に放出される BVOC には、モノテルペン (MT: C₁₀H₁₆) やセスキテルペン (SQT: C₁₅H₂₄)、またアルコール類やアルデヒド類などの他、多くの成分が存在している⁽¹⁾。本研究における BVOC の側面は、主に 2 つ存在する。

1 つは、昆虫の宿主植物の探索能力におけるシグナル物質としての側面である。昆虫は、触覚にある感覚器官で宿主植物の放出する特異的な BVOC 放出を感知することで、

表-1 ハンノキハムシ生活史⁽¹⁰⁾

ハンノキハムシ生活史	~4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月~
成虫(摂食◆,越冬+)	+++	++◆	◆◆◆		+◆◆	◆◆+	+++
幼虫(摂食■,成長■)			…■	■	■	…	

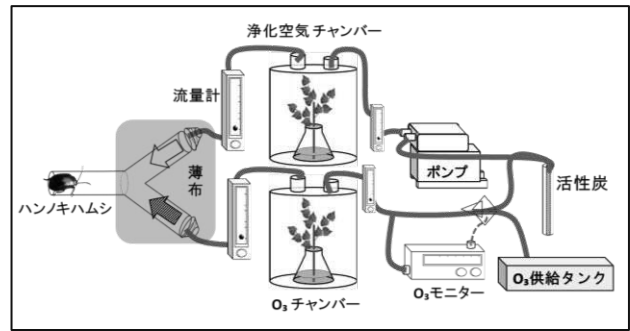


図-1 Y字管 BVOC 選好性試験：概略図
上図は実験項目③を表す

その位置を探索することが出来ると言われている。特に、訪花性昆虫であるハチ類が BVOC を感知する好例であり、花の色に加えて、授粉を助ける 1 つの要因となっている。ハムシ類でも、宿主植物の探索に BVOC を利用している例は多く報告されており^(2,4)、本研究におけるハンノキハムシとシラカンバの関係性においても、同様の現象が認められる可能性がある。

もう 1 つの側面は、放出後の BVOC の反応性である。BVOC は放出後、構造中に二重結合を持つ性質から大気中の O₃ に対して高い反応性を持つ^(1,9) ことが知られている。よって、誘因性などの効果を示す (もしくは何の効果も示さない) BVOC が O₃ との反応によって構造変化を起こす場合、それは昆虫に対する機能変化に繋がる。先行研究⁽⁹⁾では、*Cucurbita foetidissima* を宿主植物とするハムシ (*Acalymma vittatum*) において、O₃ 濃度の増加に伴い選好性が低下するという結果が得られている。

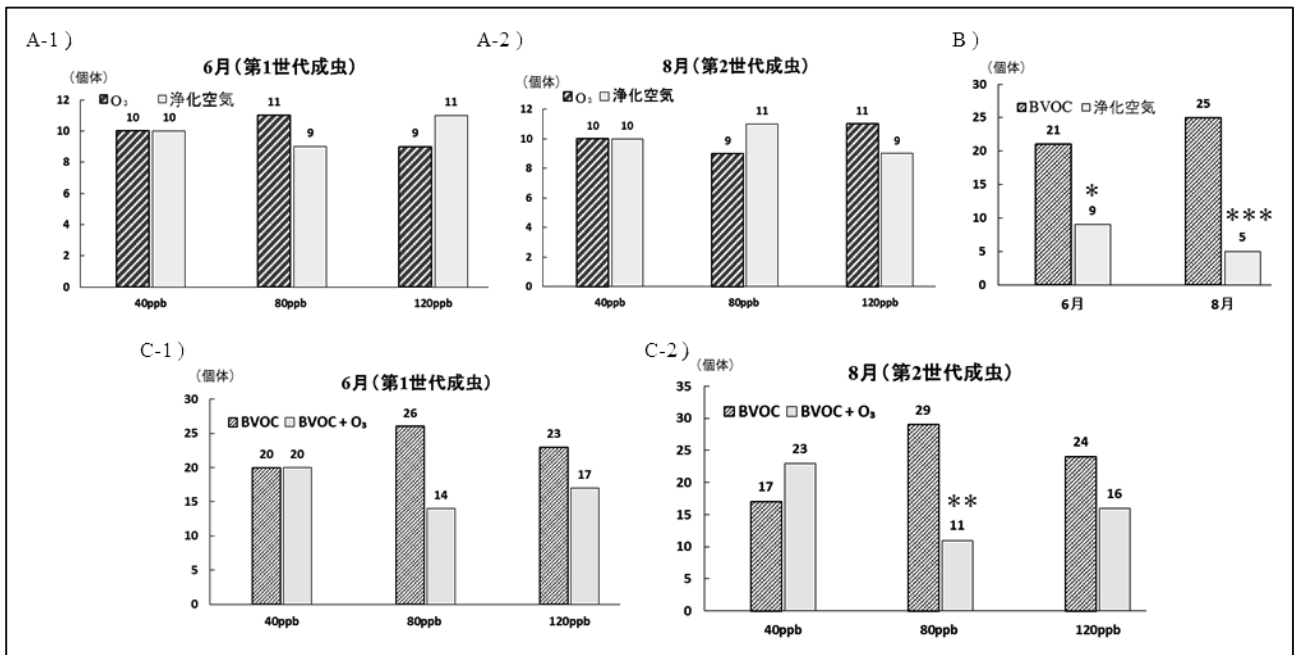
以上 2 つの側面から、「O₃ 環境に伴う植物探索能力の低下 (BVOC 誘因性の低下)」がシラカンバ-ハンノキハムシ間で起こっていると仮定して本研究を行った。

材料と方法

本研究は、北大札幌研究林苗畑に設置した紫外線透過型ビニールハウス内において行った。実験材料は、上述のハンノキハムシ成虫及び、シラカンバのシュートをを用い、開放系オゾン付加施設の対照区から採集した。

調査時期はハンノキハムシの生活史 (表-1) に合わせ、成虫の出現する 2017 年 6 月中旬 (第 1 世代成虫)、8 月中旬 (第 2 世代成虫) とした。また、シラカンバは季節性の

Noboru MASUI (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-8589), Takayoshi KOIKE (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-8589)
Effect of elevated ozone on selection behavior of leaf beetle - BVOCs (Biogenic Volatile Organic Compounds) and herbivorous insects -



図一2 Y字管 BVOC 選好性試験：結果

A) O₃ vs 浄化空気, B) BVOC vs 浄化空気, C) BVOC vs BVOC + O₃ (χ^2 検定: * p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001)

葉展開による異形葉を持つ。よって、6月の中旬には第1世代成虫とシラカンバ春葉、8月中旬には第2世代成虫とシラカンバ夏葉を用いて実験を行った。7月の中旬に該当する幼虫に関しては、活動場所が第1世代成虫の産卵場所に依存しており、孵化後の移動性は極めて低いことから本研究の対象からは除外した。

本研究では、実験方法に Y 字管 BVOC 選好性試験を採用した (図一1)。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③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つのチャンパーに、それぞれ浄化空気区と O₃ 区を再現した。

Y 字管への流量は、いずれも 0.5L/min とした。また、本研究はいわゆる嗅覚情報の検証を行う実験系であるため、検証時には視覚情報 (薄布による Y 字管の被覆)、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。加えて、5 個体検証ごとに、Y 字管のエタノール洗浄・乾燥を行った。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：①O₃ vs 浄化空気、②BVOC vs 浄化空気、③BVOC vs BVOC + O₃。各項目における検証個体数は、①20 個体、②30 個体、③40 個体であった。O₃ 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、③においては、半分の 20 個体の検証で O₃ 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、①は「ハンノキハムシに対する O₃ 単体の忌避性の有無」を検証するものである。加えて、②では

BVOC の誘因性を検証した。①②の検証後、本研究における仮説である「O₃ 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①②がそれぞれ、①「O₃ 単体の忌避性無し」、②「BVOC の誘因性有り」であることを前提条件としている。しかし、①で忌避性が確認される場合、仮説以前の問題として、ハンノキハムシの食害低下の原因が O₃ 単体の直接的な効果に由来することになる。また、②で BVOC の誘因性が得られない場合、ハンノ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 O₃ 濃度設定値の処理間比較において、 χ^2 検定を用いた (理論分布 0.5:0.5, R ver3.2.1)。

結果

Y 字管 BVOC 選好性試験の結果を、図一2 に示す。実験項目①では、6 月、8 月ともに、全ての O₃ 濃度段階 (40, 80, 120 ppb) において O₃ 単体による選好性の差は見られなかった (図一2A-1, 2A-2)。また、実験項目②では、6 月、8 月ともに、有意に BVOC 側を選択する傾向が確認でき、8 月に特にその傾向が顕著に表れた (図一2B)。

実験項目③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 O₃ 濃度) では選好性に差は見られなかった (図一2C-1, 2C-2)。80ppb では、6 月に有意とする差は確認されなかったものの、40ppb と比較して選好性の低下する傾向が得られた (図一2C-1)。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 (図一2C-2)。120ppb では 6 月、8 月ともに、O₃ 処理による有意な差は得られなかったが、40ppb よりは選好性に差が見られた。しかし、80ppb で見られた選好性低下の傾向がより顕著にはならず、逆に、わずかに誘因性の低下が緩和される結果を示した (図一2C-1, 2C-2)。

実験項目①②から、ハンノキハムシに対して「O₃ 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た。よって,本研究における仮説の前提条件は満たされている。また,実験項目③の結果から, O₃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。

考察

8月40ppbの選好性試験において,わずかにO₃処理側のBVOCを選択する結果が得られた。この原因として,生育時の環境に近いBVOCに対して応答する個体が存在した可能性が挙げられる。先述の通り,実験に用いたハンノキハムシ個体は,野外対照区で採集してきたものである。よって,この可能性に関する検定を行うため,第2世代成虫は幼虫段階から飼育し,野外情報に晒されていない状態の個体を用いて選好性試験を行う必要がある。

実験項目③では,本研究における仮説に完全に従う場合,選好性は40>80>120ppbの順となるはずであるが,本研究では40>120>80ppbとなるような結果が示された。背景で触れたハムシの先行研究⁽⁹⁾では,ハムシと宿主植物のBVOCの間で仮説に従う結果が得られている。この事例ではO₃処理によるBVOCの変化は一定であり,O₃濃度の増加によって誘因性低下の傾向が強くなることが示唆された。しかしながら,植物種に応じてBVOC放出成分は特異的である。さらに,O₃との反応度も放出成分によって異なる⁽¹⁾ことが,仮説と本研究の相違点に寄与している可能性がある。昨年の調査から,シラカンバが放出するBVOCは数多く存在する(表-2)ことが分かっており⁽⁸⁾,例えば24時間平均26 nmol/molのO₃濃度では存続時間が α -pineneで4.6時間,Limoneneは2.0時間など,O₃に対する反応度は大きく異なっている⁽¹⁾。反応度が異なる成分がそれぞれ別々の機能変化を起こす場合,O₃濃度の増加に応じたBVOC全体の機能変化が一定にならないと考えられる。現在,O₃環境下でのシラカンバ由来のBVOC挙動を解明するため,O₃混合の前後におけるBVOC組成変化の調査を進めている。

展望

考察で述べた課題の他,今後のシラカンバの食害動向をより正確に把握していくためには,O₃影響のみでは説明が不十分な点が存在する。本研究では,食害を開始するための第一段階としてBVOCに着目したが,BVOCによって訪問頻度が増加している環境では,二次的に食害影響も増加することが想定される。BVOCは葉の直接傷害によって特異的な放出(HIPV: Herbivore Induced Plant Volatile)を見ることが知られており,シラカンバ放出(表-2)においても,Ocimene系や β -Caryophyllene, α -Farneseneなど,近縁種の欧州シラカンバ(*Betula pendula*)ではHIPV放出の報告されている成分が存在する⁽¹²⁾。

宿主植物のHIPV放出に対する応答性は,昆虫種によって異なる。例えば,HIPV放出をシグナルに当該害虫に対して直接的に忌避性を持つ例や,害虫の天敵を呼び寄せるという,生物的防御能力に寄与する例は多い^(3,6)。しかし,加速度的に同じ食害昆虫を呼び寄せてしまう場合もあり,ハムシ類でもその例は報告されている⁽²⁾。食害影響によ

表-2 シラカンバのBVOC放出成分(MT及びSQT)

枝チャンパー法により採取したBVOCの定性分析結果

MT	SQT
α -Thujene	Ylangene
α -pinene	α -Copaene
Camphene	β -Elemene
Sabinene	β -Bourbonene
β -Myrcene	β -Ylangene
β -Pinene	β -Caryophyllene
trans- β -Ocimene	β -Cubebene
D-Limonene	Humulene
β -Ocimene	α -Farnesene
γ -Terpinene	β -Copaene
Neo-allo-Ocimene	

て昆虫の集積的摂食が促進される場合,「訪問頻度大→食害影響大→訪問頻度大…」というフィードバックが形成され得るが,本研究の背景であるO₃環境下で食害率が低下するような場合には,このようなフィードバックは抑制されると考えられる。いずれにしても,昆虫の食害行動を説明する上で,食害影響は切り離して考慮することが出来ない要素である。したがって,未だ未解明なハンノキハムシとシラカンバの関係において,食害処理を制御した実験系を構築し,本研究の選好性試験やBVOC解析を行うことが求められるだろう。

8月の第2世代成虫に注目すると,6月時の第1世代成虫よりもBVOCに対してより強く応答していることが示された(図-2B)。この現象をハンノキハムシの生活史に照らし合わせた時,8月は生殖活動を行わず,翌年に備えた越冬前に当たる。越冬前の宿主植物選択の行動が,越冬現象に始まる,翌年の宿主植物の選択にも関与していくのか,非常に興味深い点である。

謝辞

本研究は,科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究(16K14932)と栗林財団の支援の支援を得た。また,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) Atkinson R and Arey J (2003) Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmos. Environ.* **37**: 197-219.
- (2) Bolter CJ, Dicke M, Van Loon JJA, Visser JH and Posthumus MA (1997) Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *J. Chem. Ecol.* **23**: 1003-1023.
- (3) De Moraes CM, Lewis WJ, Paré PW, Alborn HT and Tumlinson JH (1998) Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* **393**: 570-573.
- (4) Fernandez P and Hilker M (2007). Host plant location by Chrysomelidae. *Basic. Appl. Ecol.* **8**(2): 97-116.
- (5) Fuentes JD, Roulston TH and Zenker J (2013) Ozone impedes the ability of a herbivore to find its host. *Environ.*

- Res. Lett. **8**: 014048.
- (6) Kessler A and Baldwin IT (2001) Defensive function of herbivore induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**: 2141-2144.
- (7) Koike T, Watanabe M, Hoshika Y, Kitao M, Matsumura H, Funada R and Izuta T (2013) Effects of ozone on forest ecosystems in East and Southeast Asia. *Dev. Environ. Sci.* **13**: 371-390.
- (8) 増井昇・望月智貴・谷晃・斎藤秀之・渋谷正人・小池孝良 (2016) 高オゾン濃度環境下におけるシラカンバの BVOC 放出. 北森研 **65** : 23-25.
- (9) Pinto DM, Blande JD, Souza SR, Nerg A-M and Holopaine JK (2010) Plant volatile organic compounds (BVOCs) in ozone (O₃) polluted atmospheres: the ecological effects. *J. Chem. Ecol.* **36**: 22-34.
- (10) 林業試験場北海道支場保護部 (1985) 北海道樹木病虫獣図鑑. 北方林業会, 札幌, 223pp.
- (11) Sakikawa T, Nakamura M, Watanabe M, Oikawa M, Satoh F and 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 O₃ exposure from two silver birch clones and the host-searching behavior of the generalist predator. *Kuopio Univ. Publ. C. S. Nat. Environ. Sci.* **183**: 67-80.
- (13) Yamaguchi M, Watanabe M, Matsumura H, Kohno Y and Izuta T (2011) Experimental studies on the effects of ozone on growth and photosynthetic activity of Japanese forest tree species. *Asian. J. Atmos. Environ.* **5**: 65-78.