



Title	高濃度オゾン環境下におけるシラカンバの虫害と植物由来揮発性有機化合物の関係性に関する研究
Author(s)	増井, 昇
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第7188号
Issue Date	2023-12-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.r7188">https://doi.org/10.14943/doctoral.r7188</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/91196">https://hdl.handle.net/2115/91196</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Masui_Noboru.pdf



高濃度オゾン環境下におけるシラカンバの虫害と  
植物由来揮発性有機化合物の関係性に関する研究  
Research on a relationship between herbivorous activity of insects  
and biogenic volatile organic compounds (BVOCs) of birch under  
an elevated tropospheric ozone level

増 井 昇  
Masui Noboru

2023 年 10 月

# 目次

第1章 序論 .....	4
1.1 大気汚染と虫害 .....	1
1.1.1 対流圏オゾン (O <sub>3</sub> ) による樹木の防御機能に対する影響と虫害 .....	1
1.1.2 対流圏オゾンの概況 .....	2
1.2 生物起源揮発性有機化合物 (BVOCs) .....	3
1.2.1 香気シグナルとしての機能と生物学的意義 .....	3
1.2.2 高濃度 O <sub>3</sub> 環境下における BVOCs の動態 .....	5
1.3 本論文の構成 .....	8
第2章 BVOCs 放出に対する O <sub>3</sub> の影響 .....	11
2.1 目的 .....	11
2.2 材料と方法 .....	11
2.2.1 開放系 O <sub>3</sub> 曝露施設 .....	11
2.2.2 植物材料：シラカンバ .....	11
2.2.3 BVOCs サンプルング及び定性・定量分析 .....	12
2.2.4 基礎放出速度推定及び統計解析 .....	14
2.3 結果と考察 .....	15
第3章 葉内長鎖脂肪酸 (LCFAs) に対する O <sub>3</sub> の影響 .....	17
3.1 目的 .....	17
3.2 材料と方法 .....	18
3.2.1 植物材料 .....	18
3.2.2 脂肪酸抽出及び定量分析 .....	18
3.2.3 統計解析 .....	19
3.3 結果 .....	19
3.3.1 LCFAs の季節的変動及び減衰傾向に対する O <sub>3</sub> 曝露影響 .....	19
3.3.2 LCFAs の葉内含有量及び組成に対する O <sub>3</sub> 影響 .....	22
3.4 考察 .....	23
3.4.1 異型葉性における LCFAs の季節的変動 .....	26

3.4.2	高濃度 O <sub>3</sub> 環境下における LCFA <sub>s</sub> の減衰	27
3.4.3	高濃度 O <sub>3</sub> 環境下における LCFA <sub>s</sub> の生物学的機能	28
第 4 章	BVOC <sub>s</sub> の大気中減衰反応と昆虫に対する誘引性	29
4.1	目的	29
4.2	実験材料と方法	30
4.2.1	植物材料	30
4.2.2	試験昆虫：ハンノキハムシ	30
4.2.3	BVOC <sub>s</sub> 選好性試験（Y 字管試験）	31
4.2.4	BVOC <sub>s</sub> サンプルング及び定性・定量分析	33
4.2.5	O <sub>3</sub> に対する BVOC <sub>s</sub> の大気中反応速度	34
4.2.6	統計解析	36
4.3	結果	37
4.3.1	BVOC <sub>s</sub> 選好性試験（Y 字管試験）	37
4.3.2	BVOC <sub>s</sub> 放出速度及び放出組成	38
4.4	考察	42
4.4.1	高濃度 O <sub>3</sub> 環境下におけるハンノキハムシの行動選択	42
4.4.2	BVOC <sub>s</sub> 由来の酸化生成物による影響	42
第 5 章	樹種間の BVOC <sub>s</sub> 放出組成比較による誘引組成探索	44
5.1	目的	44
5.2	実験材料と方法	44
5.2.1	植物材料	44
5.2.2	試験昆虫	45
5.2.3	BVOC <sub>s</sub> 選好性試験（Y 字管試験）	45
5.2.4	BVOC <sub>s</sub> サンプルング及び定性・定量分析（多樹種比較）	45
5.2.5	統計解析	46
5.3	結果	46
5.3.1	BVOC <sub>s</sub> 選好性試験（Y 字管試験）	46
5.3.2	BVOC <sub>s</sub> 放出の樹種間類似性	47
5.3.3	カバノキ科樹種における BVOC <sub>s</sub> の O <sub>3</sub> 反応性	51
5.4	考察	53

5.4.1	BVOCs 放出組成の類似性と生物学的意義 .....	53
5.4.2	シラカンバにおけるハンノキハムシ誘引成分と展望 .....	55
5.4.3	高濃度 O <sub>3</sub> 環境下の植物-昆虫間コミュニケーションにおける BVOCs 放出組成の影響 .....	55
第 6 章	総合考察 .....	56
6.1	結論 .....	56
6.2	展望 .....	58
6.2.1	高濃度 O <sub>3</sub> 環境による植物-昆虫間コミュニケーションの崩壊と生態的改変 ...	58
6.2.2	植物-昆虫間コミュニケーションに対する大気環境要因の複合影響 .....	59
6.2.3	BVOCs を介した虫害の連続的影響 .....	60
6.2.4	昆虫の植物探索における二相性応答 .....	61
6.2.5	O <sub>3</sub> 曝露影響の長期シミュレーション .....	62
謝辞	.....	63
参考文献	.....	64

## 第1章 序論

### 1.1 大気汚染と虫害

#### 1.1.1 対流圏オゾン (O<sub>3</sub>) による樹木の防御機能に対する影響と虫害

地表付近の対流圏オゾン (O<sub>3</sub>; 次項後述) は強力な酸化作用を有し、気孔から植物組織内に侵入した O<sub>3</sub> は光合成の抑制や葉の可視障害 (茶褐色や白色病斑点の発生) など植物の成長に負の影響を引き起こすことが知られている (Izuta, 2017)。さらに、植物地上部への O<sub>3</sub> ストレスは、落葉や菌根菌への光合成産物の分配を介して、根の成長、土壌中のリターの分解、土壌微生物の群集組成など、地下部にも影響を及ぼす (Wang et al., 2016; Vitale et al., 2019)。特に都市部では、景観向上や気温・大気汚染低減を期待して街路樹などの都市緑化が整備されているものの、これらの緑化植物は O<sub>3</sub> による障害を受けると、本来期待されている機能を発揮することが出来ない。

炭素由来の防御物質は植物の光合成産物量に依存することから、O<sub>3</sub> ストレスによる光合成機能の低下は結果として、植食性昆虫に対する植物の防御機能の低下を引き起こす (Lindroth, 2010; Duque et al., 2019)。反対に、二酸化炭素濃度が高濃度である条件の様に光合成産物量が増加する場合においては、葉内窒素濃度の低下 (C/N 比の増加) 及び防御物質量の増加によって葉は“食べにくい餌”となり、植食性昆虫の摂食葉に対する嗜好性は低下する (Holopainen et al., 2018; Xu et al., 2019)。

光合成機能が抑制される O<sub>3</sub> ストレスである場合、O<sub>3</sub> 曝露された葉は光合成産物由来の各種防御形質が低下するため植食性昆虫に対して“食べやすい餌”となり、理論上は植食性昆虫による被害は O<sub>3</sub> 濃度が高い環境に生育する植物であるほど大きくなると想定される。北海道大学札幌研究林実験苗畑では野外の開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設を利用して、シラカンバ (*Betula platyphylla* Sukaczew var. *japonica* (Miq.) H.Hara) など樹木に対する長期 O<sub>3</sub> 曝露影響及び虫害動態の評価を行ってきた (Sakikawa et al. 2016)。野外で O<sub>3</sub> 曝露処理を受けたシラカンバの葉を採集して葉内防御物質量の分析を行ったところ、上述した理論上の仮説と同様に、高濃度 O<sub>3</sub> 区に生育するシラカンバでは葉内の防御物質量 (総フェノール量、縮合タンニン量) が低下することが認められた。また、この O<sub>3</sub> 曝露葉を実験室内において主要植食者のハンノキハムシ (*Agelastica coerulea*) に供試する摂食試験を行ったところ、対照区から採集した葉よりも O<sub>3</sub> 曝露葉に対して摂食量は増加することが認められた (Agathokleous et al., 2017; Abu ElEla et al., 2018a)。ハンノキ類 (ミヤマハンノキ、ハンノキ) における虫害評価においても、縮合タンニン量の増加がハンノキハムシの食害行動を抑制

することが支持された (Masui et al., unpublished)。したがって、シラカンバに対する O<sub>3</sub> 影響及び虫害傾向は、室内試験の結果では仮説通りになることが示された。しかし、上述の室内摂食試験に使用した葉を採集した同開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設の野外調査の結果では、シラカンバの食害度及びハンノキハムシの発生密度は O<sub>3</sub> 区で逆に低下した (Agathokleous et al., 2017)。

以上の結果から、ハンノキハムシは O<sub>3</sub> 曝露による葉の生理的変化を介して O<sub>3</sub> 区のシラカンバ個体をより強く選好するべきであるにも関わらず、野外に存在する他の要因により O<sub>3</sub> 区を避けている、もしくは認識出来なくなっていると考えられた。なお、このような高濃度 O<sub>3</sub> の野外環境における仮説との対立はハルニレ (*Ulmus davidiana* var. *japonica*) - ニレハムシ (*Pyrrhalta maculicollis*) 間でも認められており (Sugai et al., 2020)、シラカンバ - ハンノキハムシ間に限った特異的な現象ではないことが推察される。野外環境において植物 - 植食者の関係性を改変する外部要因として、本研究では次節 1.2 に述べる植物由来の香りシグナルに着目した。

### 1.1.2 対流圏オゾンの概況

地表付近の対流圏オゾンは、オゾン層を構成する成層圏オゾンとは異なり、光エネルギー ( $h\nu$ ) としての紫外線存在下の大気中で二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) の光化学反応 ( $\text{NO}_2 + h\nu + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_3 + \text{NO}$ ) によって生成される光化学オキシダントの主成分である。前者の成層圏オゾンが“良いオゾン”であると認識されているのに対し、対流圏オゾンは人体や植生に悪影響を与える“悪いオゾン”であるとされる。本研究では、後者の対流圏オゾン (O<sub>3</sub>) に関して言及する。

近年、世界的な産業発展により、O<sub>3</sub> をはじめとする大気環境の悪化が問題となっている。例えば、東京都では大気汚染に係る環境基準値として、光化学オキシダントは 1 時間当たりの平均値が 0.06 ppm 以下と定められている。しかし、2017 年度以前では環境基準値をクリアした観測点は認められなかった。特に、東アジアでは O<sub>3</sub> 濃度は過去数十年で増加している (Koike et al., 2013; Akimoto et al., 2015; Feng et al., 2019)。図 1 に、札幌市内の観測点における NO<sub>x</sub> 及び O<sub>3</sub> の年平均濃度を示す。光化学反応における前駆物質の NO<sub>2</sub> を含む NO<sub>x</sub> 濃度は排出削減戦略の下に北半球では減少傾向にあるものの (Qu et al. 2022b)、O<sub>3</sub> 濃度は依然として微増傾向を示している。これは、後述する非メタン系炭化水素の存在下における光化学反応の平衡状態が O<sub>3</sub> 生成側に傾くことに加え (1.2.1 参照)、NO<sub>x</sub> の排出削減に伴

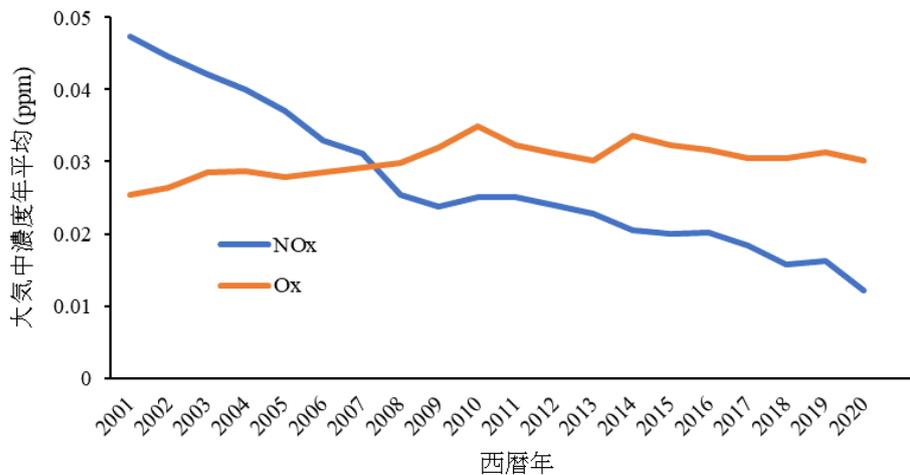


図1 札幌市における窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>) 及び光化学オキシダント (O<sub>x</sub>) 濃度の年推移  
O<sub>x</sub> の90%以上はO<sub>3</sub>である。グラフの作成は、国立環境研究所環境展望台 大気環境常時監視データファイルから得られる測定値を使用した。

いO<sub>3</sub>消費として機能するO<sub>3</sub>のNOタイトレーション反応 (NO+O<sub>3</sub> → NO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>) が低下していることが一因である(Akimoto et al., 2015; Irie et al., 2021; Zhang et al., 2022)。この傾向は、世界的にも同様である(Sicard et al., 2020; Qu et al., 2022b)。また、アジアにおけるNO<sub>2</sub>排出量は2010年代に人類史上最高値の43 Tg NO<sub>2</sub> year<sup>-1</sup>を記録し、2020年度に入った現在はやや低下傾向にあるものの、依然として欧米の4倍以上のNO<sub>2</sub>が排出されている(Qu et al., 2022a, 2022b)。したがって、日本においては越境大気汚染によるO<sub>3</sub>濃度増加の影響も無視することは出来ず、前項で述べた植物-昆虫間のコミュニケーション(被食者-捕食者関係)に対するO<sub>3</sub>の影響は、今後も増大していくことが懸念される。

## 1.2 生物起源揮発性有機化合物 (BVOCs)

### 1.2.1 香気シグナルとしての機能と生物学的意義

葉や花などの器官から植物が放出する揮発性の非メタン系炭化水素は、植物由来の生物起源揮発性有機化合物 (Biogenic Volatile Organic Compounds; BVOCs) として知られている。特に、BVOCs放出量の約半数を占めるとされるイソプレン (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) を基本骨格して、モノテルペン (MT: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>)、セスキテルペン (SQT: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>) などの多くのテルペン類が植物から大気中に放出されている。また、linalool や citronellol などのモノテルペンアルコール (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) や camphor などのモノテルペンケトン (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O) の放出も認められる。広葉樹の場合、一般的にイソプレンの放出は光強度及び葉温に依存するが、MT放出は葉温に依存する貯蔵タイプと、イソプレンと同様の光強度・葉温依存モデルに従う非貯蔵タイプ

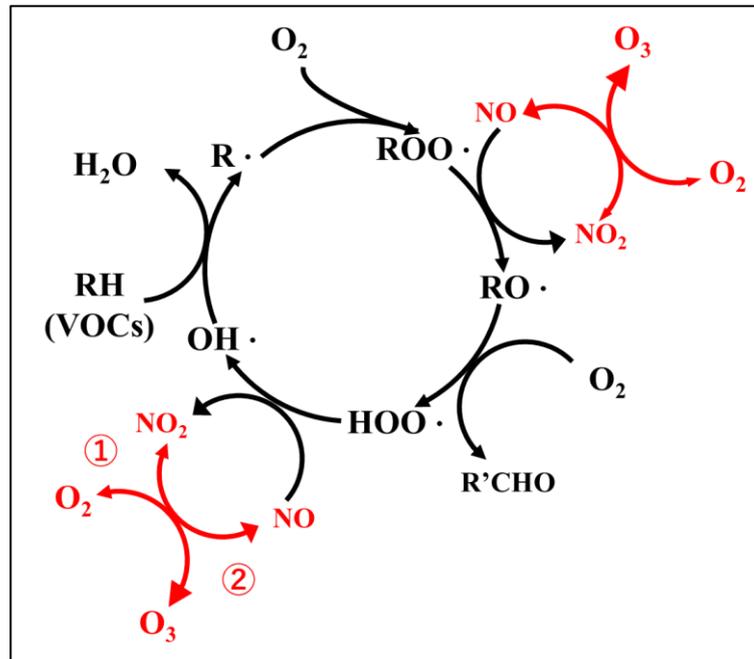


図2 大気中の VOCs 存在下における光化学反応

大気中における光化学反応は図中の赤色の反応①及び②で表される。通常、①NO<sub>2</sub>が光エネルギー ( $h\nu$ ) としての紫外線存在下で O<sub>3</sub>を生成する反応 ( $\text{NO}_2 + h\nu + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_3 + \text{NO}$ ) と②NOが O<sub>3</sub>と反応し NO<sub>2</sub>へ戻る反応 ( $\text{O}_3 + \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2$ ) は平衡関係にあり、大気中の O<sub>3</sub>濃度は増加しない。しかし、VOCsが大気中に存在する場合、②における NOは別の反応系(黒色矢印)で酸化され NO<sub>2</sub>を生成するため、光化学反応の平衡状態は O<sub>3</sub>生成側へ傾く。図は、板野ら 2006 (生活衛生; 50、115-122)を参考に作成した。

VOCs: 揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds)、RH: 非メタン系炭化水素、R·: アルキルラジカル、RO·: アルコキシルラジカル、ROO·: アルキルペルオキシラジカル、R'CHO: アルデヒド、OH·: ヒドロキシルラジカル、HOO·: ヒドロペルオキ

に大別される(Guenther et al., 1993; Tani and Kawawata, 2008; Tani and Mochizuki, 2021)。本研究の対象となるシラカンバが属するカンバ類は、温度依存性の MT 放出を示すことが報告されている(Hakola et al., 1999)。なお、針葉樹では一般的に貯蔵型の MT 放出が認められる他、広葉樹ではブナ (*Fagus crenata* Blume) の様にほとんど BVOCs の放出が見られない樹種も存在する。

本稿では詳細は論じないが、人為起源の VOCs (AVOCs; Anthropogenic Volatile Organic Compounds) 及び BVOCs は、過酸化ラジカルの生成に関与することで上述 1.1.2 の光化学反応の平衡状態を O<sub>3</sub>生成側へ促す大気化学的機能を示す(Chatani et al., 2015; 図2参照)。例えば、コナラ (*Quercus. serrata* Murray) やミズナラ (*Q. mongolica* Fisch. ex Ledeb. var. *crispula* (Blume) H.Ohashi) は日本の樹林地に多く生育が認められるが、樹木個体レベルでも非常に大きなイソプレン放出源であり(Tani and Kawawata, 2008)、これら樹種を含む樹林地は光化学反応を介した O<sub>3</sub>生成への影響が顕著である。また、全球スケールでは、BVOCs の放出量は AVOCs の約 10 倍量であると推定されており(Guenther et al., 1995; Lun et al.,

2020)、その O<sub>3</sub> 生成への影響度から森林由来の放出能の推定や O<sub>3</sub> 感受性及び O<sub>3</sub> 吸収能を考慮した樹種選定が求められている(Sicard et al., 2018; Tani and Mochizuki, 2021; Masui et al., 2023b)。

大気化学的側面の他に、BVOCs は昆虫に対しては長距離の香気シグナルとして機能する。例えば、色や形状などの有効範囲は昆虫が視覚的に認知可能な数メートル程度である(Kapustjansky et al., 2010)一方で、BVOCs の有効範囲は数百メートル以上にも及ぶ(Bruce et al., 2005; Krishnan et al., 2020)。したがって、自然界においては生物学的機能を示さないイソプレンを除き、BVOCs は昆虫を誘引する最初のシグナルとして極めて重要な要素である(Laothawornkitkul et al., 2008; Trowbridge and Stoy, 2013)。

植物が個々に特異的な BVOCs を放出して昆虫を誘引している例はほとんどなく、MT であれば  $\alpha$ -pinene や limonene など多くの植物で共通した化合物の放出が認められる。但し、同じ放出化合物セットであっても、放出組成比は植物種によって、また同じ植物種でも季節によって異なる。この組成差が昆虫に対する誘引性に寄与している(Bruce and Pickett, 2011; Proffit et al., 2020)。すなわち、BVOCs 全体の組成比は特定の昆虫に対して高い誘引性を示すが、従来と異なる組成比や個々の成分では誘引性を失うか、明らかに誘引性が低下することを意味する。実際に、ハチ目(Shiojiri et al., 2000; Klemola et al., 2012; Dötterl et al., 2016; Zhang, 2018)や甲虫目(Fernandez et al., 2007; Fuentes et al., 2013; Masui et al., 2020)、鱗翅目(De Moraes et al., 2001; Khan et al., 2010; Uefune et al., 2017)など、多くの昆虫種がそれぞれ異なる BVOCs 成分の組み合わせや組成比に誘引されることが報告されている。また、BVOCs 組成差は、植物種間や季節間だけでなく、雌雄間でも認められる。カンコノキとハナホソガ間の絶対共生関係の様に、雌花と雄花で異なる組成を示すことは花粉媒介昆虫による雌雄識別を誘導する役割を担っており、カンコノキにおいては種子(子孫)形成、ハナホソガにおいては種子を捕食する次世代幼虫の生存率向上に寄与している(Okamoto et al., 2013)。以上の様に、植物は多種多様な BVOCs 放出の戦略を展開することで生態系の原動力となっている。

### 1.2.2 高濃度 O<sub>3</sub> 環境下における BVOCs の動態

大気汚染物質である O<sub>3</sub> の BVOCs への影響として、1) BVOCs の放出に対する影響、2) 放出後の大気中における影響、の 2 通りが挙げられる(図 3)。1) に関して、植物の生理機能の 1 つである BVOCs の放出は、植物種に依存して O<sub>3</sub> 曝露の影響を受けることが知ら

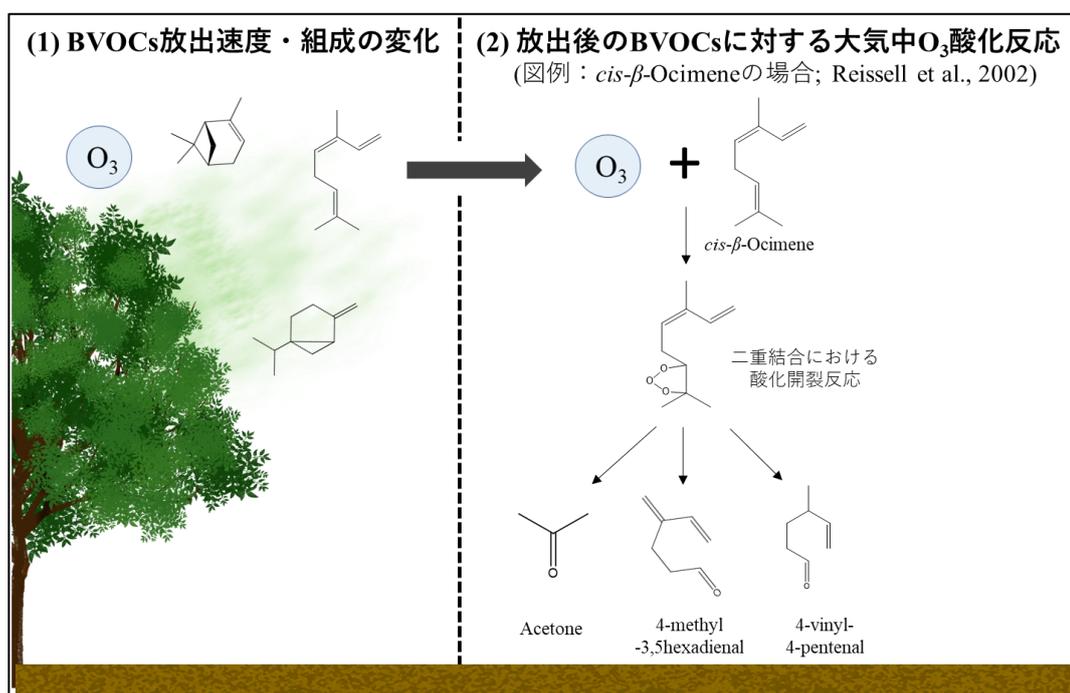


図3 BVOCsに対するO<sub>3</sub>曝露影響

BVOCsに対するO<sub>3</sub>曝露影響は、2段階存在する。まず、(1)植物のBVOCs放出自体がO<sub>3</sub>曝露によって変化するケースがあり、植物種によって応答が異なる。次に、(2)大気中へ放出されたBVOCsは、各放出成分のO<sub>3</sub>に対する反応速度係数に依存して大気中のO<sub>3</sub>と反応する。(1)においてBVOCs放出に対するO<sub>3</sub>曝露影響が起こらない場合においても、(2)における放出後BVOCsの大気中O<sub>3</sub>酸化反応は必ず起こる現象である。

れている(Kivimäenpää et al., 2016)。また、同一の植物に対するO<sub>3</sub>曝露であっても、特定の成分の放出がO<sub>3</sub>曝露により増加する一方で、他の成分は減少もしくは変化しない場合も認められる(Llusià et al., 2002)。

2)の放出後のO<sub>3</sub>曝露による影響は、1)における放出変化の有無に関わらず、大気中に放出された全てのBVOCsに対して起こる現象である。BVOCsの主体であるテルペン類は前述の通りイソプレンを基本骨格として構成されており、構造中の二重結合が大気中O<sub>3</sub>による酸化開裂反応の起点となる。このため、大気中に放出されたBVOCsは、昆虫に感知されるまでの滞留時間の中でO<sub>3</sub>との反応により大気中濃度が減衰する(Atkinson and Arey, 2003; Fuentes et al., 2016)。特に、高濃度O<sub>3</sub>環境においては、テルペン類の中でも反応性の高い成分の減衰率は大きくなり、香気シグナルとしてのBVOCsの組成が放出直後や低濃度のO<sub>3</sub>環境下と比較して大きく乖離する。前項で述べた様に、香気シグナルとしての組成差は昆虫の誘引過程において非常に重要である。したがって、1)及び2)のいずれによっても、改変されたBVOCsは応答する昆虫の行動にも影響すると考えられる。

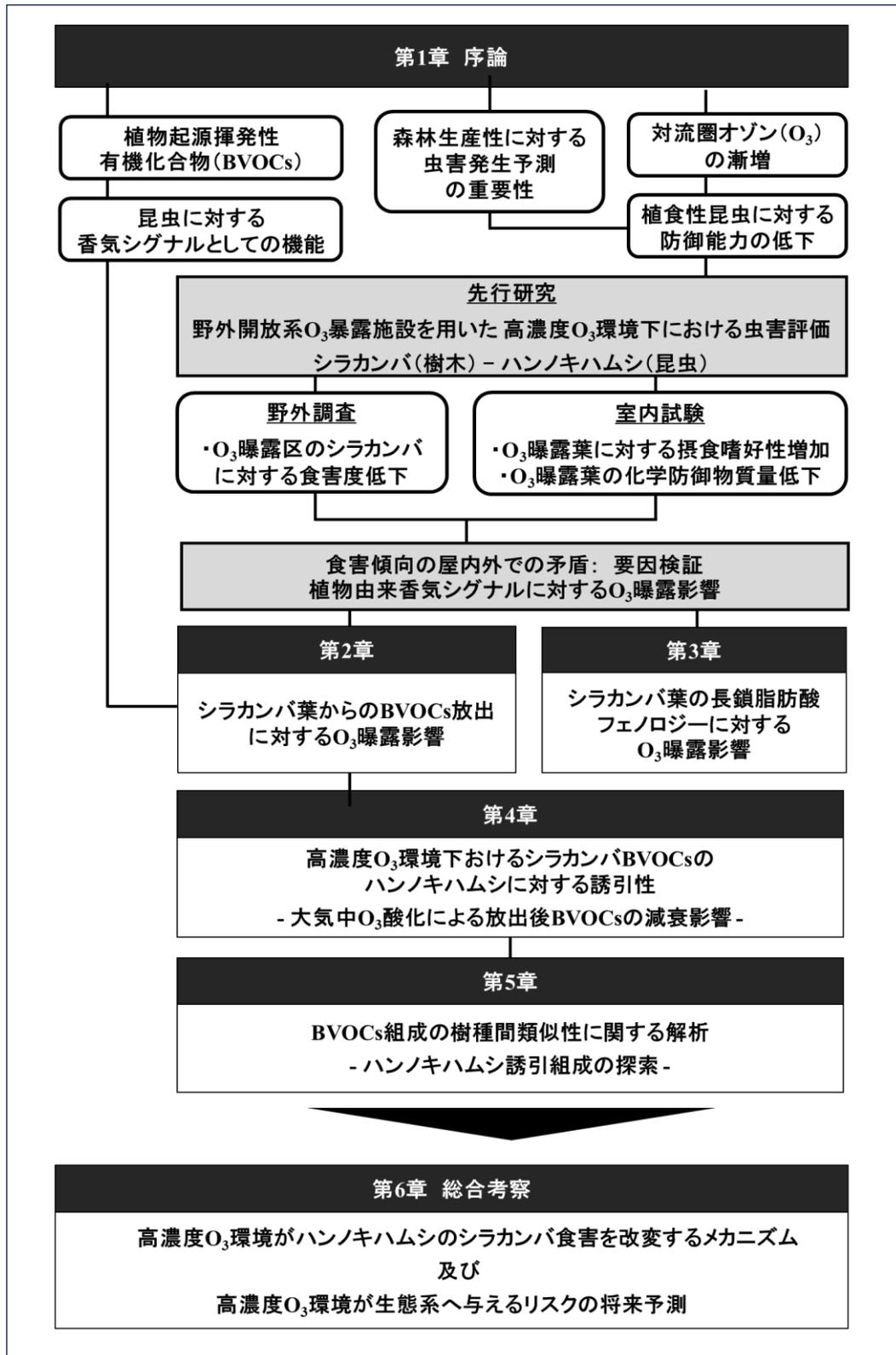


図 4 本論文の構成

### 1.3 本論文の構成

本論文の構成を図 4 に示す。植食性昆虫による食害は、温帯林における純一次生産量の最大 15% の損失に寄与する (Lindroth, 2010)。したがって、変動環境下における昆虫による虫害予測は、将来の森林生産性及び生態系のリスク予測を行う上で重要な要素である。しかし、1.1.1 で述べた様に、高濃度 O<sub>3</sub> 環境下における昆虫の誘引は、葉の防御形質などの葉内パラメーターに基づく従来の説明要因のみでは説明できないと考えられた。これまで、植物が放出する BVOCs に対して昆虫が応答する知見は認められているものの、O<sub>3</sub> 曝露による BVOCs の機能的変化は虫害評価のスキームに組み込まれていない (Masui et al., 2021)。

本論文では、「O<sub>3</sub> 曝露による葉のパラメーターの優劣に関わらず、O<sub>3</sub> 曝露により昆虫が BVOCs (葉) を見つけられない」ことが、野外環境における虫害程度の低下に起因していると仮説を立てた。

本論文 (第 2 章～第 5 章) では、香気シグナルとして特に放出後の BVOCs の誘引性変化に着目し研究を行った。第 2 章では、“放出後” の前段階の評価として、シラカンバの BVOCs 放出自体に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響を調査した。シラカンバの近縁種である MT 放出樹種のおウシュウシラカンバ (*Betula pendula* Roth ; ポット植え苗木) は O<sub>3</sub> 曝露による BVOCs 放出影響のないことが認められているものの (Vuorinen et al., 2005; Hartikainen et al., 2012)、シラカンバの BVOCs 放出においては当該研究の事例はない。また、葉に含まれる長鎖脂肪酸も、近接距離では昆虫に対して誘引性の香気シグナルとして機能することが報告されている (Schoonhoven et al., 2005; Mukherjee et al., 2014; Mitra et al., 2017)。したがって、長鎖脂肪酸は本稿における BVOCs の定義とは異なるものの、第 3 章では昆虫の誘引システムにおける 1 要因の検証として、シラカンバにおける葉内の長鎖脂肪酸 (LCFAs ; Long-Chain Fatty Acids) の含有量及び季節的变化に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響を調査した。

第 2 章及び第 3 章に関連して、個体サイズの問題から O<sub>3</sub> 曝露による樹木の各種生理活動への影響に関する研究は、カバノキ科樹木を含め多くの樹木でポット植え材料を対象にした半閉鎖系試験 (e.g., Open Top Chamber; OTC ; 図 5-A) が主流である。しかし、ポット植えの苗木では根系制限を排除できないため、野外の樹木個体への O<sub>3</sub> 曝露影響を正確に評価出来ないという問題点が挙げられる。そこで、開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設に生育するシラカンバ個体を用いることで、この問題を克服しようとした。開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設は、野外の樹木個体の周囲に単管及び O<sub>3</sub> 供給パイプを張り巡らせ (図 5-B)、施設内部の O<sub>3</sub> 濃度を常に O<sub>3</sub> 供給側へフィードバック (自動制御) することで O<sub>3</sub> 供給量を調節し任意の濃度の O<sub>3</sub> 曝露

環境を構築する (Watanabe et al. 2013)。この様に、野外生育個体が対象となることから、開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設では上述の OTC における根系制限の問題は解決された。また、害虫の発生など外部要因を排除しないことから、開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設は O<sub>3</sub> 曝露後の二次的影響を評価する上でも有用である。

第 4 章では、本研究の対象昆虫であるハンノキハムシに対する BVOCs の誘引性を人工的に再現した O<sub>3</sub> 濃度別に検証した。また、BVOCs の放出成分のうち、O<sub>3</sub> との反応速度式から O<sub>3</sub> と反応性の高い成分をハンノキハムシの行動選択における重要成分として位置付けた。加えて、第 5 章ではシラカンバを含むハンノキハムシの食害対象樹種の BVOCs 組成を比較することで、重要成分のさらなる絞り込みを行った。本研究は、高濃度 O<sub>3</sub> 曝露による森林樹木のシラカンバに対する虫害影響を香気シグナルの観点から明らかにするだけでなく、複数樹木の放出組成比較からシラカンバの特異性を解明した点で新規性を有する。

第 6 章では、本論文の一連の研究から導き出される結論及び大気汚染が及ぼす生態系へのリスクをまとめ、今後の展望として大気汚染環境下の植物-昆虫間コミュニケーションのさらなる解明のため着目すべき点に関して概説した。



図 5 オゾン (O<sub>3</sub>) 曝露施設の比較

## 第2章 BVOCs 放出に対する O<sub>3</sub> の影響

### 2.1 目的

植物が放出するテルペン類を主体とした BVOCs は、O<sub>3</sub> による減衰影響を受けることが認められている。昆虫に対して誘引性を示す BVOCs は、O<sub>3</sub> 曝露により放出組成が異なる場合、結果として誘引性が変化（忌避性、誘引性の消失など）する可能性が挙げられる。したがって、本研究の背景である野外の高濃度 O<sub>3</sub> 環境下における虫害発生傾向の変化は、BVOCs の放出変化を介している可能性は否定できない。

シラカンバの近縁種である MT 放出樹種のオウシュウシラカンバでは、80 ppb 以下の O<sub>3</sub> 曝露による MT 放出への影響はない(Vuorinen et al., 2005; Hartikainen et al., 2012)ことが認められているものの、同属内でも樹種や曝露環境・曝露期間によって BVOCs 放出特性は大きく異なる場合がある。しかし、本研究の対象である日本のシラカンバでは BVOCs の放出速度や放出組成に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響は未解明である。そこで、開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設に生育するシラカンバから BVOCs をサンプリングし、O<sub>3</sub> 曝露の有無による BVOCs の基礎放出速度への影響を調査した。

### 2.2 材料と方法

#### 2.2.1 開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設

北海道大学札幌研究林実験苗畑（北緯 43 度 0 分、東経 141 度 2 分、標高 15 m）に設置された開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設（図 5-B）において、毎年 5 月から 10 月の日中（07:00～17:00）に高濃度の O<sub>3</sub> 曝露が行われた。2016 年における O<sub>3</sub> 曝露期間中の日中平均気温は 16.2 ± 2.0°C、月平均降水量は 113.4 ± 27.5 mm、月平均相対湿度は 66.7 ± 2.9%であった。また、日中平均 O<sub>3</sub> 濃度は、対照区が約 35.2 ± 8.3 ppb（非制御）、O<sub>3</sub> 曝露区（設定値 80 ppb）は 68.5 ± 9.3 ppb であった。いずれの処理区においても、2014 年に植栽されたシラカンバ（*Betula platyphylla* Sukaczew var. *japonica* (Miq.) H.Hara）の若木を測定対象とした。

#### 2.2.2 植物材料：シラカンバ

シラカンバは、温帯林の高冷地や北海道に広く生育する遷移初期種であり（Koike 1995）、札幌など都市部では街路樹として植栽されている(Sakikawa et al., 2016)。シラカンバの展葉様式は異型葉性であり、春葉は 5 月上旬から展開し、夏葉は 6 月下旬～7 月初旬頃から展開を始める（図 6）。8 月以降のシラカンバは、通常夏葉が優占する。本章では、札幌市に

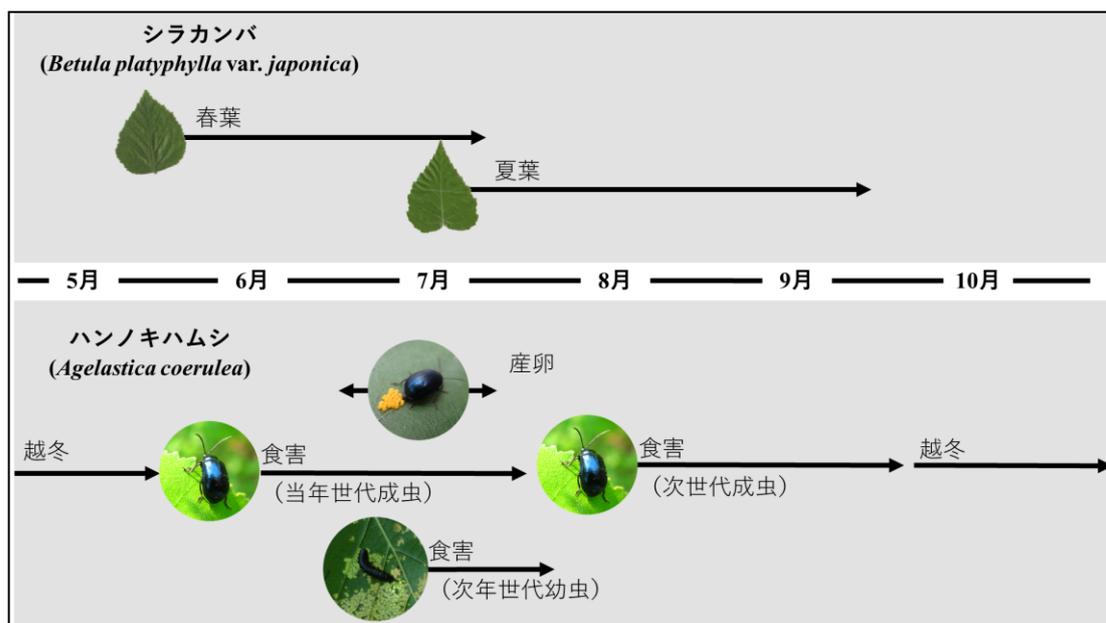


図 6 ハンノキハムシ及びシラカンバの生活史  
Masui et al. 2023 (Env. Sci. Poll. Res)の図を一部引用、改変した。

において気温が年内で最も高く、春葉と夏葉の混在する 7 月下旬の枝を対象に測定を行った。

開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設に生育するシラカンバ若木 (5 年生) を処理区あたり 6 個体ずつ選定した。なお、当該樹木個体は開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設下において 3 年間生育した状態であった。各樹木個体の、十分に陽が当たる高さ 2 m 程度に位置する枝を BVOCs サンプリングの対象枝とした。対象枝は、事前に通気性の良い防虫ネット (2 mm メッシュ; 遮光率約 8%) で保護し、ハンノキハムシを含む植食性昆虫による誘導防御などの食害影響を排除した。

### 2.2.3 BVOCs サンプリング及び定性・定量分析

枝チャンバー法 (図 7) では、PFTE サンプリングバッグ (6 L) 内に枝を封入し、サンプリングバッグ内部に O<sub>3</sub> 及び周囲大気 of VOCs を除去した清浄化空気を 3 L min<sup>-1</sup> の一定流量で送風した。なお、清浄化空気は周囲大気を活性炭の充填したフィルターに通気した後、400°C に加熱保持 (YAGAMI, YD-15N) した白金触媒に通気させることで生成した。BVOCs 放出を安定させるため、測定枝を袋内の通風状態に 3 時間以上放置した。袋内部の葉温はデータロガー (TR-52i, T&D) で記録した。サンプリングバッグ内部に放出された BVOCs は、吸気ポンプ (MP-Σ30 NII、柴田化学) を用いて吸着剤 (Tenax TA, GL Science, Tokyo, Japan; Carbotrap, Supelco, Bellefonte, PA, USA) の充填した採取管へ捕集した (0.2 L min<sup>-1</sup> × 30 分間 = 計 6 L)。BVOCs のサンプリングは晴れた日の朝から夕方まで行い、それぞれ異

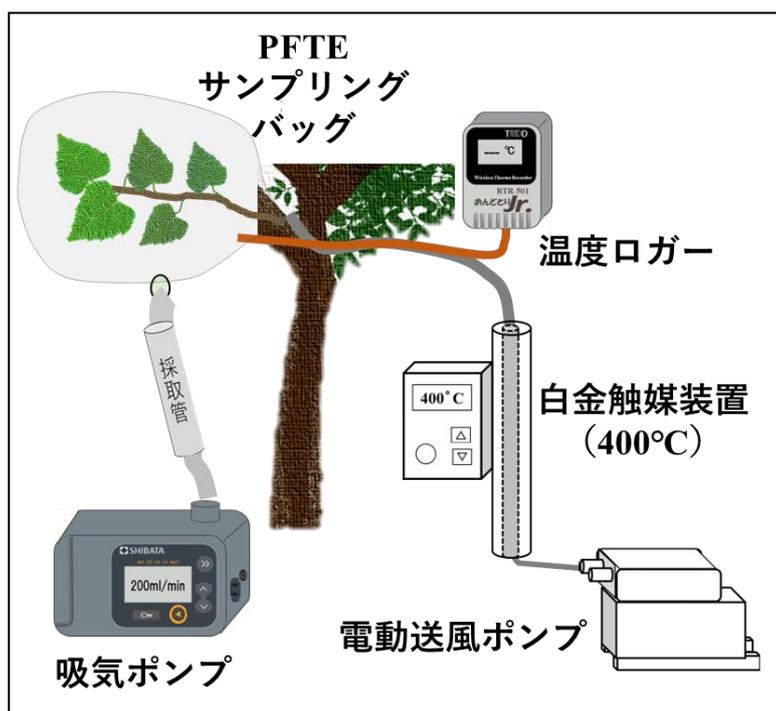


図7 枝チャンバー法の概略図

なる温度下で放出される BVOCs を各個体 6 サンプルずつ採集した。

採集した BVOCs は、自動加熱脱着装置付き (Turbo Matrix ATD650, Perkin Elmer Instruments, Fremont, CA, USA) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010、島津製作所) を用いて、定性および定量分析を行った。なお、定量分析のため内部標準としてトルエン-D8 を用いた。採取管を 280°C で 10 分間加熱した後、脱着した BVOCs 成分を -20°C に冷却したコールドトラップ部に再濃縮した。その後、コールドトラップ部を 280°C に 10 秒間急速加熱し、脱離した BVOCs 成分を GC-MS のキャピラリーカラム (SLB-5 ms、内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 0.5  $\mu\text{m}$ 、Supelco) に導入した。カラムを 35°C で 5 分間保持した後、5°C  $\text{min}^{-1}$  で 250°C まで昇温した。電子衝撃イオン化 (Electron Ionization ; EI 法) 後、スキャン分析法 ( $m/z$  : 40~400) により各 BVOCs 成分を同定した。キャリアガスにはヘリウムガス (>99.99995%) を 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$  で使用し、スプリット比は 1 : 22 とした。EI 法から得られた各化合物のマススペクトルを、各化合物の保持時間及び NIST のデータベースにおける類似度に基づき放出化合物を同定した。濃度の異なる各標準試料の分析値から、各 BVOCs 成分の注入量 (nmol) と内部標準物質であるトルエン-D8 に対する各成分ピーク面積比の関係を示す検量線を作成し、この検量線からサンプル中の各成分を定量した。

枝チャンバー法における葉面積当たりの BVOCs 放出速度 ( $E$ ;  $\text{nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) は、式[1]によって表される。

$$E = \left[ C_{out} \left( \frac{1 - W_{in}}{1 - W_{out}} \right) - C_{in} \right] * F / S_L \quad [1]$$

ここで、 $C_{in}$  及び  $C_{out}$  は、それぞれ流入空気及びチャンバー内の各成分濃度 ( $\text{nmol mol}^{-1}$ )、 $W_{in}$  及び  $W_{out}$  はそれぞれ流入空気及び流出空気の水蒸気濃度 ( $\text{nmol mol}^{-1}$ )、 $F$  はチャンバー内部への空気の流入速度 ( $\text{mol s}^{-1}$ ) であり、本研究では  $2.2 * 10^{-3} \text{ mol s}^{-1}$  ( $3 \text{ L min}^{-1}$ ) を設定した。 $S_L$  はチャンバー内の葉面積合計 ( $\text{m}^2$ ) を示す。葉面積は、全葉のサンプルをスキャンした後、画像処理ソフト (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて算出した。なお、流入空気に対する流出空気の水蒸気濃度の増加率は通常最大 2% の範囲であるため (Tani et al., 2010)、式[2]の通りに近似した。

$$\frac{1 - W_{in}}{1 - W_{out}} \approx 1 \quad [2]$$

したがって、放出速度  $E$  は式[3]により算出した。

$$E = [C_{out} - C_{in}] * F / S_L \quad [3]$$

$C_{out}$  は式[4]に従い計算した。

$$C_{out} = k * S_{M/T} / N_{air} \quad [4]$$

ここで、 $k$  ( $\text{nmol}$ ) は、各成分の標準試料を GC へ注入した際に得られる、各成分のピーク面積に対する内部標準トルエン D8 のピーク面積の比を  $x$  軸、実際の成分原体の注入量 ( $\text{nmol}$ ) を  $y$  とした、検量線  $y = kx$  の傾きである。 $S_{M/T}$  は BVOCs 採集サンプルにおける各成分のピーク面積に対する内部標準トルエン D8 のピーク面積の比である。 $C_{in}$  の場合、 $S_{M/T}$  はチャンバーに植物体を封入しない状態で採取した清浄化空気の分析値とした。また、 $N_{air}$  は採取管に通気した空気の物質質量 ( $\text{mol}$ ) であり、式[5]に従い、採取管に通気した体積 ( $V_{air}$ ; L) を測定環境中の気温 (Temp;  $^{\circ}\text{C}$ ) で補正した値で除すことにより算出した。

$$N_{air} = \frac{V_{air}}{22.4 * \left( \frac{273.15 + \text{Temp}}{273.15} \right)} \quad [5]$$

## 2.2.4 基礎放出速度推定及び統計解析

予備試験により、シラカンバはオウシュウシラカンバと同様に温度依存性の BVOCs 放出を示すことを確認した。よって、BVOCs の基礎放出速度を温度依存性の G93 モデル (Guenther et al., 1993) により推定した。G93 モデルでは、BVOCs 放出と温度の相関は下式 [6] により表される。

$$\ln E = \beta(T - T_s) + \ln E_s \quad [6]$$

ここで、 $E$  は BVOCs 放出速度の実測値 ( $\text{nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )、 $E_s$  は標準化温度  $T_s$  ( $30\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $303.15\text{ K}$ ) における BVOCs 放出速度 ( $\text{nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )、 $T$  は実測温度 ( $\text{K}$ ) である。 $\ln E$  を  $y$ 、 $(T - T_s)$  を  $x$ 、 $\ln E_s$  を切片  $b$  とすると、式[6]は  $y = \beta x + b$  の一次関数で表される。傾き  $\beta$  は経験的係数であり、MT (及びモノテルペンアルコール) は 0.09、SQT は 0.22 を適用した(Guenther et al., 1993)。

各放出化合物の基礎放出速度  $E_s$  に関して等分散性の検定 ( $\alpha = 0.05$ ) を行った後、処理区間 (対照区、 $\text{O}_3$  区) の差を t-検定 (Student または Welch の t-検定;  $\alpha = 0.05$ ) により解析した。統計解析は、Excel 2019 により実施した。

### 2.3 結果と考察

シラカンバから放出される BVOCs の基礎放出速度を表 1 に示す。対照区、 $\text{O}_3$  区のいずれにおいても放出成分数は変化せず、MT11 種 ( $\alpha$ -thujene、 $\alpha$ -pinene、camphene、sabinene、 $\beta$ -myrcene、 $\beta$ -pinene、*cis/trans*- $\beta$ -ocimene、limonene、 $\gamma$ -terpinene、neo-allo-ocimene)、MT アルコール 1 種 (linalool)、SQT9 種 ( $\alpha$ -copaene、 $\beta$ -elemene、 $\beta$ -bourbonene、 $\beta$ -ylangene、 $\beta$ -caryophyllene、 $\beta$ -cubebene、humulene、 $\alpha$ -farnesene、 $\beta$ -copaene) の放出が認められた。なお、イソプレンの放出は認められなかった。また、いずれの放出成分の基礎放出速度も処理区間で有意な差は認められなかった。したがって、 $\text{O}_3$  曝露による BVOCs 放出自体への変化はなく、BVOCs 放出時の段階ではハンノキハムシの誘引に影響を与えることはないと考えられた。シラカンバの BVOCs 放出組成の詳細に関しては、第 4 章以降で述べる。

表 1 シラカンバの BVOCs 基礎放出速度に対する O<sub>3</sub> 影響

化合物	対照区 (nmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	O <sub>3</sub> 区 (nmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	t 検定		
			種類	p 値	
MT	<i>α</i> -thujene	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.01	S	n.s
	<i>α</i> -pinene	0.28 ± 0.05	0.43 ± 0.10	S	n.s
	camphene	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	S	n.s
	sabinene	1.50 ± 0.35	2.58 ± 0.56	S	n.s
	<i>β</i> -myrcene	0.11 ± 0.02	0.17 ± 0.03	S	n.s
	<i>β</i> -pinene	0.09 ± 0.01	0.15 ± 0.04	S	n.s
	<i>cis/trans-β</i> -ocimene	0.55 ± 0.25	1.12 ± 0.29	S	n.s
	limonene	0.24 ± 0.15	0.30 ± 0.02	W	n.s
	<i>γ</i> -terpinene	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.02	S	n.s
	neo-allo-ocimene	0.03 ± 0.01	0.25 ± 0.08	W	n.s
OMT	linalool	0.43 ± 0.12	0.58 ± 0.17	S	n.s
SQT	<i>α</i> -copaene	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.02	S	n.s
	<i>β</i> -elemene	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	W	n.s
	<i>β</i> -bourbonene	0.13 ± 0.09	0.09 ± 0.02	W	n.s
	<i>β</i> -ylangene	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.01	S	n.s
	<i>β</i> -caryophyllene	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	S	n.s
	<i>β</i> -cubebene	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	S	n.s
	humulene	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.01	S	n.s
	<i>α</i> -farnesene	0.04 ± 0.02	0.22 ± 0.18	W	n.s
	<i>β</i> -copaene	0.05 ± 0.03	0.01 ± 0.00	W	n.s

BVOCs の基礎放出速度平均値 (nmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) ±SE (n = 6)を示す。O<sub>3</sub> 濃度：約 30 ppb (対照区)、60–70 ppb (O<sub>3</sub> 付加区；設定値 80 ppb)。データ群の等分散性を検証した後、S「student の t 検定」又は W「Welch の t-検定」を行った；“n.s” p > 0.05。

MT：モノテルペン、OMT：モノテルペンアルコール及びその類縁体、SQT：セスキテルペン、BVOC: Biogenic Volatile Organic Compounds；生物起源揮発性有機化合物

## 第3章 葉内長鎖脂肪酸 (LCFAs) に対する O<sub>3</sub> の影響

### 3.1 目的

植食性昆虫の食害行動は、従来 C/N 比などの葉の栄養価や物理的防御（トリコーム、葉の厚さなど）及び化学防御物質（縮合タンニン、フェノール類など）を説明要因として説明されてきた。葉に含まれる長鎖脂肪酸 (LCFAs ; Long-Chain Fatty Acids) も、植食性昆虫の成長や繁殖効率に影響を与える要因であることが古くから知られている (Friend, 1958; Eigenbrode and Espelie, 1995; Canavoso et al., 2001)。例えば、不飽和 LCFAs であるオレイン酸 (C 18:1)、リノール酸 (C 18:2)、リノレン酸 (C 18:3) は、植食性昆虫の成長を促進する (Erb et al., 2013; Ishangulyyeva et al., 2016)。飽和 LCFAs も植食性昆虫に対して同様の効果を有している。しかし、近年、LCFAs は栄養学的な面だけではなく、植食性昆虫に対して香気シグナルとしても機能することが分かってきた (Schoonhoven et al., 2005; Mukherjee and Barik, 2014)。

LCFAs (e.g., オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸) は、ハンノキハムシの属する甲虫類に対して誘引や産卵誘導の効果を示すことが報告されている (Roy et al., 2012; Sarkar et al., 2013; Sarkar and Barik, 2015; Das et al., 2019)。但し、LCFAs が香気シグナルとして BVOCs と異なる点は、その有効距離である。BVOCs が数百メートル先の遠方からでも昆虫に対して機能するのに対し (Trowbridge and Stoy, 2013)、LCFAs の有効距離は 0~数十センチの至近距離であり視覚シグナルと同等である (Manosalva et al., 2011; Mitra et al., 2017, 2020)。ハンノキハムシに対する誘引性物質として機能する可能性がある要因の 1 つとして、野外における LCFAs の季節的変化の解明が重要である。さらに、葉の LCFAs は過酸化物のマロンジアルデヒドとして検出されるように、大気中の O<sub>3</sub> による酸化反応を受けることが知られている (Yan et al., 2010)。しかし、野外の長期 O<sub>3</sub> 曝露条件における LCFAs の実際の存在量に対する影響は不明である。

本章では、シラカンバの葉に含まれる主要な 5 つの LCFAs ; オレイン酸 (C16:0)、パルミチン酸 (C18:0)、ステアリン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2)、リノレン酸 (C18:3) の季節的変化に関して、開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設を用いた野外長期 O<sub>3</sub> 曝露影響を調査した。特に、葉のタイプ (春葉、夏葉) 及び葉の展葉後の時期 (初期葉、後期葉) に着目した。展葉直後の初期葉では、葉は大気環境に曝される期間が極めて短く、当年度の O<sub>3</sub> 曝露の影響をほとんど受けないことが想定される。一方、展葉後期では 2 ヶ月程度は O<sub>3</sub> に曝されるため、初期葉と後期葉の LCFAs 量を比較することで、当年の O<sub>3</sub> 曝露の直接的影響が検出される

と考えた。さらに、不飽和脂肪酸は炭素-炭素二重結合により  $O_3$  と反応しやすいことから (Moise and Rudich, 2002; Lee and Chan, 2007; Chu et al., 2019)、リノール酸やリノレン酸などの不飽和度の高い LCFAs は飽和 LCFAs であるオレイン酸やステアリン酸よりも  $O_3$  曝露により大きく減衰すると予想した。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 植物材料

札幌研究林実験苗畑の開放系  $O_3$  曝露施設 (2.2.1 参照) に生育するシラカンバ個体から、春葉 (2017 年 5 月及び 7 月)、夏葉 (2017 年 7 月及び 9 月) をサンプリングした。各時期のサンプリングは全て晴れた日の午前 8 時～午前 10 時に行い、樹木 1 個体あたり 6 枚の葉を 1 サンプルとして、処理区あたり合計 9 反復のサンプリングとした (3 個体×3 プロット)。なお、葉内の脂肪酸は誘導防御の代謝の過程で消費される可能性 (Fukumoto et al., 2013) があることから、サンプルは食害を受けていない葉を対象とした。サンプルは、採集後すぐに  $-64^{\circ}C$  の冷凍庫で保管した。

### 3.2.2 脂肪酸抽出及び定量分析

液体窒素を用い、各試料 (サンプル葉) を乳鉢と乳棒で粉状に破碎した。次に、粉末化した試料を測定し、ステンレス製ビーカーに入れた後に酢酸エチルを加えた ( $3 \text{ ml g}^{-1}$ )。ステンレス製ビーカーにアルミホイルで蓋をし、室温  $25^{\circ}C$  の恒温環境下で試料中の脂肪酸を 24 時間抽出した。GC-MS 分析における内部標準物質として、ヘプタデカン酸 ( $C17:0$ ; マーガリン酸;  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ )  $100 \mu\text{l}$  溶液を抽出液中に添加した。次に、粗抽出物を脱脂綿で濾過し、塩酸 ( $0.3 \text{ mol l}^{-1}$ )  $20 \text{ ml}$  を添加した。抽出液の混合液をよく攪拌した後、攪拌液の上層をパスツールピペット (上から脱脂綿、活性炭粉末、脱脂綿、硫酸ナトリウム、脱脂綿を充填) で濾過し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。その後、氷冷下で濃縮液にメタノール ( $0.5 \text{ ml}$ ) および TMS-ジアゾメタン溶液 ( $0.6 \text{ ml}$ ) を添加し、30 分間放置した。メチルエステル化した濃縮液は約 30 秒間窒素気流に曝し、ロータリーエバポレーターで再度濃縮した。最後に、濃縮液をヘキサンで希釈調製した。

サンプル抽出物のヘキサン溶液を、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010、島津製作所) へ供試した。注入温度は  $250^{\circ}C$  とし、熔融シリカキャピラリーカラム (BPX-5;  $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ 、 $1.00 \mu\text{m}$  厚; トレイジャンサイエンティフィックジャパン) を使用した。昇

温プログラムは、200°Cで開始した後 5 分間保持し、8°C min<sup>-1</sup> で 300°Cまで昇温し 5 分間保持した。キャリアガスはヘリウムを用い、1.04 mL min<sup>-1</sup> で全スペクトルを  $m/z$  : 10~400 の範囲内でスキャンした。各 LCFA s のメチルエステル体である標準物質（パルミチン酸メチル、ステアリン酸メチル、オレイン酸メチル、リノール酸メチル、リノレン酸メチル）とサンプル抽出物の保持時間を比較し、各成分のピークを特定した。各 LCFA s の定量は、内部標準物質のメチルエステル体（ヘプタデカン酸メチル）に対する各検量線を作成し算出した。

### 3.2.3 統計解析

一般化線形混合モデル（GLMM ; Generalized Linear Mixed Model）を用いて、各時期の LCFA s 量に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響を解析した。なお、GLMM では  $\gamma$  分布に基づき、開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設におけるシステム反復（各処理 3 プロット）をランダム効果とした。その他の統計処理に関してランダム効果は適用されず、各処理区でプールしたデータ群を使用した（各処理計 9 サンプル）。葉の展葉初期における異型葉間（春葉、夏葉）の LCFA s 量の比較は、等分散性の検定（ $\alpha = 0.05$ ）を行った後、t-検定（Student または Welch の t-検定 ;  $\alpha = 0.05$ ）により解析した。葉の展葉初期から後期への LCFA s の減衰率に対する O<sub>3</sub> 効果を評価するため、初期段階の LCFA s 量を 100 と仮定して、展葉後期における残存量から減衰率を算出した。例えば、LCFA s 量が展葉初期で 1.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ 、後期で 0.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  の場合、減衰率は 66.7%（ $= 1.0/1.5 \times 100$ ）と算出した。

LCFA の経時的減衰率の比較には、上述と同様に t-検定を適用した。但し、データに正規性が認められない場合、t-検定の代わりに Wilcoxon の順位和検定を適用した。各異型葉型における因子間（展葉初期または展葉後期、O<sub>3</sub> 処理の有無）および展葉初期の異型葉間の LCFA s の組成を比較するため、Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA ; 999 回置換) を実施した。本章における全ての統計解析は、統計ソフト R v.3.6.3 を用いて実施した。

## 3.3 結果

### 3.3.1 LCFA s の季節的変動及び減衰傾向に対する O<sub>3</sub> 曝露影響

各時期における LCFA s の量（ $\mu\text{g g}^{-1}$  ; 葉新鮮重量ベース）を表 2 に示す。対照区では、シラカンバ春葉の展葉初期における LCFA s 含油量はパルミチン酸（C16:0 ; 0.63  $\mu\text{g g}^{-1}$ ）、

表2 シラカンバの葉中長鎖脂肪酸量

(A) 対照区	春葉		夏葉	
	5月	7月	7月	9月
総含有量	2.04 ± 0.29	0.99 ± 0.09	6.59 ± 0.82	1.98 ± 0.29
パルミチン酸 (C16:0)	0.63 ± 0.05 (33.14 ± 2.11)	0.51 ± 0.05 (50.89 ± 1.89)	1.75 ± 0.17 (27.55 ± 1.46)	1.01 ± 0.16 (50.57 ± 1.89)
ステアリン酸 (C18:0)	0.49 ± 0.06 (24.59 ± 2.25)	0.25 ± 0.03 (25.04 ± 1.17)	2.79 ± 0.38 (42.58 ± 2.27)	0.72 ± 0.11 (37.06 ± 1.75)
オレイン酸 (C18:1)	0.19 ± 0.02 (9.23 ± 0.62)	0.12 ± 0.03 (11.94 ± 2.65)	0.38 ± 0.08 (5.49 ± 0.72)	0.08 ± 0.01 (4.24 ± 0.40)
リノール酸 (C18:2)	0.27 ± 0.07 (12.03 ± 1.55)	0.06 ± 0.01 (6.44 ± 0.58)	0.70 ± 0.13 (10.14 ± 1.13)	0.10 ± 0.01 (5.29 ± 0.81)
リノレン酸 (C18:3)	0.47 ± 0.12 (21.02 ± 2.62)	0.06 ± 0.01 (5.69 ± 0.52)	0.97 ± 0.17 (14.25 ± 1.50)	0.06 ± 0.02 (2.85 ± 0.53)

(B) O <sub>3</sub> 区	春葉		夏葉	
	5月	7月	7月	9月
総含有量	2.44 ± 0.16	0.66 ± 0.06	4.77 ± 0.44	1.56 ± 0.10
パルミチン酸 (C16:0)	0.77 ± 0.05 (31.82 ± 1.30)	0.34 ± 0.04 (51.60 ± 1.36)	1.63 ± 0.13 (35.03 ± 1.68)	0.80 ± 0.05 (51.24 ± 2.04)
ステアリン酸 (C18:0)	0.74 ± 0.06 (30.19 ± 1.55)	0.18 ± 0.02 (26.82 ± 1.63)	1.60 ± 0.24 (32.52 ± 2.65)	0.59 ± 0.06 (37.67 ± 2.74)
オレイン酸 (C18:1)	0.20 ± 0.03 (8.20 ± 1.09)	0.06 ± 0.01 (9.21 ± 1.07)	0.38 ± 0.06 (7.63 ± 0.70)	0.07 ± 0.01 (4.71 ± 0.51)
リノール酸 (C18:2)	0.24 ± 0.02 (10.07 ± 1.07)	0.04 ± 0.01 (6.26 ± 1.15)	0.5 ± 0.08 (11.63 ± 1.84)	0.07 ± 0.01 (4.53 ± 0.58)
リノレン酸 (C18:3)	0.49 ± 0.05 (19.73 ± 1.28)	0.04 ± 0.01 (6.11 ± 0.90)	0.63 ± 0.09 (13.18 ± 1.27)	0.03 ± 0.01 (1.86 ± 0.27)

各長鎖脂肪酸量の値は、(A) 対照区および (B) 高濃度 O<sub>3</sub> 区における葉新鮮重量当たりの平均含有量 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  $\pm$ SE (n = 9) を表す。括弧内の値は、長鎖脂肪酸の総量を 100% と仮定した場合の各割合 (%)  $\pm$ SE である。

ステアリン酸 (C18:0;  $0.49 \mu\text{g g}^{-1}$ ) 等の飽和脂肪酸量が最も多く、次いでリノレン酸 (C18:3;  $0.47 \mu\text{g g}^{-1}$ )、リノール酸 (C18:2;  $0.27 \mu\text{g g}^{-1}$ )、オレイン酸 (C18:1;  $0.19 \mu\text{g g}^{-1}$ ) の順であった。7月の夏葉の展葉初期でも、飽和脂肪酸が最も優占した。しかし、これらの展葉初期における LCFA 量は、合計量が  $2.04 \mu\text{g g}^{-1}$  (春葉) から  $6.59 \mu\text{g g}^{-1}$  (夏葉) に増加したことから明らかであるように、夏葉は春葉よりも著しく高い LCFA 量を示した (表2、表3)。また、O<sub>3</sub> 曝露区でも LCFA 量は同様の傾向を示した。

春葉と夏葉のいずれにおいても、全ての LCFA 量は展葉初期から後期 (春葉: 5月→7月、夏葉: 7月→9月) にかけて経時的に減少した。例えば、対照区における LCFA 総含有量の平均減衰率は、春葉では 51.5% ( $2.04 \mu\text{g g}^{-1} \rightarrow 0.99 \mu\text{g g}^{-1}$ )、夏葉では 70.0% ( $6.59 \mu\text{g g}^{-1} \rightarrow 1.98 \mu\text{g g}^{-1}$ ) であった。また、LCFA 構造中の炭素数及び不飽和度が増加するに

表3 シラカンバ展葉初期における異形葉間の長鎖脂肪酸量の比較.

(A) 対照区	t 検定		(B) O <sub>3</sub> 区	t 検定	
	種類	p 値		種類	p 値
総含有量	W	***	総含有量	W	***
パルミチン酸 (C16:0)	W	***	パルミチン酸 (C16:0)	W	***
ステアリン酸 (C18:0)	W	***	ステアリン酸 (C18:0)	W	***
オレイン酸 (C18:1)	W	*	オレイン酸 (C18:1)	W	*
リノール酸 (C18:2)	S	*	リノール酸 (C18:2)	W	**
リノレン酸 (C18:3)	S	*	リノレン酸 (C18:3)	S	0.20

(A) 対照区、(B) O<sub>3</sub> 区。データ群の等分散性を検証した後、S「student の t 検定」又は W「Welch の t 検定」を行った； $p < 0.05$  \*； $p < 0.01$  \*\*； $p < 0.001$  \*\*\*。

表4 シラカンバ葉の長鎖脂肪酸の経時的減衰に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響

(A) 春葉	減衰率 (%)		検定	t 値	W 値	p 値
	対照区	O <sub>3</sub> 区				
パルミチン酸 (C16:0)	20.52 ± 6.49	55.00 ± 4.03	t-test (S)	-4.52	-	***
ステアリン酸 (C18:0)	44.06 ± 7.99	75.32 ± 2.71	t-test (W)	-3.71	-	**
オレイン酸 (C18:1)	44.29 ± 8.25	69.04 ± 2.40	Wilcoxon	-	7	**
リノール酸 (C18:2)	69.74 ± 4.17	83.78 ± 1.28	t-test (W)	-3.22	-	**
リノレン酸 (C18:3)	84.80 ± 2.02	91.75 ± 1.40	t-test (S)	-2.83	-	*

(B) 夏葉	減衰率 (%)		検定	t 値	W 値	p 値
	対照区	O <sub>3</sub> 区				
パルミチン酸 (C16:0)	40.65 ± 8.62	48.96 ± 4.84	t-test (S)	-0.84	-	0.41
ステアリン酸 (C18:0)	72.21 ± 3.13	58.03 ± 6.61	Wilcoxon	-	60	0.09
オレイン酸 (C18:1)	66.94 ± 9.87	76.44 ± 5.15	Wilcoxon	-	38	0.86
リノール酸 (C18:2)	79.63 ± 5.32	83.71 ± 4.18	Wilcoxon	-	35	0.67
リノレン酸 (C18:3)	92.10 ± 2.12	94.58 ± 1.38	Wilcoxon	-	38	0.86

表中数字は、(A) シラカンバ春葉 及び (B) 夏葉における展葉初期の LCFAs 量を 100% とした場合の展葉後期における平均減衰率 (%) ±SE (n=9；3 個体/プロット×3 プロット/処理)。データ群の等分散性を検証した後、S「student の t 検定」又は W「Welch の t 検定」を行った。なお、データ群の正規性が認められない場合は、Wilcoxon の順位和検定を行った； $p < 0.05$  \*； $p < 0.01$  \*\*； $p < 0.001$  \*\*\*。

従い、いずれの異型葉でも経時的な LCFAs の減衰率は増大した。特に、春葉では LCFAs の減衰率は O<sub>3</sub> 曝露によって有意に高い値を示した (表 4-A)。一方、夏葉ではいずれの LCFAs も O<sub>3</sub> 曝露による LCFAs の経時的な減衰率に対する影響は認められなかった (表 4-B)。

### 3.3.2 LCFAs の葉内含有量及び組成に対する O<sub>3</sub> 影響

各異型葉及び展葉期の LCFAs 量に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響を表 5 及び図 8 に示す。春葉の展葉初期における飽和 LCFAs (パルミチン酸、ステアリン酸) の含有量は O<sub>3</sub> 曝露により有意に上昇したが、不飽和 LCFAs (オレイン酸、リノール酸、リノレン酸) では有意差は認

表 5 シラカンバ葉の長鎖脂肪酸に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響 (一般化線形混合モデル)

(A) 春葉			(B) 夏葉		
展葉初期 (5月)	t 値	p 値	展葉初期 (7月)	t 値	p 値
総含有量	-1.12	0.26	総含有量	0.88	0.38
パルミチン酸 (C16:0)	-2.02	*	パルミチン酸 (C16:0)	0.10	0.92
ステアリン酸 (C18:0)	-2.61	**	ステアリン酸 (C18:0)	1.55	0.12
オレイン酸 (C18:1)	-0.46	0.65	オレイン酸 (C18:1)	-0.38	0.70
リノール酸 (C18:2)	0.03	0.98	リノール酸 (C18:2)	0.47	0.64
リノレン酸 (C18:3)	-1.05	0.29	リノレン酸 (C18:3)	1.49	0.14
展葉後期 (7月)	t 値	p 値	展葉後期 (9月)	t 値	p 値
総含有量	2.35	*	総含有量	1.5	0.12
パルミチン酸 (C16:0)	87.87	***	パルミチン酸 (C16:0)	1.65	0.10
ステアリン酸 (C18:0)	1.61	0.11	ステアリン酸 (C18:0)	0.77	0.44
オレイン酸 (C18:1)	1.52	0.13	オレイン酸 (C18:1)	0.65	0.51
リノール酸 (C18:2)	2.08	*	リノール酸 (C18:2)	1.39	0.16
リノレン酸 (C18:3)	0.30	0.77	リノレン酸 (C18:3)	2.45	*

一般化線形混合モデル ( $\chi$  分布) による (A) シラカンバ春葉 及び (B) 夏葉の長鎖脂肪酸含有量に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響解析 (n = 9 ; 3 個体/プロット×3 プロット/処理)。各処理区におけるプロットをランダム効果とした ; p < 0.05 \*; p < 0.01 \*\*; p < 0.001 \*\*\*。

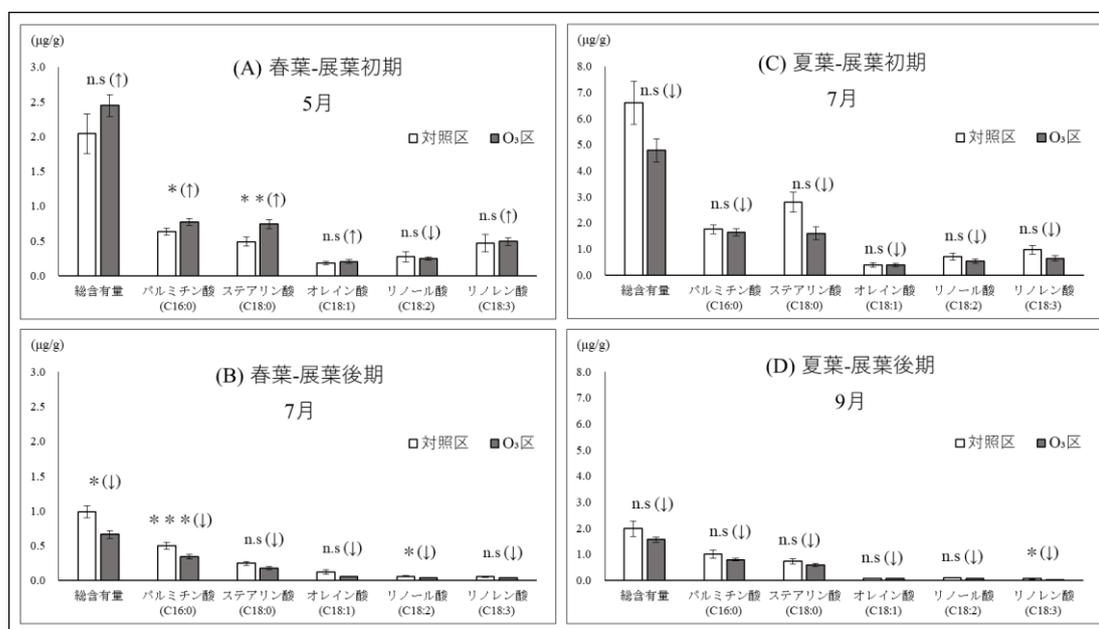


図 8 シラカンバ葉の長鎖脂肪酸に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響 (一般化線形混合モデル) シラカンバ葉の LCFAs 量平均値±SE (表 2) より作成した。統計解析の結果は、一般化線形混合モデル ( $\chi$  分布) によるシラカンバの長鎖脂肪酸含有量に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響 (表 5) に対応する ; p 値 : p < 0.05 \*; p < 0.01 \*\*; p < 0.001 \*\*\* ; n.s. 有意差なし。矢印は O<sub>3</sub> 処理による長鎖脂肪酸量の増加 (↑) 及び低下 (↓) を表す。

められなかった (図 8-A)。しかし、展葉後期になると、全ての LCFA 量は O<sub>3</sub> 曝露区で低い値を示し、ステアリン酸及びリノール酸、総含有量の O<sub>3</sub> 処理区間の差は顕著だった (図 8-B)。一方、春葉とは対照的に、夏葉では O<sub>3</sub> 曝露による LCFA 量の減衰傾向が展葉初期から認められたものの、いずれも有意な差は認められなかった (図 8-C)。また、夏葉は展葉後期においても、リノレン酸を除き LCFA 量に有意な減衰は認められなかった (図 8-D)。

各時期の LCFA の組成を図 9-1、図 9-2 に示す。PERMANOVA による解析から、LCFA の組成は異型葉のタイプや O<sub>3</sub> 曝露の有無に関わらず、葉の展葉時期によって有意な差が認められた (表 6-A)。O<sub>3</sub> 処理に関する PERMANOVA 解析においては、夏葉の展葉初期を除き O<sub>3</sub> 処理区間の LCFA 組成差は認められなかった (表 6-B)。ここで、葉の展葉初期に着目すると、異型葉間の組成差は対照区で顕著に認められるのに対し、O<sub>3</sub> 曝露区では差が認められなかった (表 6-C)。

表 6 長鎖脂肪酸の組成に関する Permutational Multivariate Analysis of Variance 解析

説明要因	df	F 値	p 値
(A) 展葉時期			
- 春葉 (5 月→7 月)			
- 対照区	1,16	18.12	***
- O <sub>3</sub> 区	1,16	36.02	***
- 夏葉 (7 月→9 月)			
- 対照区	1,16	33.86	***
- O <sub>3</sub> 区	1,16	21.38	***
(B) O <sub>3</sub> 処理			
- 春葉			
- 展葉初期 (5 月)	1,16	1.48	0.26
- 展葉後期 (7 月)	1,16	0.64	0.66
- 夏葉			
- 展葉初期 (7 月)	1,16	4.58	*
- 展葉後期 (9 月)	1,16	0.24	0.81
(C) 異形葉			
- 展葉初期 (春葉→夏葉)			
- 対照区	1,16	10.62	***
- O <sub>3</sub> 区	1,16	2.46	0.07

n=9 (3 個体×3 プロット/区 ; p < 0.05 \*; p < 0.01 \*\*; p < 0.001 \*\*\* )

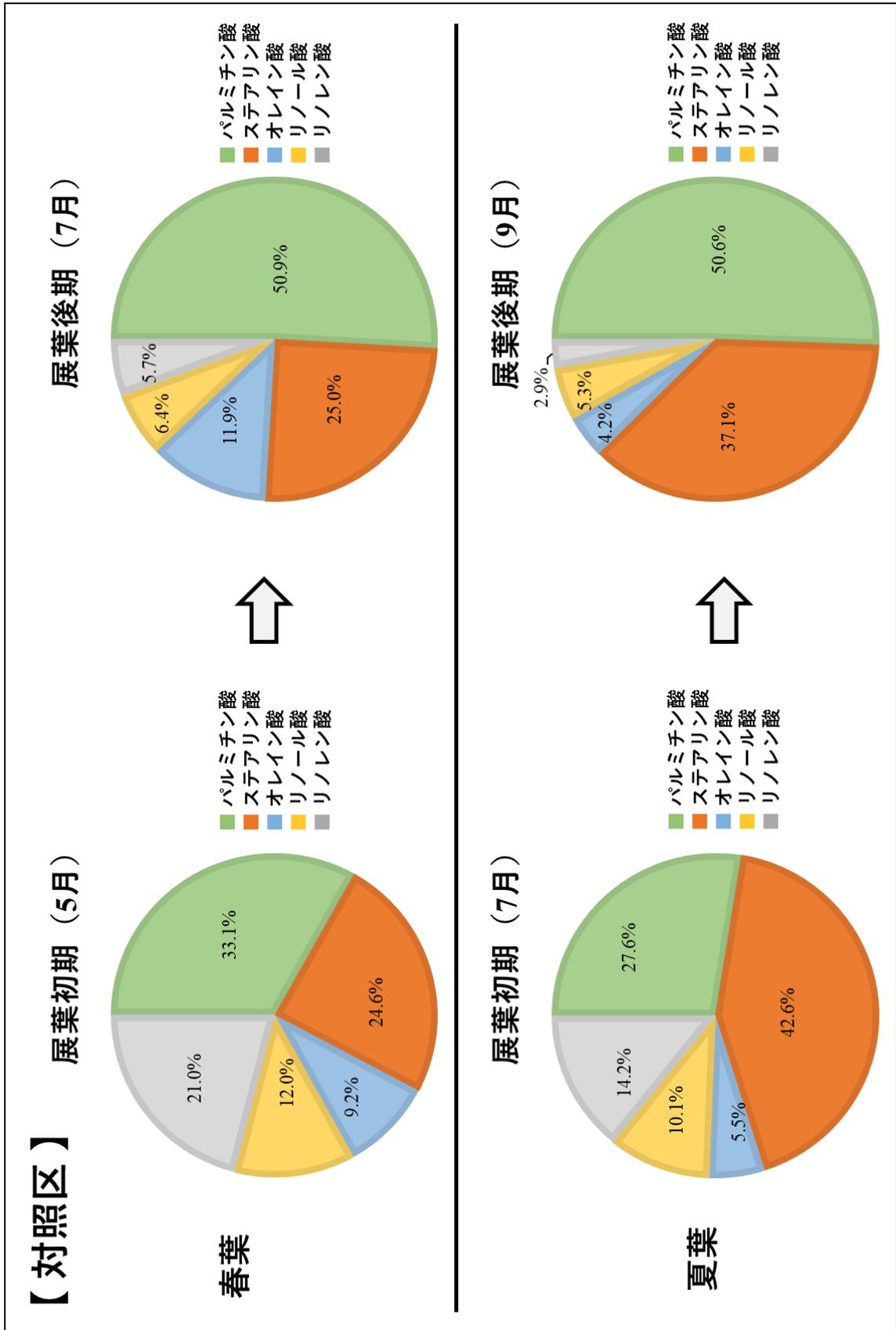


図 9-1 対照区 (O<sub>3</sub>濃度約 30 ppb) におけるシラカンバ葉の長鎖脂肪酸の組成

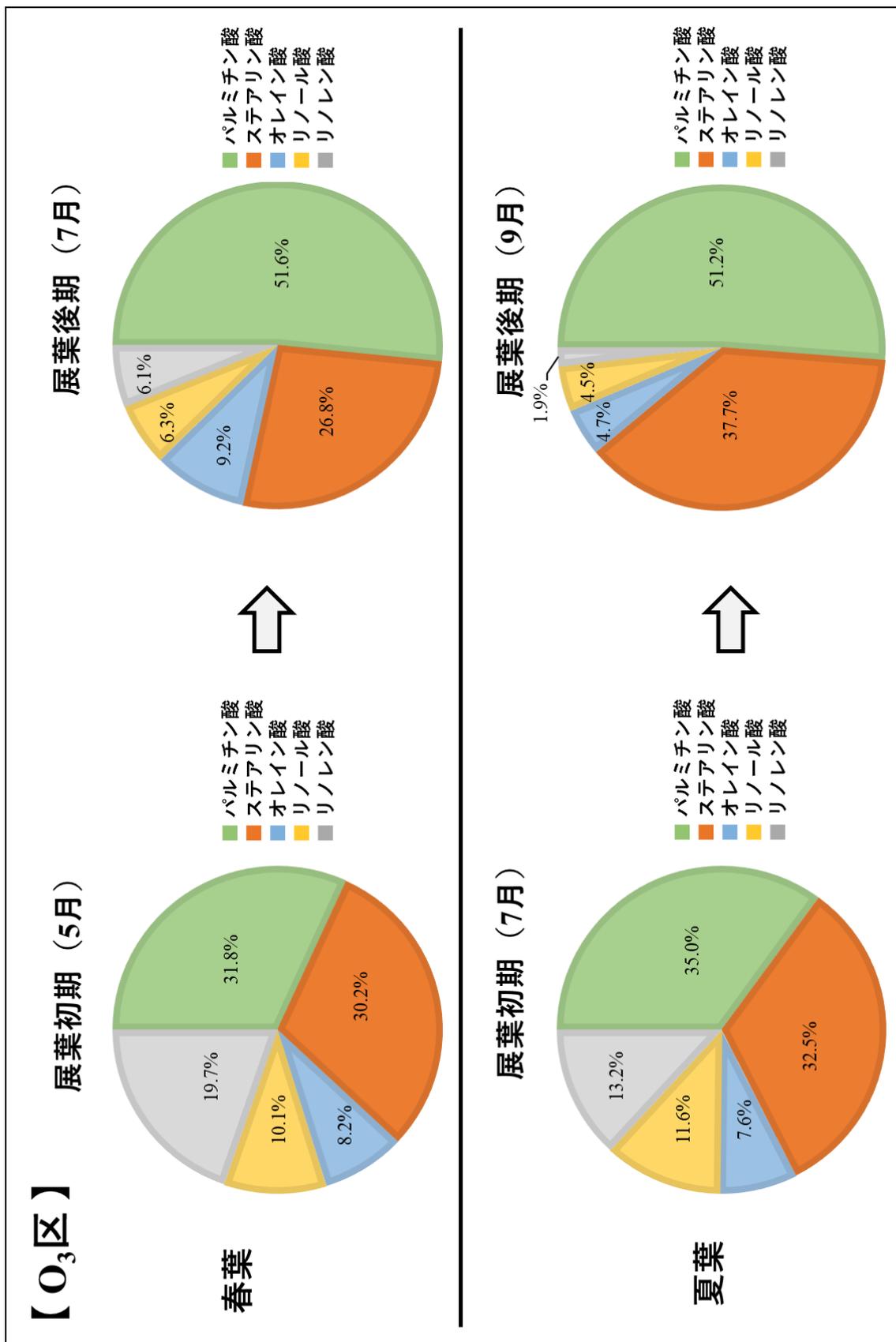


図 9-2 高濃度 O<sub>3</sub> (O<sub>3</sub>濃度 60 – 70 ppb) 区におけるシラカンバ葉の長鎖脂肪酸の組成

## 3.4 考察

### 3.4.1 異型葉性における LCFAs の季節的変動

シラカンバの展葉初期における LCFAs 量、すなわち経時的に LCFAs が減衰する前の初期含有量に関して、夏葉は春葉よりも明らかに含有量が高く、異型葉性による差が明らかであった。この初期含有量における差は、特にパルミチン酸やステアリン酸の飽和 LCFAs の夏葉における増加が大きく寄与し、結果的に組成差としても現れた。さらに、経時的に飽和 LCFAs の優占率が高くなることは、不飽和度の高い LCFAs の減衰率が O<sub>3</sub> 曝露の有無に関わらず高いため（飽和 LCFAs の減衰率が相対的に低いため）であると考えられた。したがって、異型葉性や LCFAs の不飽和度、季節的变化により、シラカンバの LCFAs は量的・質的に変化することが示唆された。

展葉初期は当年の O<sub>3</sub> 曝露を受ける期間が極めて短く、LCFAs が直接的な O<sub>3</sub> 影響を受ける可能性は低い。当年の O<sub>3</sub> 曝露の直接的影響は LCFAs 量の減衰として現れることから、飽和 LCFAs をはじめとして春葉の展葉初期における LCFAs 量が著しく増加していることは、前年度以前のシラカンバ個体に対する O<sub>3</sub> 曝露歴による間接的な O<sub>3</sub> 曝露影響の可能性が挙げられる。サンプリング対象となったシラカンバ個体は開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設に植栽後 4 年が経過しており、前年度以前から O<sub>3</sub> 曝露を長期間受けた状態であった。春葉では O<sub>3</sub> 曝露により LCFAs 量が対照区の葉よりも著しく減衰したことから、展葉初期から事前に LCFAs 量を多く含有するという誘導的応答が起こったと考えられる。また、展葉後期には増加分を上回る減衰により O<sub>3</sub> 曝露区の LCFAs 量が対照区と比較して低下へと転じることから、春葉では展葉初期から展葉後期にかけて LCFAs 量の転換期が存在することが明らかとなった。春葉の LCFAs 量が昆虫の摂食に何らかの影響を与える場合、O<sub>3</sub> 曝露の影響は転換期の前後で異なると考えられる。

夏葉では、当年度の O<sub>3</sub> 曝露による LCFAs の減衰率に大きな影響はなく、夏葉よりも春葉の方が O<sub>3</sub> に対する感受性は高いことが示唆された。しかし、春葉では O<sub>3</sub> 曝露による LCFAs の質的变化（組成変化）は認められず、春葉に対する O<sub>3</sub> 曝露の影響は量的影響に限られることが明らかとなった。夏葉では減衰率など著しい量的変化が認められない一方で、O<sub>3</sub> 曝露による展葉初期の LCFAs の組成変化が認められた。この O<sub>3</sub> 曝露による展葉初期の組成差が、結果として展葉初期における異型葉間の組成差を打ち消したと考えられる。また、夏葉において展葉初期の LCFAs がわずかに低下傾向にあることは、当年度の春葉に対する O<sub>3</sub> 曝露の間接的影響が大きいと考えられる。通常、シラカンバの夏葉の発達は当年度

の春葉の光合成活動に依存する (Topps and Elliott, 1965; Matsuki et al., 2004)。したがって、O<sub>3</sub> 曝露区で春葉の光合成活動がわずかに低下 (Hoshika et al., 2013) したことで炭素資源量が制限され、夏葉における LCFAs 生合成量の低下に繋がったと考えられる。

### 3.4.2 高濃度 O<sub>3</sub> 環境下における LCFAs の減衰

本章では「不飽和度の高い LCFAs は O<sub>3</sub> 曝露の影響を受け減衰しやすい」と仮説を立てた。しかし、LCFAs の減衰が顕著な春葉においても飽和 LCFAs (パルミチン酸、ステアリン酸) の方が減衰率に対する O<sub>3</sub> 曝露影響は大きかった。これは、異型葉に関わらず、対照区においてもリノール酸やリノレン酸の不飽和 LCFAs の減衰率が高いことから、O<sub>3</sub> 曝露による減衰分が小さかったためと考えられる。仮説に反した明確な要因は不明であるものの、1つの可能性として、O<sub>3</sub> が気孔から取り込まれたのち、葉内の LCFAs 過酸化と葉表層における LCFAs 過酸化で減衰程度の傾向が異なる可能性を挙げることができる。本研究では、LCFAs の厳密な局在性は明らかに出来ていない。そのため、LCFAs の葉内局在性を明らかにすることで、春葉と夏葉における LCFAs の O<sub>3</sub> に対する減衰速度差を含め、本研究における仮説との乖離を説明することが期待される。

O<sub>3</sub> 曝露による LCFAs への量的影響として、春葉における顕著な LCFAs の減衰が認められた。また、有意な差ではないものの、夏葉においてもわずかに O<sub>3</sub> 曝露区で LCFAs 量の低下が認められた。これらの量的な LCFAs の減衰は、植物の防御機能に影響を及ぼすことが考えられる。植食性昆虫に対する防御物質として機能するジャスモン酸 (JA ; Jasmonic acid) は、食害を受けた際の誘導防御の一環として発現し (Fukumoto et al., 2013)、傷害葉における集積 (Howe and Jander, 2008; Fürstenberg-Hägg et al., 2013) 及び非傷害葉への輸送 (Ishimaru et al., 2017) も認められている。LCFAs のうち、特にリノレン酸は JA の前駆物質であることから葉内で利用されやすい物質であり (Liechti and Farmer, 2002)、過酸化によりリノレン酸へ変換されるリノール酸やその他の LCFAs も合成経路としては前駆物質として連動している。また、リノール酸やリノレン酸の植物体内における消費は、*cis*-3-hexen-1-yl acetate などの炭素数 6 の炭化水素化合物 (Green leaf volatiles ; GLVs) の生合成にも関与しており、これらの放出による植食性昆虫への誘導防御としての機能に寄与している (Aljibory and Chen, 2018)。したがって、JA 前駆物質のリノレン酸を含む LCFAs 量の低い O<sub>3</sub> 曝露区では、植食性昆虫に対する誘導防御能力が対照区よりも劣ることが示唆された。

### 3.4.3. 高濃度 O<sub>3</sub> 環境下における LCFAs の生物学的機能

LCFAs は、有効な組成により香気シグナルとして昆虫を誘引する生物学的機能を示す (Bosch et al., 2000; Manosalva et al., 2011; Sarkar et al., 2013; Sarkar and Barik, 2015)。シラカンバでは、春葉での量的変化は認められたものの、全ての LCFAs が同じ傾向で O<sub>3</sub> 曝露により増減しており、組成としての差は認められなかった。また、夏葉では展葉初期のみ組成差は認められたものの、経時的に組成差は解消した。したがって、O<sub>3</sub> 曝露影響による一時的な LCFAs の組成差を介してシラカンバに対するハンノキハムシの行動が変化する可能性はあるものの、「O<sub>3</sub> 区への食害 (飛来) が低下する」という異型葉間及び季節間で一貫した虫害傾向を LCFAs により説明することは出来ないと結論付けた。

但し、LCFAs は昆虫に対する栄養学的な観点 (Eigenbrode and Espelie, 1995) から、植食性昆虫との関係性を解明する意義がある。例えば、鱗翅目など多くの昆虫種は、リノール酸やリノレン酸などを栄養素として要求しており、幼虫の成長や成虫の繁殖力を促進することが知られている (Canavoso et al. 2001)。本研究の場合、調査時期の多くで O<sub>3</sub> 曝露区の葉の LCFAs 量は対照区を下回った。LCFAs が必須栄養素として機能している場合、LCFAs 量の低下している O<sub>3</sub> 曝露区の葉では、ハンノキハムシは必要な栄養量を得るためにより多くの葉量を摂食しなくてはならない。したがって、LCFAs 量がハンノキハムシ成虫及び幼虫の摂食量に与える影響を明らかにする必要がある。また、春葉で顕著に O<sub>3</sub> 区の葉の LCFAs 量が増加する展葉初期の 6 月は、越冬後成虫の繁殖活動及び次世代幼虫の発生開始時期に該当している (図 6)。よって、春葉の展葉初期に関しては、室内の摂食試験における O<sub>3</sub> 区の葉の食害量増加 (Abu ElEla et al., 2018b) に、防御物質 (縮合タンニン、フェノール類) の低下だけでなく LCFAs の増加が関与している可能性がある。このような昆虫の摂食に関わるケースの場合、LCFAs による昆虫行動への影響は、防御物質と同様に質的变化ではなく量的変化で議論されるべきである。今後、春葉における LCFAs の転換期を含めたより詳細な季節的变化の調査の他、LCFAs の変化が植物-昆虫間の相互作用に与える生物学的機能の解明が求められる。

## 第4章 BVOCsの大気中減衰反応と昆虫に対する誘引性

### 4.1 目的

植食性昆虫や花粉媒介昆虫が BVOCs を香気シグナルとして植物を探索するように、BVOCs は植物と昆虫の相互作用において生物学的に重要な役割を担っている (Holopainen and Blande, 2013; Blande et al., 2014)。しかし、植物から放出される BVOCs は、 $C_5H_8$  のイソプレノユニットから成る MT や SQT に代表されるように、構造中の二重結合を起点に大気中の  $O_3$  と反応することが報告されている (Pinto et al., 2010; Li et al., 2016)。したがって、 $O_3$  曝露による BVOCs 放出自体への影響が認められない場合でも、植物から放出された BVOCs は必ず大気中の  $O_3$  による影響を受けることで BVOCs 全体の組成が大きく変化する (Atkinson and Arey, 2003; Fuentes et al., 2016)。

BVOCs の組成は昆虫の誘引システムにおいて極めて重要な要素である。したがって、高濃度  $O_3$  の曝露は、BVOCs の組成変化を介して当該 BVOCs を探知する昆虫の行動に影響を及ぼすと考えられた。例えば、ハムシの一種である *Acalymma vittatum* F. (Coleoptera: Chrysomelidae) は、80 ppb 以上の  $O_3$  曝露によって食害対象であるウリ科作物 (*Cucurbita pepo*) の花由来の BVOCs を選択する頻度が有意に低くなることが明らかとなった (Fuentes et al., 2013)。しかし、このような研究は、「 $O_3$  を曝露した場合、昆虫に対する花の香りの誘引性が低下する」という課題提案型の研究である。一方、本研究は開放系  $O_3$  曝露システムの野外環境において認められた現象に基づいており、現象解明型の研究である。また、農作物など草本類における BVOCs を介した植物-昆虫間コミュニケーションの研究事例は多く認められるものの (Feng et al., 2017; Takabayashi and Shiojiri, 2019; Piersanti et al., 2020)、森林樹木など木本類の葉由来の BVOCs に関しては虫害要因の特定が困難であることが一要因となり研究事例が乏しい。特に、森林樹木に対する高濃度  $O_3$  曝露影響を組み込んだ評価系は、本研究が先駆的事例である。

本章では、高濃度  $O_3$  環境下でのハンノキハムシの行動を解明するために、人工的に任意の  $O_3$  濃度環境をガラスチャンバー内に再現し、Y字管 BVOCs 選好性試験を実施した。植物が高濃度の  $O_3$  と混合された場合、ハンノキハムシ成虫は  $O_3$  が存在しない場合よりも葉を訪れる頻度が低くなると仮説を立てた。また、シラカンバから放出される BVOCs の定性及び定量分析を行い、 $O_3$  との反応速度式から誘引性の鍵となる候補成分の絞り込みを試みた。

## 4.2 実験材料と方法

### 4.2.1 植物材料

BVOCs 選好性試験（香気シグナル検証試験）には、北海道大学札幌研究林実験苗畑に生育するシラカンバ幼木（5年生、平均樹高5m）の地上2.5mの陽当たりの良い枝を採集し供試した。なお、試験に供試する枝は事前に前述の防虫ネットで保護し、ハンノキハムシを含む植食性昆虫による誘導防御などの食害影響を排除した。樹木個体から50cm以上の長さの枝を切断した後、通水性を保つためフラスコの水中で再度切り口を切断した(Koike, 1986)。

BVOCs のサンプリングには、シラカンバの接ぎ木苗5個体を使用した。これらは、札幌研究林実験苗畑に生育する開放系O<sub>3</sub>曝露施設外の1個体を接ぎ穂とし、シラカンバ苗（北海道園芸緑化センター提供）を台木とした。接ぎ穂は2017年2月に冬芽が付いた状態で採集し、台木に接合した後、パラフィルムで補強した。台木の切断面には、脱水防止のため癒着液を塗布した。その後、冬芽の付いた接ぎ穂先端をポリ袋で覆い、通気のため袋右上部の一部を開けた。苗木はいずれもガラス温室内で管理した。2017年4月に接ぎ穂の冬芽が開葉した後ポリ袋を取り外し、2017年6月よりBVOCsのサンプリングに供試した。

### 4.2.2 試験昆虫：ハンノキハムシ

ハンノキハムシ (*Agelastica coerulea*) は5月に越冬を終えた成虫が出現し、食害を始める。その後、6月～7月にかけて繁殖活動を行い、幼虫による食害が顕著となる。幼虫は土中で蛹になった後、7月下旬以降に成虫として出現する。成虫の食害は9月末まで続き、10月以降に越冬を始める。便宜上、本研究では越冬後成虫を「第1世代成虫」、当年の次世代を「第2世代成虫」と呼称する。前項のシラカンバのシュートの生物季節をハンノキハムシの生活史と照らし合わせると、ハンノキハムシの第1世代成虫は春葉、第2世代成虫は夏葉が優占する時期に活動が活発となる(図6)。本研究では、上記ハンノキハムシの成虫を研究対象とした。ハンノキハムシ成虫よりも幼虫の方がシラカンバの葉に与える被害は大きいものの(図10-D)、飛翔能力のない幼虫の活動場所は1世代成虫の植物選択に依存する。したがって、幼虫はBVOCsによる飛来頻度への影響は受けなため本研究の対象から除外した。

本研究では、2017年6月（第1世代成虫）および8月（第2世代成虫）に、札幌研究林

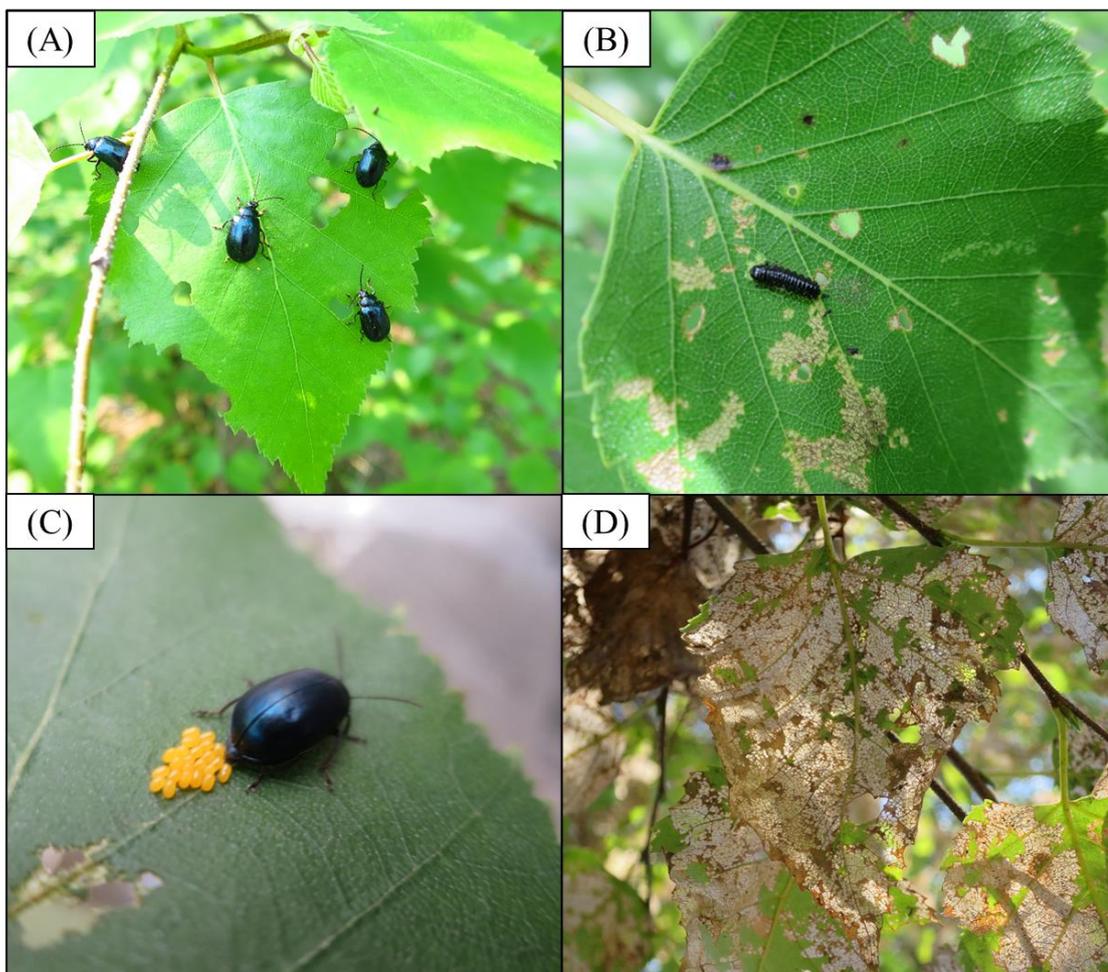


図 10 ハンノキハムシの生態及びシラカンバに対する食害

- (A) 成虫：葉を齧り取る食害様式
- (B) 幼虫：葉肉のみを食害し葉を骸骨状態にする食害様式
- (C) 成虫と卵：成虫は黄色の卵塊を葉の裏面に産卵する
- (D) 幼虫による激害で葉面積の 90%以上が食害された状態（8 月末）

実験苗畑の開放系  $O_3$  曝露施設外に生育するシラカンバ上からハンノキハムシ成虫を採集した。採集したハンノキハムシ成虫は人工光源下（16L8D、 $25^{\circ}C$ ）で飼育し、水差しに入れたシラカンバの切り枝を餌として与えた。BVOCs 選好性試験の開始前 2 時間は、絶食期間とした。

#### 4.2.3 BVOCs 選好性試験（Y 字管試験）

試験は、第 1 世代成虫（2017 年 6 月）及び第 2 世代成虫（2017 年 8 月）に対して行った。試験法は、Y 字型ガラス製試験管（内径：17 mm、アーム長：55 mm、中央アーム長：150 mm）を用いた嗅覚試験法を採用した（図 11；通称、Y 字管試験）。現実環境における  $O_3$  と BVOCs の反応を再現するため、試験は紫外線透過性農業用ビニールシート（スカイコート 5、厚さ 0.1 mm、タキロンシーアイ株式会社）を用いて設置した小屋の中で実施し

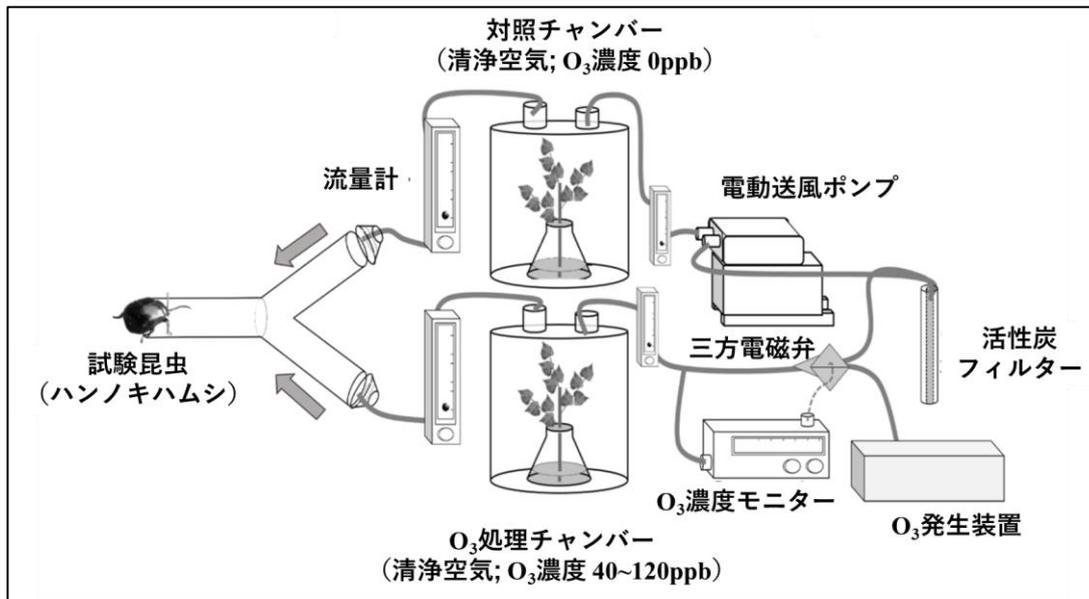


図 11 BVOCs 選好性試験

図は、BVOCs を気体 A (対照チャンバー)、BVOCs+O<sub>3</sub> を気体 B (O<sub>3</sub> 処理チャンバー) とした場合の模式図。BVOCs に対する誘引性を検層する場合、O<sub>3</sub> 処理チャンバーは植物体を置かず、O<sub>3</sub> 発生装置を停止した状態とした (O<sub>3</sub> 濃度=0 ppb)。O<sub>3</sub> に対する忌避性を検証する場合、対照チャンバーには植物を置かず、O<sub>3</sub> 処理チャンバーの O<sub>3</sub> 濃度を任意の値 (40 ppb、80 ppb、120 ppb) に設定した。

BVOC: Biogenic Volatile Organic Compounds ; 生物起源揮発性有機化合物

た。各ガラスチャンバー (3 L) への通気量は、電動ポンプ (APN-240MAN-1、イワキ) 及び流量計 (RK 1650、KOFLOC) により  $3 \text{ L min}^{-1}$  に制御した。チャンバー内には水差しに入れたシラカンバのシュート (葉 5 枚程度) を設置し、加湿防止のためチャンバー下流に排気口を開けた。Y 字型試験管各アームへの流量は流量計により  $0.5 \text{ L min}^{-1}$  に制御した。O<sub>3</sub> 濃度は、デジタル指示調節計 (SDC15、アズビル株式会社) により任意の O<sub>3</sub> 濃度を設定した後、O<sub>3</sub> モニター (Model 202, 2B Techno, Colorado, USA) 及び三方電磁弁 (CMXTE105TTP、日本バルブコントロールズ株式会社) で自動制御した。なお、チャンバー内へ通気する空気は、電動送風ポンプの上流側に活性炭フィルター (内径 6 cm、長さ 50 cm) を設置し、外部空気に含まれる O<sub>3</sub> 及び VOC を除去した清浄空気とした。

Y 字型試験管の中央アーム入口に供試成虫 1 頭を置き、入口を先述の防虫ネットで塞いだ。供試成虫が周囲の実験環境から得られる視覚情報を遮断するため、Y 字型試験管はキムタオル (日本製紙) で覆った。また、Y 字管は供試成虫 5 個体の試行ごとに各アームへ通風する気体を入れ替え、空間バイアスによる影響を排除した。1 個体の選好性試験に関して、試行時間は 5 分間とした (Brilli et al., 2009; Fuentes et al., 2013)。昆虫が各アームの中間点を越えた場合を「選択回数 1」として選択頻度が高い側、または試行時間 (5 分間) 内

に1分間連続で一方に留まり続けた場合、当該供試成虫において「選好気体の決定」と見做した。供試成虫がいずれのアームの中間点も越えなかった場合、「選好気体の選択なし」と見做し、その試行は破棄した。5個体の試行ごとにY字管はエタノールで洗浄・乾燥（65℃；定温乾燥機）し、次の試行には洗浄済みのY字型試験管を使用した。

本試験では、下記3項目に関してハンノキハムシ成虫に対する選好性を検証した。

	気体 A	気体 B	目的
(1)	O <sub>3</sub>	清浄空気	O <sub>3</sub> 自体の忌避性を検証
(2)	BVOCs	清浄空気	シラカンバ BVOCs の誘引性を検証
(3)	BVOCs	BVOCs + O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> 混合による BVOCs の誘引性変化を検証

ここで、(1)及び(2)は、本試験の主目的である(3)に対する前提条件の検証である。特に(2)に関して、O<sub>3</sub> 自体がハンノキハムシ成虫に対して忌避性を示す場合、開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設における食害度の低下は、O<sub>3</sub> 単体によって説明される。「選好気体の選択なし」として破棄された結果を除き、(1)は計 20 試行、(2)は計 30 試行実施した。(3)は、40 ppb、80 ppb、120 ppb の各 O<sub>3</sub> 濃度段階において、計 40 試行実施した。但し、(3)中の計 20 試行の後に、O<sub>3</sub> 処理チャンバーへ設置するシラカンバの枝を入れ替えた。

#### 4.2.4 BVOCs サンプルング及び定性・定量分析

シラカンバのクローン苗木（4.2.1 参照）を用いて、枝チャンバー法により春葉、夏葉のそれぞれに関して BVOCs をサンプルングした。測定に用いた個体はいずれもガラス温室内で管理し、ハンノキハムシ及びその他昆虫による食害は生じなかった。BVOCs 測定は、恒温条件（25℃）の実験室内へ植物体を移動して行った。

枝チャンバー法では、PFTE サンプルングバッグ（6 L）内に枝を封入し、サンプルングバッグ内部に活性炭を用いて清浄化した空気を 3 L min<sup>-1</sup> の一定流量で送風した。BVOCs 放出を安定させるため、測定枝を袋内通風状態に 1 時間以上放置した。チャンバー内の環境条件は気温 30℃、光合成有効光量子束密度（Photosynthetic Photon Flux Density；PPFD）200 μ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>であった。サンプルングバッグ内部に放出された BVOCs は吸着剤（Tenax TA, GL Science, Tokyo, Japan; Carbotrap, Supelco, Bellefonte, PA, USA）の充填した採取管へ捕集した。BVOCs のサンプルングは 200 ml min<sup>-1</sup> に設定した吸気ポンプ（MP-Σ30NII、柴田化学）を用いて各 30 分間行い、1 個体あたり 2 サンプルとした。BVOCs を捕集した採取管

は、分析へ供試するまで 4°C の冷蔵庫内で保管した。

捕集した BVOCs は、自動加熱脱着装置付きガスクロマトグラフ質量分析計を用いて、定性および定量分析を行った。GC-MS の分析条件及び放出速度 ( $E$ ;  $\text{nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) の算出は、2.2.3 と同様である。各成分または成分群の放出比率 (%) は、各放出速度を全体放出速度で除し 100 を乗じた値として算出した。なお、1 個体としての放出速度及び放出比率の値は、2 サンプルの平均値を使用した。

シラカンバから放出された BVOCs 各成分の  $\text{O}_3$  混合による減衰傾向を簡易的に評価するため、BVOCs と  $\text{O}_3$  の混合試験を行った。シラカンバから放出された BVOCs を  $1 \text{ L min}^{-1}$  でガラス容器 (3 L) 内へ送風し、同流量の任意の  $\text{O}_3$  気流と混合した (混合後の  $\text{O}_3$  濃度: 80 ppb、120 ppb)。200  $\text{ml min}^{-1}$  で 30 分間 (計 6 L) 混合チャンバー内の空気を採取管に捕集し、 $\text{O}_3$  混合前後の BVOCs の捕集量を比較した ( $n=3$ )。但し、BVOCs 及び  $\text{O}_3$  気流を 1:1 で混合するため、混合前の BVOCs 存在量に 1/2 を乗じて混合後の存在量と比較した。 $\text{O}_3$  混合による減衰率は、各成分のトルエン D8 に対するピーク面積比に基づき、混合前の値を 100% として算出した。なお、BVOCs を含まない浄化空気と  $\text{O}_3$  気流の混合気体をブランクサンプルとして、BVOCs と  $\text{O}_3$  混合サンプルの面積値より差し引いた。

#### 4.2.5 $\text{O}_3$ に対する BVOCs の大気中反応速度

任意の  $\text{O}_3$  濃度環境における BVOCs の大気中濃度の減衰は、下式[7]の指数関数式により推定される (McFrederick et al., 2008)。また、大気寿命 (秒) は下式[8]の通り推定される。

$$[x]_t = [x]_{t_0} \exp(-k_2 [\text{O}_3] t) \quad [7]$$

$$\text{大気寿命} = \frac{1}{[\text{O}_3]k_2} \quad [8]$$

ここで、 $[x]_{t_0}$ 、 $[x]_t$  は、それぞれ初期及び所定秒数 ( $t$ ) 経過時の BVOCs の濃度、 $[\text{O}_3]$  は環境中の  $\text{O}_3$  濃度 ( $\text{molecule cm}^{-3}$ )、 $k_2$  は各成分の  $\text{O}_3$  に対する大気中反応速度係数 ( $\text{cm}^3 \text{ molecule}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) を表す。各成分の既知の  $k_2$  及び  $\text{O}_3$  濃度 28.4 ppb ( $6.99 \times 10^{11} \text{ molecule cm}^{-3}$ ) 時の大気寿命を表 7 に示す。表 7 中の 80 ppb ( $1.97 \times 10^{12} \text{ molecule cm}^{-3}$ ) 時の大気寿命は、既知の  $k_2$  を用いて式[8]により新たに推定した。本研究では、 $\text{O}_3$  濃度 80 ppb において大気寿命が 1 時間未満となる成分を「 $\text{O}_3$  反応性成分」として定義した (e.g., 2-carene、limonene、*cis/trans*- $\beta$ -ocimene)。

また、BVOCs- $\text{O}_3$  混合試験 (前項 4.2.4 参照) において実測した BVOCs の濃度データを

用いて、BVOCs の減衰率 (%) を下式[9]に従い算出した。

$$\text{減衰率} = \frac{[x]_{\text{in}} - [x]_{\text{out}}}{[x]_0} \times 100 \quad [9]$$

ここで、 $[x]_{\text{in}}$ 、 $[x]_{\text{out}}$  はそれぞれ、混合チャンバーへ導入する BVOCs の初期濃度の実測値、混合チャンバーから排出される BVOCs 濃度の実測値である。なお、BVOCs- $\text{O}_3$  混合試験では  $\text{O}_3$  以外の濃度は制御及び除去をしていない。したがって、BVOCs の大気中減衰に関わる  $\text{O}_3$  以外の要因 (OH ラジカル、 $\text{NO}_3$  ラジカル) も取り入れた式[10] (McFrederick et al., 2008) により、大気中反応速度係数が既知の化合物のチャンバー内での平均反応時間を算出した。

$$t = \frac{\ln[x]_{\text{in}} - \ln[x]_{\text{out}}}{k_1 * [\text{OH}] + k_2 * [\text{O}_3] + k_3 * [\text{NO}_3]} \quad [10]$$

$[\text{OH}]$ 、 $[\text{O}_3]$ 及び $[\text{NO}_3]$ はそれぞれ、大気中の OH ラジカル濃度、 $\text{O}_3$  濃度及び  $\text{NO}_3$  ラジカル濃度を表す。日中の $[\text{OH}]$ 及び $[\text{NO}_3]$ は、それぞれ  $2.0 \times 10^6 \text{ molecule cm}^{-3}$  (Atkinson and Arey, 2003, Mochizuki et al. 2019)、 $1.25 \times 10^8 \text{ molecule cm}^{-3}$  (Wang et al. 2022) と仮定した。 $k_1$ 、 $k_2$  及び  $k_3$  はそれぞれ、OH ラジカル、 $\text{O}_3$  及び  $\text{NO}_3$  ラジカルに対する各化合物の大気中反応速度係数 ( $\text{cm}^3 \text{ molecule}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; 表 7) を表す。

表7 BVOCsの大气中反応速度係数及びO<sub>3</sub>との反応による大气寿命

化合物名	大气中反応速度係数 (cm <sup>3</sup> molecule <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )			O <sub>3</sub> との反応による大气寿命			
	<i>k</i> <sub>1</sub>	<i>k</i> <sub>2</sub>	<i>k</i> <sub>3</sub>	[O <sub>3</sub> ] 28.4 ppb		[O <sub>3</sub> ] 80.0 ppb	
モノテルペン							
camphene	5.3E-11	9.2E-19	6.5E-13	18.0	d	6.4	d
2-carene	8.2E-11	2.3E-16	1.7E-11	1.7	h	36.2	m
3-carene	8.7E-11	3.6E-17	9.5E-12	11.0	h	3.9	h
limonene	1.7E-10	2.0E-16	1.3E-11	2.0	h	42.6	m
myrcene	2.1E-10	4.8E-16	1.1E-11	50.0	m	17.7	m
<i>cis/trans</i> -β-ocimene	2.5E-10	5.4E-16	2.2E-11	44.0	m	15.7	m
α-phellandrene	3.1E-10	3.0E-15	7.4E-11	8.0	m	2.8	m
β-phellandrene	1.7E-10	4.7E-17	8.3E-12	8.4	h	3.0	h
α-pinene	5.3E-11	8.6E-17	6.1E-12	4.6	h	1.6	h
β-pinene	7.7E-11	1.5E-17	2.5E-12	1.1	d	0.4	d
sabinene	1.2E-10	8.3E-17	9.5E-12	4.8	h	1.7	h
α-terpinene	3.6E-10	2.4E-14	1.3E-10	1.0	m	0.4	m
γ-terpinene	1.8E-10	1.4E-16	3.3E-11	2.8	h	59.6	m
terpinolene	2.3E-10	1.8E-15	9.5E-11	13.0	m	4.6	m
セスキテルペン							
β-caryophyllene	2.0E-10	1.2E-14	2.2E-11	2.0	m	0.7	m
α-cedrene	6.6E-11	2.8E-17	8.3E-12	14.0	h	5.0	h
α-copaene	9.3E-11	1.6E-16	1.7E-11	2.5	h	53.2	m
α-humulene	3.0E-10	1.2E-14	3.3E-11	2.0	m	0.7	m
その他							
1,8-cineole	-	-	-	>110.0 <sup>a</sup>	d	-	-
<i>cis</i> -3-hexen-1-ol	1.1E-10 <sup>b</sup>	6.4E-17 <sup>b</sup>	2.7E-13 <sup>b</sup>	6.2 <sup>b</sup>	h	2.2	h
<i>cis</i> -3-hexenyl acetate	7.8E-1 <sup>b</sup>	5.4E-17 <sup>b</sup>	2.5E-13 <sup>b</sup>	7.3 <sup>b</sup>	h	2.6	h
linalool	1.6E-10 <sup>b</sup>	4.3E-16 <sup>b</sup>	1.1E-11 <sup>b</sup>	55.0 <sup>b</sup>	m	19.7	m
2-methyl-3-buten-2-ol	5.8E-11 <sup>c</sup>	9.7E-18 <sup>d</sup>	4.6E-14 <sup>e</sup>	1.7 <sup>d</sup>	d	0.6	d
6-methyl-5-hepten-2-one	1.6E-10 <sup>f</sup>	3.9E-16 <sup>f</sup>	7.5E-12 <sup>f</sup>	1.0 <sup>f</sup>	h	21.3	m

*k*<sub>1</sub>、*k*<sub>2</sub>及び*k*<sub>3</sub>はそれぞれ、OHラジカル、O<sub>3</sub>及びNO<sub>3</sub>ラジカルに対する各化合物の大气中反応速度係数 (cm<sup>3</sup> molecule<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)を示す。各反応速度係数及びO<sub>3</sub> (28.4 ppb ; 6.99×10<sup>11</sup> molecule cm<sup>-3</sup>)と反応した場合の大气寿命の値は、Calvert et al. (2000)より引用した。上記引用に該当しないものは、それぞれ<sup>a</sup>(Atkinson et al. 1990)、<sup>b</sup>(Atkinson et al. 1995)、<sup>c</sup>(Papagni et al. 2001)、<sup>d</sup>(Grosjean and Grosjean,1994)、<sup>e</sup>(Rudich et al. 1996)、<sup>f</sup>(Smith et al. 1996)より引用した。高濃度のO<sub>3</sub> (80.0 ppb ; 1.97×10<sup>12</sup> molecule cm<sup>-3</sup>)と反応した場合の大气寿命の値は、既知の*k*の値を用いて、式[8]により算出した。“m”、“h”、“d”は、それぞれ“分”、“時”、“日”を示す。O<sub>3</sub>濃度 80 ppbにおいて大气寿命が1時間未満となる成分を、本研究では「O<sub>3</sub>反応性成分」として定義した。

#### 4.2.6 統計解析

各成分の放出速度および放出比率は、等分散性の検定 ( $\alpha = 0.05$ ) を行った後、異型葉間の差に関して t-検定 (Student または Welch の t-検定 ;  $\alpha = 0.05$ ) により解析した。BVOCs 選好性試験における選択性は、処理間 (O<sub>3</sub> 付加の有無) の二項検定 ( $\alpha = 0.05$ ) により解析した。本章における統計解析は、統計ソフト R v.3.6.3 により実施した。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 BVOCs 選好性試験（Y字管試験）

ハンノキハムシは第1世代成虫（図12-A）及び第2世代成虫（図12-B）のいずれも、O<sub>3</sub>（≦120 ppb）に対して選好性も忌避性も示さなかった。一方、シラカンバから放出されるBVOCsには明らかな選好性を示した（図12-C；第1世代： $p < 0.05$ 、第2世代成虫： $p < 0.001$ ）。

O<sub>3</sub>曝露環境（BVOC+O<sub>3</sub>）を想定した試験では、第1世代および第2世代成虫ともに、40 ppbではBVOCsとBVOCs+O<sub>3</sub>の間に選好性の差は認められなかった（図12-D、12-E）。80 ppbでは、第1世代成虫に関して統計的有意差は見られなかったものの（ $p = 0.08$ ）、第2世代成虫（ $p < 0.01$ ）ともにBVOCs+O<sub>3</sub>よりもBVOCsのみの気体をより好む傾向が認められた。したがって、O<sub>3</sub>曝露により、シラカンバのBVOCのハンノキハムシ成虫に対する誘引性は低下することが認められた。しかし、120 ppbでは上述の選好性の低下がさらに顕著となることはなく、第1世代成虫（ $p = 0.43$ ）及び第2世代成虫（ $p = 0.27$ ）のいずれも40 ppb時の選好性よりもやや下回る程度であった。

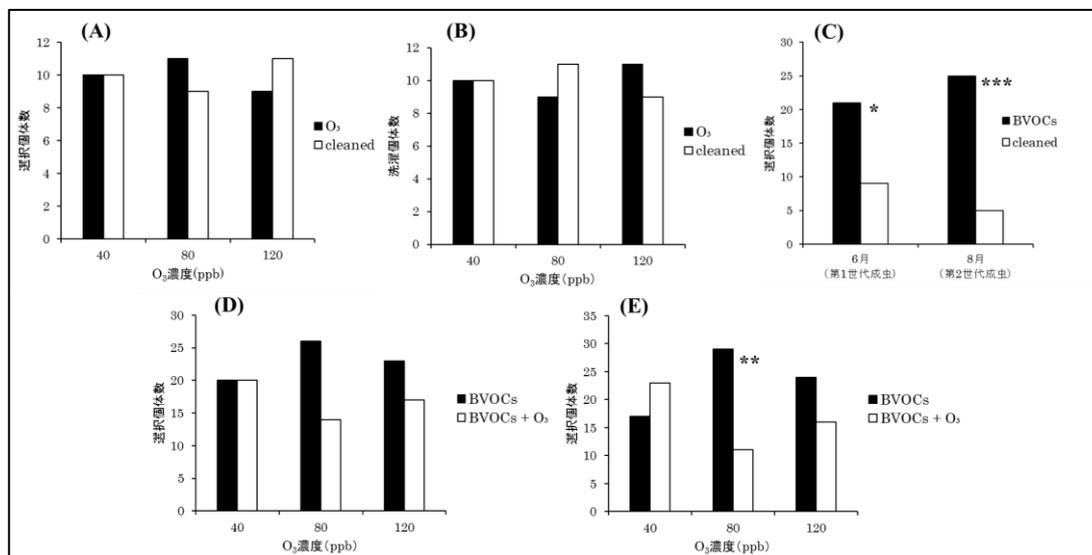


図12 Y字管選好性試験の結果

(A) ハンノキハムシ第1世代成虫及び(B)第2世代成虫に対するO<sub>3</sub>の忌避性検証。(C)ハンノキハムシ成虫に対するBVOCsの選好性検証；任意のO<sub>3</sub>濃度条件下における(D)ハンノキハムシ第1世代成虫及び(E)第2世代成虫に対する選好性試験。統計解析：二項検定  $p > 0.05$  \*； $p > 0.01$  \*\*； $p > 0.001$  \*\*\*。"Cleaned"は清浄化したBVOCs及びO<sub>3</sub>を含まない気体を示す。

BVOC: Biogenic Volatile Organic Compounds；生物起源揮発性有機化合物

表 8 シラカンバの葉から放出される BVOCs 化合物群の放出組成比

化合物群	放出組成 (%)		t検定	
	春葉	夏葉	種類	p値
	6月	9月		
MT	65.24 ± 2.64	96.63 ± 0.27	W	**
OMT	17.12 ± 2.03	2.37 ± 0.09	W	**
SQT	7.97 ± 3.96	0.22 ± 0.05	W	n.s
シアン化物	3.27 ± 0.56	0.17 ± 0.05	W	**
GLV	6.39 ± 0.98	0.61 ± 0.25	W	**
有機酸エステル	-	0.06 ± 0.03	-	-

表中数字は、各放出組成比の平均値 (%) ± SE (n=5) を示す。データ群の等分散性を検証した後、S「student の t 検定」又は W「Welch の t-検定」を行った； $p < 0.01$  \*\*；n.s 有意差なし；- 検出なし。

MT：モノテルペン、OMT：モノテルペンアルコール及びその類縁体、SQT：セスキテルペン、GLV：Glean leaf Volatile（みどりの香り；炭素数 6 個のアルデヒド，アルコール，およびエステル等の揮発性化合物の総称）、BVOC: Biogenic Volatile Organic Compounds（生物起源揮発性有機化合物）

#### 4.3.2 BVOCs 放出速度及び放出組成

シラカンバから放出される BVOCs の化合物群レベルの放出比率では、春葉及び夏葉のいずれも、MT が最も優占していることが認められた（表 8）。但し、MT の放出比率は夏葉（96.6%）が春葉（65.2%）よりも著しく高く、異型葉間で有意に異なった。また、モノテルペンアルコール（e.g., linalool）、シアン化物（geranyl nitrile）、GLVs の組成比も同様に有意に異なることが認められた。有機酸エステル（サリチル酸メチル）は夏葉でのみわずかに放出が認められた。

シラカンバの葉から放出が同定された化合物を、表 9 に示した（代表化合物の構造式及び分子式は図 13 を参照）。夏葉からの合計放出速度 ( $2.12 \text{ nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) は、春葉 ( $0.98 \text{ nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) よりも顕著に高かった。春葉（全 30 成分）、夏葉（27 成分）ともに同定された化合物数は同程度であり、いずれも MT の一種である sabinene が最も優占した。しかし、放出組成は異型葉間で大きく異なっており、春葉と比較して sabinene、*cis/trans*- $\beta$ -ocimene、*trans*-sabinene-hydrate、neo-allo-ocimene は夏葉で有意に増加、hexanal、*cis*-3-hexen-1-ol、linalool oxide、limonene、 $\beta$ -linalool、geranyl nitrile は夏葉で有意に減少した（表 9）。

シラカンバの放出する BVOCs のうち、表 7 で示した  $\text{O}_3$  反応性成分（4.2.5 参照）は *cis/trans*- $\beta$ -ocimene、limonene、2-carene、 $\gamma$ -terpinene、 $\beta$ -linalool、 $\alpha$ -copaene、 $\beta$ -caryophyllene の 8 化合物が認められた。また、これら  $\text{O}_3$  反応性成分の全体の放出組成に占める割合は、春葉（21.6%）と夏葉（25.6%）でいずれも 20%以上が認められた。

表9 シラカンバの葉から放出される BVOCs 各成分の放出組成比

		春葉		夏葉		t 検定	
		6月	9月	種類	p 値		
合計放出速度 (nmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )		0.98 ± 0.18	2.12 ± 0.13	S	**		
化合物名	化合物群						
hexanal	GLV	0.72 ± 0.20	0.15 ± 0.04	W	*		
cis-3-hexen-1-ol	GLV	1.05 ± 0.11	0.46 ± 0.21	S	*		
α-thujene	MT	1.49 ± 0.13	1.57 ± 0.19	S	n.s		
α-pinene	MT	7.50 ± 0.26	7.79 ± 0.23	S	n.s		
camphene	MT	0.24 ± 0.03	0.30 ± 0.03	S	n.s		
sabinene	MT	40.91 ± 2.21	50.13 ± 1.80	S	*		
β-pinene	MT	3.29 ± 0.09	3.50 ± 0.14	S	n.s		
trans-3-hexenyl acetate	GLV	4.01 ± 0.83	-	-	-		
cis-2-hexenyl acetate	GLV	0.59 ± 0.13	-	-	-		
2-carene	MT	0.60 ± 0.08	0.61 ± 0.13	S	n.s		
o-cymene	MT	1.78 ± 0.64	1.62 ± 0.44	S	n.s		
trans-β-ocimene	MT	0.99 ± 0.17	4.33 ± 0.33	S	**		
limonene	MT	0.45 ± 0.01	0.67 ± 0.04	S	*		
β-phellandrene	MT	1.01 ± 0.10	1.02 ± 0.14	S	n.s		
p-Cineole	OMT	1.17 ± 0.44	0.24 ± 0.01	W	n.s		
cis-β-ocimene	MT	4.25 ± 0.80	17.91 ± 1.35	S	**		
γ-terpinene	MT	1.47 ± 0.20	1.47 ± 0.32	S	n.s		
trans-sabinene-hydrate	OMT	0.91 ± 0.12	1.44 ± 0.05	S	**		
linalool oxide	OMT	4.70 ± 0.77	0.51 ± 0.04	W	**		
β-linalool	OMT	10.35 ± 1.93	0.18 ± 0.04	W	**		
geranyl nitrile	CN	3.27 ± 0.56	0.17 ± 0.05	W	**		
neo-allo-ocimene	MT	1.19 ± 0.22	5.71 ± 0.43	S	**		
methyl salicylate	Oa-est	-	0.06 ± 0.02	-	-		
ylangene	SQT	0.90 ± 0.43	0.04 ± 0.01	W	n.s		
α-copaene	SQT	0.73 ± 0.34	0.02 ± 0.01	W	n.s		
β-bourbonene	SQT	1.47 ± 0.62	0.07 ± 0.02	W	n.s		
β-caryophyllene	SQT	0.74 ± 0.32	0.03 ± 0.01	W	n.s		
β-copaene	SQT	0.55 ± 0.28	-	-	-		
aristolene	SQT	2.46 ± 1.45	-	-	-		
α-farnesene	SQT	-	0.03 ± 0.01	-	-		
germacrene	SQT	0.81 ± 0.44	-	-	-		
α-guaiene	SQT	0.31 ± 0.14	0.02 ± 0.01	W	n.s		

表中“合計放出速度”の右欄のみ放出速度 (nmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) ±SE (n = 5) を示す。各成分名右欄の数字は、各放出組成比の平均値 (%) ±SE (n = 5) を示す。データ群の等分散性を検証した後、S「student の t 検定」又は W「Welch の t-検定」を行った；p < 0.05 \*；p < 0.01 \*\*；n.s 有意差なし；- 検出なし。

MT「モノテルペン」、OMT「モノテルペンアルコール及びその類縁体」、SQT「セスキテルペン」、GLV「Glean leaf Volatile；みどりの香り」、Oa-est「有機酸エステル」、CN「シアン化合物」、BVOC: Biogenic Volatile Organic Compounds (生物起源揮発性有機化合物)

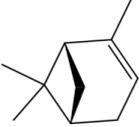
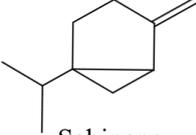
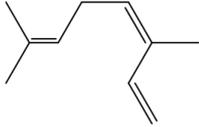
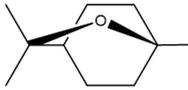
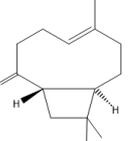
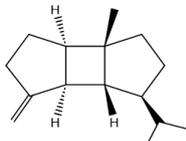
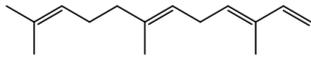
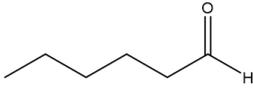
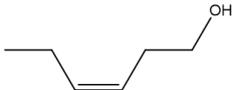
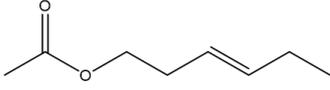
MT	 <i>α</i> -Pinene C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	 Sabinene C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	 <i>cis</i> - <i>β</i> -Ocimene C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
OMT	 Linalool C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	 <i>p</i> -Cineole C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	 Linalool oxide C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
SQT	 <i>β</i> -Caryophyllene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	 <i>β</i> -Bourbonene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	 <i>α</i> -Farnesene C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
GLV	 Hexanal C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	 <i>cis</i> -3-hexen-1-ol C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	 <i>trans</i> -3-hexenyl acetate C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>

図 13 シラカンバの放出する代表的 BVOCs の構造式及び分子式

MT：モノテルペン、OMT：モノテルペンアルコール及びその類縁体、SQT：セスキテルペン、GLV：Glean leaf Volatile、BVOC: Biogenic Volatile Organic Compounds（生物起源揮発性有機化合物）

BVOCs の O<sub>3</sub> 混合試験（図 14）では、式[10]（4.2.5 参照）から O<sub>3</sub> 混合チャンバーにおける BVOCs の平均反応時間は 4.95 ± 0.89 分であった。チャンバーの容積（3 L）に対する供給流量（2 L min<sup>-1</sup>）の値から簡易的に推定される反応時間（3 / 2 = 1.5 分）とやや乖離するものの反応時間は安定しており、BVOCs-O<sub>3</sub> の反応傾向を把握する試験系としては適正であったと判断した。混合前後の比較から、シラカンバから放出された化合物は表 7 の O<sub>3</sub> に対する反応速度係数の順に低減し、O<sub>3</sub> 濃度が 80 ppb 時よりも 120 ppb の減衰率が高くなる傾向が認められた（図 14-A、14-B）。例えば、O<sub>3</sub> に対する反応速度が特に高い *β*-caryophyllene の減衰率は他放出成分よりも明らかに高い値を示し、次いで MT でも O<sub>3</sub> 反応性成分として定義した *β*-ocimene や *β*-linalool が高い減衰率を示した。

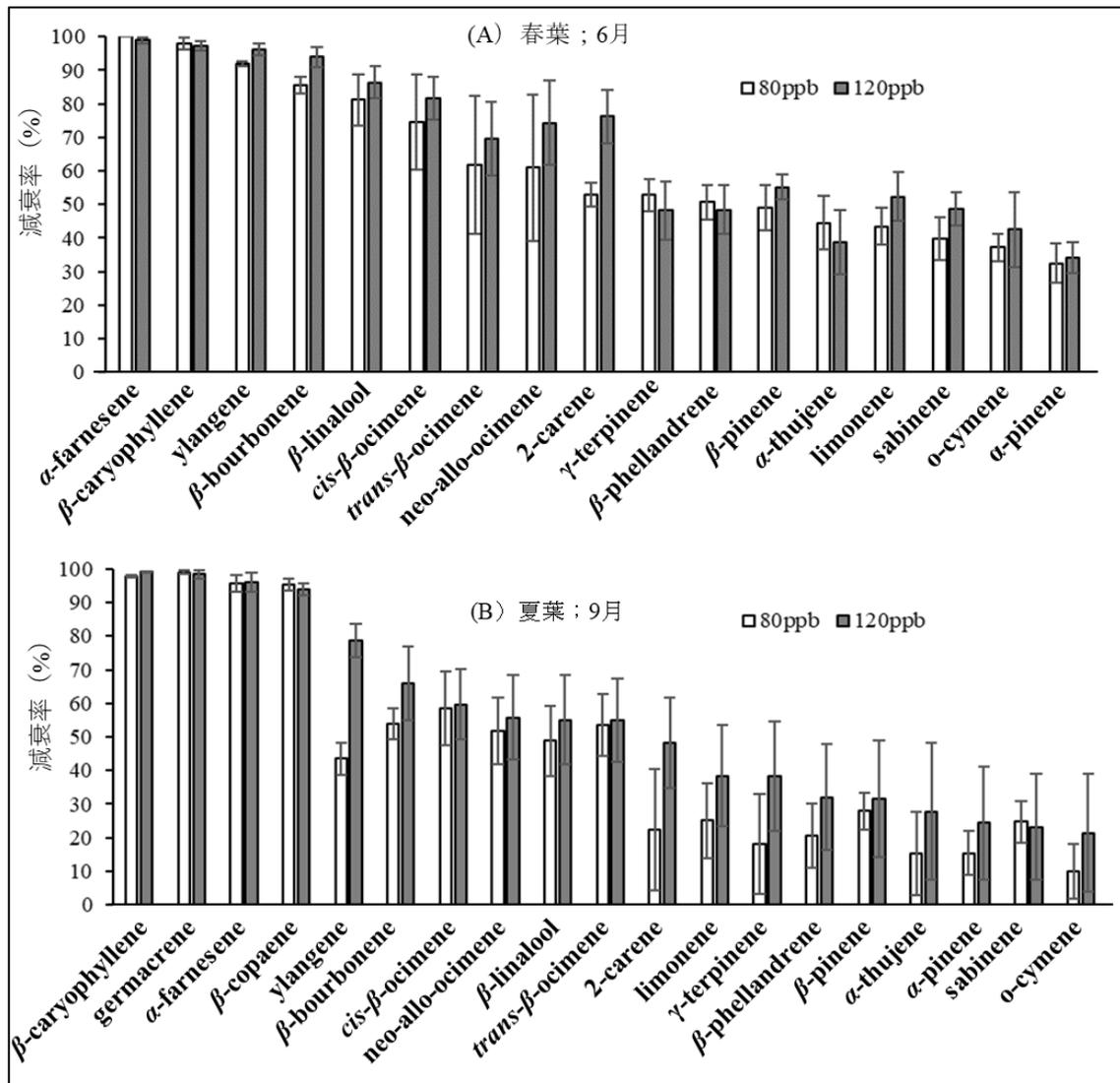


図 14 O<sub>3</sub> 混合による BVOCs 濃度の実測値から計算した減衰率  
 O<sub>3</sub> 濃度 0 ppb において存在する各 BVOCs 成分のトルエン D8 とのピーク面積比を基準とした、各 O<sub>3</sub> 濃度 (80 ppb、120 ppb) 環境へ混合した際の平均減衰率 (%) ±SD (n = 3) を示す。

BVOC: Biogenic Volatile Organic Compounds (生物起源揮発性有機化合物)

## 4.4 考察

### 4.4.1 高濃度 O<sub>3</sub> 環境下におけるハンノキハムシの行動選択

Y 字管試験では、ハンノキハムシはシラカンバの葉から放出される BVOCs を強く選好するものの、大気中の O<sub>3</sub> 濃度が上昇すると BVOCs への選好性が低下する傾向が認められた。先行研究の野外開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設において、ハンノキハムシの食害度が低下した 80 ppb 設定の濃度条件(Agathokleous et al., 2017)においては、特にその傾向が顕著であった。また、O<sub>3</sub> 自体 (≦120 ppb) はハンノキハムシに対して誘引・忌避いずれの影響も認められなかったことから、仮説の通り、BVOCs が O<sub>3</sub> との反応により減衰することで BVOCs の誘引性も低下したと考えられた。

本研究で検出されたシラカンバの葉から放出される BVOCs は、例えば  $\alpha$ -pinene や sabinene など、いずれも多く多くの植物からも放出の認められる一般的な成分で構成されていた。したがって、特定の 1 つの成分だけがハンノキハムシを誘引した可能性は低く、各成分の放出比率が誘引性に寄与していると考えられた。本研究では、O<sub>3</sub> に対する反応速度の大きな成分 (e.g.,  $\beta$ -caryophyllene) から順に、大気中 O<sub>3</sub> 濃度の増加に従って放出後のシラカンバの BVOCs 存在量は減衰することが示唆された (図 14)。特に O<sub>3</sub> 反応性成分に該当する MT (*cis/trans*- $\beta$ -ocimene や linalool) や SQT ( $\beta$ -caryophyllene) の減衰がいずれの季節においても見られることから、O<sub>3</sub> 反応性成分の減衰が BVOCs 放出組成を改変することで、BVOCs 全体としてのハンノキハムシに対する誘引性が低下したと考えられる。

### 4.4.2 BVOCs 由来の酸化生成物による影響

本研究では、80 ppb においてハンノキハムシのシラカンバに対する誘引性が低下したものの、120 ppb では誘引性の低下がより顕著にはならなかった (図 12、図 15)。このような二相性の応答は「BVOCs の減衰」と「酸化生成物の増大」の複合影響が関与している可能性が挙げられる。O<sub>3</sub> による BVOCs の減衰反応は酸化反応であるため、酸化物 (アルデヒド類やアルコール類) が反応の過程で大気中に生成される (Reissell et al., 2002; McFrederick et al., 2008)。例えば、花の芳香にも含まれる benzaldehyde や acetophenone は、複数の昆虫に

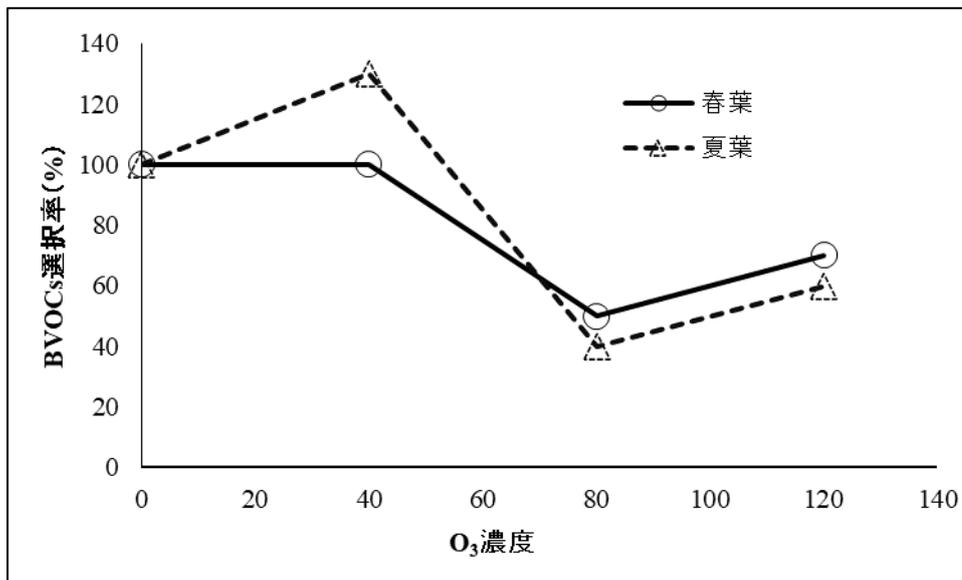


図 15 O<sub>3</sub> 混合によるシラカンバに対するハンノキハムシの選好性変化  
 清浄化した空気 (O<sub>3</sub> 濃度 0 ppb) へ放出された BVOCs 気流への選択率を基準とし  
 た場合の相対選択率を示す。

対して誘引性を示すことが報告されている (Rohrig et al., 2008; El-Sayed et al., 2018)。また、シラカンバの BVOCs のうち最も組成比率の高い sabinene は MT の中で O<sub>3</sub> との反応性は比較的低いものの、その O<sub>3</sub> 酸化物である sabina ketone (Ridgway et al., 2017) は、特定の昆虫の触覚上で強い電氣的応答を示す (Bozsik et al., 2016)。

したがって、80 ppb 以上の O<sub>3</sub> 濃度において BVOCs の誘引率が大きく低下した後に誘引性物質としての酸化生成物の寄与が相対的に大きくなることで、120 ppb のより高濃度な O<sub>3</sub> 環境において BVOCs + O<sub>3</sub> 混合気体の誘引性が低下から増加に転じた可能性がある。但し、本研究の O<sub>3</sub> 混合試験 (図 14) は BVOCs の O<sub>3</sub> に対する反応の傾向を見るための簡易的な評価法であり、酸化生成物の同定には至っていない。また、野外環境における BVOCs の反応時間 (または放出源である植物体からの距離) の設定や、BVOCs の減衰に関わる OH ラジカル及び NO<sub>3</sub> ラジカルの実測、自然拡散による BVOCs 濃度の動態は未検討であり、現実の O<sub>3</sub> 酸化反応のシミュレーションには不十分である。今後、これらの項目から BVOCs 成分の減衰と酸化生成物増加のバランスによる上記の選好性変化の仮説を検証することで、高濃度 O<sub>3</sub> 環境下におけるより詳細な虫害評価系の確立が期待される。

## 第 5 章 樹種間の BVOCs 放出組成比較による誘引組成探索

### 5.1 目的

第 4 章において、シラカンバが放出する BVOCs が大気中に放出された後に高濃度の O<sub>3</sub> と反応し減衰することで、ハンノキハムシに対する誘引性が低下することが示唆された (Masui et al., 2020)。また、シラカンバから放出された BVOCs のうち各成分の O<sub>3</sub> に対する反応速度係数から、誘引性低下の原因となる候補成分 (O<sub>3</sub> 反応性成分 : 表 7 参照) を見出した。しかし、BVOCs の昆虫に対する誘引性を成すのは O<sub>3</sub> 反応性成分だけではなく、その他の成分も含めた全体の組成である (Bruce et al., 2005)。したがって、どの様な BVOCs 組成がハンノキハムシに対して誘引性の香気シグナルとして機能しているのかを解明することが重要である。

シラカンバは春葉 (6 月)、夏葉 (9 月) のいずれも放出成分数は 30 化合物を超えており、どの成分の組み合わせ及び組成比がハンノキハムシに対して有効であるのか特定することは困難である。そこで、本章ではハンノキハムシが食害する複数のカバノキ科樹種に関して、BVOCs の香気シグナルとしての誘引性を検証した後、GC-MS 分析により BVOC 放出組成の類似性を解析した。ハンノキハムシはその名の通り、ハンノキ類やカバノキ科樹種を好んで食害する狭食性昆虫 (スペシャリスト ; specialist) である。樹木全般を加害する広食性害虫 (ジェネラリスト ; generalist) よりも、狭食性昆虫は適応可能な宿主を明確に特定する必要があることから (Ali and Agrawal, 2012)、食害対象とするカバノキ科樹木ではハンノキハムシが選好する BVOCs 放出組成の類似性が存在すると仮説を立てた。

### 5.2 実験材料と方法

#### 5.2.1 植物材料

ハンノキハムシに対する食害対象樹種として、シラカンバ (接ぎ木苗 ; 4.2.1 参照)、ハンノキ (*Alnus japonica* (Thunb.) Steud. ; トオヤマグリーンより購入)、ヤマハンノキ (*Alnus hirsuta* Turcz. var. *sibirica* (Spach) C.K.Schneid. ; トオヤマグリーンより購入) の各 5 個体の苗木 (樹高約 1 m 程度) を用いて各樹種から放出される BVOCs を測定した。また、非食害対象樹種として、北海道内の森林でシラカンバやハンノキ類と同環境に生育している 2 樹種 ; ナナカマド (*Sorbus commixta* Hedl.) 及びヤマグワ (*Morus bombycis* Koidz.) を選定し (図 16)、札幌研究林実験苗畑内に生育する若齢木 (各 5 個体) から枝を切り取り試験に供試した。食害対象樹種の苗はいずれも温室内で管理し、ハンノキハムシを含む昆虫の

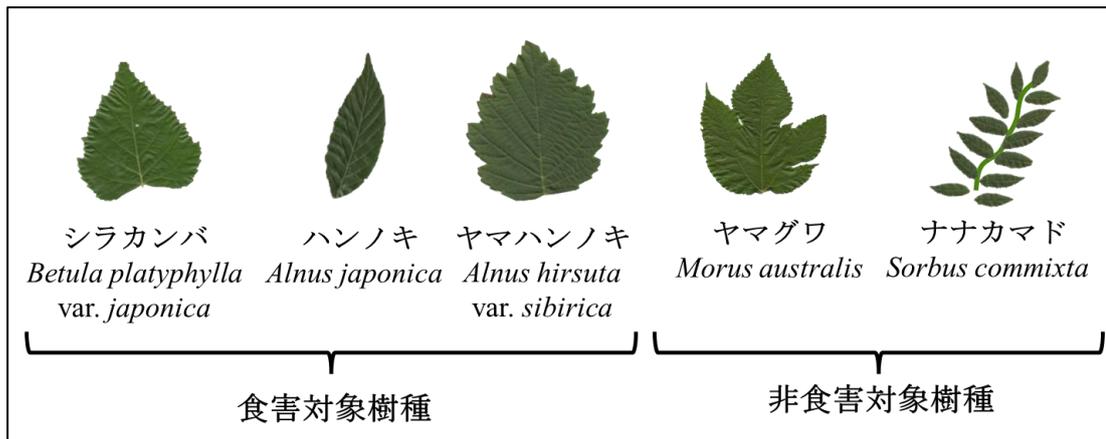


図 16 ハンノキハムシの食害対象樹種及び非食害対象樹種  
 その他樹種の例も野外では存在するが、本研究では上記 5 樹種の BVOCs 放出を測定し、放出組成の類似性を解析した。

食害影響を排除した。なお、非食害対象樹種に関して、予備試験として摂食試験（室内試験）を行ったところ、ハンノキハムシは成虫・幼虫のいずれも非食害対象樹種の葉を摂食しなかった。

### 5.2.2 試験昆虫

BVOCs 選好性試験を開始する 3 日前に、札幌研究林実験苗畑に生育するシラカンバ上からハンノキハムシ成虫を採集した。採集したハムシは、4.2.2 と同様に、シラカンバの切り枝を餌として、25°C (16L:8D) の飼育ケージ内で飼育した。なお、各試験個体は、BVOCs 選好性試験の直前 2 時間を絶食期間とした。

### 5.2.3 BVOCs 選好性試験（Y 字管試験）

食害対象 3 樹種（シラカンバ、ハンノキ、ヤマハンノキ）及び食害非対象 2 樹種（ナナカマド、ヤマグワ）に関して、Y 字型試験管を用いた BVOCs 選好性試験を行った。試験方法や試験環境は、4.2.3 の試験項目(2)と同様である。

### 5.2.4 BVOCs サンプルング及び定性・定量分析（多樹種比較）

BVOCs のサンプルングは枝チャンバー法を採用した。測定環境は、4.2.4 と同様である。本章では、いずれの樹種もハンノキハムシ成虫の生活史に合わせ、6 月（第 1 世代成虫）及び 9 月（第 2 世代成虫）に BVOCs のサンプルングを行った。各樹種における反復は 5 個体であるものの、6 月はヤマハンノキの 1 個体で展葉がやや遅れたため、ヤマハンノキ

に限り反復は4個体であった。

自動加熱脱着装置付きガスクロマトグラフ質量分析計を用いて、採取した BVOCs の定性および定量分析を行った。GC-MS の分析条件及び放出速度 ( $E$ ;  $\text{nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) の算出は、2.2.3 と同様である。本章では、樹種間の放出組成の類似性に焦点を当てているため、いずれの樹種に関しても各成分の放出比率 (= 各成分の放出量 / 全体の放出量  $\times 100$ ) を算出した。本章では全放出成分のうち、いずれの樹種からも放出が認められる BVOCs を「共通化合物」として選定した。各樹種における共通化合物の放出組成比の和を 100% と見做し、各共通化合物の放出組成比を補正した。例えば、化合物 A (共通化合物の 1 つ) の放出組成比が 20.0%、共通化合物の合計放出組成比が 80.0% の時、化合物 A の補正後放出組成比は 25.0% ( $= 20.0 * 100 / 80.0$ ) である。

### 5.2.5 統計解析

各樹種の BVOCs 選好性試験 (Y 字管選好性試験) では、BVOCs 又は浄化空気に対するハンノキハムシ成虫の選択性を二項検定により解析した ( $\alpha = 0.05$ )。GC-MS 分析により算出した BVOCs の放出速度及び放出比率に関して、等分散性の検定 ( $\alpha = 0.05$ ) を行った後、各樹種の異型葉間差 (6 月: 春葉、9 月: 夏葉) を t-検定 (Student または Welch の t-検定;  $\alpha = 0.05$ ) により解析した。また、PERMANOVA (並び替え 999 回) 検定により、各樹種の季節間の BVOCs 組成の類似性を比較した。さらに、共通化合物の補正後組成比率に基づき、Pairwise-PERMANOVA 検定により樹種間の BVOCs 組成の類似性を解析した。樹種間の BVOCs 組成の類似性は、Bray-Curtis 距離に基づく二次元の非計量多次元尺度法 (NMDS; Non-metric Multidimensional Scaling) により視覚化した。NMDS は、多次元のデータ (多変量データ) で構成される多数の点を、類似した点同士は近くなるように低次元 (本論文では二次元平面; 軸-NMDS1 及び軸-NMDS2) へ配置し直し、群集間の類似性を視覚化する手法である。本章における統計解析は、いずれも統計ソフト R v.3.6.3 を使用した。

## 5.3 結果

### 5.3.1 BVOCs 選好性試験 (Y 字管試験)

ハンノキハムシの第 1 世代成虫は、食害対象樹種 (シラカンバ、ハンノキ、ヤマハンノキ) 由来の BVOCs を好む傾向を示した (図 17-A)。一方、非食害対象樹種として選定したナナカマド ( $p = 0.58$ ) 及びヤマグワ ( $p = 0.58$ ) は選好 / 忌避いずれの応答も示さなかつ

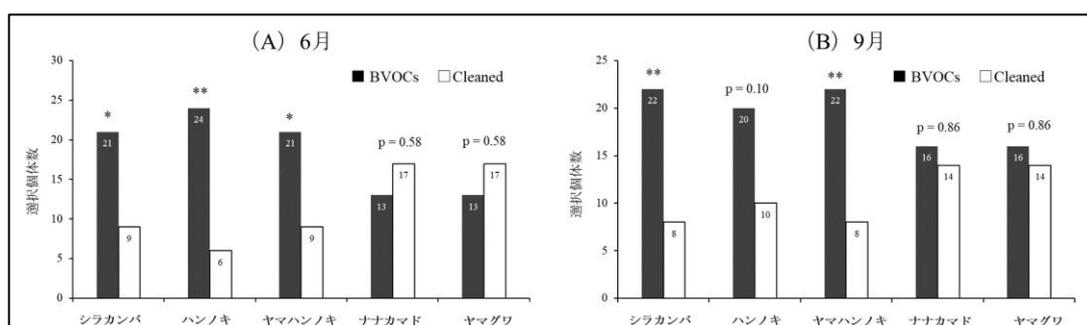


図 17 ハンノキハムシ成虫の各樹種 BVOCs に対する誘引性試験

各樹種の葉から放出される BVOCs に対する (A) ハンノキハムシ第 1 世代成虫 ; 6 月、(B) ハンノキハムシ第 2 世代成虫の選択個体数を示す。統計解析は二項検定を行った ;  $p > 0.05$  \* ;  $p > 0.01$  \*\*。 ”Cleaned” は清浄化した BVOCs 及び  $O_3$  を含まない気体を示す。BVOC: Biogenic Volatile Organic Compounds ; 生物起源揮発性有機化合物

た。第 2 世代成虫 (9 月) も同様に食害対象樹種由来の BVOCs を選好する傾向を示し、非食害対象樹種には応答を示さなかった (図 17-B)。したがって、ハンノキハムシ成虫は食害対象となる植物を BVOCs によって区別していることが認められた。

### 5.3.2 BVOCs 放出の樹種間類似性

GC-MS 分析により算出された各樹種の BVOCs 放出組成に関して、表 10 に示す。放出成分数は、6 月及び 9 月のいずれもシラカンバで最も多く認められた。また、シラカンバにおいて 9 月の合計放出速度が 6 月よりも有意に高かった ( $p < 0.01$ ) 一方で、その他の樹種 (ハンノキ、ヤマハンノキ、ヤマグワ、ナナカマド) では合計放出速度の季節間差は認められなかった。

BVOCs の放出組成に着目した場合、PERMANOVA 検定において、いずれの樹種でも季節間差が認められた ; シラカンバ ( $F_{1,8} = 22.51, p < 0.01$ )、ヤマハンノキ ( $F_{1,7} = 6.40, p < 0.01$ )、ハンノキ ( $F_{1,8} = 12.73, p < 0.01$ )、ナナカマド ( $F_{1,8} = 3.22, p < 0.01$ )、ヤマグワ ( $F_{1,8} = 4.70, p < 0.01$ )。特に、シラカンバでは 11 化合物 ( $p < 0.05$ : hexanal, *cis*-3-hexen-1-ol, sabinene, limonene;  $p < 0.01$  : *cis/trans*- $\beta$ -ocimene, *trans*-sabinene-hydrate, linalool oxide,  $\beta$ -linalool, geranyl nitrile, neo-allo-ocimene) の放出組成が季節間 (異型葉間) で有意に異なった。その他の樹種では、ナナカマドの 1 化合物 ( $p < 0.05$ : geranyl nitrile)、ヤマハンノキの 2 化合物 ( $p < 0.01$  : sabinene,  $\beta$ -linalool)、ハンノキの 4 化合物 ( $p < 0.05$  : sabinene,  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -phellandrene, *cis*- $\beta$ -ocimene)、ヤマグワの 4 化合物 ( $p < 0.05$ : *cis*- $\beta$ -ocimene,  $\beta$ -linalool, methyl salicylate;  $p < 0.01$ : geranyl nitrile) の放出組成が季節間で有意に異なり、シラカンバよりも放出組成の変動は小さかった。



表 11 各樹種における BVOCs の放出組成（化合物群単位）

(A) 6月	シラカンバ	ヤマハンノキ	ハンノキ	ヤマグワ	ナナカマド
合計放出速度 (nmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	0.98 ± 0.18	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.02	1.86 ± 1.39
MT	65.25 ± 2.64	9.66 ± 4.22	4.59 ± 1.32	5.32 ± 1.39	2.34 ± 1.39
OMT	17.11 ± 2.03	8.58 ± 1.40	13.32 ± 1.88	16.96 ± 4.13	3.57 ± 2.66
SQT	7.97 ± 3.96	20.57 ± 6.76	0.84 ± 0.26	3.66 ± 1.30	2.33 ± 1.34
シアン化物	3.27 ± 0.56	17.32 ± 4.98	13.56 ± 5.86	4.63 ± 0.62	1.37 ± 0.47
GLV	6.39 ± 0.98	43.86 ± 13.18	66.91 ± 8.11	60.30 ± 2.65	90.24 ± 5.82
有機酸エステル	-	-	0.80 ± 0.30	9.13 ± 2.59	0.16 ± 0.08
(B) 9月	シラカンバ	ヤマハンノキ	ハンノキ	ヤマグワ	ナナカマド
合計放出速度 (nmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	2.12 ± 0.13	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	7.15 ± 6.66	16.48 ± 6.75
MT	96.57 ± 0.27	25.61 ± 6.41	35.21 ± 6.04	1.79 ± 0.985	0.07 ± 0.02
OMT	2.37 ± 0.09	25.21 ± 3.39	16.45 ± 6.70	1.02 ± 0.520	0.08 ± 0.03
SQT	0.22 ± 0.05	14.72 ± 5.40	2.80 ± 0.66	4.25 ± 2.842	0.03 ± 0.01
シアン化物	0.17 ± 0.05	30.22 ± 6.03	18.57 ± 7.13	0.84 ± 0.441	0.05 ± 0.02
GLV	0.61 ± 0.25	-	24.81 ± 7.80	91.52 ± 5.158	99.71 ± 0.08
有機酸エステル	0.06 ± 0.02	4.25 ± 1.31	2.17 ± 0.57	0.58 ± 0.400	0.06 ± 0.02

表中数字は、合計放出速度に対する各化合物の放出比率 (%) ±SE を示す。n = 5。

MT: モノテルペン、OMT: モノテルペンアルコール及びその類縁体、SQT: セスキテルペン、GLV: Glean leaf Volatile、“-”: 検出なし、BVOC: Biogenic Volatile Organic Compounds; 生物起源揮発性有機化合物

BVOCs 選好性試験の結果 (5.3.1 参照) から、ハンノキハムシは野外の食害傾向と同様にカバノキ科樹種を好んで選択することが認められた。したがって、カバノキ科樹種には BVOCs 放出組成の類似性がある可能性が示唆された。そこで、化合物群単位で BVOCs 組成を比較したところ、シラカンバでは6月の春葉で MT 放出が最も優勢であったのに対し、他の樹種ではカバノキ科ハンノキ類を含めて MT 放出比率は小さく、明らかに放出組成が異なった (表 11-A)。9月の夏葉では、シラカンバの MT 放出比率は春葉よりも明らかに高かった (65.3%→96.6%)。また、ハンノキ類 (ハンノキ、ヤマハンノキ) の MT 放出比率も6月から9月にかけて増加したものの、モノテルペンアルコールの放出比率が低いシラカンバとは明らかに放出組成が異なった (表 11-B)。非食害対象樹種は6月、9月のいずれも MT 放出比率は低かった。

次に、化合物単位で樹種間の放出組成を比較した。共通化合物 (5.2.4 参照) の補正後放出比率に基づき Pairwise-PERMANOVA 検定を行ったところ、6月 ( $F_{1,7} = 1.24$ ,  $p = 0.311$ ) 及び9月 ( $F_{1,8} = 2.01$ ,  $p = 0.180$ ) いずれの季節においてもハンノキ属間 (ヤマハンノキ及びハンノキ) のみ類似性が認められた (表 12-A、12-B)。しかし、シラカンバと各ハンノキ類の放出組成はいずれも有意に異なった。これらの放出組成の類似性又は相違性は NMDS 図でも示され、6月ではハンノキ類2種のプロットが明らかに重複しており、geranyl

表 12 各樹種における BVOCs の放出組成に対する Pairwise-PERMANOVA 検定

(A) 6 月					
検定組み合わせ		df	F 値	p 値	
シラカンバ	-	ハンノキ	1,8	41.55	*
	-	ヤマグワ	1,8	86.58	*
	-	ナナカマド	1,8	184.57	*
	-	ヤマハンノキ	1,7	17.12	*
ハンノキ	-	ヤマグワ	1,8	2.74	*
	-	ナナカマド	1,8	10.68	*
	-	ヤマハンノキ	1,7	1.24	n.s
ヤマグワ	-	ナナカマド	1,8	6.99	*
	-	ヤマハンノキ	1,7	4.59	*
ナナカマド	-	ヤマハンノキ	1,7	11.41	*

(B) 9 月					
検定組み合わせ		df	F 値	p 値	
シラカンバ	-	ハンノキ	1,8	14.30	*
	-	ヤマグワ	1,8	70.90	*
	-	ナナカマド	1,8	30.20	*
	-	ヤマハンノキ	1,8	45.57	*
ハンノキ	-	ヤマグワ	1,8	8.33	*
	-	ナナカマド	1,8	4.72	*
	-	ヤマハンノキ	1,8	2.01	n.s
ヤマグワ	-	ナナカマド	1,8	3.76	*
	-	ヤマハンノキ	1,8	4.55	*
ナナカマド	-	ヤマハンノキ	1,8	3.16	*

検定に使用した放出組成比は、5 樹種全てで放出の認められる化合物の合計放出組成比を 100%と仮定した際の補正值とした； $0.01 \leq p < 0.05$  \*, n.s 有意差なし。

nitrile を代表として高い類似性が認められた (図 18-A)。一方、シラカンバはハンノキ類とは明らかに離れた位置にプロットされ、Pairwise-PERMANOVA 検定と同様に類似性は認められなかった。9 月では、ハンノキ類のプロットも重複はしていないものの、シラカンバとの距離と比較してハンノキ類は放出組成が近い関係にあることが認められた (図 18-B)。

以上の結果から、「食害対象樹種群内では、ハンノキハムシが選好する BVOCs の放出組成には類似性がある」という仮説はハンノキ類でのみ立証されたものの、シラカンバに関しては適用されなかった。また、共通化合物に基づく放出組成の相違性に加え、シラカンバの 6 月の春葉で 8 化合物 ( $\alpha$ -thujene, 2-carene, o-cymene, *trans*- $\beta$ -ocimene, limonene,  $\gamma$ -

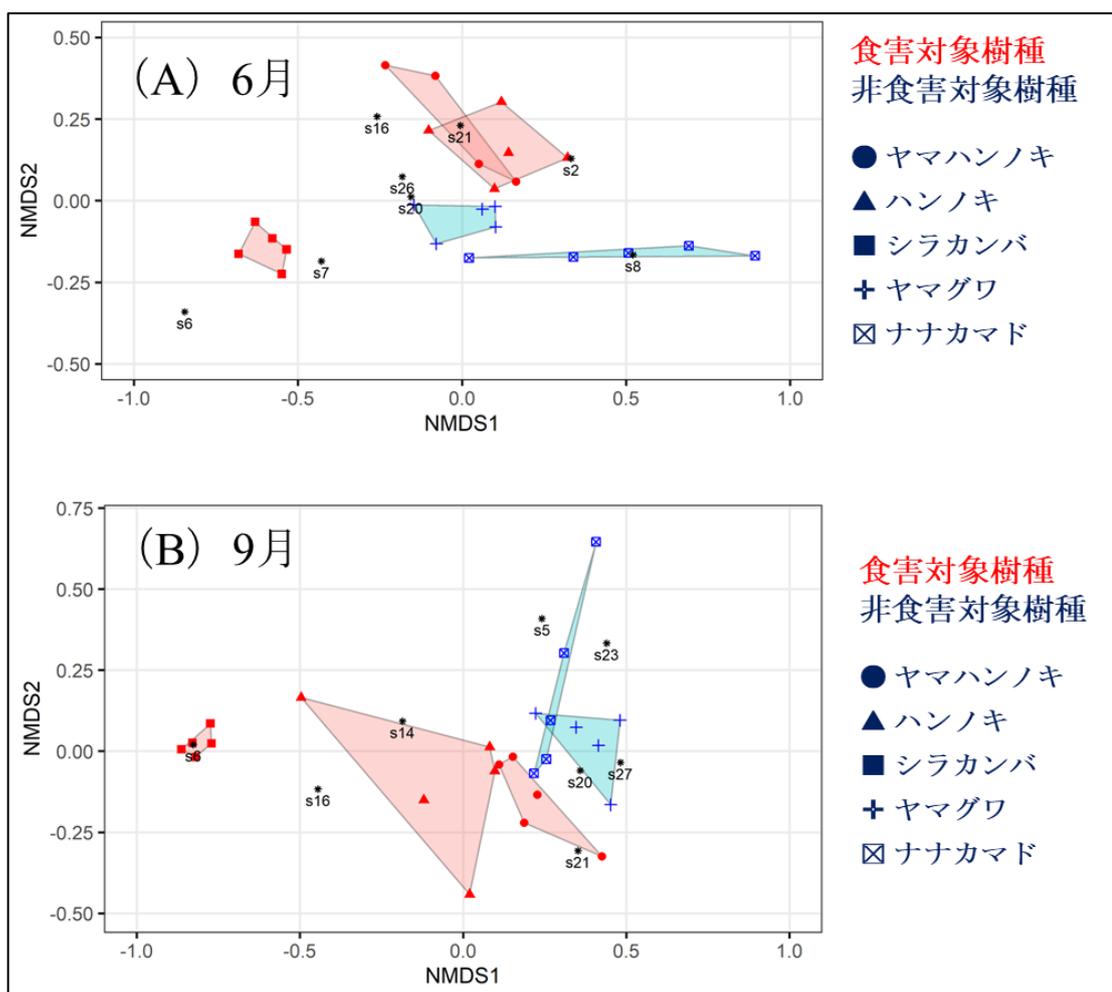


図 18 非計量多次元尺度構成法による樹種間の BVOCs 放出組成における類似性 Bray-Curtis 距離に基づく二次元の非計量多次元尺度法 (NMDS ; Non-metric Multidimensional Scaling) を用いた。NMDS に使用した放出組成比は、5 樹種全てで放出の認められる化合物の合計放出組成比を 100% と仮定した際の補正值とした。  
s2: *cis*-3-hexen-1-ol, s5: camphene, s6: sabinene, s7:  $\beta$ -pinene, s8: *trans*-3-hexenyl acetate, s14:  $\beta$ -phellandrene, s16: *cis*- $\beta$ -ocimene, s20:  $\beta$ -linalool, s21: geranyl nitrile, s23: methyl salicylate, s26:  $\beta$ -bourbonene, s27:  $\beta$ -caryophyllene

terpinene, neo-allo-ocimene, camphene, and *p*-cineole)、9 月の夏葉で 5 化合物 (2-carene, limonene, *p*-cineole,  $\beta$ -linalool oxide and  $\alpha$ -guaiene) がシラカンバのみから放出された成分であった。したがって、シラカンバは食害対象樹種の中でも、BVOCs 放出組成の観点から少なくともハンノキ類とは全く異なる樹種であることが示唆された。

### 5.3.3 カバノキ科樹種における BVOCs の O<sub>3</sub> 反応性

「O<sub>3</sub> 反応性成分」(4.2.5 参照) に関して、カバノキ科樹種からの放出を表 13 に示す。カバノキ科樹種では、6 月にシラカンバとヤマハンノキで合計放出比率 20% 程度の高い O<sub>3</sub> 反

表 13 カバノキ科樹木における O<sub>3</sub> 反応性 BVOCs の放出比率

(A) 6 月	シラカンバ	ヤマハンノキ	ハンノキ
合計放出比率 (%)	19.58 ± 1.98	25.37 ± 5.91	8.84 ± 2.43
<i>β</i> -caryophyllene	0.74 ± 0.32	6.40 ± 2.45	-
( <i>E</i> ) or ( <i>Z</i> )- <i>β</i> -ocimene	5.24 ± 0.97	6.98 ± 3.62	3.49 ± 1.38
<i>β</i> -linalool	10.33 ± 1.93	8.58 ± 1.39	5.24 ± 1.69
2-carene	0.60 ± 0.08	-	-
limonene	0.45 ± 0.06	-	-
<i>α</i> -copaene	0.73 ± 0.34	1.66 ± 0.52	0.11 ± 0.04
<i>γ</i> -terpinene	1.47 ± 0.20	-	-
(B) 9 月	シラカンバ	ヤマハンノキ	ハンノキ
合計放出比率 (%)	25.24 ± 1.65	42.95 ± 3.68	37.33 ± 6.39
<i>β</i> -caryophyllene	0.03 ± 0.01	5.89 ± 2.89	1.16 ± 0.33
( <i>E</i> ) or ( <i>Z</i> )- <i>β</i> -ocimene	22.25 ± 1.66	11.97 ± 3.55	20.03 ± 4.01
<i>β</i> -linalool	0.18 ± 0.04	24.31 ± 3.28	15.40 ± 6.77
2-carene	0.61 ± 0.13	-	-
limonene	0.67 ± 0.04	-	-
<i>α</i> -copaene	0.02 ± 0.01	0.78 ± 0.22	0.29 ± 0.15
<i>γ</i> -terpinene	1.47 ± 0.32	-	0.46 ± 0.13

表中数字は、合計放出速度に対する各化合物の放出比率 (%) ; ±SE) を示す ; n = 5 (6 月のヤマハンノキは n = 4) 、 - : 放出なし。

反応性成分の放出比率が認められた。ハンノキでは当該合計放出比率自体は他 2 種よりも低かったものの (8.84%)、その組成の大部分は O<sub>3</sub> との反応速度が高い *β*-ocimene や *β*-linalool で占められた。9 月には、いずれのカバノキ科樹種も O<sub>3</sub> 反応性成分の放出比率は増加し、特にハンノキ属 2 種における増加傾向が顕著だった。また、シラカンバでは 6 月 (春葉)、9 月 (夏葉) のいずれも O<sub>3</sub> 反応性成分としての 2-carene と limonene が放出された。O<sub>3</sub> 曝露環境下におけるシラカンバのハンノキハムシに対する誘引性の低下は O<sub>3</sub> 反応性成分が BVOCs の誘引性を構成する候補であることを示唆しており、上記 *cis/trans-β*-ocimene や *β*-linalool に加え、2-carene と limonene がシラカンバにおける誘引性を構成していることが示唆された。

## 5.4 考察

### 5.4.1 BVOCs 放出組成の類似性と生物学的意義

シラカンバは、他の食害対象樹種であるハンノキ類と比較しても BVOCs の量的（放出速度）及び質的（放出組成）変化が季節間で大きかった。これは、6月の春葉と9月の夏葉では光合成速度、防御物質など生理機能が異なる(Matsuki et al., 2004; Hoshika et al., 2013)ことと同様に、シラカンバの異型葉性に起因するものであると考えられる。ハンノキ類は BVOCs 放出速度に季節間の変化は認められないものの、放出組成はシラカンバと同じく有意に異なった。ハンノキハムシの生活史(図6)において、第2世代成虫(9月)は冬眠前の成虫自身の餌資源を探索するのに対し、第1世代成虫(6月)は繁殖活動及び産卵場所の探索を行う。特に、幼虫は孵化した場所からの移動性は低いことから、幼虫の食害場所は第1世代成虫の産卵場所に依存する。したがって、ハンノキハムシ成虫の各世代で植物探索の意義は異なっており、ハンノキハムシ成虫は出現する時期に合わせてそれぞれ異なる BVOCs 放出組成を検知していることが示唆された。なお、本研究では同ハンノキ属のハンノキ及びヤマハンノキが類似の BVOCs 放出組成を示したものの、同属樹種が必ずしも同様の放出挙動を示すわけではない。例えば、ブナ科コナラ属(*Quercus*)の落葉広葉樹種はコナラ(*Q. serrata* Murray)やミズナラ(*Q. mongolica* Fisch. ex Ledeb. var. *crispula* (Blume) H. Ohashi)が大きなイソプレン放出源であるが、アベマキ(*Q. variabilis* Blume)やウバメガシ(*Q. phillyraeoides* A. Gray)等は MT 放出樹種である(Mochizuki et al., 2020)。さらに、日本に広く生育する同ブナ科のブナ(*Fagus crenata* Blume)が BVOCs を放出しないのに対し、ヨーロッパブナ(*F. sylvatica* L.)は MT 放出種である(Tani and Mochizuki, 2021)。したがって、食害対象となる同属の樹種から放出される BVOCs の放出組成が類似することは、昆虫による植物探策において貴重なシグナルである。

通常、植食性昆虫による被害は、餌としての葉に対する当該昆虫の摂食嗜好性により説明される。例えば、カバノキ科樹木のツノハシバミ(*Corylus sieboldiana* Blume)は、ハンノキハムシ幼虫の強制摂食試験ではハンノキ類同等の被食害率を示したものの、選択式摂食試験ではハンノキ類に対して幼虫の食害は集中した(Park et al., 2004)。また、本研究で使用したヤマハンノキに極めて近縁なケヤマハンノキ(*A. hirsuta*)の葉は、シラカンバの葉(生残率≒80.0%)よりもハンノキハムシ幼虫の生育を向上させる(生残率≒100%)ことが報告されている(及川ら 2012)。しかし、ハンノキハムシ幼虫の食害場所は成虫の産卵場所に依存することから、成虫の樹種選択が特に重要である。この点において、幼虫の摂

食嗜好性とリンクした成虫の植物選択が、ハンノキハムシ(Park et al., 2004)を含む多くの昆虫で認められる。本研究で認められたシラカンバとハンノキ類の BVOCs の放出組成差は、BVOCs 組成に基づく樹種識別を介してハンノキハムシの生存戦略に寄与していると考えられる。なお、本研究のハンノキハムシを採集した札幌研究林実験苗畑ではハンノキ類の優占度は低く、食害は優占樹種であるシラカンバに集中して認められた(図 10、図 19)。餌として一定以上の質が担保されている場合、量的要素(生育地域内の優占度、BVOCs の集団としての放出量)も嗜好性に組み込まれている可能性が挙げられる。

今後、本研究で使用したカバノキ科樹木に関して、「ハンノキハムシ幼虫の摂食嗜好性」、「同成虫の摂食・産卵嗜好性」、「BVOCs に対する同成虫の選好順位」を検証し、BVOCs 放出の類似性/相違性が生み出す生物学的意義を解明することが求められる。

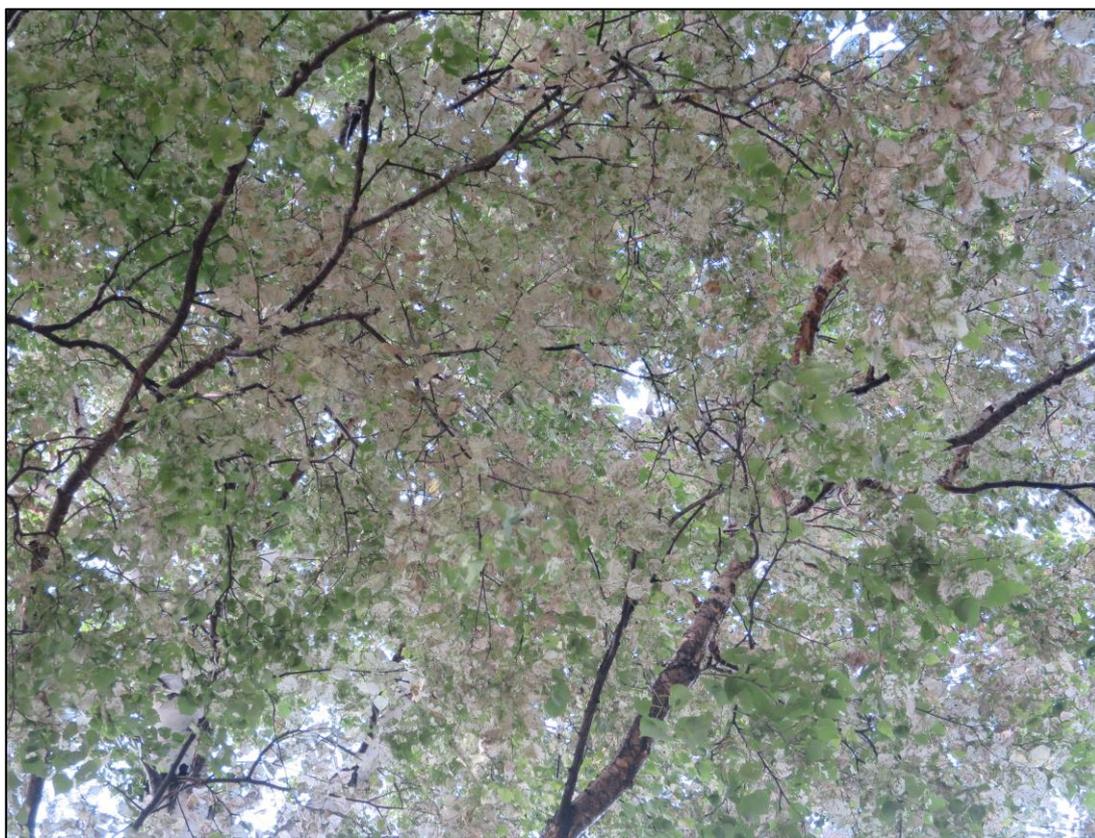


図 19 ハンノキハムシによるシラカンバの激害(北海道大学札幌研究林実験苗畑)実験苗畑内におけるハンノキハムシの食害対象樹種はシラカンバが最も優占しており、ハンノキ類の優占度はわずかだった。

#### 5.4.2 シラカンバにおけるハンノキハムシ誘引成分と展望

本研究では、シラカンバは同じく食害対象樹種であるハンノキ類と類似した放出組成が認められることを仮定し、その類似性がハンノキハムシに対する食害対象としての誘引性に寄与していると想定していた。しかし、本研究で明らかになった様に、シラカンバの BVOCs 放出組成はハンノキ類と著しく異なった。したがって、シラカンバに関しては、ハンノキ類とは独立して誘引組成を探索する必要がある。シラカンバは、MT 放出樹種であることが認められたが、O<sub>3</sub> 反応性成分である  $\beta$ -ocimene や linalool の他、食害対象樹種のうちシラカンバでのみ放出が認められた 2-carene や limonene が候補成分として挙げられる。これら候補成分の誘引性を検証するために、標準試薬を用いた BVOCs 選好性試験が有効である。

第一に、本研究でも用いた BVOCs 選好性試験 (Y 字管試験) によって、各候補成分単独のハンノキハムシ成虫に対する誘引性を濃度別に検証する。第 1 章 (序論) で述べた様に、個々の成分自体が BVOCs 全体と同等の誘引性を示すケースはあまり認められない (Bruce and Pickett, 2011; Zhang, 2018)。よって、単独成分検証の後、候補成分の組み合わせにおける誘引性検定を実施する。その後、人工的に再現した BVOCs 組成に対して任意の O<sub>3</sub> 濃度環境に暴露することで、第 3 章の実験で認められた選好性低下の再現性が得られるかの検証を行う。なお、候補成分の詳細なスクリーニングにおいて有用であるのが、昆虫触角電位検出付き GC (GC-EAD ; gas chromatography-electroantennography) である。放出組成比率が高いことが必ずしも当該昆虫に対して誘引的であるとは限らない。GC-EAD を使用することで、BVOCs 放出成分のうち、昆虫の触覚が電位的に応答している成分のみを検出することが可能である (Pawlowski et al., 2020)。但し、GC-EAD 上でピークがないことは昆虫に対して何の機能も示さないことを意味する一方で、ピーク化合物が「誘引性か忌避性」の判断をすることは出来ない。したがって、従来の BVOCs 選好性試験と GC-EAD を同時に評価することで、候補成分のスクリーニングを正確かつ効率的に進めることが期待される。

#### 5.4.3 高濃度 O<sub>3</sub> 環境下の植物-昆虫間コミュニケーションにおける BVOCs 放出組成の影響

カバノキ科の食害対象樹種では、シラカンバだけでなく他ハンノキ類においても、O<sub>3</sub> 反応性成分の一定比率以上の放出が認められた。このことから、シラカンバとハンノキハムシ間の関係と同様に、ハンノキハムシに対するハンノキ類の誘引性も高濃度 O<sub>3</sub> 環境下で

低下する可能性が示唆された。但し、樹種間の BVOCs 組成が異なるということは、O<sub>3</sub> に対する反応速度も異なることを意味する。

第一に、ハンノキ類の BVOCs 放出速度はシラカンバと比較して明らかに低いものの、BVOCs 選好性試験ではハンノキハムシ成虫は各食害対象樹種の BVOCs を検出した(表 10、図 17)。したがって、ハンノキ類の BVOCs 放出速度は、ハンノキハムシ成虫における BVOCs 検出の閾値を満たしている。但し、放出速度の絶対値が低いということは、大気中の O<sub>3</sub> と BVOCs が反応した場合に、閾値以下の存在量になるまでの滞留時間が短いことを意味する。さらに、ハンノキ類の BVOCs 放出は、*cis/trans-β-ocimene* や *β-linalool* など O<sub>3</sub> に対する反応速度係数が高い化合物への依存が大きい(表 7、表 13)。したがって、上記化合物が香気シグナルとしての誘引性を成す場合、ハンノキ類はシラカンバ以上に高濃度 O<sub>3</sub> 環境下でハンノキハムシに対する誘引性を低下させる可能性がある。一方、5.4.1 で述べた様に、ハンノキハムシは BVOCs に対して複数の選好性、優先順位を示すことが示唆された。したがって、一方の食害対象樹種の誘引性がある O<sub>3</sub> 濃度下で著しく低下した場合に、誘引性を維持している他の食害対象樹種に食害が集中することが想定される。ハンノキ類が実際に第一選好樹種である場合、第二位以降の選好樹種への食害の移行は、既存の虫害発生量を加味した森林生産性及び生態系バランスを変化させることが懸念される。また、樹種間と同様に季節間の BVOCs 組成も異なることから、各季節において、高濃度 O<sub>3</sub> 環境下におけるハンノキハムシの BVOCs に対する選好順位を明らかにする必要がある。

以上の様に、植物-昆虫間コミュニケーションは通常「一対一」の関係性で論じられるものの、特に高濃度 O<sub>3</sub> 環境下では「一対多」の相対的な関係性も強く関与する。したがって、BVOCs という香気シグナルを介した植物-昆虫間コミュニケーションに基づく虫害評価では、BVOCs の放出組成や昆虫の選好性を考慮した、生態系全体を俯瞰する視点が重要である(Takabayashi and Shiojiri, 2019; Masui et al., 2022, 2023b)

## 第 6 章 総合考察

### 6.1 結論

本研究では、(Q)「野外開放系 O<sub>3</sub> 曝露区から採集したシラカンバ葉を供試した方がハンノキハムシの成長率や摂食嗜好性は高いにも関わらず、実際の野外のハンノキハムシによる食害は O<sub>3</sub> 曝露区の方が対照区よりも低い」という問いに対して現象の要因解明を試みた。特に、本研究では長距離から香気シグナルとして昆虫を誘引する BVOCs に重点を置

き、以下①～④の研究から高濃度 O<sub>3</sub> 環境下におけるハンノキハムシの行動変化の要因を検証した。

第一に、①「シラカンバの BVOCs 放出速度や放出組成が、O<sub>3</sub> 曝露のストレスにより変化している可能性」を検証した。本研究では、シラカンバは BVOCs の中でも MT を主に放出する樹種であることを確認し、いずれの放出成分も O<sub>3</sub> 曝露による放出速度自体への影響は認められないことを明らかにした（表 1）。

また、葉に含まれる LCFAs は近距離で昆虫に対する香気シグナルとしての機能を示すことが知られていることから、②「野外環境におけるシラカンバ葉の LCFAs に対する O<sub>3</sub> 曝露影響」を調査した。その結果、LCFAs は当年の O<sub>3</sub> 曝露が春葉に対して量的に顕著な脂肪酸の減衰を引き起こす一方で（表 4、表 5、図 8）、組成への影響は認められなかった（図 9、表 6）。また、夏葉に対してはわずかな脂肪酸量の減衰（表 5、図 8）と展葉初期の組成差（図 9、表 6）を除き、O<sub>3</sub> 曝露が春葉と比較して LCFAs に大きな影響を与えないことが明らかとなった。したがって、春葉と夏葉の異型葉間で O<sub>3</sub> 曝露に伴う脂肪酸の動態は異なり、野外におけるハンノキハムシの行動選択を制限するような一貫性のある傾向は認められなかった(Masui et al., 2023a)。①及び②により、ハンノキハムシの行動に影響を与え得る香気シグナルの源は、O<sub>3</sub> 曝露によるハンノキハムシの行動選択の変化の説明要因とはならないと判断した。

次に、③「放出後の BVOCs が大気中で O<sub>3</sub> と反応することで減衰し、高濃度 O<sub>3</sub> 環境下ではハンノキハムシに対する誘引性が低下する可能性」を検証した。前提として、シラカンバや食害対象樹種であるハンノキ類の葉が放出する BVOCs は、ハンノキハムシ成虫に対して高い誘引性を示し、ハンノキハムシは BVOCs を利用した植物探索を行うことが認められた（図 12、図 17）。但し、④「狭食者であるハンノキハムシの食害対象樹種は互いに類似した BVOCs 組成を示す」と仮説を立てたものの、シラカンバとハンノキ類の BVOCs 組成は有意に異なり、シラカンバは sabinene を主体としたハンノキ類よりも高い MT 組成でハンノキハムシを誘引していると考えられた（表 10、表 11、表 12、図 18；Masui et al., 2022）。③に関して、O<sub>3</sub> 単独（ $\leq 120$  ppb）のハンノキハムシに対する忌避性及び誘引性が認められない一方で、野外の開放系 O<sub>3</sub> 曝露と同等程度の 80 ppb の O<sub>3</sub> 曝露環境を再現した場合に、O<sub>3</sub> 曝露側の BVOCs への選択性が低下することが認められた（図 12；Masui et al., 2020）。

以上の結果より、本研究の問いである（Q）に関して、「ハンノキハムシの行動原理に基

づく推定では O<sub>3</sub> 区の葉がより食害されるべきであるものの、香気シグナルである BVOCs の誘引性が放出後に O<sub>3</sub> との反応により低下することでハンノキハムシの植物探索が阻害されている」と結論付けられた。さらに、特に③における各成分の大気寿命を考慮した誘引成分のスクリーニングから、O<sub>3</sub> と反応性の高い *cis/trans-β-ocimene* や *linalool*、*2-carene* 等がハンノキハムシの誘引及び O<sub>3</sub> 区における誘引性低下の要因であると考えられた(表 7、表 13 ; Masui et al., 2020, 2022)。

## 6.2 展望

### 6.2.1 高濃度 O<sub>3</sub> 環境による植物-昆虫間コミュニケーションの崩壊と生態的改変

札幌研究林実験苗畑の開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設では、本研究におけるシラカンバとハンノキハムシの関係性以外にも虫害評価が実施され、O<sub>3</sub> 曝露区における植食性昆虫の発生率低下が認められた。例えば、ヤマナラシ属 2 種 (*Populus maximowiczii* A.Henry、*P. tremula* L. × *P. alba* L. 雑種 F<sub>1</sub>) の虫害評価においては、ポプラ類 (ヤマナラシ属樹木) の成長に影響しない、もしくは O<sub>3</sub> 曝露区の成長量が対照区を上回るにも関わらず、植食者であるドロノキハムシ (*Chrysomela populi*) による食害度が O<sub>3</sub> 曝露区で低下した。一方、ポプラ類を好んで食害するサクツクリハバチ (*Stauronematus compressicornis*) の発生及び食害度に差は認められなかった (増井ら 2021, 2022)。ハルニレ (*Ulmus davidiana* Planch. var. *japonica* (Rehder) Nakai) の場合、O<sub>3</sub> 曝露により防御物質である葉内の縮合タンニン量は大きく低下しているにも関わらず、ニレハムシ (*Pyrrhalta maculicollis*) の発生量は O<sub>3</sub> 曝露区で低下した。しかし、ニレチュウレンジ (*Arge captiva*) の発生量は大きく増加し、防御物質量の変化に依存した応答を示した (Sugai et al., 2020)。本研究のハンノキハムシの結果を合わせると、甲虫目 (Coleoptera) であるハムシの O<sub>3</sub> 曝露区における発生量が総じて低下している傾向にある一方で、ハチ目 (Hymenoptera) は O<sub>3</sub> 曝露による植物探索の阻害を受けていないようであった。ポプラ類 (Pellegrini et al., 2012; Martín et al., 2014) 及びハルニレ (Takei et al., 2015) でも MT や SQT の放出は認められており、本研究のシラカンバと同様に O<sub>3</sub> 曝露による大気中酸化反応を受けることが想定される。但し、BVOCs に対する昆虫の触覚上での応答では種間差はあるものの、甲虫目とハチ目に知覚される成分は大きく異なる (Bruce et al., 2005)。この知覚差が、甲虫目とハチ目の行動変化に起因する可能性が挙げられる。これら樹木においても BVOCs 放出組成の解析を行うほか、触覚電図法 (Pawlowski et

al., 2020; Shuttleworth and Johnson, 2020)による各昆虫の触覚上の応答性を解析することで、高濃度 O<sub>3</sub> 環境下における昆虫行動の解明に寄与することが期待される。

高濃度 O<sub>3</sub> 曝露による BVOCs という香気シグナルを介した植物-昆虫間コミュニケーションの崩壊は、花粉媒介昆虫や天敵昆虫の誘引機能低下という現象でも近年報告されている(Knaden et al., 2022; Ryalls et al., 2022)。特に、1対1の絶対共生関係(Kato et al., 2003; Okamoto et al., 2013)や絶対寄生関係(Shiojiri et al., 2000)において、そのリスクは大きい。これらの有用昆虫に対する影響は、生態系内の多様性や農作物の生産に関わるため、直感的に重大な課題として認識される。一方、本研究の様な植食性昆虫(害虫)の飛来率が低下するような現象は、少なくとも食害対象植物に対してプラスの効果をもたらすように見受けられる。しかし、5.4.3で述べた様に生態系内にはいくつかの食害対象植物が同時に存在しており、ある植物を見失った昆虫は代わりに別の植物を見つけ出すと考えられる。同様に、食害を行う昆虫も1種類とは限らない。例えば、シラカンバの葉を食害する森林害虫としては、狭食性昆虫のハンノキハムシ以外にクスサン(*Caligula japonica*)やマイマイガ(*Lymantria dispar*)のような広食性昆虫の発生が認められる。

一方で、ポプラ類やハルニレ属におけるハチ目害虫の例の様に、これらの害虫が高濃度 O<sub>3</sub> 曝露による植物探索阻害を受けない昆虫種であるケースも想定される。生育環境における虫害パターンの変化は当該植物の防御形質を改変し得ることが知られていることから(Hull-Sanders et al., 2007; Fukano and Nakayama, 2018)、ハンノキハムシの誘引性低下は結果として、その他の植食性昆虫に対する防御システムにまでその影響が波及するリスクを含んでいる。特定の植食性昆虫の発生頻度変化が長期的に当該植物及びその他の昆虫種に対して実際にどのような影響を与えるのかは、生物多様性や生物間相互関係の観点からも、今後の虫害予測・樹林地管理において注視すべき点である。

## 6.2.2 植物-昆虫間コミュニケーションに対する大気環境要因の複合影響

大気汚染環境下における植物-昆虫間コミュニケーションに関して、本研究で着目した O<sub>3</sub> 以外の大気中成分が昆虫の植物探索に及ぼす影響の解明が今後の展望として挙げられる。例えば、O<sub>3</sub> 濃度の増加に伴って天敵の誘引率が低下した一方で、O<sub>3</sub> とディーゼルガスとの混合効果により特定の天敵の誘引率は大きく増加することが報告された(Ryalls et al., 2022)。ディーゼルガスの主成分である NO<sub>x</sub> (NO+NO<sub>2</sub>) は、図1に示すように減少傾向であるものの、O<sub>3</sub> との複合効果としては昆虫の植物探索能力に影響する可能性がある。

また、依然として増加傾向を示す CO<sub>2</sub> も、単独及び O<sub>3</sub> との複合影響下で BVOCs 放出を介して昆虫の行動を改変させる要因である(Otieno et al., 2023)。BVOCs の放出自体に関しては、高 CO<sub>2</sub> 条件下で光合成速度が上昇する条件では BVOCs 放出も増加する一方で、O<sub>3</sub> との複合影響により BVOCs 放出の増加が打ち消される例が報告されている(Jasoni et al., 2004; Glennly et al., 2018)。但し、葉や根系など各植物器官への炭素分配や植物の成長システムにより、CO<sub>2</sub> による BVOCs 放出への影響は異なることが示唆されている(Jasoni et al., 2004)。炭素分配に関して、ハンノキハムシの食害するハンノキ類の例では樹種間で成長／防御の炭素分配は異なり、光合成産物量の分配差が変動環境下におけるテルペン類放出などの生理活動に影響を与えることが示唆された (Masui et al., unpublished)。以上の様に、今後は O<sub>3</sub> と他環境要因との複合影響による、BVOCs 放出及び植物-昆虫間コミュニケーションの変化に関する目も着目していくことが求められる。

### 6.2.3 BVOCs を介した虫害の連続的影響

本研究では、シラカンバが食害を受ける前の初期段階における（非食害葉）、ハンノキハムシの誘引性に関して実験を行った。しかし、ハンノキハムシが飛来した後、実際にはその後も連続的に食害は発生し続けるため、展葉期間全体では食害の発生による影響を考慮する必要がある。虫害を受けた被食害葉もしくは被食害個体では、防御物質量の増加など誘導防御が認められる(Fürstenberg-Hägg et al., 2013)。同様に、虫害による BVOCs 放出の変化は、GLVs 放出を含めた HIPVs (Herbivore Induced Plant Volatiles 植食者誘導性植物揮発性物質) として知られている。しかし、HIPVs は天敵誘引や植食者の忌避など植物の被食防衛に寄与している一方で、植食者をより誘引する場合に植物側には負（昆虫側には正）の影響を及ぼす(Sun et al., 2012; Uefune et al., 2012; Douma et al., 2019; Takabayashi and Shiojiri, 2019)。本研究で使用したシラカンバやハンノキ類においても、ハンノキハムシの食害を受けた後に GLVs や MT の顕著な増加を予備試験として確認した。

開放系 O<sub>3</sub> 曝露システムの場合、ハンノキハムシの食害頻度が高い対照区の方が HIPVs の放出量も高くなることが想定される。対照区におけるハンノキハムシは既に食害されている葉を忌避している様子は見受けられないことから（図 10-A）、少なくとも HIPVs がハンノキハムシの食害を抑制する可能性は極めて低いと考えられる。したがって、シラカンバとハンノキハムシの関係性において検討すべきは HIPVs の誘引性である。また、通常の BVOCs の放出と同様に、HIPVs も放出後に大気中の O<sub>3</sub> 曝露影響を受ける。なお、GLVs の

代表的な成分である *cis*-3-hexen-1-ol ( $O_3$  濃度 28.4ppb 下において 6.2 時間) や *cis*-3-hexenyl acetate ( $O_3$  濃度 28.4 ppb 下において 7.3 時間) は大気寿命が長い部類である (Atkinson and Arey, 2003)。しかし、HIPVs として放出の発現・増加した MT の多くは  $O_3$  曝露による大きな減衰を受けるため、組成による誘引性の観点から  $O_3$  区では結果として HIPVs 全体としての誘引性が低下すると考えられる。これは、HIPVs を利用する天敵誘引性の低下としても認められる現象である (Ryalls et al., 2022)。したがって、ハンノキハムシによる食害由来の HIPVs に同種誘引性の効果がある場合、対照区と  $O_3$  区の食害差は初期飛来時の期待値よりも拡大していくと考えられる。さらに、本研究で着目した LCFA s は GLV s 前駆体としての機能が挙げられることから、特に春葉において  $O_3$  曝露による LCFA s 量の減衰は GLV s 放出に間接的影響を及ぼすことが示唆された。今後、上述の連続的な虫害発生による HIPVs 放出にも着目して高濃度  $O_3$  環境下における虫害動態を評価する。

#### 6.2.4 昆虫の植物探索における二相性応答

本研究では、シラカンバ BVOC s のハンノキハムシに対する誘引性が  $O_3$  濃度の上昇に従い低下すると仮説を立てたものの、80 ppb から 120 ppb の結果で認められるように、80 ppb を境に二相性の応答が示唆された (図 12、図 15)。上記二相性応答の要因として挙げられる BVOC s の酸化生成物 (4.4.2 参照) のうち、SOM (Secondary Organic Materials) として葉の表面上に堆積するものが存在する (Tröstl et al., 2016; Holopainen et al., 2017)。SOM は、長距離の香気シグナルとして機能することはなく、接触シグナルや葉の摂食嗜好性に影響する要因となることが報告されている (Holopainen et al., 2017)。ハンノキハムシの場合、先行研究の摂食試験の結果から  $O_3$  区の葉はハンノキハムシに対して好適なものであり (Agathokleous et al., 2017; Abu ElEla et al., 2018a)、少なくとも SOM による忌避効果は認められないと考えられる。また、特に  $O_3$  に対する反応速度係数の高い化合物 ( $O_3$  反応性成分) である SQT や MT の一部は、短時間で SOM として堆積する酸化物を生成しやすい (Pinto et al., 2007)。したがって、人工環境下における BVOC s- $O_3$  混合試験に加え、野外環境中における大気中酸化生成物の実測及び葉面 SOM の分析により酸化生成物を区別することで、香気シグナルとして機能する酸化生成物の誘引性を評価することが求められる。

上述の例とは異なるものの、単独ストレスによる二相性応答に関しては近年生態学の分野においてホルミシス (hormesis) の概念が提唱されている。ホルミシスとは従来は医学的用語であり、放射線の様に有害物質として機能するものが、低レベルでは生体に有益な効

果を与える現象を指す。植物に対しては、低濃度の O<sub>3</sub> が植物の成長にプラスに働き (Agathokleous, 2018; Agathokleous et al., 2019)、その他の環境要因によってホルミシスの挙動が変化することも分かってきた (Li et al., 2021)。昆虫に関しては、O<sub>3</sub> 単体が数百 ppb 以上に達する超高濃度の O<sub>3</sub> 曝露によって昆虫の触覚機能を低下させることが報告されている一方で (Dötterl et al., 2016; Vanderplanck et al., 2021; Démares et al., 2022)、100 ppb 未満の様な比較的 low 濃度域の O<sub>3</sub> 曝露による触覚機能への負の影響は認められていない。

殺虫剤の有効成分など、有害物質や環境ストレスによる昆虫の触覚機能に対するホルミシスは認められていることから (Tricoire-Leignel et al., 2012; Lalouette et al., 2016)、O<sub>3</sub> によっても同様にホルミシスが起る可能性がある。なお、昆虫が各 BVOCs 成分を知覚する触角上の受容体によってストレス受容後の応答は異なる点 (Dötterl et al., 2016) に注意し、大気中の O<sub>3</sub> 濃度による各 BVOCs 濃度の減衰と触覚における受容感度の乗算として昆虫に対する誘引性を評価していくことが求められる。本試験における 100 ppb 前後の O<sub>3</sub> 曝露では触覚機能の阻害を引き起こす可能性は極めて低いものの、ホルミシスによる触覚機能への影響は考慮されていない。よって、ハンノキハムシの選好性が低下した 80 ppb 以下の濃度域における触覚機能 (受容感度) への影響を評価することで、より詳細な昆虫行動の推定が可能になることが期待される。

#### 6.2.5 O<sub>3</sub> 曝露影響の長期シミュレーション

ある地域における大気中 O<sub>3</sub> 濃度は、越境大気汚染の流入の様な突発的な現象を除き、長期的には緩やかに変化していくことが想定される。花粉媒介昆虫を用いた研究では、O<sub>3</sub> 曝露によって改変され誘引性を失った BVOCs 組成が、視覚情報による学習によって再認識されることが認められた (Cook et al., 2020)。よって、視覚情報自体の安定性や視覚情報への依存度によると考えられるものの、昆虫は改変された嗅覚情報に適応していくことが示唆された。嗅覚情報の改変に対する昆虫の適応性は、大気汚染環境における虫害発生をより複雑化する要因であると考えられる。

本研究及び関連する先行研究におけるハンノキハムシの場合、いずれも開放系 O<sub>3</sub> 曝露施設のシステム外から飛来する個体群である。各 O<sub>3</sub> 曝露区で隔離して繁殖させた学習済み個体群を用いることで、O<sub>3</sub> 改変後の BVOCs のハンノキハムシに対する誘引性を検証していくことが重要である。但し、上述の懸念は質的な側面 (放出組成) であり、香気シグナルとなる BVOCs が昆虫の知覚下限値以下に低下する様な量的影響で見れば、大気汚染

の進行に伴う昆虫の行動変化は多くの昆虫種で起こり得る現象である。酸化生成物の昆虫に対する影響や樹種選好性など、 $O_3$  と BVOCs に関わる様々な観点から昆虫の行動を評価し、長期的な  $O_3$  濃度シミュレーションにおける虫害動態を解明したい。

## 謝辞

本論文を作製するにあたり、多くの方々にご指導、ご鞭撻を賜りましたことを感謝申し上げます。

まず、本論文の作成に当たり絶え間なく、ご指導と激励を賜りました北海道大学・大学院農学研究院の松浦英幸教授に心より厚くお礼申し上げます。また、本論文への懇切なるご審査を賜りました同農学研究院の橋本誠教授、荒川圭太准教授にも心より感謝申し上げます。同農学研究院の平野高司教授には、本研究遂行に関する生物由来揮発性有機化合物 (BVOCs) 採集に当たり、各種の機材をご提供いただきました。また、本論文のご審査を賜りました。心より感謝申し上げます。

静岡県立大学・食品栄養科学部植物環境研究室の谷晃教授には、本研究の BVOCs の採集及び分析方法に関して、北海道大学・農学部森林科学科の卒業研究時より、今日に至るまで、懇切な子細にわたるご指導を賜りました。さらに、本論文のご審査を賜りました。心より厚く感謝を申し上げます。また、BVOCs 測定に際し、ご支援を賜りました望月智貴博士（当時・静岡県立大学・食品栄養科学部助教）にもお礼を申し上げます。

北海道大学・大学院農学研究院の小池孝良名誉教授（作物栄養学研究员）には、同農学部森林科学科における基礎講義から卒業研究、学位関連論文の執筆に至るまで、今日までご指導賜りました。さらに、本論文のご審査を賜りました。心より感謝を申し上げます。

本研究の開放系オゾン ( $O_3$ ) 曝露施設の管理及び学位関連論文の英文執筆に当たり、中国・南京信息工程大学応用気象学部 (NUIST) の Agathokleous Evgenios 教授（当時・北海道大学・大学院農学院博士課程及び日本学術振興会海外特別研究員）には、数々のご協力を賜りました。心から感謝申し上げます。また、開放系  $O_3$  曝露施設の使用に当たり、北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター長及び森林圏ステーション札幌研究林長であった佐藤冬樹名誉教授、故・市川一氏、並びに研究林スタッフの御支援を賜りました。感謝を申し上げます。

本論文及び学位関連論文の執筆に当たり、龍谷大学・農学部生命科学科の塩尻かおり教授には BVOCs による昆虫の行動学に関して広くご指導を賜りました。心より感謝を申し

上げます。

シラカンバの接ぎ木苗育成に際し、接ぎ木作成法及び育成方法に関してご教授いただきました国立研究開発法人・森林総合研究所・林木育種センター北海道育種場の坂本庄生氏に感謝を申し上げます。

また、本論文の脂肪酸研究に際し、検量線作成及び分析にご助力を賜りました北海道大学・大学院農学院博士後期課程の井上史郎氏に厚くお礼を申し上げます。

本研究を遂行するに際し、北海道大学・農学部森林科学科の造林学研究室在籍時より研究計画や学会発表のご指導を賜りました同研究室内の澁谷正人特任教授、斎藤秀之講師、並びに全面的にご協力を賜りました造林学研究室 OB・OG の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、今日まで私を応援していただいた両親、家族に深く感謝致します。

## 参考文献

- Abu ElEla, S. A., Agathokleous, E., Ghazawy, N. A., Amin, T. R., ElSayed, W. M., & Koike, T. (2018a) Enzyme activity modification in adult beetles (*Agelastica coerulea*) inhabiting birch trees in an ozone-enriched atmosphere. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(32): 32675–32683.
- Abu ElEla, S. A., Agathokleous, E., & Koike, T. (2018b) Growth and nutrition of *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae changed when fed with leaves obtained from an O<sub>3</sub>-enriched atmosphere. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(13): 13186–13194.
- Agathokleous, E. (2018) Environmental hormesis, a fundamental non-monotonic biological phenomenon with implications in ecotoxicology and environmental safety. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148: 1042–1053. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.003>.
- Agathokleous, E., Belz, R. G., Calatayud, V., De Marco, A., Hoshika, Y., Kitao, M., Saitanis, C. J., Sicard, P., Paoletti, E., & Calabrese, E. J. (2019) Predicting the effect of ozone on vegetation via linear non-threshold (LNT), threshold and hormetic dose-response models. *Sci. Total Environ.* 649: 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.264>.
- Agathokleous, E., Kitao, M., Wang, X., Mao, Q., Harayama, H., Manning, W. J., & Koike, T. (2021) Ethylenediurea (EDU) effects on Japanese larch: an one growing season experiment with simulated regenerating communities and a four growing season application to individual saplings. *J. For. Res.* 32: 2047–2057. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01223-6>.

- Agathokleous, E., Sakikawa, T., Abu ElEla, S. A., Mochizuki, T., Nakamura, M., Watanabe, M., Kawamura, K., & Koike, T. (2017) Ozone alters the feeding behavior of the leaf beetle *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Chrysomelidae) into leaves of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24(21): 17577–17583.
- Akimoto, H., Mori, Y., Sasaki, K., Nakanishi, H., Ohizumi, T., & Itano, Y. (2015) Analysis of monitoring data of ground-level ozone in Japan for long-term trend during 1990-2010: Causes of temporal and spatial variation. *Atmos. Environ.* 102: 302–310.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.12.001>.
- Ali, J. G., & Agrawal, A. A. (2012) Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends Plant Sci.* 17(5): 293–302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.006>.
- Aljbory, Z., & Chen, M. S. (2018) Indirect plant defense against insect herbivores: a review. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1744-7917.12436>.
- Atkinson, R., & Arey, J. (2003) Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmos. Environ.* 37(2): 197–219. [papers://2ae67f3f-e008-4816-adce-b312905b08fd/Paper/p485](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(02)00485-5).
- Atkinson, R., Arey, J., Aschmann, S.M., Corchnoy, S.B., Shu, Y. (1995) Rate constants for the gas-phase reactions of *cis*-3-hexen-1-ol, *cis*-3-hexenylacetate, *trans*-2-hexenal, and linalool with OH and NO<sub>3</sub> radicals and O<sub>3</sub> at 29672K, and OH radical formation yields from the O<sub>3</sub> reactions. *Int J Chem Kinet.* 27: 941–955.
- Atkinson, R., Hasegawa, D., Aschmann, S.M. (1990) Rate constants for the gas-phase reactions of O<sub>3</sub> with a series of monoterpenes and related compounds at 29672K. *Int J Chem Kinet.* 22: 871–887.
- Blande, J. D., Holopainen, J. K., & Niinemets, Ü. (2014) Plant volatiles in polluted atmospheres: Stress responses and signal degradation. *Plant, Cell Environ.* 37(8): 1892–1904.
- Bosch, O. J., Geier, M., & Boeckh, J. (2000) Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female *Aedes aegypti*. *Chem. Senses.* 25(3): 323–330.
- Bozsik, G., Tröger, A., Francke, W., & Szöcs, G. (2016) *Thuja occidentalis*: identification of volatiles and electroantennographic response by the invasive cedar bark beetle, *Phloeosinus aubei*. *J. Appl. Entomol.* 140(6): 434–443.
- Brilli, F., Cicciooli, P., Frattoni, M., Prestininzi, M., Spanedda, A. F., & Loreto, F. (2009) Constitutive and herbivore-induced monoterpenes emitted by *Populus × euroamericana* leaves are key

- volatiles that orient *Chrysomela populi* beetles. *Plant, Cell Environ.* 32(5): 542–552.
- Bruce, T. J. A., & Pickett, J. A. (2011) Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. *Phytochemistry.* 72(13): 1605–1611.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.011>.
- Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (2005) Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Sci.* 10(6): 269–274.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138505000968>.
- Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Karnas, K. J., Pennington, J. E., & Wells, M. A. (2001) Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutr.* 21(1): 23–46.  
<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nutr.21.1.23>.
- Calvert, J.G., Atkinson, R., Kerr, J.A., Madronich, S., Moortgat, G.K., Wallington, T.J., Yarwood, G. (2000) The Mechanisms of Atmospheric oxidation of the alkenes. *Oxford University Press*, New York, NY, 552pp.
- Chatani, S., Matsunaga, S. N., & Nakatsuka, S. (2015) Estimate of biogenic VOC emissions in Japan and their effects on photochemical formation of ambient ozone and secondary organic aerosol. *Atmos. Environ.* 120: 38–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.08.086>.
- Chu, Y., Cheng, T. F., Gen, M., Chan, C. K., Lee, A. K. Y., & Chan, M. N. (2019) Effect of Ozone Concentration and relative humidity on the heterogeneous oxidation of linoleic acid particles by ozone: an insight into the interchangeability of ozone concentration and time. *ACS Earth Sp. Chem.* 3(5): 779–788. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsearthspacechem.9b00002>.
- Cook, B., Haverkamp, A., Hansson, B. S., Roulston, T., Lerdau, M., & Knaden, M. (2020) Pollination in the Anthropocene: a moth can learn ozone-altered floral blends. *J. Chem. Ecol.* 46(10): 987–996.
- Das, S., Koner, A., & Barik, A. (2019) A beetle biocontrol agent of rice-field weeds recognizes its host plants by surface wax long-chain alkanes and free fatty acids. *Chemoecology.* 29(4): 155–170. <https://doi.org/10.1007/s00049-019-00285-1>.
- Démares, F., Gibert, L., Creusot, P., Lapeyre, B., & Proffit, M. (2022) Acute ozone exposure impairs detection of floral odor, learning, and memory of honey bees, through olfactory generalization. *Sci. Total Environ.* 827.
- Dötterl, S., Vater, M., Rupp, T., & Held, A. (2016) Ozone differentially affects perception of plant

- volatiles in western honey bees. *J. Chem. Ecol.* 42(6): 486–489.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10886-016-0717-8>.
- Douma, J. C., Ganzeveld, L. N., Unsicker, S. B., Boeckler, G. A., & Dicke, M. (2019) What makes a volatile organic compound a reliable indicator of insect herbivory? *Plant Cell Environ.* 42(12): 3308–3325.
- Duque, L., Poelman, E. H., & Steffan-Dewenter, I. (2019) Plant-mediated effects of ozone on herbivores depend on exposure duration and temperature. *Sci. Rep.* 9(1): 1–11.
- Eigenbrode, S. D., & Espelie, K. E. (1995) Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 171–194.
- El-Sayed, A. M., Sporle, A., Colhoun, K., Furlong, J., White, R., & Suckling, D. M. (2018) Scents in orchards: floral volatiles of four stone fruit crops and their attractiveness to pollinators. *Chemoecology.* 28(2): 39–49. <http://dx.doi.org/10.1007/s00049-018-0254-8>.
- Erb, M., Huber, M., Robert, C. A. M., Ferrieri, A. P., Machado, R. A. R., & Arce, C. C. M. (2013) The role of plant primary and secondary metabolites in root-herbivore behaviour, nutrition and physiology. P. 53–95 in *Advances in Insect Physiology*, Elsevier Ltd.  
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417165-7.00002-7>.
- Feng, B., Qian, K., & Du, Y.-J. (2017) Floral volatiles from *Vigna unguiculata* are olfactory and gustatory stimulants for oviposition by the bean pod borer moth *Maruca vitrata*. *Insects.* 8(2) <http://www.mdpi.com/2075-4450/8/2/60>.
- Feng, Z., Shang, B., Li, Z., Calatayud, V., & Agathokleous, E. (2019) Ozone will remain a threat for plants independently of nitrogen load. Stevens, C. (ed.). *Funct. Ecol.* 33: 1854–1870.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2435.13422>.
- Fernandez, P. C., Meiners, T., Björkman, C., & Hilker, M. (2007) Electrophysiological responses of the blue willow leaf beetle, *Phratora vulgatissima*, to volatiles of different *Salix viminalis* genotypes. *Entomol. Exp. Appl.* 125(2): 157–164.
- Friend, W. G. (1958) Nutritional requirements of phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 3: 57–74. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.03.010158.000421>.
- Fuentes, J. D., Chamecki, M., Roulston, T., Chen, B., & Pratt, K. R. (2016) Air pollutants degrade floral scents and increase insect foraging times. *Atmos. Environ.* 141: 361–374.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.07.002>.

- Fuentes, J. D., Lerdaun, M., Atkinson, R., Baldocchi, D., Bottenheim, J. W., Ciccioli, P., Lamb, B., Geron, C., Gu, L., Guenther, A., Sharkey, T. D., & Stockwell, W. (2000) Biogenic hydrocarbons in the atmospheric boundary layer: a review. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 81(7): 1537–1575.
- Fuentes, J. D., Roulston, T. H., & Zenker, J. (2013) Ozone impedes the ability of a herbivore to find its host. *Environ. Res. Lett.* 8, 014048.
- Fukano, Y., & Nakayama, S. (2018) An experimental test of trade-offs associated with the adaptation to alternate host plants in the introduced herbivorous beetle, *Ophraella communa*. *J. Insect Behav.* 31(5): 490–502.
- Fukumoto, K., Alamgir, K. M., Yamashita, Y., Mori, I. C., Matsuura, H., & Galis, I. (2013) Response of rice to insect elicitors and the role of OsJAR1 in wound and herbivory-induced JA-ile accumulation. *J. Integr. Plant Biol.* 55(8): 775–784.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013) Plant defense against insect herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* 14(5): 10242–10297. <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/5/10242>.
- Glenny, W. R., Runyon, J. B., & Burkle, L. A. (2018) Drought and increased CO<sub>2</sub> alter floral visual and olfactory traits with context-dependent effects on pollinator visitation. *New Phytol.* 220(3): 785–798.
- Grosjean, E., Grosjean, D. (1994) Rate constants for the gas-phase reactions of ozone with unsaturated aliphatic alcohols. *Int J Chem Kinet.* 26: 1185–1191.
- Guenther, A. B., Zimmerman, P. R., Harley, P. C., Monson, R. K., & Fall, R. (1993) Isoprene and monoterpene emission rate variability: model evaluations and sensitivity analyses. *J. Geophys. Res.* 98(D7): 12609. <http://doi.wiley.com/10.1029/93JD00527>.
- Guenther, A., Nicholas Hewitt, C., David, E., Fall, R., Chris, G., Tom, G., Peter, H., Klinger, L., Manuel, L., McKay, W. A., Tom, P., Scholes, B., Steinbrecher, R., Tallamraju, R., Taylor, J., & Zimmerman, P. (1995) A global model of natural volatile organic compound emissions. *J. Geophys. Res.* 100(94): 8873–8892.
- Hakola, H., Rinne, J., & Laurila, T. (1999) The VOC emission rates of boreal deciduous trees. *Eur. Comm.* (1999): 158: 21-28. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3fde6434-985d-4415-9be8-48ab60eb7e24/language-en>.
- Hartikainen, K., Riikonen, J., Nerg, A. M., 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.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.014>.
- Holopainen, J. K., & Blande, J. D. (2013) Where do herbivore-induced plant volatiles go? *Front. Plant Sci.* 4: 1–13.
- Holopainen, J. K., Kivimäenpää, M., & Nizkorodov, S. A. (2017) Plant-derived secondary organic material in the air and ecosystems. *Trends Plant Sci.* 22(9): 744–753.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.004>.
- Holopainen, J. K., Virjamo, V., Ghimire, R. P., Blande, J. D., Julkunen-Tiitto, R., & Kivimäenpää, M. (2018) Climate change effects on secondary compounds of forest trees in the northern hemisphere. *Front. Plant Sci.* 9: 1–10.
- Hoshika, Y., Watanabe, M., Inada, N., Mao, Q., & Koike, T. (2013) Photosynthetic response of early and late leaves of white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) grown under free-air ozone exposure. *Environ. Pollut.* 182: 242–247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.033>.
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59(1): 41–66.
- Hull-Sanders, H. M., Clare, R., Johnson, R. H., & Meyer, G. A. (2007) Evaluation of the evolution of increased competitive ability (EICA) hypothesis: Loss of defense against generalist but not specialist herbivores. *J. Chem. Ecol.* 33(4): 781–799.
- Irie, H., Yonekawa, D., Damiani, A., Hoque, H. M. S., Sudo, K., & Itahashi, S. (2021) Continuous multi-component MAX-DOAS observations for the planetary boundary layer ozone variation analysis at Chiba and Tsukuba, Japan, from 2013 to 2019. *Prog. Earth Planet. Sci.* 8(1).
- Ishangulyyeva, G., Najar, A., Curtis, J. M., & Erbilgin, N. (2016) Fatty acid composition of novel host jack pine do not prevent host acceptance and colonization by the invasive mountain pine beetle and its symbiotic fungus. *PLoS One.* 11(9): e0162046.  
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0162046>.
- Ishimaru, Y., Oikawa, T., Suzuki, T., Takeishi, S., Matsuura, H., Takahashi, K., Hamamoto, S., Uozumi, N., Shimizu, T., Seo, M., Ohta, H., & Ueda, M. (2017) GTR1 is a jasmonic acid and jasmonoyl-L-isoleucine transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81(2): 249–255. <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2016.1246174>.

- Izuta, T. (2017) Air pollution impacts on plants in east asia. *Air Pollut. Impacts Plants East Asia*. : 1–322.
- Jasoni, R., Kane, C., Green, C., Peffley, E., Tissue, D., Thompson, L., Payton, P., & Paré, P. W. (2004) Altered leaf and root emissions from onion (*Allium cepa* L.) grown under elevated CO<sub>2</sub> conditions. *Environ. Exp. Bot.* 51(3): 273–280.
- Kapustjansky, A., Chittka, L., & Spaethe, J. (2010) Bees use three-dimensional information to improve target detection. *Naturwissenschaften*. 97: 229–233.  
<http://link.springer.com/10.1007/s00114-009-0627-5>.
- Kato, M., Takimura, A., & Kawakita, A. (2003) An obligate pollination mutualism and reciprocal diversification in the tree genus *Glochidion* (Euphorbiaceae). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(9): 5264–5267. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0837153100>.
- Khan, Z. R., Midega, C. A. O., Bruce, T. J. A., Hooper, A. M., & Pickett, J. A. (2010) Exploiting phytochemicals for developing a “push-pull” crop protection strategy for cereal farmers in Africa. *J. Exp. Bot.* 61(15): 4185–4196.
- Kivimäenpää, M., Ghimire, R. P., Sutinen, S., Häikiö, E., Kasurinen, A., Holopainen, T., & Holopainen, J. K. (2016) Increases in volatile organic compound emissions of Scots pine in response to elevated ozone and warming are modified by herbivory and soil nitrogen availability. *Eur. J. For. Res.* 135: 343–360. <https://doi.org/10.1007/s10342-016-0939-x>.
- Klemola, T., Ammunét, T., Andersson, T., Klemola, N., & Ruohomäki, K. (2012) Larval parasitism rate increases in herbivore-damaged trees: A field experiment with cyclic birch feeding moths. *Oikos*. 121(10): 1525–1531.
- Knaden, M., Anderson, P., Andersson, M. N., Hill, S. R., Sachse, S., Sandgren, M., Stensmyr, M. C., Löfstedt, C., Ignell, R., & Hansson, B. S. (2022) Human impacts on insect chemical communication in the anthropocene. *Front. Ecol. Evol.* 10: 1–15.
- Koike, T. (1986) A method for measuring photosynthesis with detached parts of deciduous broadleaved trees in Hokkaido. *Journal of Japanese Forestry Society*. 68:425-428.
- Koike, T. (1995) Physiological ecology of the growth characteristics of Japanese mountain birch in northern Japan: a comparison with Japanese mountain white birch. In E.O. Box et al. eds. *Vegetation Science in Forestry: Global Perspective based on Forest Ecosystems of East & Southeast Asia*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 409-422.

- Koike, T., Watanabe, M., Hoshika, Y., Kitao, M., Matsumura, H., Funada, R., & Izuta, T. (2013) Effects of ozone on forest ecosystems in East and Southeast Asia. In: Matyssek R, Clarke N, Cudlin P, Mikkelsen TN, Tuovinen J-P, Wieser G, Paoletti E (eds) *Climate change, air pollution and global challenges: understanding and perspectives from forest research*. Elsevier, Oxford, pp 371–390.
- Krishnan, S., Guerra, G. W., Bertrand, D., Wertz-Kanounnikoff, S., & Kettle, C. J. (2020) The pollination services of forests – A review of forest and landscape interventions to enhance their cross-sectoral benefits. *FAO & Bioversity International*. Rome.  
<https://doi.org/10.4060/ca9433en>.
- Lalouette, L., Pottier, M. A., Wycke, M. A., Boitard, C., Bozzolan, F., Maria, A., Demondion, E., Chertemps, T., Lucas, P., Renault, D., Maibeche, M., & Siaussat, D. (2016) Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral olfactory response and sexual behavior in a pest insect. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(4): 3073–3085.
- Laothawornkitkul, J., Paul, N. D., Vickers, C. E., Possell, M., Taylor, J. E., Mullineaux, P. M., & Hewitt, C. N. (2008) Isoprene emissions influence herbivore feeding decisions. *Plant, Cell Environ.* 31(10): 1410–1415.
- Lee, A. K. Y., & Chan, C. K. (2007) Heterogeneous reactions of linoleic acid and linolenic acid particles with ozone: Reaction pathways and changes in particle mass, hygroscopicity, and morphology. *J. Phys. Chem. A.* 111(28): 6285–6295.
- Li, T., Blande, J. D., & Holopainen, J. K. (2016) Atmospheric transformation of plant volatiles disrupts host plant finding. *Sci. Rep.* 6(1): 33851. <http://www.nature.com/articles/srep33851>.
- Li, Z., Yang, J., Shang, B., Agathokleous, E., Rubert-Nason, K. F., Xu, Y., & Feng, Z. (2021) Nonlinear responses of foliar phenylpropanoids to increasing O<sub>3</sub> exposure: Ecological implications in a *Populus* model system. *Sci. Total Environ.* 767: 144358.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144358>.
- Liechti, R., & Farmer, E. E. (2002) The jasmonate pathway. *Science.* 296(5573): 1649–1650.  
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1071883>.
- Lindroth, R. L. (2010) Impacts of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> on forests: Phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. *J. Chem. Ecol.* 36: 2–21.
- Llusià, J., Peñuelas, J., & Gimeno, B. S. (2002) Seasonal and species-specific response of VOC

- emissions by Mediterranean woody plant to elevated ozone concentrations. *Atmos. Environ.* 36(24): 3931–3938.
- Lun, X., Lin, Y., Chai, F., Fan, C., Li, H., & Liu, J. (2020) Reviews of emission of biogenic volatile organic compounds (BVOCs) in Asia. *J. Environ. Sci.* 95: 266–277.  
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.04.043>.
- Manosalva, L., Pardo, F., Perich, F., Mutis, A., Parra, L., Ortega, F., Isaacs, R., & Quiroz, A. (2011) Behavioral responses of clover root borer to long-chain fatty acids from young red clover (*Trifolium pratense*) roots. *Environ. Entomol.* 40(2): 399–404.
- Martín, J. B. S., Quiroz, A., Verdugo, J. A., Parra, L., Hormazabal, E., Astudillo, L. A., Rojas-Herrera, M., & Ramírez, C. C. (2014) Host selection and probing behavior of the poplar aphid *Chaitophorus leucomelas* (Sternorrhyncha: Aphididae) on two poplar hybrids with contrasting susceptibility to aphids. *J. Econ. Entomol.* 107(1): 268–276.
- Masui, N., Agathokleous, E., Mochizuki, T., Tani, A., Matsuura, H., & Koike, T. (2021) Ozone disrupts the communication between plants and insects in urban and suburban areas: an updated insight on plant volatiles. *J. For. Res.* 32(4): 1337–1349. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01287-4>.
- Masui, N., Agathokleous, E., Tani, A., Matsuura, H., & Koike, T. (2022) Plant-insect communication in urban forests: Similarities of plant volatile compositions among tree species (host vs. non-host trees) for alder leaf beetle *Agelastica coerulea*. *Environ. Res.* 204: 111996.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111996>.
- Masui, N., Inoue, S., Agathokleous, E., Matsuura, H., & Koike, T. (2023a) Elevated ozone alters long-chain fatty acids in leaves of Japanese white birch saplings. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30: 79161–79170. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28056-0>.
- 増井昇・小池孝良・北岡哲・渡邊陽子・佐藤冬樹・渡部敏裕 (2022) オゾン存在下でのヤマナラシ属二種の病虫害への応答. 樹木医学研究26 : 26-27.
- Masui, N., Mochizuki, T., Tani, A., Matsuura, H., Agathokleous, E., Watanabe, T., & Koike, T. (2020) Does ozone alter the attractiveness of Japanese white birch leaves to the leaf beetle *Agelastica coerulea* via changes in biogenic volatile organic compounds (BVOCs): an examination with the Y-tube test. *Forests.* 11: 58. <https://www.mdpi.com/1999-4907/11/1/58>.
- Masui, N., Shiojiri, K., Agathokleous, E., Tani, A., & Koike, T. (2023b) Elevated O<sub>3</sub> threatens

- biological communications mediated by plant volatiles: A review focusing on the urban environment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 53(22):1982-2001.  
<https://doi.org/10.1080/10643389.2023.2202105>.
- 増井昇・菅井徹人・渡邊陽子・渡部敏裕・塩尻かおり・佐々木圭子・藤戸永司・荒川圭太・佐藤冬樹・小池孝良 (2021) 高オゾン環境下でのヤマナラシ属2種の成長と病虫害の観察 : 中間報告. 北方森林保全技術 38 : 1-8.
- Matsuki, S., Sano, Y., & Koike, T. (2004) Chemical and physical defence in early and late leaves in three heterophyllous birch species native to northern Japan. *Ann. Bot.* 93: 141–147.
- Matyssek, R., Wieser, G., Calfapietra, C., De Vries, W., Dizengremel, P., Ernst, D., Jolivet, Y., Mikkelsen, T. N., Mohren, G. M. J., Le Thiec, D., Tuovinen, J. P., Weatherall, A., & Paoletti, E. (2012) Forests under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future directions for research. *Environ. Pollut.* 160: 57–65.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.007>.
- McFrederick, Q. S., Fuentes, J. D., Roulston, T., Kathilankal, J. C., & Lerdau, M. (2009) Effects of air pollution on biogenic volatiles and ecological interactions. *Oecologia.* 160(3): 411–420.
- McFrederick, Q. S., Kathilankal, J. C., & Fuentes, J. D. (2008) Air pollution modifies floral scent trails. *Atmos. Environ.* 42(10): 2336–2348.
- Mitra, P., Das, S., & Barik, A. (2020) Leaf waxes from *Lathyrus sativus*: short-range attractant and stimulant for nymph laying in a viviparous insect. *Chemoecology.* 30(3): 117–129.  
<https://doi.org/10.1007/s00049-020-00303-7>.
- Mitra, S., Sarkar, N., & Barik, A. (2017) Long-chain alkanes and fatty acids from *Ludwigia octovalvis* weed leaf surface waxes as short-range attractant and ovipositional stimulant to *Altica cyanea* (Weber) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bull. Entomol. Res.* 107(3): 391–400.
- Mochizuki, T., Ikeda, F., Sawakami, K., & Tani, A. (2020) Monoterpene emissions and the geranyl diphosphate content of *Acer* and Fagaceae species. *J. For. Res.* 25(5): 339–346.
- Mochizuki, T., Kawamura, K., Miyazaki, Y., Kunwar, B., and Boreddy, S. K. R. (2021) Distributions and sources of low-molecular-weight monocarboxylic acids in gas and particles from a deciduous broadleaf forest in northern Japan, *Atmos. Chem. Phys.* 19: 2421–2432.  
<https://doi.org/10.5194/acp-19-2421-2019>
- Moise, T., & Rudich, Y. (2002) Reactive uptake of ozone by aerosol-associated unsaturated fatty

- acids: kinetics, mechanism, and products. *J. Phys. Chem. A.* 106(27): 6469–6476.  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp025597e>.
- De Moraes, C. M., Mescher, M. C., & Tumlinson, J. H. (2001) Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature.* 410: 577–580.  
<http://www.nature.com/articles/35069058>.
- Mukherjee, A., & Barik, A. (2014) Long-chain free fatty acids from *Momordica cochinchinensis* Spreng flowers as allelochemical influencing the attraction of *Aulacophora foveicollis* Lucas (Coleoptera: Chrysomelidae). *Allelopath. J.* 33(2): 255–266.
- 及川 聞太・松木 佐和子・斎藤 秀之・澁谷 正人・小池 孝良 (2012) 落葉広葉樹の葉を餌とした食性の異なる植食性昆虫の生残. 北方森林研究60 : 111-112.
- Okamoto, T., Kawakita, A., Goto, R., Svensson, G. P., & Kato, M. (2013) Active pollination favours sexual dimorphism in floral scent. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280(1772): 20132280.  
<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2013.2280>.
- Otieno, M., Karpati, Z., Peters, M. K., Duque, L., Schmitt, T., & Steffan-Dewenter, I. (2023) Elevated ozone and carbon dioxide affects the composition of volatile organic compounds emitted by *Vicia faba* (L.) and visitation by European orchard bee (*Osmia cornuta*). *PLoS One.* 18(4): e0283480. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0283480>.
- Papagni, C., Arey, J., Atkinson, R. (2001) Rate constants for the gas-phase reactions of OH radicals with a series of unsaturated alcohols. *Int J Chem Kinet.* 33: 142–147.
- Park, I.-K., Lee, S.-G., Shin, S.-C., Kim, C.-S., & Ahn, Y.-J. (2004) Feeding and attraction of *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Chrysomelidae) to Betulaceae plants. *J. Econ. Entomol.* 97(6): 1978–1982.
- Pawlowski, S. P., Sweeney, J. D., & Hillier, N. K. (2020) Electrophysiological responses of the beech leaf-mining weevil, *Orchestes fagi*, to seasonally-variant volatile organic compounds emitted by american beech, *Fagus grandifolia*. *J. Chem. Ecol.* 46(10): 935–946.  
<https://link.springer.com/10.1007/s10886-020-01216-z>.
- Pellegrini, E., Cioni, P. L., Francini, A., Lorenzini, G., Nali, C., & Flamini, G. (2012) Volatiles emission patterns in poplar clones varying in response to ozone. *J. Chem. Ecol.* 38(7): 924–932.
- Piersanti, S., Reborá, M., Ederli, L., Pasqualini, S., & Salerno, G. (2020) Role of chemical cues in cabbage stink bug host plant selection. *J. Insect Physiol.* 120: 103994.

- <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103994>.
- Pinto, D. M., Blande, J. D., Nykänen, R., Dong, W. X., Nerg, A. M., & Holopainen, J. K. (2007) Ozone degrades common herbivore-induced plant volatiles: Does this affect herbivore prey location by predators and parasitoids? *J. Chem. Ecol.* 33(4): 683–694.
- Pinto, D. M., Blande, J. D., Souza, S. R., Nerg, A. M., & Holopainen, J. K. (2010) Plant volatile organic compounds (VOCs) in ozone (O<sub>3</sub>) polluted atmospheres: The ecological effects. *J. Chem. Ecol.* 36: 22–34.
- Proffit, M., Lapeyre, B., Buatois, B., Deng, X. X., Arnal, P., Gouzerh, F., Carrasco, D., & Hossaert-McKey, M. (2020) Chemical signal is in the blend: bases of plant-pollinator encounter in a highly specialized interaction. *Sci. Rep.* 10: 1–11. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-66655-w>.
- Qu, L., Wang, Y., Masyagina, O., Kitaoka, S., Fujita, S., Kita, K., Prokushkin, A., & Koike, T. (2022a) Larch: a promising deciduous conifer as an eco-environmental resource. In: Gonçalves AC and Fonseca TF (eds) Conifers - recent advances. *IntechOpen*. pp 1–37. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101887>.
- Qu, L., Wang, Y., Shi, C., Wang, X., Masui, N., Rötzer, T., Watanabe, T., & Koike, T. (2022b) Vigor and health of urban green resources under elevated O<sub>3</sub> in Far East Asia. In L. Hufnagel (ed.), Vegetation dynamics, changing ecosystems and human responsibility. *IntechOpen*. pp. 1–26.
- Reissell, A., Aschmann, sara m., Atkinson, R., & Arey, J. (2002) Products of the gas-phase reactions of myrcene and ocimene with OH radicals and O<sub>3</sub>. *J. Geophys. Res.* 107: ACH 3-1–ACH 3-6. <https://doi.org/10.1029/2001JD001234>.
- Ridgway, H. F., Mohan, B., Cui, X., Chua, K. J., & Islam, M. R. (2017) Molecular dynamics simulation of gas-phase ozone reactions with sabinene and benzene. *J. Mol. Graph. Model.* 74: 241–250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.04.020>.
- Rohrig, E., Sivinski, J., Teal, P., Stuhl, C., & Aluja, M. (2008) A floral-derived compound attractive to the tephritid fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Chem. Ecol.* 34(4): 549–557.
- Roy, N., Laskar, S., & Barik, A. (2012) The attractiveness of odorous esterified fatty acids to the potential biocontrol agent, *Altica cyanea*. *J. Asia. Pac. Entomol.* 15(2): 277–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2012.03.001>.

- Rudich, Y., Talukdar, R.K., Fox, R.W., Ravishankara, A.R. (1996) Rate coefficients for reactions of NO<sub>3</sub> with a few olefins and oxygenated olefins. *J. Phys. Chem.* 100: 5374–5381.
- Ryalls, J. M. W., Bromfield, L. M., Bell, L., Jasper, J., Mullinger, N. J., Blande, J. D., & Girling, R. D. (2022) Concurrent anthropogenic air pollutants enhance recruitment of a specialist parasitoid. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 289(1986).
- Sakikawa, T., Shi, C., 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. Agric. Meteorol.* 72(2): 80–84.
- Sarkar, N., & Barik, A. (2015) Free fatty acids from *Momordica charantia* L. flower surface waxes influencing attraction of *Epilachna dodecastigma* (Wied.) (Coleoptera: Coccinellidae). *Int. J. Pest Manag.* 61: 47–53.
- Sarkar, N., Mukherjee, A., & Barik, A. (2013) Olfactory responses of *Epilachna dodecastigma* (Coleoptera: Coccinellidae) to long-chain fatty acids from *Momordica charantia* leaves. *Arthropod. Plant. Interact.* 7(3): 339–348.
- Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A., & Dicke, M. (2005) Insect-plant biology. *Oxford University Press*, Oxford.
- Shiojiri, K., Takabayashi, J., Yano, S., & Takafuji, A. (2000) Herbivore-species-specific interactions between crucifer plants and parasitic wasps (Hymenoptera: Braconidae) that are mediated by infochemicals present in areas damaged by herbivores. *Appl. Entomol. Zool.* 35(4): 519–524. <https://doi.org/10.1303/aez.2000.519>.
- Shuttleworth, A., & Johnson, S. D. (2020) Using two confluent capillary columns for improved gas chromatography-electroantennographic detection (GC-EAD). *Entomol. Exp. Appl.* 168(2): 191–197. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eea.12873>.
- Sicard, P., Agathokleous, E., Araminiene, V., Carrari, E., Hoshika, Y., De Marco, A., & Paoletti, E. (2018) Should we see urban trees as effective solutions to reduce increasing ozone levels in cities? *Environ. Pollut.* 243: 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.049>.
- Sicard, P., De Marco, A., Agathokleous, E., Feng, Z., Xu, X., Paoletti, E., Rodriguez, J. J. D., & Calatayud, V. (2020) Amplified ozone pollution in cities during the COVID-19 lockdown. *Sci. Total Environ.* 735: 139542. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004896972033059X>.
- Smith, A.M., Rigler, E., Kwok, E.S.C., Atkinson, R. (1996) Kinetics and products of the gas-phase

- reactions of 6-methyl-5-hepten-2-one and *trans*-cinnamaldehyde with OH and NO<sub>3</sub> radicals and O<sub>3</sub> at 29672K. *Environmental Science and Technology*. 30: 1781–1785.
- Sugai, T., Okamoto, S., Agathokleous, E., Masui, N., Satoh, F., & Koike, T. (2020) Leaf defense capacity of Japanese elm (*Ulmus davidiana* var. *japonica*) seedlings subjected to a nitrogen loading and insect herbivore dynamics in a free air ozone-enriched environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27(3): 3350–3360.
- Sun, J. G., Huang, L. Q., & Wang, C. Z. (2012) Electrophysiological and behavioral responses of *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) to tobacco volatiles. *Arthropod. Plant. Interact.* 6(3): 375–384.
- Takabayashi, J., & Shiojiri, K. (2019) Multifunctionality of herbivory-induced plant volatiles in chemical communication in tritrophic interactions. *Curr. Opin. Insect Sci.* 32: 110–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.01.003>.
- Takei, M., Yoshida, S., Kawai, T., Hasegawa, M., & Suzuki, Y. (2015) Adaptive significance of gall formation for a gall-inducing aphids on Japanese elm trees. *J. Insect Physiol.* 72: 43–51.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.11.006>.
- Tani, A., & Kawawata, Y. (2008) Isoprene emission from the major native *Quercus* spp. in Japan. *Atmos. Environ.* 42(19): 4540–4550.
- Tani, A., & Mochizuki, T. (2021) Review: Exchanges of volatile organic compounds between terrestrial ecosystems and the atmosphere. *J. Agric. Meteorol.* 77(1): 66–80.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/agrmet/77/1/77\\_D-20-00025/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/agrmet/77/1/77_D-20-00025/_article).
- Tani, A., Tobe, S., & Shimizu, S. (2010) Uptake of methacrolein and methyl vinyl ketone by tree saplings and implications for forest Atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 44(18): 7096–7101.  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es1017569>.
- Topps, J. ., & Elliott, R. C. (1965) Heterophyllous shoots in *Betula papyrifera*. *Nat. Publ. Gr.* 205: 1030–1031.
- Tricoire-Leignel, H., Thany, S. H., Gadenne, C., & Anton, S. (2012) Pest insect olfaction in an insecticide-contaminated environment: Info-disruption or hormesis effect. *Front. Physiol.* 3: 1–6.
- Tröstl, J., Chuang, W. K., Gordon, H., Heinritz, M., Yan, C., Molteni, U., Ahlm, L., Frege, C., Bianchi, F., Wagner, R., Simon, M., Lehtipalo, K., Williamson, C., Craven, J. S., Duplissy, J.,

- Adamov, A., Almeida, J., Baltensperger, U. et al. (2016) The role of low-volatility organic compounds in initial particle growth in the atmosphere. *Nature*. 533(7604): 527–531.
- Trowbridge, A. M., & Stoy, P. C. (2013) BVOC-mediated plant-herbivore interactions. In: Niinemets Ü, Monson RK (eds) *Biology, controls and models of tree volatile organic compound emissions*. Springer, Dordrecht, pp 21–46.
- Uefune, M., Kugimiya, S., Sano, K., & Takabayashi, J. (2012) Herbivore-induced plant volatiles enhance the ability of parasitic wasps to find hosts on a plant. *J. Appl. Entomol.* 136: 133–138.
- Uefune, M., Shiojiri, K., & Takabayashi, J. (2017) Oviposition of diamondback moth *Plutella xylostella* females is affected by herbivore-induced plant volatiles that attract the larval parasitoid *Cotesia vestalis*. *Arthropod. Plant. Interact.* 11(2): 235–239.
- Vanderplanck, M., Lapeyre, B., Brondani, M., Opsommer, M., Dufay, M., Hossaert-McKey, M., & Proffit, M. (2021) Ozone pollution alters olfaction and behavior of pollinators. *Antioxidants*. 10(5): 636. <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/5/636>.
- Vitale, M., Amitrano, W., Hoshika, Y., & Paoletti, E. (2019) Plant species-specific litter decomposition rates are directly affected by tropospheric ozone: Analysis of trends and modelling. *Water, Air, Soil Pollut.* 230: 311. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4339-y>.
- Vuorinen, T., Nerg, A. M., Vapaavuori, E., & Holopainen, J. K. (2005) Emission of volatile organic compounds from two silver birch (*Betula pendula* Roth) clones grown under ambient and elevated CO<sub>2</sub> and different O<sub>3</sub> concentrations. *Atmos. Environ.* 39(7): 1185–1197.
- Wang, X. N., Agathokleous, E., Qu, L. Y., Watanabe, M. and Koike, T. (2016) Effects of CO<sub>2</sub> and/or O<sub>3</sub> on the interaction between root of woody plants and ectomycorrhizae. *J. Agric. Meteorol.* 72: 95-105.
- Wang, X., Wang, S., Zhang, S., Gu, C., Tanvir, A., Zhang, R., Zhou, B., (2022) Clustering analysis on drivers of O<sub>3</sub> diurnal pattern and interactions with nighttime NO<sub>3</sub> and HONO. *Atmosphere*. 13: 351. <https://doi.org/10.3390/atmos13020351>
- Watanabe, M., Hoshika, Y., Inada, N., Wang XN, Mao, QZ. & Koike, T. (2013) Photosynthetic traits of Siebold's beech and oak saplings grown under free air ozone exposure in northern Japan. *Environ. Pollut.* 174: 50-56
- Xu, H., Xie, H., Wu, S., Wang, Z., & He, K. (2019) Effects of elevated CO<sub>2</sub> and increased N fertilization on plant secondary metabolites and chewing insect fitness. *Front. Plant Sci.* 10: 739.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00739>

Yan, K., Chen, W., He, X., Zhang, G., Xu, S., & Wang, L. (2010) Responses of photosynthesis, lipid peroxidation and antioxidant system in leaves of *Quercus mongolica* to elevated O<sub>3</sub>. *Environ. Exp. Bot.* 69(2): 198–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.03.008>.

Zhang, T., Xu, X., & Su, Y. (2022) Long-term measurements of ground-level ozone in Windsor, Canada and surrounding areas. *Chemosphere.* 294: 133636.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133636>.

Zhang, X.-M. (2018) Floral volatile sesquiterpenes of *Elsholtzia rugulosa* (Lamiaceae) selectively attract Asian honey bees. *J. Appl. Entomol.* 142(3): 359–362.  
<http://doi.wiley.com/10.1111/jen.12481>.