

多年生草本イラクサの被食応答における表現型可塑性

Phenotypic plasticity in response to browsing in a perennial herbaceous plant,

Urtica thunbergiana.

岩手大学大学院

連合農学研究科

加藤 禎孝

目次

第1章 序章.....	5
1.1 植物による誘導防御	5
1.2 親植物における誘導防御が子植物の防御形質に及ぼす影響.....	6
1.3 被食頻度の異なる地域間での誘導防御の差異.....	7
1.4 調査種.....	8
1.5 本研究の目的.....	8
第2章 刺毛形質と成長に及ぼす茎頂切除の影響.....	10
2.1 はじめに.....	10
2.2 材料と方法.....	11
2.2.1 調査地.....	11
2.2.2 切除実験及び調査の方法.....	12
2.2.3 分析方法.....	17
2.3 結果.....	19
2.3.1 光環境と土壌中の硝酸イオン濃度.....	19
2.3.2 葉面積・刺毛形質・防御度に及ぼす茎頂切除の影響：同一調査時における 処理間の比較.....	19
2.3.3 葉面積・刺毛形質・防御度の季節変化に及ぼす茎頂切除の影響.....	36
2.3.4 夏の葉面積・刺毛形質・防御度における年度間変化と年度間変化に及ぼす 茎頂切除の影響.....	37
2.3.5 葉面積・刺毛形質の可塑性における経時的変化と前年切除の影響.....	46
2.3.6 成長に及ぼす茎頂切除の影響.....	47
2.4 考察.....	55
2.5 まとめ.....	59

第3章 親植物における被食応答が子植物の刺毛形質に及ぼす影響.....	61
3.1 はじめに.....	61
3.2 材料と方法.....	62
3.2.1 親植物における茎頂切除が子植物の刺毛形質に及ぼす影響.....	62
3.2.2 子植物の刺毛形質に及ぼすシカの採食の影響.....	64
3.2.3 分析方法.....	65
3.3 結果.....	69
3.3.1 親植物における茎頂切除が子植物の葉面積、刺毛形質、草丈に及ぼす影響	69
3.3.2 子植物の葉面積と刺毛形質に及ぼすシカの採食の影響.....	69
3.4 考察.....	82
3.4.1 親植物における茎頂切除が子植物の刺毛形質に及ぼす影響.....	82
3.4.2 子世代の刺毛形質に及ぼすシカの採食の影響.....	83
3.5 まとめ.....	84
第4章 被食頻度の異なる地域間での誘導防御の程度の差異.....	86
4.1 はじめに.....	86
4.2 材料と方法.....	87
4.2.1 自然集団における未被食個体の刺毛形質の集団間変異.....	87
4.2.2 栽培した未被食個体の刺毛形質の集団間変異.....	89
4.2.3 刺毛形質における誘導防御の大きさの集団間変異.....	90
4.2.4 統計分析.....	94
4.3 結果.....	95
4.3.1 自然集団における未被食個体の刺毛形質の集団間変異.....	95
4.3.2 栽培で得られた未被食個体の刺毛形質の集団間変異.....	96
4.3.3 刺毛形質における誘導防御の大きさの集団間変異.....	96
4.4 考察.....	107

4.4.1 未被食個体の刺毛形質の集団間変異.....	107
4.4.2 刺毛形質における誘導防御の大きさの集団間変異.....	108
4.5 まとめ.....	110
第5章 総合考察.....	111
5.1 刺毛形質における誘導防御と時間的变化及び適応的意義.....	111
5.2 親植物における被食が子植物の刺毛形質に及ぼす影響及びその適応的意義....	114
5.3 刺毛形質とその誘導防御の集団間変異.....	117
第6章 結論.....	120
摘要.....	122
Summary	124
引用文献.....	127
謝辞.....	136

第1章 序論

1.1 植物における誘導防御

植物は食物として利用され、病原体、植食性昆虫から大型哺乳類まで、様々な生物から食物資源として被食される。植食者と植物の相互作用系の研究は、生物間の相互作用系の研究の中心をなすものの一つである。植物は固着生活者であるため、被食を回避するために植食者に対して様々な防御機構を進化させてきた。植物の防御機構は、大きく化学的防御と物理的防御に分けることができる。(Heil 2010)。化学的防御は、植物体内で生産される化学物質による防御機構で、植食者にたいして苦味や毒作用、また栄養吸収阻害効果をもたらす。哺乳類に対する化学防御物質としては二次代謝物質のフェノール類、テルペノイド、窒素を含む化合物等が知られている。多くの植食者に対する一般的な物理的防御は刺やトライコームであり、その多くは茎、枝、葉に見られる。(Grubb 1992)。細胞壁の外に形成されるクチクラはクチン、疎水性の脂肪酸や脂肪酸エステル(Brett & Waldron 1990) からなり、病原体にたいして障害物として機能している。

被食後に現れる形質の変化は誘導反応の一種であり、植食者の好みや採食量を減少させることがある。被食によって現れる誘導反応には、ダメージを受けた後、同じシーズン内に反応が現れるもの(即時反応: rapid response; Tuomi *et al.* 1990) と次のシーズンに反応が現れるもの(遅延反応: delayed response; Haukioja 1990a、1990b、Tuomi *et al.* 1990) が知られている。遅延反応は多年生植物にのみ認められる現象である。このような誘導反応の結果として被食量が減少する現象を誘導防御という (Karban & Myers 1989、Padilla 2001、Kopp & Tollrian 2003b)。植物の誘導防御についての生態学的研究はこれまで多数行われてきた (Pullin & Gilbert 1989、Gowa 1997、Young 1987、Pigliucci 2001、Heil 2010)。例えば、ヨーロッパ産イラクサ属 *Urtica dioica* では、刺毛が哺乳類に対する防御機能を持つことが明らかにされており、被食後に新しく形成された葉で刺毛密度が高くなることが知られている (Pullin & Gilbert 1989)。

遺伝子型ごとの表現型可塑性、すなわち、環境の変異と表現型の変異との関係は反応基準とよばれている (Futuyma 1986)。植食者が多い場所では多年生草本や木本種は毎年被食され続けるリ

スクがあるため、被食の頻度（年度をまたぐ被食の繰り返し）と誘導防御の程度との関係、すなわち、被食の頻度と防御形質値との関係を表す反応基準は多年生植物の適応度に大きく関わると考えられる。このような防御形質の反応基準を明らかにするためには、被食の頻度（年度をまたぐ被食の繰り返し）と誘導防御の程度（被食による防御形質の変化の程度）との関係を調べる必要があるが、このような視点から行われた研究事例は少ない（Kamata *et al.* 1996、Young *et al.*, 2003）。

1.2 親植物における誘導防御が子植物の防御形質に及ぼす影響

親に現れた誘導防御が子植物に伝わる現象が知られている。例えば、セイヨウダイコン *Raphanus raphanistrum* は、モンシロチョウの幼虫によって食害されると刺状毛状突起（トライコーム）とカラシ油配糖体の濃度を増加させる（Agrawal 1999）。このような誘導防御を示す親世代のセイヨウダイコン由来の子植物は、被食されていなくても刺状毛状突起が多く、カラシ油配糖体の濃度も高い。このことから、親世代に現れた誘導防御が何らかのメカニズムによって子世代に伝達されると考えられている（Agrawal 1999）。親世代に現れた誘導防御の子世代への伝達は継代防衛誘導（transgenerational defense induction）と呼ばれる（Holeski *et al.* 2012、田中 2017）。継代防衛誘導は、環境に適応した表現型を次世代に伝える可能性があり、適応進化において重要な役割を果たす可能性がある（Gilbert & Epel 2009）。継代防衛誘導のメカニズムとして有力視されているのは世代間エピジェネティック遺伝（transgenerational epigenetic inheritance）と呼ばれる遺伝的プロセスである（Rakyan & Whitelaw 2003、Jablonka & Raz 2008）。世代間エピジェネティック遺伝とは、ある世代において生じたエピジェネティックな変化（環境による遺伝子発現プロセスの変化を介して遺伝子型の変化を伴わずに表現型が変化するという現象）が子世代に遺伝するという現象である（Agrawal 1999、Jablonka & Lamb 2005、Jablonka & Raz 2008）。

植物の誘導防御についても継代防衛誘導が生じることを明示した研究事例があるが、知見は蓄積されていない（Agrawal 2001、Holeski 2007、Scoville *et al.* 2011）。当年生実生は植食者について情報を得る機会が少ないため、被食についての情報を親から得ることを可能にする継代防衛誘導は子植物の適応度を高めることに役立つ可能性がある。植物の誘導防御の適応的意義とその進化

を明らかにするためには、継代防衛誘導の視点、すなわち、親世代の被食の頻度や程度と子世代の防御形質との関係を明らかにする必要があるといえる。

1.3 被食頻度の異なる地域間での誘導防御の差異

植物の被食防御形質には種内変異があり、遺伝的変異や誘導防御（すなわち、採食圧の場所間変異）を反映している（Pollard & Briggs 1984、Takada *et al.* 2001、Shikata *et al.* 2013）。例えば、*U. dioica* の刺毛形質には明瞭な遺伝的変異があることが示されている（Pollard and Briggs 1982）。しかしながら、植物の誘導防御のパターンや程度にどのような種内変異があるのかを検討した事例は僅かしかない（Zangerl & Berenbaum 1990、Mutikainen & Walls 1995、Wang *et al.* 2012）。例えば、ヨーロッパ産イラクサ属 *Urtica dioica* についてみると、フィンランド南部の亜種 *U. dioica* subsp. *dioica* は摘葉に応答し、摘葉後に形成された葉の刺毛密度が高くなることが示されている。その一方で、同地域北部の亜種 *U. dioica* subsp. *Sondenii* は摘葉に応答しないが茎頂切除に応答し、茎頂切除後に形成された葉の刺毛密度が高くなる（Mutikainen & Walls 1995）。このような亜種間での誘導防御の違いは、各亜種の分布域における植食動物の種類の違いを反映していると考えられている。

防御形質の進化を扱った理論的研究によると、誘導防御は、被食の発生頻度が断続的であり、なおかつ被食される可能性をある程度予測できる環境下で進化しやすいと考えられている（Karban & Baldwin 1997、Tollrian & Harvell 1999）。したがって、植食者が生息している地域と稀な地域の集団では誘導防御の程度に差違があり、前者の方が後者よりも誘導防御の程度が大きいと予想される。一方、植食者の密度が高くて絶えず食害が続く地域であれば、恒常的な防御形質が進化する可能性がある。誘導防御の程度の地域変異（集団間変異）についての予想を検証することにより、誘導防御の進化に関する理解を深めることができるといえる。

1.4 調査種

本研究では、イラクサ科イラクサ属の多年生草本であるイラクサ (*Urtica thunbergiana*) を用いた。イラクサは日本の中央部から南部にかけて分布し、林縁部で養分の多い場所に生育している (北村・村田 1961. 加藤 2001)。本種は雌雄同株の風媒花であり (Molisch & Dobat 1979)、10月頃までに果実が成熟する。地上部は12月頃に枯れるが、10月頃に地下部でシュートが形成され、その一部は側方に伸びて栄養繁殖に貢献する (加藤 未発表資料)。イラクサの茎、葉柄、葉の表面・裏面には、ケイ酸質とカルシウムを主成分とする刺毛が形成される (Harberland 1886. Thurston 1969)。刺毛は中空となっており、ヒスタミン、酒石酸、シュウ酸等からなる毒液が充填されている (Fu *et al.* 2006)。刺毛は接触刺激によって先端部が壊れやすい。壊れた刺毛の先端部は鋭利であり、動物の皮膚に刺さると毒液が注入される (Lenggenhager 1974)。このため、刺毛は植食性の哺乳類に対して防御機能を持つ (Kato *et al.* 2008)

イラクサの刺毛形質 (葉の表面・裏面の刺毛数と刺毛密度) には地域変異があり、ニホンジカ (*Cervus nippon*) (以降はシカと表記する) が多く生息する場所のイラクサは刺毛数が多く刺毛密度も高い一方で、シカの生息数が少ない他地域のイラクサは逆に刺毛が少なく刺毛密度も低くなる傾向が認められている (Kato *et al.* 2008)。各地域で採取した果実を用いた栽培実験の結果から、このような地域変異には遺伝的な変異が関係していることが示されている。この植物を用いた野外での採食実験の結果から、このような地域変異はシカの採食による自然選択を介した適応進化を反映していると推定されている。

1.5 本研究の目的

以上の視点から、本研究では多年生草本イラクサの刺毛形質を対象に、(1) 年度をまたぐ誘導防御、(2) 世代をまたぐ誘導防御 (継代防衛誘導)、(3) 採食体制が異なる地域間での誘導防御の差違の実態を明らかにし、被食応答における表現型可塑性の適応的意義について考察する。この目的を達成するため、以下の3課題を設定した。

(1) シュートの損傷の回数と刺毛形質との関係を明らかにし、刺毛による年度をまたぐ誘導防御の適応的意義について考察する。このため、野外で2年間にわたる茎頂切除実験を行い、切除

回数と個葉面積及び刺毛形質との関係を明らかにする。

(2) 親世代におけるシュートの損傷が子世代の刺毛形質に及ぼす影響を分析することにより、継代防衛誘導の実態とその適応的意義について考察する。このため、茎頂を切除した個体およびシカに採食された個体から採取した果実を用いた栽培実験を行い、親世代におけるシュートの損傷が子世代の刺毛形質に及ぼす影響を明らかにする。

(3) シカによる採食体制が異なる地域間で刺毛形質に見られる誘導防御の程度を比較し、刺毛による誘導防御の適応進化について考察する。このため、シカの個体密度が異なる複数の地域から採取した果実を用いた栽培実験を行い、未被食個体の刺毛形質の集団間変異を明らかにする。さらに、採食頻度が異なる2地点に自生する当年生実生を対象とした茎頂切除実験を行い、刺毛形質に見られる誘導防御の程度の場所間変異を明らかにする。

第2章 刺毛形質と成長に及ぼす茎頂切除の影響

2.1 はじめに

植物の防御形質の可塑性、特に誘導防御についての生態学的研究はこれまで多数行われてきた (Pullin & Gilbert 1989、Young *et al.* 2003、Pigliucci 2001、Heil 2010)。多年生草本種や木本種の防御形質の反応基準を明らかにするためには、被食が翌年に形成される防御形質に及ぼす影響や年度をまたぐ複数の被食が防御形質に及ぼす影響を評価する必要があるが、このような多年生植物に特有の反応基準についての知見は蓄積されていない (Kamata *et al.* 1996、Young *et al.* 2003)。多年生草本であるイラクサについても、被食頻度と刺毛形質・成長についての表現型可塑性や反応基準についての知見は得られていない。

本章では、イラクサの刺毛形質と成長に注目して年度をまたぐ被食回数と被食応答との関係(反応基準)を分析し、本種の刺毛形質の表現型可塑性における特徴とその適応的意義を明らかにする目的で、シカが多く生息する奈良公園において、採食圧が低い場所(低採食圧区:フェンスで囲まれた竹林)でイラクサを対象に茎頂切除実験を行った。特に、年度をまたぐシカの採食頻度とイラクサの誘導防御形質・成長との関係及び、それらの形質の反応基準を明らかにするため、奈良公園内に生育するイラクサ実生を対象に2年連続で茎頂切除実験を行い、①1回(1年目の春に切除)の場合、②2回(1年目と2年目の春に切除)の場合、および③2年間無切除の場合で春期における茎頂切除がこれらの形質と成長に及ぼす影響がどのように異なるかを検討した。この実験では特に、以下の点に注目して分析を行った:(1)春の刺毛形質については、前年の切除がどのように影響しているか。(2)切除後に伸長する側枝につく葉の刺毛(すなわち夏に形成される刺毛)の形質は切除回数とどのように関係しているか。(3)切除回数が増えると成長への配分はどのように変化するか。さらに、本研究では調査個体の生育環境を評価するため、調査地の光環境と土壌養分(硝酸イオン濃度)も測定した。

2.2 材料と方法

2.2.1 調査地

奈良公園内の春日大社境内の高さ約 1.5m のフェンスで囲まれた竹林 (34°40' N, 35°50' E, 119m a.s.l.) に調査地を設定した (図 2.2.1)。この竹林は、南向きのなだらかな傾斜地に植栽されたモウソウチクの林分であり、春日大社の祭礼のために用いられるタケを育てる目的で植栽されたものである。2014 年の調査区内 (林内下層) の平均気温 (5 月 1 日～11 月 4 日の平均気温) は 19.4°C、最高気温と最低気温はそれぞれ 33.6°C、3.4°Cであった (加藤禎孝 未発表データ)。

この竹林には、イヌガシ、ヤブムラサキ、ニワトコ等の木本種が混生している。下層には草本が生育しているが、下層植生は単純である。竹林周辺部の植生は、イチイガシ、イヌガシ、アラカシ、スタジイ、クスノキ、ナギ等の常緑広葉樹、ナンキンハゼ、アセビ、イズセンリョウ等からなる常緑広葉樹林である。フェンスは 1980 年までに (1950 年から 1970 年代の間と推定) 設置されたようである (春日大社の工事を請け負っている工事会社の担当者の 2015 年時の証言による)。2011 年までは、年に 1 回～2 回、夏にフェンスを開け、竹林内の下草をシカに採食させていた (奈良の鹿愛護会職員の 2013 年時の証言による)。以上のことから、竹林内のイラクサは、フェンスの無い奈良公園の他の場所に比べてシカの採食圧が低く、断続的に被食を受けてきたと考えられる。なお、2012 年～本研究の期間中は、竹林内へのシカの侵入はなかった。

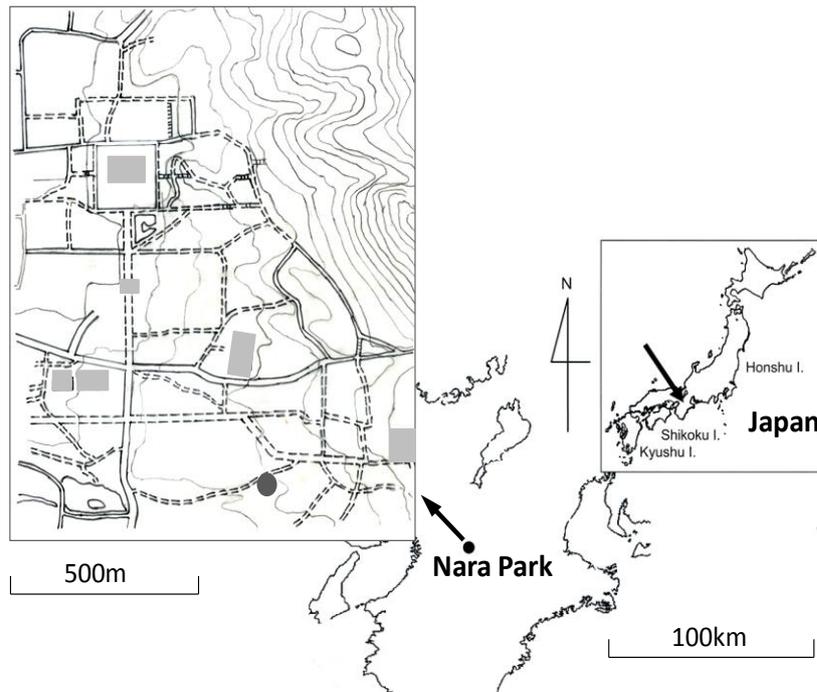


図 2.2.1 調査地の位置

図中の黒丸は調査地の位置を示す。

2.2.2 切除実験及び調査の方法

上記の竹林内に 2013 年に大きさ $10 \times 20\text{m}$ の調査区を設定した。調査区内に互いに 1-1.5m 離れて生育するイラクサの当年生実生を 2013 年 4 月に 120 個体選び、「2 年連続切除（2013 年春と 2014 年春に切除）」、「1 年のみ切除（2013 年春のみ切除）」、「対照（非切除）」の 3 グループ、各 40 個体に分け、切除グループの個体には茎頂切除を行った。切除は 2013 年 5 月 16 日と 2014 年 5 月 14 日に行った（図 2.2.2）。切除実験は、茎頂から 3 節目と 4 節目の間の茎をハサミで切除した。切除の後、使用したハサミを毎回 70%エタノール液に入れて消毒し、切断面には綿棒を用いてラノリンを塗布した。

春と夏における葉面積と刺毛形質の測定のため、以上の調査個体について毎年春と夏（2013 年 5 月 16 日、2013 年 8 月 20 日～21 日、2014 年 5 月 14 日、2014 年 8 月 27～31 日）に葉をサン

プリングした(図 2.2.2)。奈良公園ではイラクサは9月下旬~10月上旬まで伸長成長するので(加藤禎孝 未発表)、サンプリングした葉は生育期間中の状態を表すものといえる。春(5月)は、各個体について主軸の茎頂から3節目の葉を1枚採取した(図 2.2.3A)。夏(8月)については、非切除個体では主軸の茎頂から3節目の葉を1枚採取し(1個体あたり1枚;図 2.2.3B)、切除個体では切除後に伸長した左右の側枝(主軸茎頂から4節目の葉の腋から伸長した側枝)のそれぞれについて非切除個体の場合と同じ葉位(茎頂から3節目の葉)に付く葉を1枚ずつ(1個体あたり2枚)採取した(図 2.2.3C)。採取した葉は表面、裏面別々にスキャナー(Epson GT-X900 Seiko)を用いて解像度 800dpi で画像を取り込んだ。そして、この画像により葉面積と両面の刺毛数を測定した。刺毛密度はそれぞれの面の全刺毛数を葉面積で除して求めた。また、刺毛長については、以上の画像を用いて葉の両面からそれぞれ任意に刺毛5本を選び、フリーソフト LIA 32 (Yamamoto 1997)を用いてその長さを計測した。さらに、刺毛形質の防御機能を評価するため、刺毛長(個体ごとの刺毛長測定値の平均値)と刺毛密度(個体ごとの刺毛密度の平均値)の積を求め、この値を各個体の「防御度」とした。葉面積と刺毛形質を計測した個体数(葉枚数)は1調査時あたり処理グループあたりで5~40個体(5~60枚)である(表 2.2.1)。

調査個体の成長量を評価するため、毎年春と秋に(2013年5月23日、同年11月19-24日及び2014年5月14~15日、同年11月5日)各処理グループから5~15個体を選んで掘り、温室内で風乾した後、乾燥器で3日間(70°C)乾燥させ、根・葉・茎それぞれの乾重を測定した(表 2.2.1)。

調査個体の光環境は相対光量子束密度(Relative Photosynthetically active Photon Flux Density; RPPFD)で評価した。相対光量子束密度の測定は、曇天の日を選び、イラクサ個体が生えている10地点の地上部約70cm及び近接した全天の場所でLI-190SAクエンタムセンサー付きのデータロガーLI-1400(LI-COR, Lincoln, NE)を用いてPPFDを10回測定し、イラクサ個体生育地点での値を全天の平均値で除して求めた。この測定は2013年4月15日に実施した。また、2016年3月4日に土壌を採取し、土壌中の硝酸イオン濃度を次に示す方法で測定した。(1)土壌を5サンプルを採集し、1週間風乾する。(2)サンプルを2mmメッシュの篩に通す。(3)おおよそ50gの

サンプルを 100ml の三角フラスコに入れ、秤量する。(4) 24 時間 100℃で加熱処理後、秤量し、水分含有量を求める。(5) 各サンプルに 50ml の純水を加え、シェイカーで 1 時間振とうする。(6) 振とう後の上澄み液を遠心分離機で 10,000rpm、10 分間遠心する。(7) 上澄み液をとり、0.2 μ mメッシュのコマ型フィルターで濾過する。(8) 得られた原液に純水を加え、4 倍希釈液をつくる。(9) 原液及び希釈液を冷蔵庫で保存する。(10) 希釈液の硝酸イオン濃度を島津製作所製高速液体クロマトグラフ (LC-VP シリーズ LC-10A) を用いて測定する。

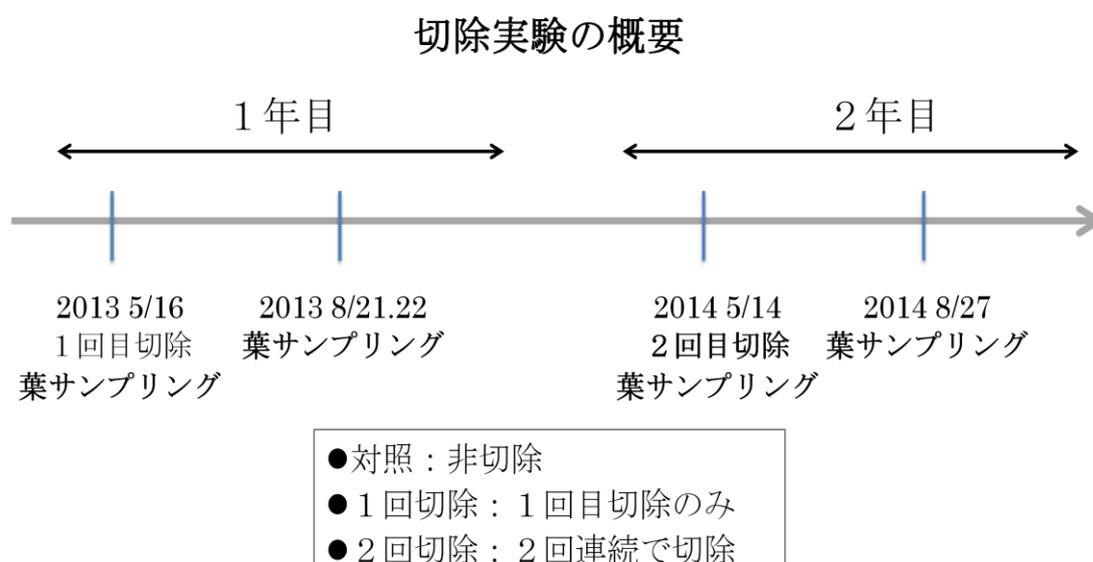


図 2.2.2 茎頂切除実験における切除と葉サンプリングの時期

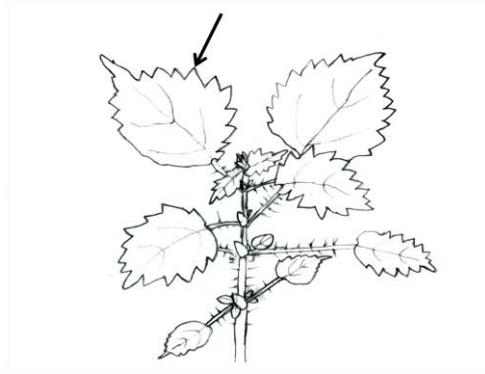
切除処理（茎頂切除）は 2013 年と 2014 年の春（5 月）に行った（2.2.3 参照）。刺毛形質測定のための葉のサンプリングは同年の春と夏（8 月）に行った。春のサンプリングと切除処理は同じ日に実施した。

表 2.2.1 茎頂切除実験における調査個体数

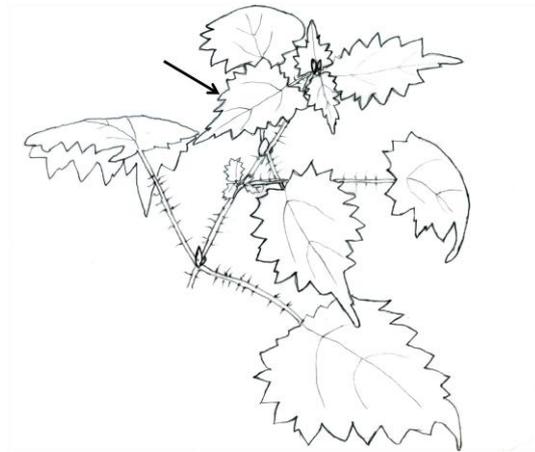
括弧内の数値は測定に供した葉の枚数を表す。

形質	処理グループ		
	対照	1回切除	2回切除
葉面積および刺毛形質			
2013 年春	40 (40)	40 (40)	40 (40)
2013 年夏	30 (30)	30 (60)	30 (57)
2014 年春	20 (20)	5 (5)	15 (15)
2014 年夏	10 (10)	15 (15)	14 (25)
根重・茎重・総葉重			
2013 年春	10	10	10
2013 年秋	10	10	9
2014 年春	10	5	5
2014 年秋	10	15	14

A



B



C

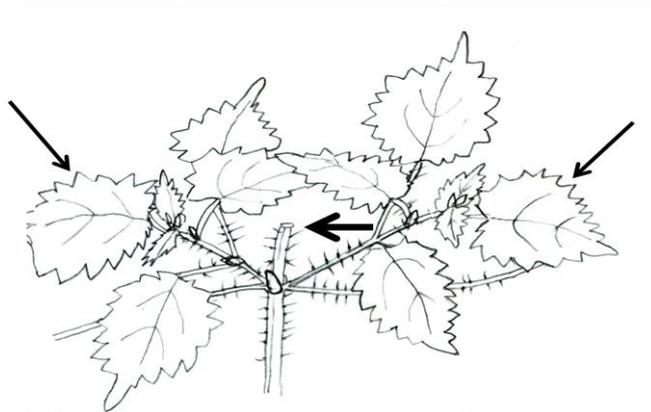


図 2.2.3 葉の採取部位

A: 春の採取部位。B: 非切除（対照）個体の夏の採取部位。C: 切除個体の夏の採取部位。葉は茎頂から3節目のものを1枚採取した。細矢印は採取した葉を示す。太矢印は春に切除した部位（3節と4節の節間）を示す。

2.2.3 分析方法

(1) 同一時期における葉面積・刺毛形質・防御度の処理間比較

2013年夏及び2014年春・夏の葉面積と刺毛形質（刺毛数、刺毛密度、刺毛長）について、同一調査時における処理グループ間の比較を行った。2013年夏の形質については、「1回切除」と「2回切除」の2グループをまとめて「切除」グループとし、このグループと対照グループ（非切除個体）との値の差の有意確率を nested ANOVA（切除処理にネストした個体の影響を考慮して切除の影響を分析する分散分析）を用いて形質ごとに計算した。2014年春の形質については、「切除」グループと「対照」グループとの平均値の差を t 検定を用いて分析した。2014年春の時点では、以上の「切除」グループは「2013年春に1回切除された個体」と「2013年春及び2014年春に2回切除された個体」を含むことになる。春の葉のサンプリングは切除処理と同じ日に行なったため、「切除」グループの葉は同日の切除の影響を受けていないと仮定して切除グループと対照グループとの差を分析し、諸形質に及ぼす前年切除の影響を推定した。2014年夏の形質については、「1回切除」、「2回切除」、「対照（非切除）」の3グループ間の値に有意差がないかどうかを2013年夏の場合と同様の nested ANOVA を用いて調べた。この nested ANOVA によりグループ間で有意差が検出された場合は、さらに多重比較（Dunnett 検定）を行い、2グループごとに有意差の有無を検討した。さらに、防御度についても同一調査時における処理グループ間の比較を行った。防御度は1個体1データのため、2013年夏と2014年春については処理グループ間の平均値に有意差がないかどうかを t 検定で調べた。これらの2013年夏と2014年春の値については、葉面積・刺毛形質と同様に「1回切除」と「2回切除」の2グループをまとめて「切除」グループとして分析を行った。また、2014年夏の防御度の処理グループ間の差は ANOVA（一元分散分析）を用いて分析した。以上の nested ANOVA、ANOVA 及び t 検定は SPSS version 9.01J (SPSS 1999) を用いて行った。

(2) 葉面積・刺毛形質・防御度の季節変異・年度間変異に及ぼす茎頂切除の影響

本研究では、葉面積・刺毛形質・防御度の季節変異及び年度間変異に及ぼす茎頂切除の影響を分析した。2013年の季節変異については、「1回切除」と「2回切除」の2グループをまとめて「切除」グループとし、季節変異におけるこのグループと「非切除（対照）」グループとの差を nested ANOVA（「季節間の差」、「切除の効果」、「季節と切除の交互作用」、「切除処理にネストした個体の効果」）を用いて形質ごとに分析した。2014年の季節変異については、「1回切除」、「2回切除」、「非切除（対照）」間の差を以上の方法と同様の nested ANOVA を用いて形質ごとに分析した。各形質の年度間変異に及ぼす茎頂切除の影響は、夏の葉面積・刺毛形質・防御度を対象に分析を行った。分析は、標本内配置実験（「年度間差」、「切除処理の効果」、「年度と切除処理の交互作用」、「切除処理にネストした個体」）を用いて行った。以上の nested ANOVA と標本内配置実験は SPSS version 9.01J (SPSS 1999)を用いて行った。

（3）葉面積・刺毛形質における可塑性とその経時的変化

葉面積および刺毛形質の茎頂切除に対する応答の程度とその経時的変化（季節・経年変化）を評価するため、切除個体の各形質値について可塑性値（value of plasticity；Rozendaal *et al.* 2006）を計算した。可塑性値は、切除個体について1個体ごとに計算される値であり、次の手順で計算した。まず（1）切除個体ごとに、ある時点における当該形質についての平均値を計算し（1個体あたり1測定値のみの場合はその値を使用）、次に（2）切除個体1個体ごとにこの値と対照個体の平均値（当該切除個体と同じ時期に測定された対照個体の測定値の平均値）との差の絶対値を求め、さらに（3）この差の絶対値を対照個体の平均値で除して100倍した値が当該切除個体・当該時期における可塑性値である。可塑性値は常に正の値をとる指数であり、対照個体の形質値との差を100分率で相対的に表す。すなわち、可塑性値が大きいほど当該形質の可塑性が大きいことを示す。この可塑性値について、測定時期による差の有無および処理（切除の繰り返し）の影響を評価するため、ウィルコクソンの符号付順位和検定を用いた分析を行った。以上の分析は統計ソフトウェア R（R Development Core Team 2010）を用いて行った。

(4) 総葉重・茎重・根重に及ぼす茎頂切除の影響

本研究では、総葉重・茎重・根重に及ぼす茎頂切除の影響を時期ごとに分析した。各器官の重量は乾燥重量で評価した。茎頂切除の影響は t 検定 (2013 年 11 月の場合) または分散分析 (2014 年の 5 月及び 8 月の場合) を用いて行った。2014 年 8 月の値については、以上の分析で処理間に有意な差が認められた場合は、多重比較 (Tukey 法) を用いて 2 処理間の差の有意性も評価した。以上の t 検定、分散分析及び多重比較は SPSS version 9.01J (SPSS 1999) を用いて行った。

2.3 結果

2.3.1 光環境と土壌中の硝酸イオン濃度

調査区内のイラクサ生育地の相対光量子束密度は $16.3\% \pm 1.8\%$ (平均値 \pm 標準誤差) であった。土壌中の硝酸イオン濃度は $4.93\text{mg/L} \pm 0.31\text{ mg/L}$ (平均値 \pm 標準誤差) であった。

2.3.2 葉面積・刺毛形質・防御度に及ぼす茎頂切除の影響：同一調査時における処理間の比較

葉面積については、1 年目の夏 (2013 年 8 月) は切除と対照との間で有意な差は認められなかった (表 2.3.1; 図 2.3.1)。一方、2 年目の春 (2014 年 5 月) の値については対照 (前年非切除) の方が切除 (前年切除) よりも有意に大きかった ($P < 0.05$; 表 2.3.1; 図 2.3.2)。2 年目の夏 (2014 年 8 月) についても処理グループ間で有意な差が認められたが、2014 年春に認められた傾向とは逆に、対照 $<$ 1 回切除 $<$ 2 回切除の順に大きくなる傾向が認められた ($P < 0.05$; 表 2.3.1; 図 2.3.2)。

刺毛数については、1 年目の夏の葉の表面の値は切除の方が対照よりも有意に刺毛数が多かった ($P < 0.05$; 表 2.3.1; 図 2.3.3)。1 年目の夏の裏面についても刺毛数の処理間差はマージナルに有意 ($P = 0.056$) であり、切除の方が対照よりも多かった。2 年目の春は両面ともに切除 (前年切除) と対照との間に有意な差は認められなかった (表 2.3.1; 図 2.3.4)。2 年目の夏についても

表面では処理グループ間の有意な差が認められなかったが、裏面では有意な差が認められ、対照 < 1回切除 < 2回切除の順に多くなる傾向が認められた ($P < 0.01$; 表 2.3.1; 図 2.3.5)。2年目夏の裏面の刺毛数については、対照と1回切除の差、及び1回切除と2回切除の差は有意であった(対照と1回切除 $P < 0.01$; 1回切除と2回切除 $P < 0.05$)。

刺毛密度については、1年目の夏は葉の両面ともに処理グループ間の有意な差は認められなかった(表 2.3.1; 図 2.3.6)。2年目については、春は両面とも切除(前年切除)の切除の方が対照よりも有意に高かったが(表面: $P < 0.001$; 裏面: $P < 0.01$; 表 2.3.1; 図 2.3.7)、夏は両面ともに処理グループ間の有意な差は認められなかった(表 2.3.1; 図 2.3.8)。

刺毛長についてみると、1年目の夏の葉は両面ともに処理グループ間の有意な差は認められなかった。表 2.3.1; 図 2.3.9)。2年目の春は両面ともに処理グループ間の有意な差は認められなかった(表 2.3.1; 図 2.3.10)。2年目の夏については表面・裏面ともに有意な差が認められた($P < 0.001$; 表 2.3.1; 図 2.3.11)。w s q 2年目の夏の表面では1回切除 < 対照 < 2回切除の順に長く、裏面では対照 < 1回切除 < 2回切除の順に長くなる傾向が認められた。2年目夏の表の刺毛長については、1回切除と対照の差、及び対照と2回切除の差は有意であった(1回切除と対照 $P < 0.05$; 対照と2回切除 $P < 0.05$)。2年目夏の裏の刺毛長についても、対照と1回切除の差、及び1回切除と2回切除の差は有意であった(対照と1回切除 $P < 0.01$; 1回切除と2回切除 $P < 0.001$)。

防御度については、1年目夏、2年目春、2年目夏のいずれも処理グループ間の有意な差は認められなかった(表 2.3.1; 図 2.3.12; 図 2.3.13)。

表 2.3.1 各グループの葉面積・刺毛形質値・防御度に及ぼす切除処理の影響（同一時期内での処理間の比較）。n.s.は有意な差が認められないことを示す（すなわち $P > 0.05$ ）。

形質	グループ	処理	測定時期	平均値 ±標準誤差	処理の効果 (切除/対照)	有意確率 (処理間差)
葉面積 (夏)	対照	非切除	2013年8月	6.41±0.60	1.1	n.s.
	1回切除・2回切除	切除		7.22±0.32		
葉面積 (春)	対照	非切除	2014年5月	9.44±1.12	0.6	n.s.
	1回切除・2回切除	前年切除		5.81±1.00		
葉面積 (夏) (2年目)	対照	非切除	2014年8月	4.36±0.65	1.2	n.s.
	1回切除	前年切除		5.12±0.70		
	2回切除	2年連続切除		6.94±0.56		
刺毛数 (夏;表面)	対照	非切除	2013年8月	25.9±3.5	1.4	n.s.
	1回切除・2回切除	切除		37.4±1.9		
刺毛数 (春;表面)	対照	非切除	2014年5月	24.3±4.5	1.4	n.s.
	1回切除・2回切除	前年切除		34.7±4.1		
刺毛数 (夏;表面) (2年目)	対照	非切除	2014年8月	15.2±3.6	1.7	n.s.
	1回切除	前年切除		26.1±4.7		
	2回切除	2年連続切除		25.4±4.2		
刺毛数 (夏;裏面)	対照	非切除	2013年8月	138.1±10.6	1.2	$P < 0.05$
	1回切除・2回切除	切除		166.6±5.7		
刺毛数 (春;裏面)	対照	非切除	2014年5月	108.6±15.2	1.1	n.s.
	1回切除・2回切除	前年切除		122.3±10.3		
刺毛数 (夏;裏面) (2年目)	対照	非切除	2014年8月	86.2±11.7	1.7	$P < 0.05$
	1回切除	前年切除		147.7±14.0		
	2回切除	2年連続切除		186.4±17.8		
刺毛密度 (夏;表面)	対照	非切除	2013年8月	4.66±0.74	1.3	n.s.
	1回切除・2回切除	切除		6.20±0.39		
刺毛密度 (春;表面)	対照	非切除	2014年5月	3.08±0.58	2.9	$P < 0.001$
	1回切除・2回切除	前年切除		8.84±1.42		
刺毛密度 (夏;表面) (2年目)	対照	非切除	2014年8月	4.30±1.20	1.6	n.s.
	1回切除	前年切除		6.81±1.32		
	2回切除	2年連続切除		4.12±0.80		
刺毛密度 (夏;裏面)	対照	非切除	2013年8月	24.83±1.93	1.1	n.s.
	1回切除・2回切除	切除		26.84±1.01		
刺毛密度 (春;裏面)	対照	非切除	2014年5月	15.05±2.27	2.0	$P < 0.01$
	1回切除・2回切除	前年切除		30.33±4.09		
刺毛密度 (夏;裏面) (2年目)	対照	非切除	2014年8月	22.34±3.52	1.5	n.s.
	1回切除	前年切除		32.46±3.40		
	2回切除	2年連続切除		28.20±2.69		

表 2.3.1 続き

刺毛長 (夏;表面)	対照 1回切除・2回切除	非切除 切除	2013年8月	1.59±0.02 1.78±0.01	1.1	n.s.
刺毛長 (春;表面)	対照 1回切除・2回切除	非切除 前年切除	2014年5月	1.35±0.02 1.32±0.02	1.0	n.s.
刺毛長 (夏;表面) (2年目)	対照 1回切除 2回切除	非切除 前年切除 2年連続切除	2014年8月	1.49±0.05 1.41±0.03 1.56±0.03	0.9 1.0	$P < 0.001$
刺毛長 (夏;裏面)	対照 1回切除・2回切除	非切除 切除	2013年8月	1.53±0.02 1.74±0.01	1.1	n.s.
刺毛長 (春;裏面)	対照 1回切除・2回切除	非切除 前年切除	2014年5月	1.33±0.03 1.33±0.02	1.0	n.s.
刺毛長 (夏;裏面) (2年目)	対照 1回切除 2回切除	非切除 前年切除 2年連続切除	2014年8月	1.30±0.04 1.41±0.02 1.67±0.03	1.1 1.3	$P < 0.01$
防御度 (夏)	対照 1回切除・2回切除	非切除 切除	2013年8月	45.5±3.8 56.6±2.7	1.2	n.s.
防御度 (春)	対照 1回切除・2回切除	非切除 前年切除	2014年5月	12.6±1.9 25.8±3.3	2.0	n.s.
防御度 (夏) (2年目)	対照 1回切除 2回切除	非切除 前年切除 2年連続切除	2014年8月	35.8±5.5 48.2±5.1 52.4±7.1	1.3 1.5	n.s.

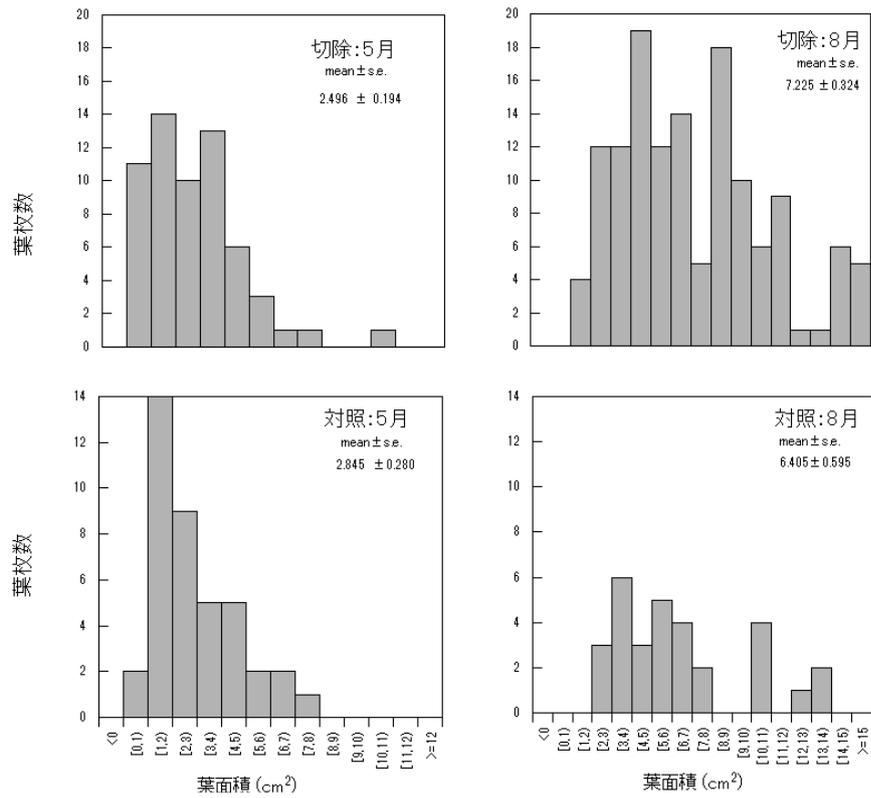


図 2.3.1 葉面積の頻度分布（1年目：2013年）

切除：2013年5月に切除したグループ；対照：非切除。

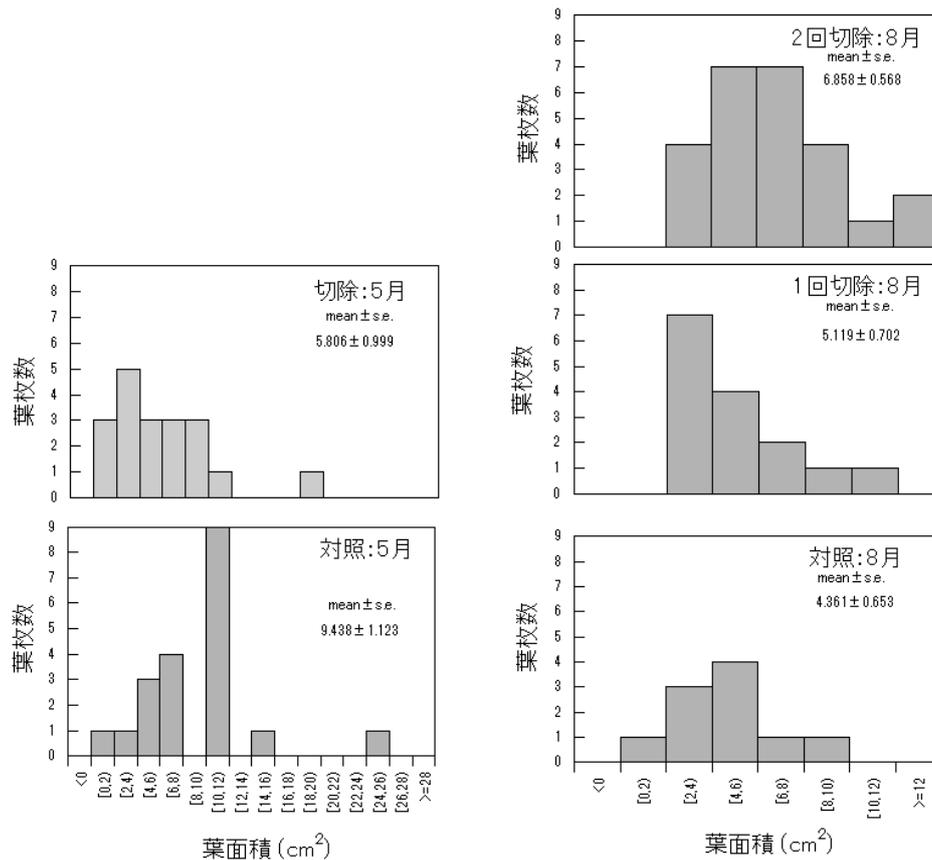


図 2.3.2 葉面積の頻度分布 (2年目:2014年)

切除 (5月): 1回切除した個体 (2013年5月切除) と2回切除した個体 (2013年5月及び2014年5月に切除) を含む。5月のサンプリングと切除処理は同じ日に行ったため、このグループの葉はサンプリング時点では2回目の切除の影響を受けていない。

1回切除 (8月): 2013年5月に切除したグループ。

2回切除 (8月): 2013年5月と2014年5月に切除したグループ。

対照 (8月): 非切除。

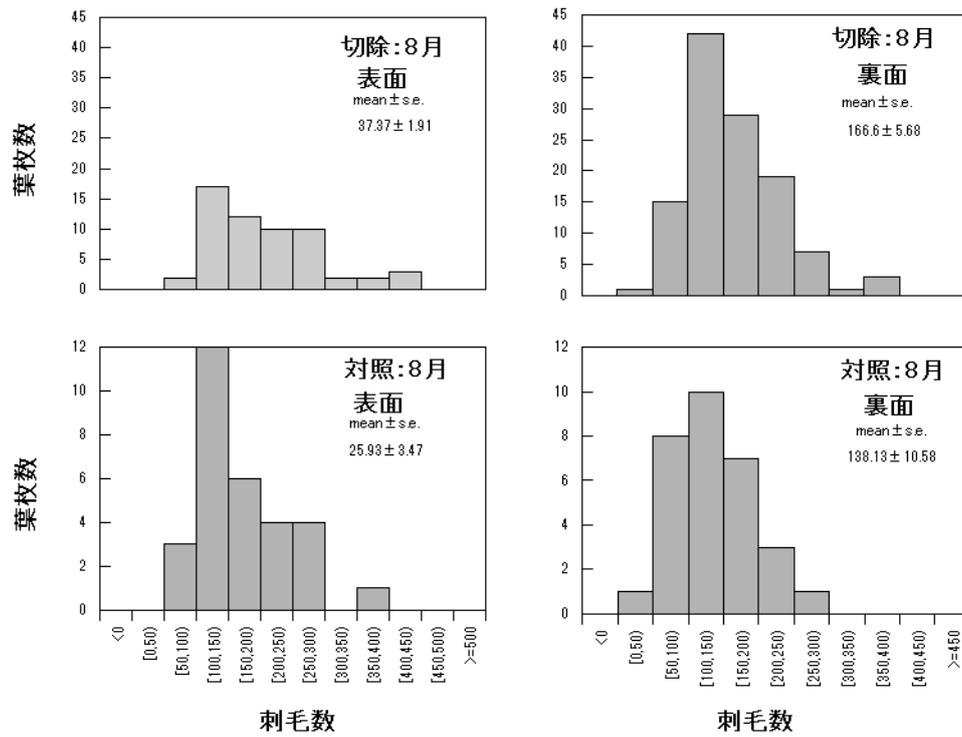


図 2.3.3 刺毛数の頻度分布 (1年目:2013年8月)

切除:2013年5月に切除したグループ; 対照:非切除。

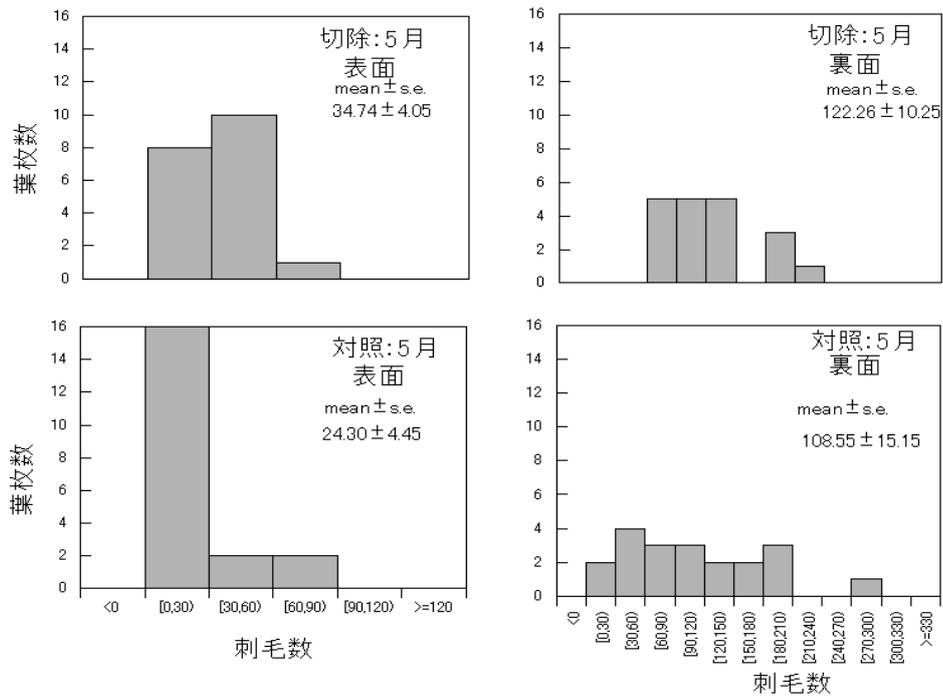


図 2.3.4 刺毛数の頻度分布 (2年目:2014年5月)

切除: 1回切除した個体(2013年5月切除)と2回切除した個体(2013年5月及び2014年5月に切除)を含む。5月のサンプリングと切除処理は同じ日に行ったため、このグループの葉はサンプリング時点では2回目の切除の影響を受けていない。対照:非切除。

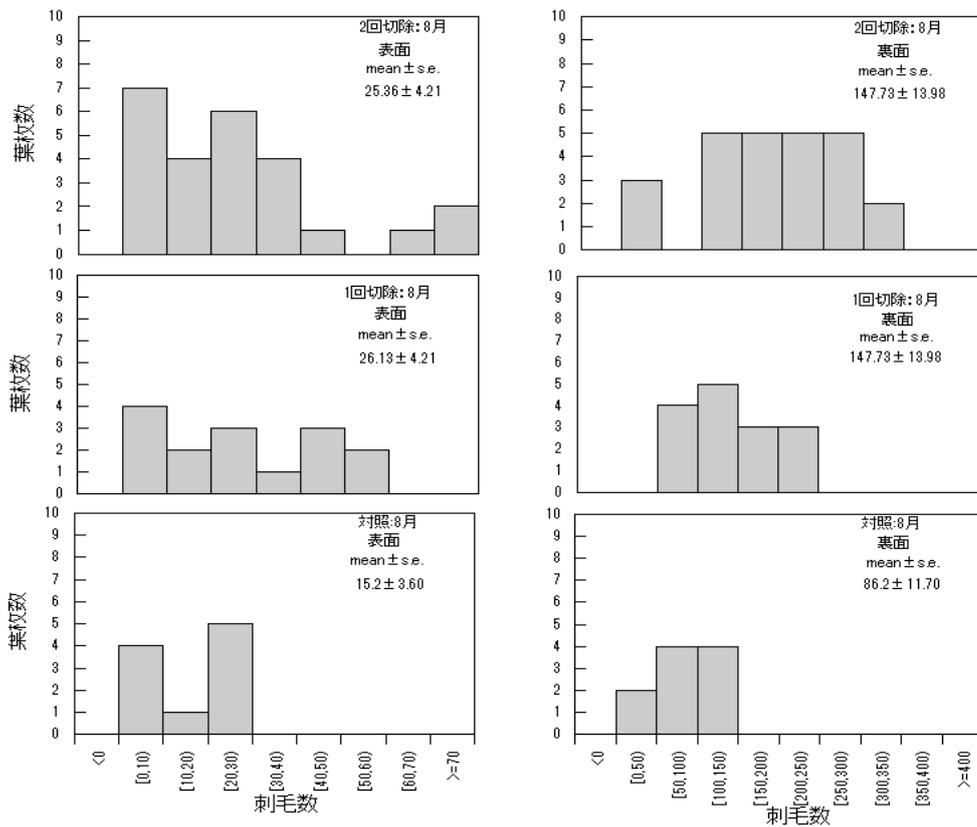


図 2.3.5 刺毛数の頻度分布(2年目:2014年8月)

1回切除:2013年5月に切除したグループ。2回切除:2013年5月及び2014年5月に切除したグループ。対照:非切除。

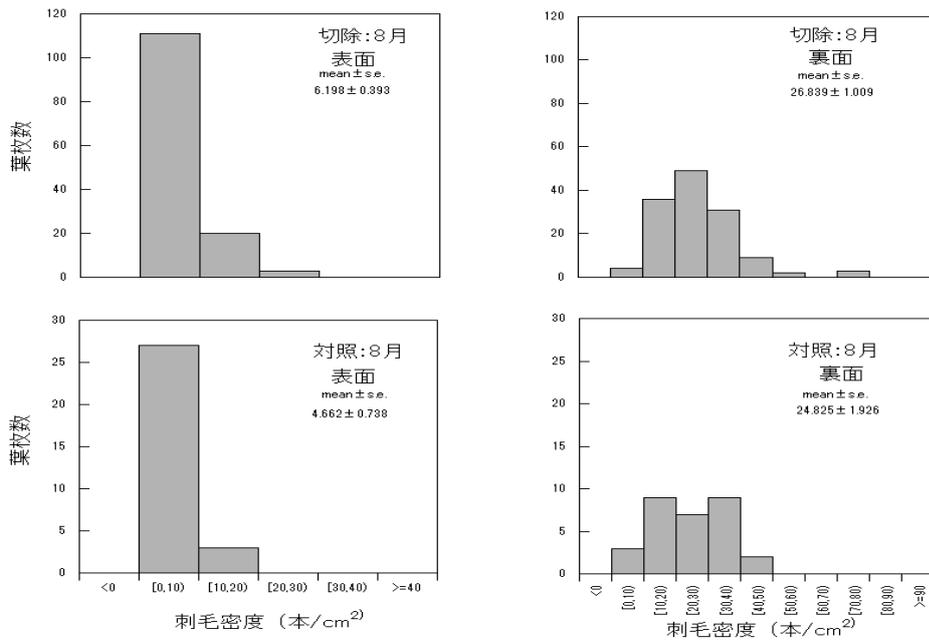


図 2.3.6 刺毛密度の頻度分布 (1年目:2013年8月)

切除:2013年5月に切除したグループ。対照:非切除。

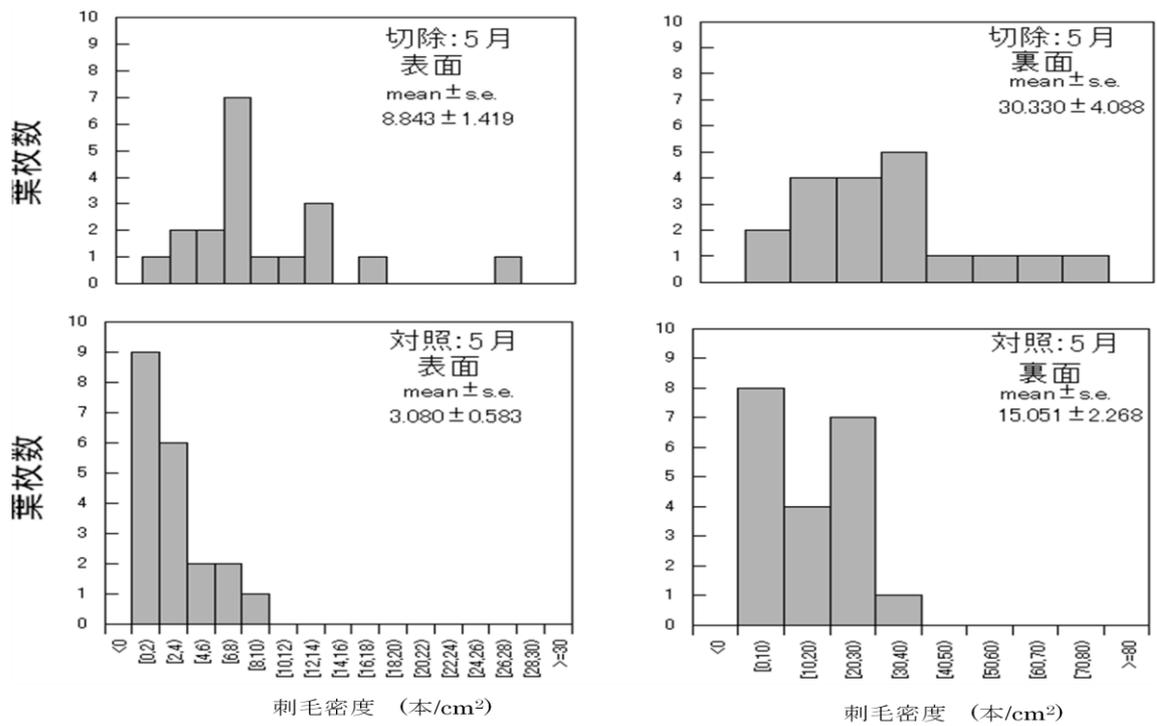


図 2.3.7 刺毛密度の頻度分布(2年目:2014年5月)

切除: 1回切除した個体(2013年5月切除)と2回切除した個体(2013年5月及び2014年5月に切除)を含む。5月のサンプリングと切除処理は同じ日に行ったため、このグループの葉はサンプリング時点では2回目の切除の影響を受けていない。

対照: 非切除。

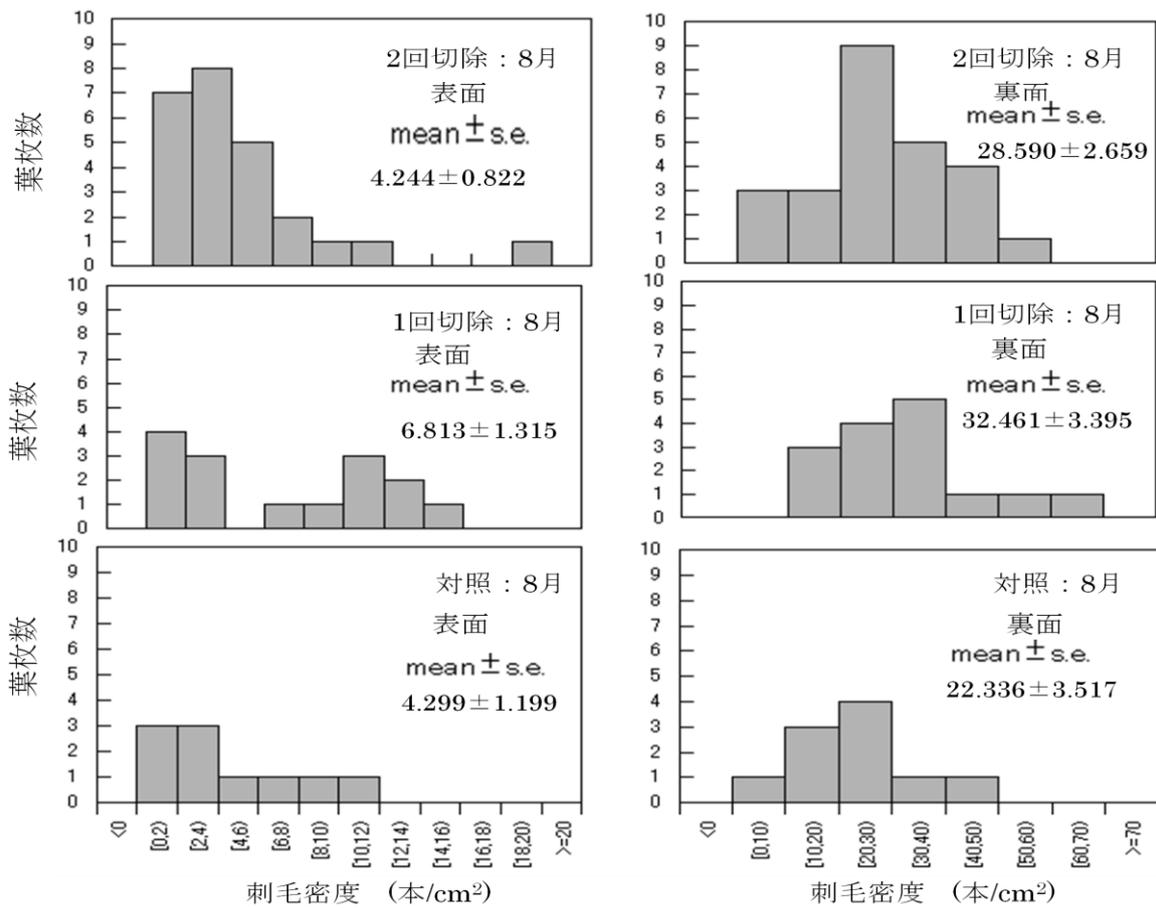


図 2.3.8 刺毛密度の頻度分布(2年目：2014年8月)

1回切除：2013年5月に切除したグループ。

2回切除：2014年5月及び2013年5月に切除したグループ。

対照：非切除。

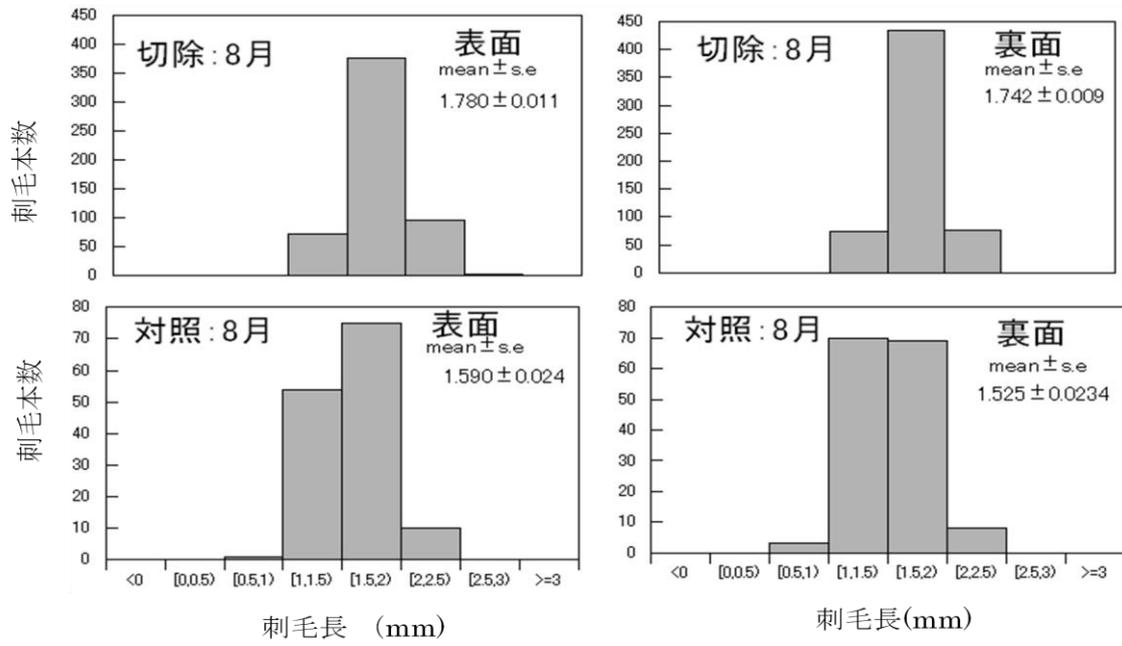


図 2.3.9 刺毛長の頻度分布(1年目:2013年8月)

切除:2013年5月に切除したグループ。対照:非切除。

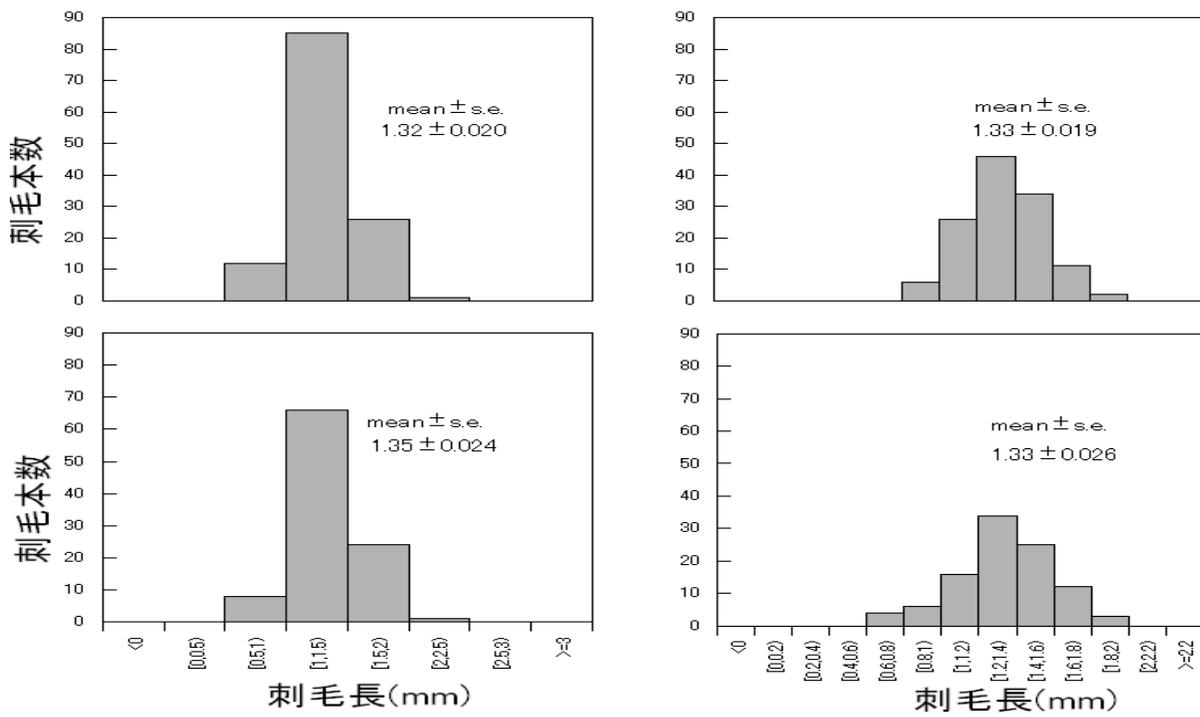


図 2.3.10 刺毛長の頻度分布(2年目：2014年5月)

切除：1回切除した個体（2013年5月切除）と2回切除した個体（2013年5月及び2014年5月に切除）を含む。5月のサンプリングと切除処理は同じ日に行ったため、このグループの葉はサンプリング時点では2回目の切除の影響を受けていない。対照：非切除。

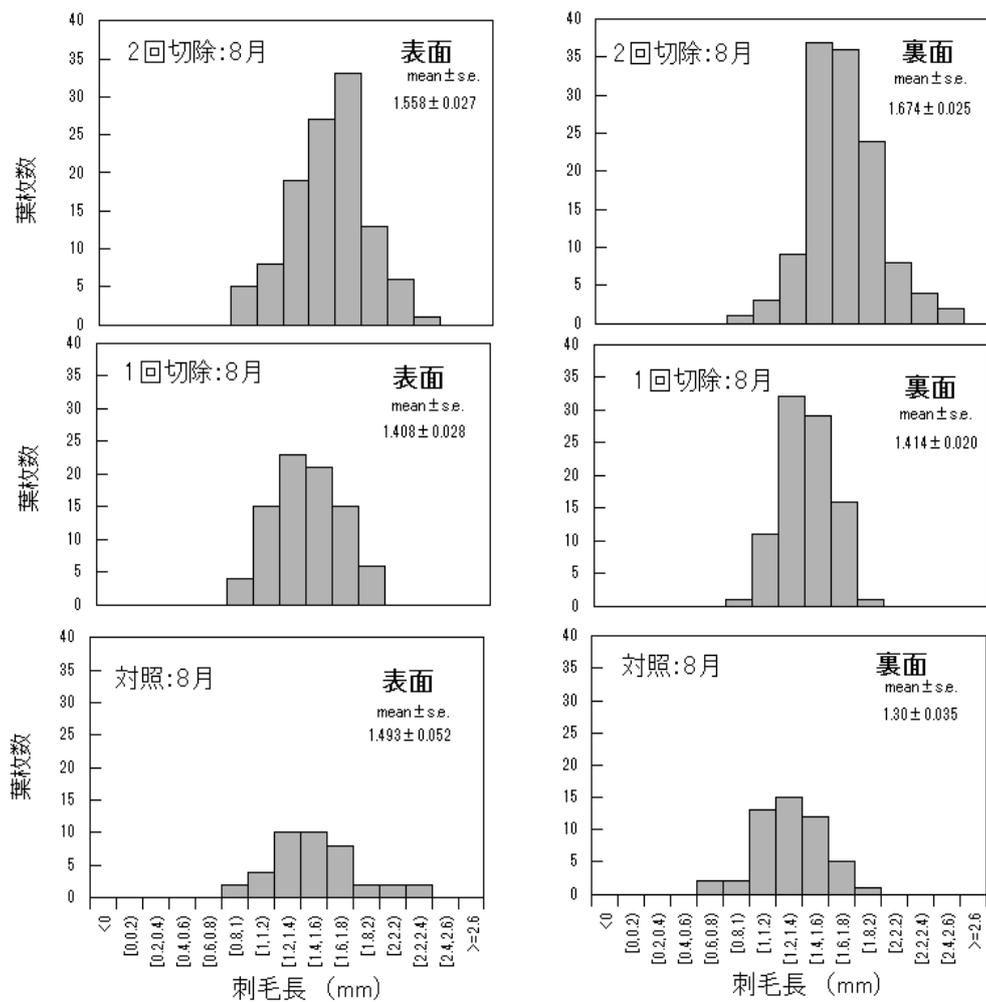


図 2.3.11 刺毛長の頻度分布(2年目:2014年8月)

1回切除:2013年5月に切除したグループ。

2回切除:2013年5月及び2014年5月に切除したグループ。

対照:非切除。

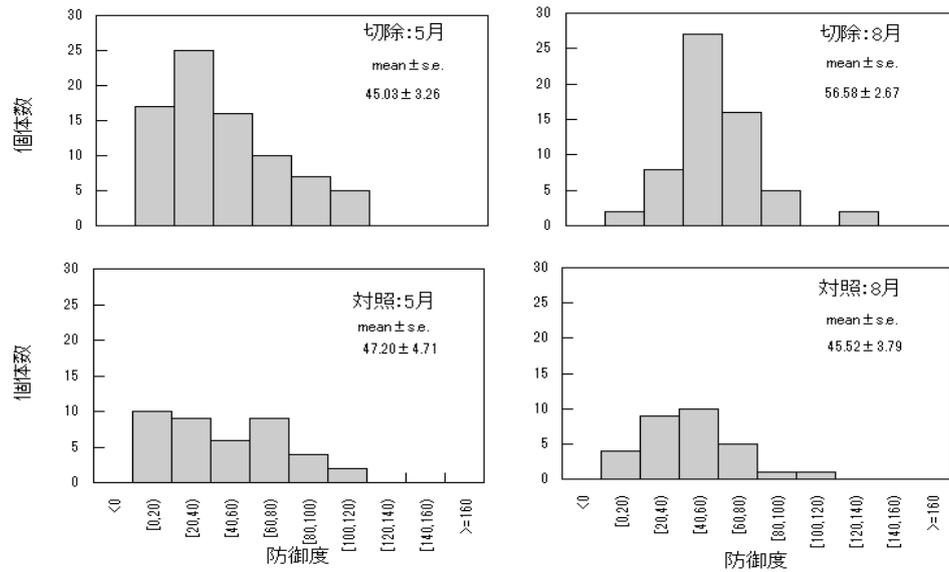


図 2.3.12 防御度の頻度分布(1年目：2013年)

切除：2013年5月に切除したグループ。対照：非切除。

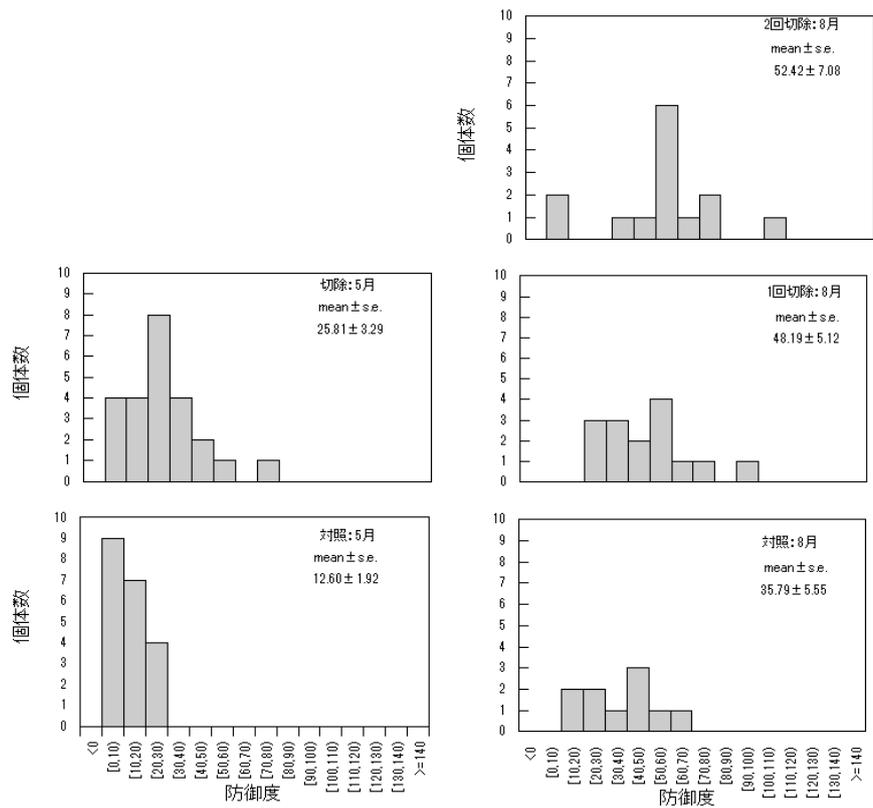


図 2.3.13 防御度の頻度分布(2年目:2014年)

切除 (5月): 2013年5月もしくは「2013年5月及び2014年5月」に切除したグループ。

1回切除 (8月): 2013年5月に切除したグループ。

2回切除 (8月): 2013年5月と2014年5月に切除したグループ。

対照 (5月)、対照 (8月): 非切除。

2.3.3 葉面積・刺毛形質・防御度の季節変化に及ぼす茎頂切除の影響

葉面積については、2013年の値は全グループ（対照、1回切除、2回切除）で季節間差が認められ、夏（8月）の方が春（5月）よりも有意に大きかった（ $P < 0.001$ ；図 2.3.14；表 2.3.2）。2013年における葉面積の季節変化の度合い（春から夏への増加量の相対値）は1.3～1.9であり、季節間差は切除（1回切除・2回切除）と非切除（対照）で有意に異ならなかった。2014年の季節間差については有意な処理間差（グループ間差）が認められ（ $P < 0.01$ ；図 2.3.14；表 2.3.3）、対照では春の値の方が夏の値よりも大きかったが、1回切除と2回切除では逆に夏の方が春よりも大きかった。2013年における葉面積の季節変化の度合いは-0.5～0.2であり、対照 < 1回切除 < 2回切除の順に大きくなる傾向が認められた。

2013年における表面と裏面の刺毛数の季節変化の度合いはそれぞれ-0.2～0.3、2.3～3.8であり、裏面の方が表面よりも大きかった（図 2.3.15；表 2.3.2）。2013年の表面刺毛数の季節間差は処理間で有意に異なり、切除（1回切除・2回切除）の値の方が非切除（対照）よりも大きかった（ $P = 0.059$ ）。裏面では季節間差は処理間で有意に異ならなかった。2014年についても刺毛数の季節変化の度合いは裏面の方が表面よりも大きく、前者と後者の値はそれぞれ-0.4～-0.3、-0.2～0.5であった（図 2.3.15；表 2.3.3）。2014年の裏面の値の季節間差は処理間で有意に異なり（ $P < 0.01$ ）、対照 < 1回切除 < 2回切除の順に季節変化の度合いが大きくなる傾向が認められた。表面の値については季節間差に有意な処理間の差違は認められなかった。2013年における表面と裏面の刺毛密度の季節変化の度合いはそれぞれ-0.2～-0.5、0.2～0.5であり、裏面の方が表面よりも大きかった（図 2.3.16；表 2.3.2）。両面ともに季節間差は処理間で有意に異ならなかった。2014年については表面と裏面の刺毛密度の季節変化の度合いはそれぞれ-0.5～0.4、-0.1～0.5であった（図 2.3.16；表 2.3.3）。2014年の表面の値の季節間差は処理間で有意に異なり（ $P < 0.05$ ）、2回切除 < 1回切除 < 対照の順に季節変化の度合いが大きくなる傾向が認められた。裏面では季節間差は処理間で有意に異ならなかった。

2013年における表面と裏面の刺毛長の季節変化の度合いはどちらも0.1～0.3であった（図 2.3.17；表 2.3.2）。両面ともに刺毛数の季節間差は処理間で有意に異なり（ $P < 0.001$ ）、切除（1

回切除・2回切除)の方が非切除(対照)よりも季節間変化の度合いが大きかった。2014年については表面と裏面の刺毛数の季節変化の度合いはそれぞれ0.1~0.3、0.0~0.3であった(図2.3.17;表2.3.3)。2014年の裏面の刺毛数の季節間差は処理間で有意に異なり($P < 0.001$)、対照<1回切除<2回切除の順に季節変化の度合いが大きくなる傾向が認められた。表面では季節間差は処理間で有意に異ならなかった。

2013年における防御度の季節変化の度合いは0.0~0.4であった(図2.3.18;表2.3.2)。2013年の防御度の季節間差は処理間で有意に異ならなかった。2014年の防御度の季節変化の度合いは2013年の値よりも大きく、1.0~1.8であった(図2.3.18;表2.3.3)。2014年の値の季節間差も処理間で有意に異ならなかった。

2.3.4 夏の葉面積・刺毛形質・防御度における年度間変化と年度間変化に及ぼす茎頂切除の影響

葉面積の年度間変化の度合い(2013年から2014年への増加量の相対値)は-0.3~0.0であった(図2.3.14;表2.3.4)。葉面積の年度間差は処理グループ間で有意に異ならなかった。

葉の表面と裏面における刺毛数の年度間変化の度合いはそれぞれ-0.4~-0.2、-0.4~0.1であった(図2.3.15;表2.3.4)。刺毛数の年度間差は両面ともにグループ間(対照・1回切除・2回切除)で有意に異ならなかった。表面と裏面における刺毛密度の年度間変化の度合いはそれぞれ-0.4~0.2、-0.1~0.3であった(図2.3.16;表2.3.4)。刺毛密度の年度間差についても両面ともにグループ間(対照・1回切除・2回切除)で有意に異ならなかった。

表面と裏面における刺毛長の年度間変化の度合いはそれぞれ-0.2~-0.1、-0.2~0.0であった(図2.3.17;表2.3.4)。刺毛長の年度間差は両面ともにグループ間で有意に異なった($P < 0.001$)。表面の刺毛長の年度間変化の度合いは1回切除で最も小さく(-0.2)、対照と2回切除は同程度の値(-0.1)であった。裏面の値の年度間変化の度合いは2回切除で最も大きく(0.0)、対照と2回切除は同程度の値(-0.2)であった。

防御度の年度間変化の度合いはそれぞれ-0.2~-0.1であった(図2.3.18;表2.3.4)。防御度の年度間差についてもグループ間(対照・1回切除・2回切除)で有意に異ならなかった

表 2.3.2 1年目における各グループの葉面積・刺毛形質値・防御度の季節変化に及ぼす切除処理の影響 (2013年)。n.s.は有意でないことを示す (すなわち $P > 0.05$)。変化の度合いは[(8月の値) - (5月の値)]/(5月の値)を表す。

形質	グループ	2013年度 処理	2013年度 平均値 ± 標準誤差		変化の度合い	有意確率	
			2013年5月	2013年8月		季節間差	季節と処理の 交互作用
葉面積	対照	非切除	2.84±0.28	6.41±0.60	1.3	$P < 0.001$	n.s.
	1回切除	切除	2.52±0.19	7.34±0.78	1.9		
	2回切除	切除	2.46±0.34	7.15±0.63	1.9		
刺毛数 (表面)	対照	非切除	31.7±2.2	25.9±3.4	-0.2	n.s.	$P = 0.059$
	1回切除	切除	27.2±2.6	33.8±3.9	0.2		
	2回切除	切除	30.5±3.2	39.9±3.9	0.3		
刺毛数 (裏面)	対照	非切除	42.3±5.1	138.1±10.6	2.3	$P < 0.001$	n.s.
	1回切除	切除	33.2±3.7	159.1±11.1	3.8		
	2回切除	切除	39.8±5.8	167.8±12.7	3.2		
刺毛密度 (表面) (本/cm ²)	対照	非切除	14.34±1.20	4.66±0.74	-0.7	$P < 0.001$	n.s.
	1回切除	切除	14.51±1.31	5.67±0.82	-0.6		
	2回切除	切除	13.48±1.21	6.40±0.71	-0.5		
刺毛密度 (裏面) (本/cm ²)	対照	非切除	19.99±2.36	24.83±1.93	0.2	$P < 0.001$	n.s.
	1回切除	切除	19.93±2.44	25.33±1.94	0.3		
	2回切除	切除	18.39±2.19	27.12±2.24	0.5		
刺毛長 (表面) (mm)	対照	非切除	1.42±0.02	1.59±0.02	0.1	$P < 0.001$	$P < 0.001$
	1回切除	切除	1.41±0.02	1.79±0.01	0.3		
	2回切除	切除	1.39±0.02	1.77±0.01	0.3		
刺毛長 (裏面) (mm)	対照	非切除	1.36±0.02	1.53±0.02	0.1	$P < 0.001$	$P < 0.001$
	1回切除	切除	1.36±0.02	1.75±0.01	0.3		
	2回切除	切除	1.30±0.02	1.73±0.01	0.3		
防御度	対照	非切除	47.2±4.7	45.5±3.8	0.0	$P < 0.05$	n.s.
	1回切除	切除	47.6±5.0	54.5±3.7	0.1		
	2回切除	切除	42.5±4.3	58.7±3.8	0.4		

表 2.3.3 2年目における各グループの葉面積・刺毛形質値・防御度の季節変化に及ぼす切除処理の影響 (2014年)。n.s.は有意でないことを示す (すなわち $P > 0.05$)。変化の度合いは[(8月の値) - (5月の値)]/(5月の値)を表す。

形質	グループ	処理	平均値 ± 標準誤差		変化の度合い	有意確率	
			2014年5月	2014年8月		季節間差	季節と処理の 交互作用
葉面積	対照	非切除	9.44±1.12	4.36±0.65	-0.5	n.s.	$P < 0.01$
	1回切除	前年切除	5.31±1.46	5.12±0.70	0.0		
	2回切除	2年連続切除	5.81±1.00	6.94±0.56	0.2		
刺毛数 (表面)	対照	非切除	24.3±4.5	15.2±3.6	-0.4	$P < 0.01$	n.s.
	1回切除	前年切除	35.2±3.7	26.1±4.7	-0.3		
	2回切除	2年連続切除	34.7±4.0	25.4±4.2	-0.3		
刺毛数 (裏面)	対照	非切除	108.6±15.2	86.2±11.7	-0.2	n.s.	$P < 0.01$
	1回切除	前年切除	110.6±8.3	147.7±14.0	0.3		
	2回切除	2年連続切除	122.3±10.3	186.4±17.8	0.5		
刺毛密度 (表面) (本/cm ²)	対照	非切除	3.08±0.58	4.30±0.20	0.4	$P < 0.05$	$P < 0.05$
	1回切除	前年切除	9.51±3.48	6.81±1.39	-0.3		
	2回切除	2年連続切除	8.84±1.42	4.12±0.80	-0.5		
刺毛密度 (裏面) (本/cm ²)	対照	非切除	15.05±2.27	22.34±3.52	0.5	n.s.	n.s.
	1回切除	前年切除	28.73±7.68	32.46±3.40	0.1		
	2回切除	2年連続切除	30.33±4.09	28.20±2.69	-0.1		
刺毛長 (表面) (mm)	対照	非切除	1.35±0.02	1.59±0.02	0.2	$P < 0.001$	n.s.
	1回切除	前年切除	1.26±0.04	1.41±0.02	0.1		
	2回切除	2年連続切除	1.34±0.02	1.56±0.03	0.2		
刺毛長 (裏面) (mm)	対照	非切除	1.33±0.03	1.30±0.04	0.0	$P < 0.001$	$P < 0.001$
	1回切除	前年切除	1.24±0.04	1.41±0.02	0.1		
	2回切除	2年連続切除	1.36±0.02	1.67±0.03	0.2		
防御度	対照	非切除	12.6±1.9	35.8±5.6	1.8	$P < 0.001$	n.s.
	1回切除	前年切除	24.4±7.1	48.2±5.1	1.0		
	2回切除	2年連続切除	26.2±3.8	52.4±7.1	1.0		

表 2.3.4 各グループの8月の葉面積・刺毛形質値・防御度の年度間変化に及ぼす切除処理の影響。
n.s.は有意でないことを示す（すなわち $P > 0.05$ ）。変化の割合は[(2014年の値)-(2013年の値)]/(2013年の値)を表す。

形質	グループ	平均値 ± 標準誤差		変化の割合	有意確率	
		2013年8月	2014年8月		年度間差	年度とグループの 交互作用
葉面積	対照	6.41±0.60	4.36±0.65	-0.3	$P < 0.01$	n.s.
	1回切除	7.34±0.78	5.12±0.70	-0.3		
	2回切除	7.15±0.63	6.94±0.56	0.0		
刺毛数 (表面)	対照	25.9±3.5	15.2±3.6	-0.4	$P < 0.001$	n.s.
	1回切除	33.8±3.9	26.1±4.7	-0.2		
	2回切除	39.9±3.9	25.4±4.2	-0.4		
刺毛数 (裏面)	対照	138.1±10.6	86.2±11.7	-0.4	$P < 0.05$	n.s.
	1回切除	159.1±11.1	147.7±14.0	-0.1		
	2回切除	167.8±12.7	186.4±17.8	0.1		
刺毛密度 (表面) (本/cm ²)	対照	4.66±0.74	4.30±1.20	-0.1	n.s.	n.s.
	1回切除	5.67±0.82	6.81±1.32	0.2		
	2回切除	6.40±0.71	4.12±0.80	-0.4		
刺毛密度 (裏面) (本/cm ²)	対照	24.83±1.93	22.34±3.52	-0.1	n.s.	n.s.
	1回切除	25.33±1.94	32.46±3.40	0.3		
	2回切除	27.12±2.24	28.20±2.69	0.0		
刺毛長 (表面) (mm)	対照	1.59±0.02	1.49±0.05	-0.1	$P < 0.001$	$P < 0.001$
	1回切除	1.79±0.01	1.41±0.03	-0.2		
	2回切除	1.77±0.01	1.56±0.03	-0.1		
刺毛長 (裏面) (mm)	対照	1.53±0.02	1.30±0.04	-0.2	$P < 0.001$	$P < 0.001$
	1回切除	1.75±0.01	1.41±0.02	-0.2		
	2回切除	1.73±0.01	1.67±0.03	0.0		
防御度	対照	45.5±3.8	35.8±5.6	-0.2	n.s.	n.s.
	1回切除	54.5±3.7	48.2±5.1	-0.1		
	2回切除	58.7±3.8	52.4±7.1	-0.1		

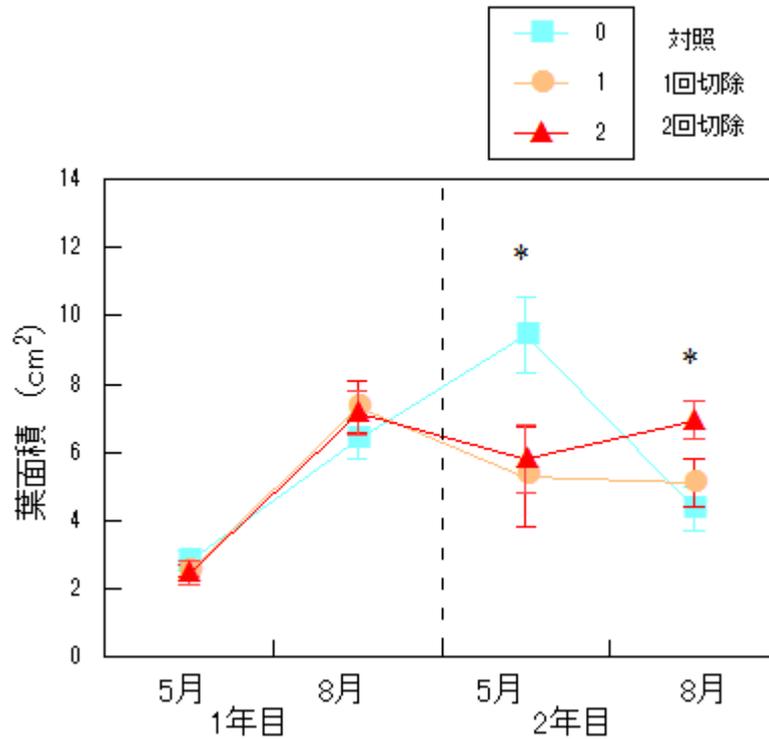


図 2.3.14 葉面積の経時変化

「1回切除」グループ（橙色）は1年目（2013年）の5月に茎頂を切除した。「2回切除」グループ（赤色）は1年目（2013年）の5月と2年目（2014年）の5月に茎頂を切除した。対照（青色）は非切除である。図中の記号（*、**、***）は当該時期における3グループ間の差が有意であることを示す（* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ ）。記号が示されていない時期は3グループ間の差が有意でないことを示す。誤差線は標準誤差を示す。

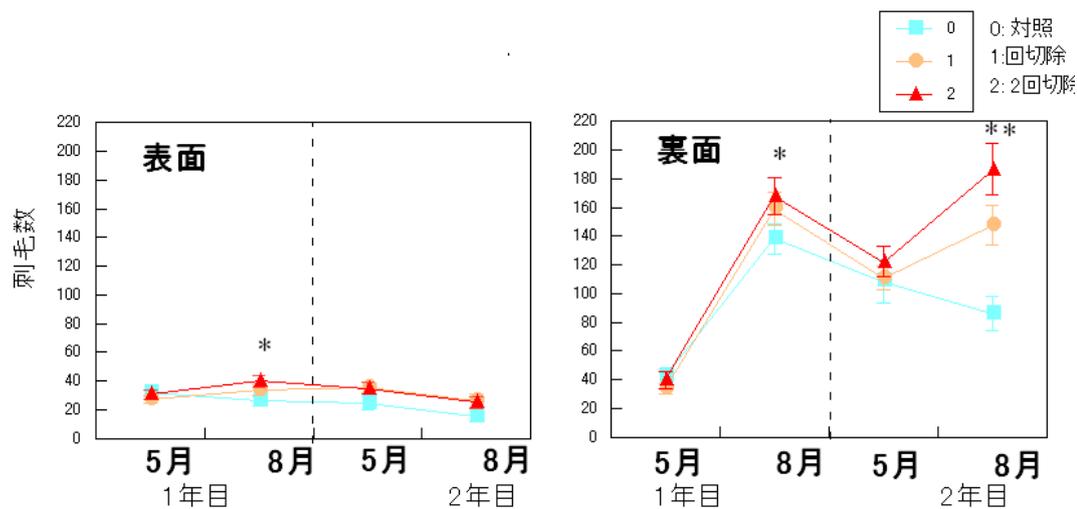


図 2.3.15 刺毛数の経時変化

「1回切除」グループ（橙色）は1年目（2013年）の5月に茎頂を切除した。「2回切除」グループ（赤色）は1年目（2013年）の5月と2年目（2014年）の5月に茎頂を切除した。対照（青色）は非切除である。図中の記号は図 2.3.14 に示したものと同一である。

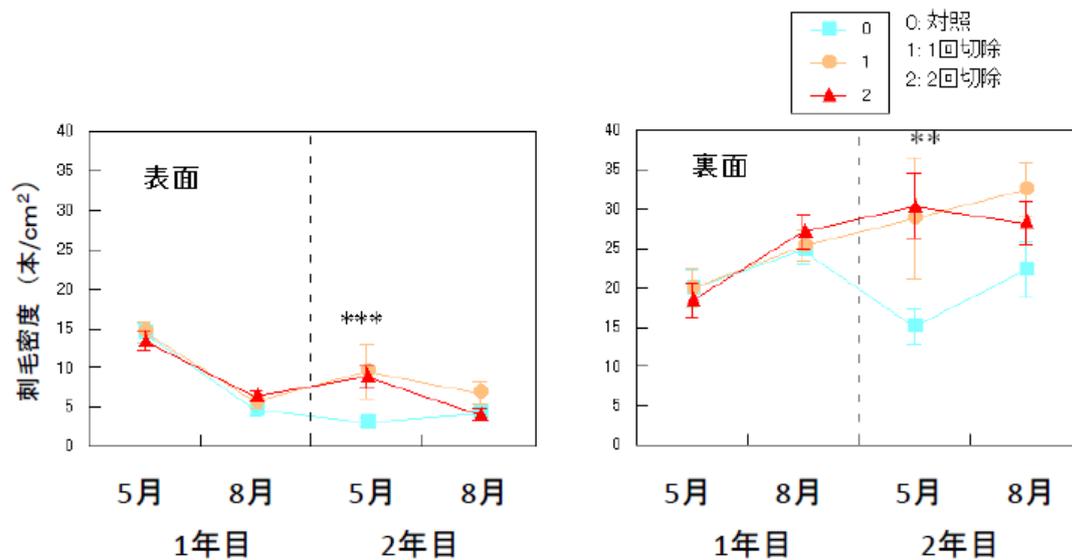


図 2.3.16 刺毛密度の経時変化

「1回切除」グループ（橙色）は1年目（2013年）の5月に茎頂を切除した。「2回切除」グループ（赤色）は1年目（2013年）の5月と2年目（2014年）の5月に茎頂を切除した。対照（青色）は非切除である。図中の記号は図 2.3.14 に示したものと同一である。

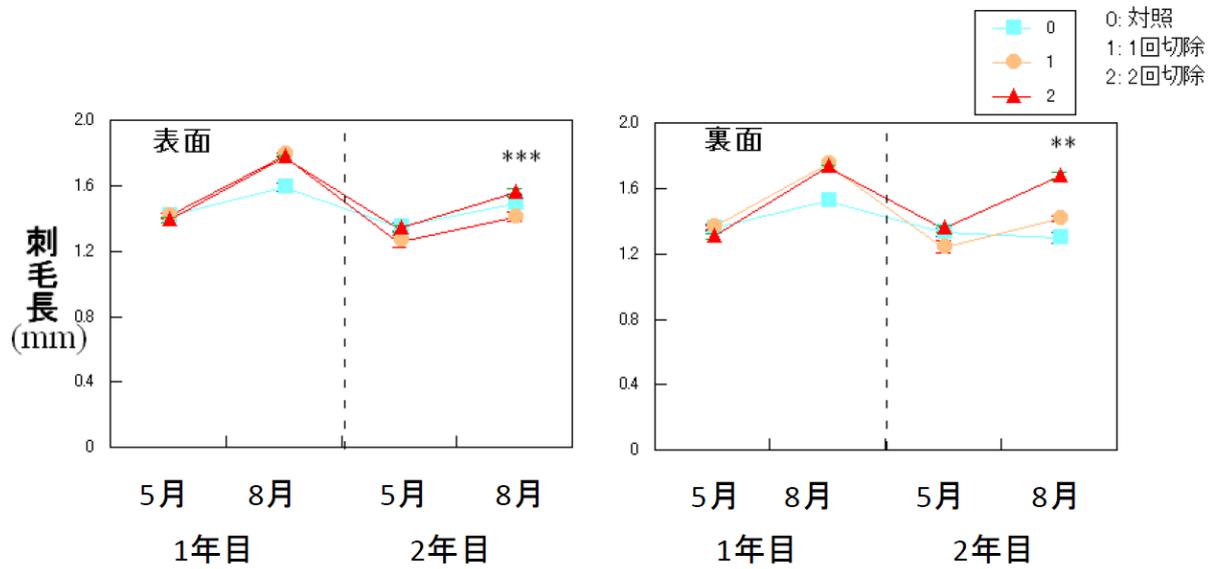


図 2.3.17 刺毛長の経時変化

「1回切除」グループ（橙色）は1年目（2013年）の5月に茎頂を切除した。「2回切除」グループ（赤色）は1年目（2013年）の5月と2年目（2014年）の5月に茎頂を切除した。対照（青色）は非切除である。図中の記号は図 2.3.14 に示したものと同一である。

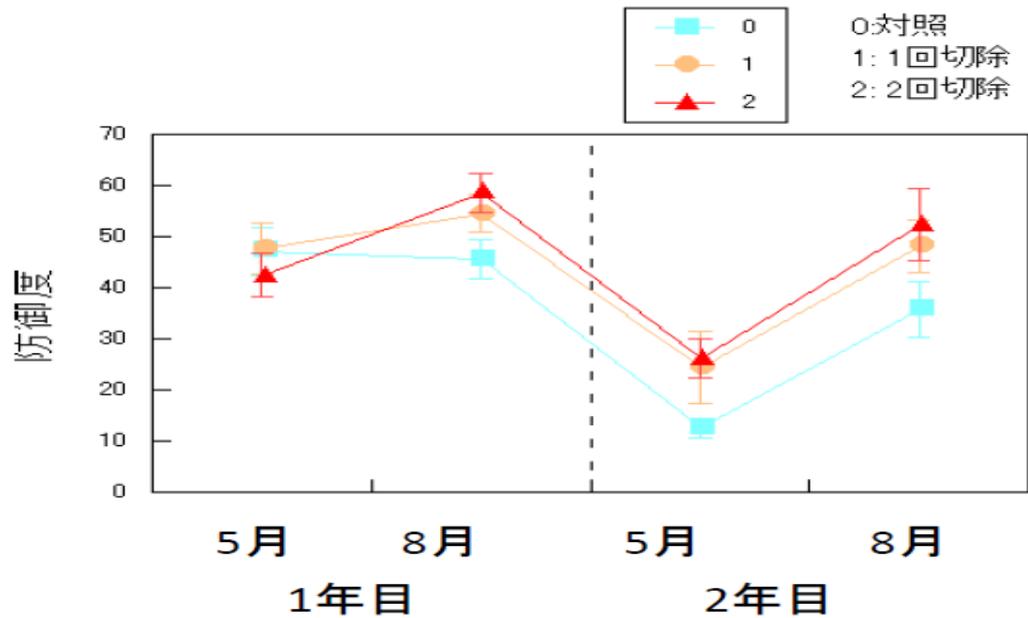


図 2.3.18 防御度の経時変化

「1回切除」グループ（橙色）は1年目（2013年）の5月に茎頂を切除した。「2回切除」グループ（赤色）は1年目（2013年）の5月と2年目（2014年）の5月に茎頂を切除した。対照（青色）は非切除である。図中の記号は図 2.3.14 に示したものと同一である。

2.3.5 葉面積と刺毛形質の可塑性における経時的変化と前年切除の影響

1回切除グループの1年目夏（8月）、2年目春（5月）、2年目夏（8月）の可塑性値は、葉面積については38～45%であり、測定時期による有意な差は認められなかった（図 2.3.19）。同グループの葉の表面の刺毛数における可塑性値は67～111%であり、この値についても時期による有意な差は認められなかった（図 2.3.20）。一方、同グループの裏面の刺毛数については明瞭な経時的変化が認められ、2年目夏の値（72%）は1年目夏・2年目春の値（22～29%）よりも有意に大きかった（ $P < 0.05$ ）。表面・裏面の刺毛密度についても、1年目夏と2年目春との間、及び1年目夏と2年目夏との間に有意な経時的変化が認められた（ $P < 0.05$ ）。これらの2形質値は、2年目春の可塑性値（115～238%）が他の時期の可塑性値（27～118%）よりも大きくなる傾向が認められた。刺毛長についてみると、表面での可塑性値は9～13%であり、時期による明瞭な差が認められなかったが、裏面では時期による有意な差が認められた。裏面の可塑性値は1年目夏で最も大きく（15%）、2年目春・夏の値はそれよりも小さかった。

2回切除グループにおける1年目夏（すなわち1回切除後の値）と2年目夏（2回切除後の値）の可塑性値についてみると、葉面積では65～69%であり、切除処理の繰り返しによる有意な変化は認められなかった（図 2.3.21）。同グループにおける葉の表面の刺毛数の可塑性値についても、切除処理の繰り返しによる有意な変化は認められなかった（図 2.3.22）。一方、それらの葉の裏面の刺毛数の2年目夏の可塑性値は133%であり、1年目夏の値（38%）よりも有意に大きかった（ $P < 0.001$ ）。この結果は、切除の繰り返しにより、切除に対する応答の程度が前年（切除1回目）よりも増加したことを示している。同グループの刺毛密度については、1年目夏と2年目夏の可塑性値は51～62%であり、切除処理の繰り返しによる有意な変化は認められなかった。それらの葉の刺毛長についても、表面の可塑性値については有意な変化が認められなかったが、裏面の値は1年目夏の15%から2年目夏の28%へと有意に大きくなる傾向が認められた（ $P < 0.01$ ）。この結果も、裏面の刺毛数の場合と同様に、切除の繰り返しによって切除に対する応答の程度が前年よりも増加したことを示している。

2年目夏における1回切除グループと2回切除グループの可塑性値についてみると、葉面積で

は 45~61%であり、有意な差は認められなかった (図 2.3.21)。同時期における両グループの表面の刺毛数についても、可塑性値は同程度 (111~113%) であり、有意な差は認められなかった (図 2.3.22)。一方、これら両グループの裏面の刺毛数の可塑性値は 72~133%であり、2 回切除グループの値の方が 1 回切除グループよりも有意に大きかった ($P < 0.05$)。この結果は、切除処理に対する応答の程度が前年の切除処理によって増加することを示している。それらの葉の表面の刺毛密度についても可塑性値は 62~118%とグループ間差が大きく、その差は有意であった ($P < 0.05$)。この形質値の可塑性値は 1 回切除グループの方が 2 回切除グループよりも大きく、切除処理に対する応答の程度が前年の切除処理によって減少することを示している。裏面の刺毛密度の可塑性値は同程度 (51~52%) であり、有意な差は認められなかった。刺毛長についても、表面の可塑性値は 11~16%であり、グループ間差は有意でなかったが、裏面の可塑性値は 2 回切除の値 (28%) の方が 1 回切除の値 (11%) よりも有意に大きかった ($P < 0.01$)。この結果は、裏面の刺毛数の場合と同様に、切除処理に対する応答の程度が前年の切除処理によって増加することを示している。

2.3.6 成長に及ぼす茎頂切除の影響

総葉重・茎重・根重については、全形質・全グループともに春 (5 月) と秋 (11 月) いずれについても 2 年目の方が 1 年目より重かった (図 2.3.23、図 2.3.24、図 2.3.25)。処理間の有意な差は 1 年目秋、2 年目春秋いずれについても認められなかった。

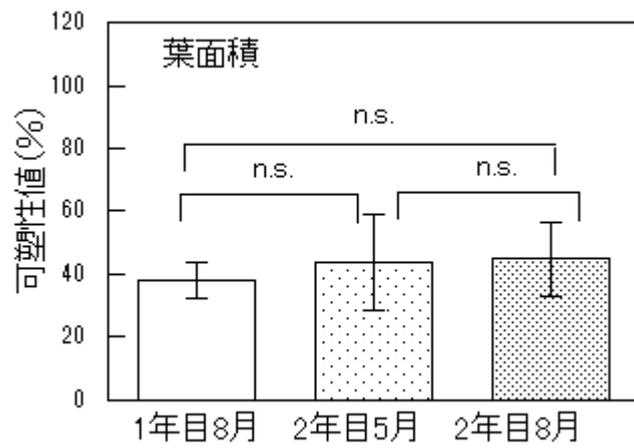


図 2.3.19 1回切除グループの葉面積における可塑性値の経時変化

図中の記号 (*、**、***) は時期による差が有意であることを示す (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$)。n.s.は差が有意でないこと ($0.05 < P$) を示す。

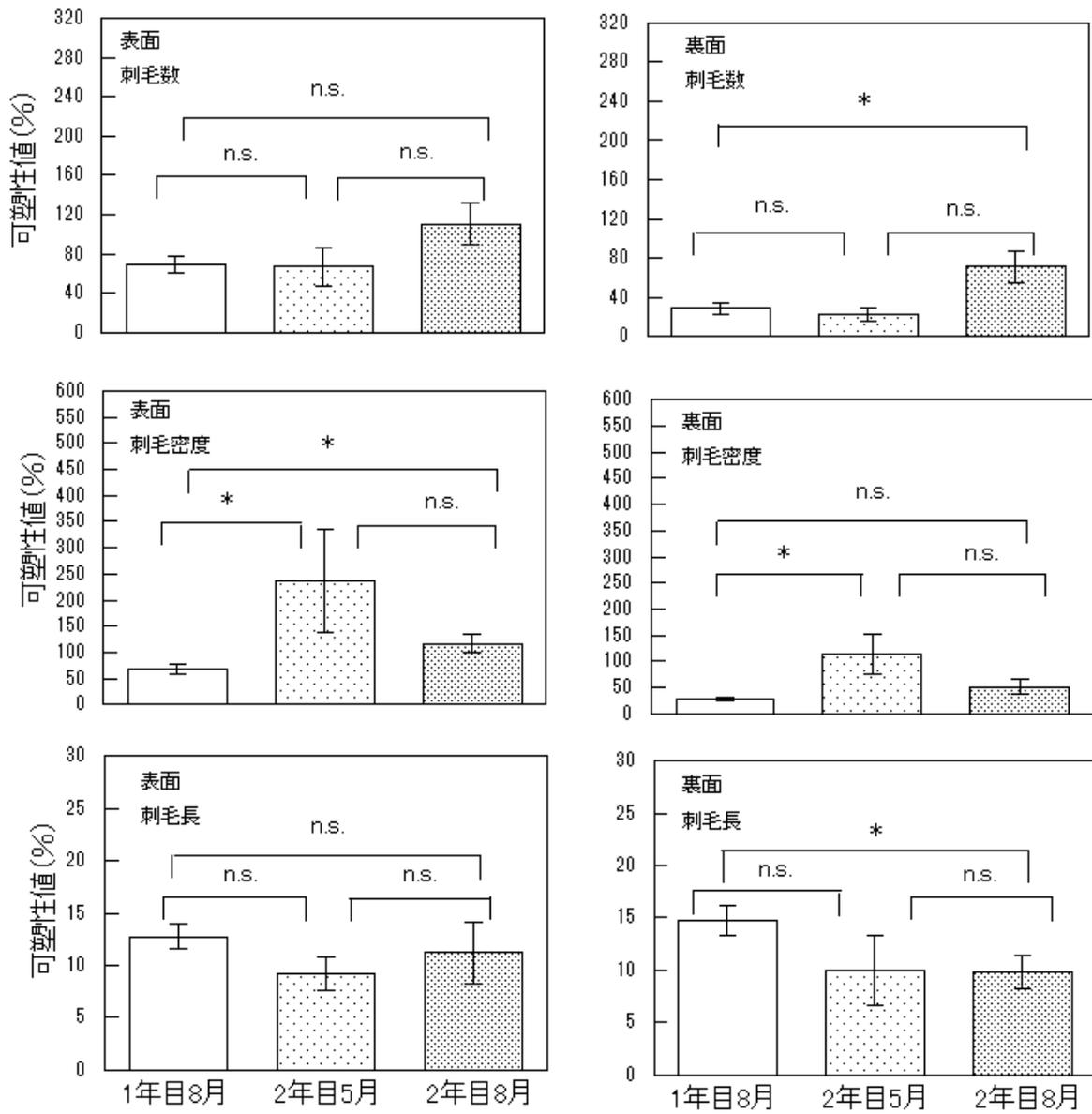


図 2.3.20 1 回切除グループの刺毛形質における可塑性値の経時変化

図中の記号は図 2.3.19 に示したものと同一である。

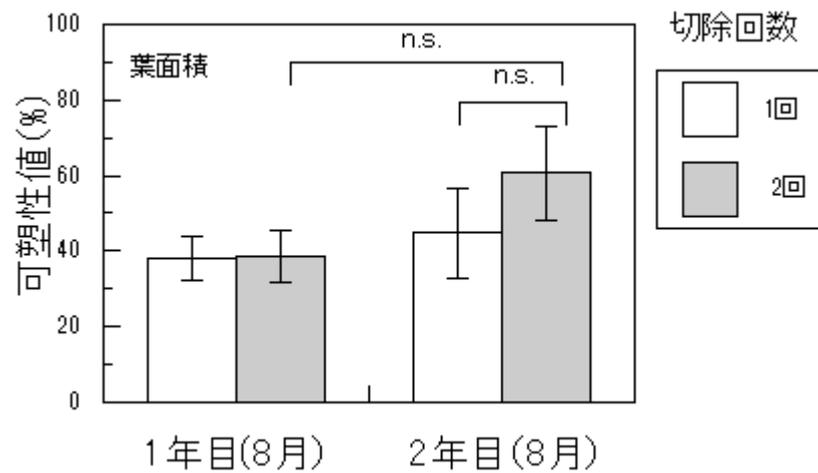


図 2.3.21 各切除処理グループの葉面積における可塑性値

図中上側の記号は、2回切除グループにおける年度間差（すなわち1回切除後と2回切除後の応答の差）の有意確率を示す。下側の記号は2年目夏（8月）における処理グループ間の差の有意確率を示す。図中の記号は図 2.3.19 に示したものと同一である。

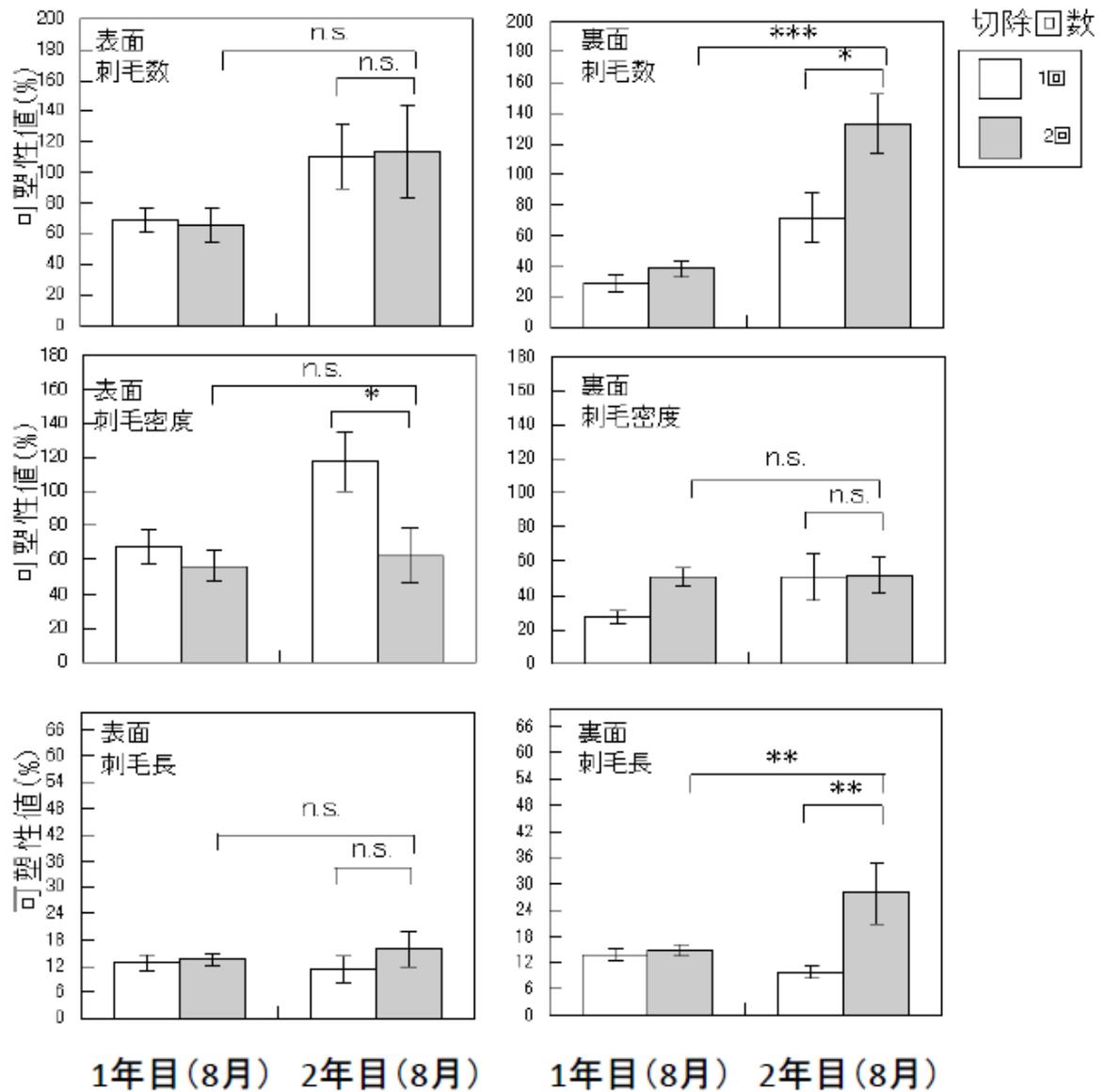


図 2.3.22 各切除処理グループの刺毛形質における可塑性値

図中上側の記号は、2回切除グループにおける年度間差（すなわち1回切除後と1回切除後の応答の差）の有意確率を示す。下側の記号は2年目夏（8月）における処理グループ間の差の有意確率を示す。図中の記号は図 2.3.19 に示したものと同一である。

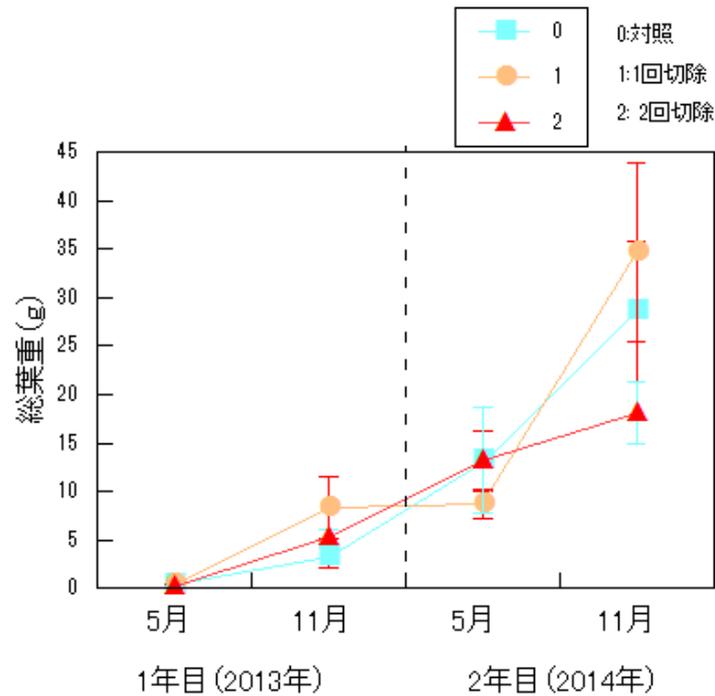


図 2.3.23 総葉重の経時変化

「1回切除」グループ（橙色）は1年目（2013年）の5月に茎頂を切除した。「2回切除」グループ（赤色）は1年目（2013年）5月と2年目（2014年）5月に茎頂を切除した。対照（青色）は無切除である。図中の記号（*、**）はグループ間の差が有意であることを示す（* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ ）。記号（*）が示されていない時期はグループ間の差が有意でないことを示す。誤差線は標準誤差を示す。

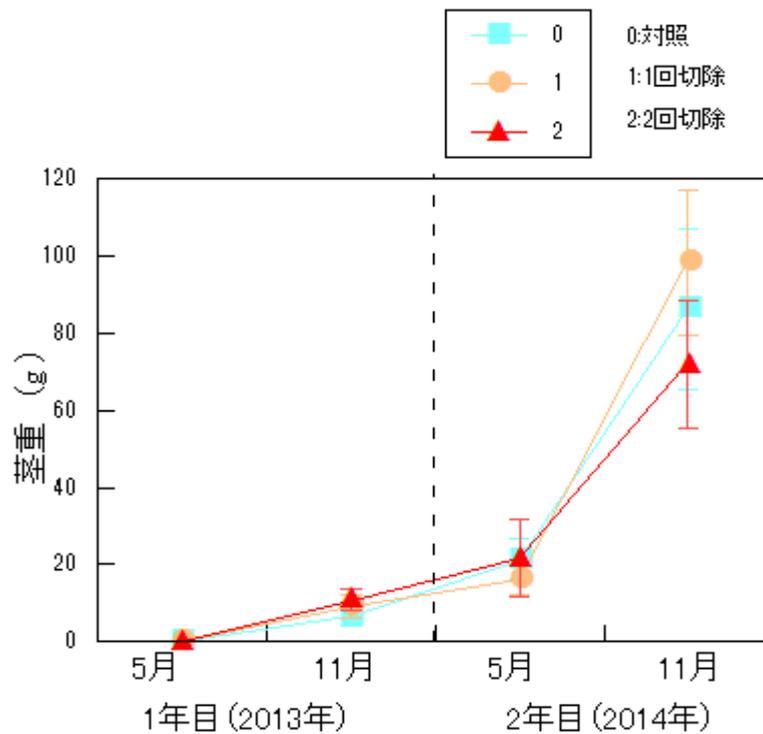


図 2.3.24 茎乾重の経時変化

「1回切除」グループ（橙色）は1年目（2013年）の5月に茎頂を切除した。「2回切除」グループ（赤色）は1年目（2013年）5月と2年目（2014年）5月に茎頂を切除した。対照（青色）は無切除である。図中の記号は図 2.3.23 に示したものと同一である。

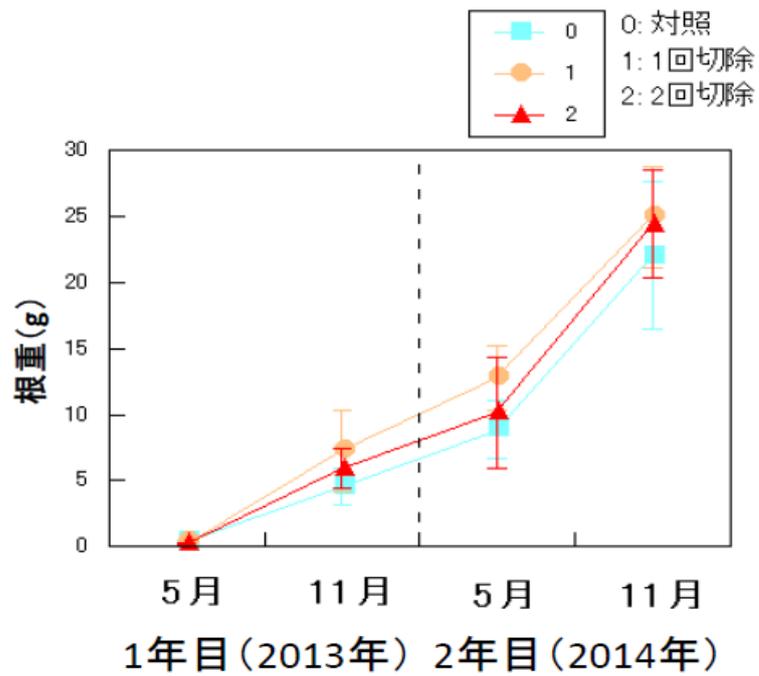


図 2.3.25 根重の経時変化

「1回切除」グループ（橙色）は1年目（2013年）の5月に茎頂を切除した。「2回切除」グループ（赤色）は1年目（2013年）5月と2年目（2014年）5月に茎頂を切除した。対照（青色）は無切除である。図中の記号は図 2.3.23 に示したものと同一である。

2.4 考察

切除実験の結果、イラクサの葉面積に及ぼす春の茎頂切除の影響は1年目の夏は認められなかったが、2年目は明瞭な影響が認められた。2年目春の葉面積は前年の切除によって減少したが、2年目夏の値は切除回数の多いグループほど大きくなる傾向が認められた。ただし、葉面積の茎頂切除に対する可塑性値（対照個体の値と比較した場合の相対的変化の程度）には、有意な年度間差も前年切除の影響も認められなかったことから、葉面積に現れる可塑性に及ぼす前年切除の影響は小さいものと考えられる。一般に、植物の個葉面積は被食により小さくなる傾向が認められているが（McNaughton 1984、Okuda 1987、Takada *et al.* 2001）、今回の2年目夏の結果はこの傾向とは逆である。このような切除後の個葉面積の増加は、シュートの損傷後に成長量を維持するための補償作用（Begon *et al.* 2006）を示している可能性がある。補償作用をもたらす細胞レベルでのメカニズムについては、葉を構成する細胞のサイズが変化することなどが知られている（塚谷 2007）。葉面積の季節変化についてみると、1年目は切除・対照ともに夏の方が春よりも大きく、春の茎頂切除は葉面積の季節変化のパターンに影響していないといえる。一方、2年目は茎頂切除が葉面積の季節変化のパターンに影響しており、対照では葉面積が春から夏へと減少する傾向が認められたが、2回切除では逆に増加する傾向が認められた。この結果は、2年連続の茎頂切除によって個葉レベルでの補償作用が増大した可能性を示唆している。

刺毛形質については、茎頂切除によって刺毛数や刺毛長が増加する傾向が認められた。この傾向は2年目夏の裏面の刺毛数と刺毛長で顕著であり、切除回数が多くなるほど、すなわち対照<1回切除<2回切除の順に両形質値が有意に増加する傾向が示された。また、2年目夏のこれらの形質値の可塑性値についても1回切除と2回切除の間で有意な差が認められた。裏面の刺毛数については、1年目夏の可塑性値よりも2年目夏の可塑性値の方が有意に大きかった。これらの結果は、夏の葉の裏面の刺毛数と刺毛長の切除に対する応答の程度が前年の切除処理によって大きくなること、また、1年目の切除による裏面の刺毛数の増加は、翌春に切除されなくとも、少なくとも翌夏まで持続することを示している。

2年目夏の表面の刺毛長についても処理間で有意な差が認められたが、処理間の差は裏面刺毛

長よりも小さかった。一方、2年目夏の表面の刺毛長における処理間の大小関係は裏面の値とは異なり、1回切除<対照<2回切除の順に増加する傾向が認められた。しかしながら、2年目夏のこの形質値については、1回切除と2回切除の可塑性値の間には有意な差が認められなかったことから、前年切除がこの形質値に及ぼす影響は小さいものと考えられる。刺毛密度についても2年目の葉の両面で切除の影響が認められたが、処理による有意な差(対照<切除)が認められたのは春のみであった。2年目夏に刺毛密度に有意な差が認められないのは、2年目夏の刺毛数は切除回数が増えるほど増加する一方で、上述したように葉面積も切除回数が増えるほど増加するためと考えられる。一方、表面の刺毛密度の可塑性値については、形質値そのものを用いた分析(分散分析)で認められた傾向とは異なり、有意な年度間変異及び前年切除処理の影響(すなわち、2年目夏の1回切除と2回切除の差)が認められた。2年目春のみならず2年目夏についても刺毛密度の可塑性値に切除回数による有意な差が認められたのは、対照と切除グループとの間の形質値の大小関係が1回切除と2回切除で異なるためと考えられる。

刺毛密度と刺毛長の積である防御度についてみると、いずれの時期についても対照が切除(1回切除と2回切除)よりも値が小さくなる傾向が認められたものの、処理間の差は有意でなかった。

以上の結果から、イラクサの刺毛数と刺毛長は茎頂切除に応答して増加するという表現型可塑性を示すものといえる。イラクサ属の刺毛形質の表現型可塑性は、これまでヨーロッパ産イラクサ属 *Urtica dioica* で調べられており、シュート切除後に刺毛密度が増加することが示されている(Pullin & Gilbert 1989)。イラクサ属の刺毛は草食動物に対して防御機能を持つことから(Pollard & Briggs 1984, Kato *et al.* 2008)、*U. dioica* で認められたシュート切除後の刺毛密度の増加は誘導防御にあたると考えられている(Pullin & Gilbert 1989)。同様に、本研究で認められた2年目夏における裏面の刺毛数と切除回数との間の正の相関は、イラクサにおける刺毛数の表現型可塑性が誘導防御にあたることを示している。イラクサ属の刺毛長の可塑性についての先行研究事例はみあたらないが、イラクサの刺毛が中空となっており、その内部の空洞に毒液を貯留していること(Lenggenhager 1974, Fu *et al.* 2006)、さらに、刺毛長と刺毛の直径との間には正の相関があるこ

と（加藤禎孝 未発表データ）から、2年目夏における裏面の刺毛長と切除回数との関係は、刺毛数の場合と同様に、イラクサの刺毛長に見られる表現型可塑性が物理的・化学的防御の増加、すなわち誘導防御にあたることを示唆している。

以上のように、2年目夏の裏面の刺毛数・刺毛長において1回切除の値が対照の値よりも有意に大きいことは、茎頂切除の影響あるいはそれによって生じる何らかの情報が少なくとも翌年まで維持されることを示している。また、2年目夏の刺毛数・刺毛長について、2回切除の値が1回切除の値よりも大きいこと、及び2回切除の可塑性値が1回切除の値よりも大きいことは、少なくとも2年目まではこれらの形質に及ぼす切除の影響が、あたかも相加的に累積していくように現れることを示している。このような防御形質値と損傷（食害）頻度との正の相関は、樹木の防御形質と食葉性昆虫による被食との関係を調べた多くの研究事例で示されている（Tuomi *et al.* 1990、Kamata *et al.* 1996）。さらに、裏面の刺毛長についてみると、1年目夏には処理間で有意な差が認められないにもかかわらず、2年目の夏に対照と1回切除（すなわち前年春の切除）との間で値に有意な差が認められることから、この形質については、被食された翌年に反応が生じるという遅延反応（Haukioja 1990a、1990b、Tuomi *et al.* 1990）が現れているとみなすことができる。ただし、2年目春の刺毛長にはこのような誘導反応が認められないことから、裏面の刺毛長における茎頂切除に対する遅延反応は、夏に特異的に現れる可能性がある。以上のような、イラクサにおける茎頂切除の影響が翌年まで維持されるという現象は、茎頂切除が根あるいはシュートの基部に及ぼす影響が翌年まで維持されることを示唆している。茎頂切除の影響を受けた根あるいはシュートの基部が翌年にどのようにして刺毛形質を変えるのか、また、前年の切除による刺毛形質の変化に刺毛形質の発現を制御する遺伝子におけるエピジェネティックな変化が関与しているのかどうかは今後の検討課題である。

ヨーロッパ産イラクサ属 *U. dioica* では、切除されると刺毛密度を増加させることが示されている（Pullin & Gilbert 1989）。一方、本研究では、切除による刺毛密度の有意な増加は2年目春のみでしか認められなかった。このような違いは刺毛密度の計測方法の違いによって生じている可能性がある。すなわち、Pullin & Gilbert がヨーロッパ産イラクサ属の刺毛密度を葉の中央部の 2cm×

2cm の枠内の刺毛数に基づいて求めている一方で、本研究では葉 1 枚の総刺毛数を葉面積で除することによって刺毛密度を計算していることから、この計測方法の違いが異なる結果をもたらした可能性がある。

本研究では、刺毛数と刺毛長に有意な季節変化が現れることも明らかにした。対照の刺毛形質についてみると、1 年目は表面の刺毛数以外の全ての刺毛形質において春から夏へと形質値が増加したが、2 年目は刺毛密度と表面の刺毛長で春から夏にかけて増加する傾向が認められる一方で、他の形質ではほぼ一定（裏面の刺毛長）もしくは減少（刺毛数）する傾向が認められた。1 年目の形質値の季節変化は、根を含めた個体サイズの増加によって刺毛に投資する栄養塩や同化産物などの量が春から夏にかけて増加したことを示唆している。また、2 年目の季節変化が1 年目と同様でないことは、個体サイズの季節的な増加以外の要因が刺毛形質の季節変化に関わっている可能性を示唆している。さらに、2 年目の裏面の刺毛形質の季節変化については、茎頂切除の影響が顕著に認められた。裏面の刺毛形質値は対照ではほぼ一定（刺毛長）、あるいは春から夏へと減少する（刺毛数）傾向が認められたが、切除（1 回切除と 2 回切除）では逆に増加する傾向が認められた。これらのことは、イラクサの刺毛形質の季節変化のパターン自体が切除に対応して可塑的に変化する性質を持つことを示している。また、2 年目夏の刺毛形質の季節変化に顕著な切除の影響（対照と切除の大きな差）が認められるのは、2 年連続で切除されると春から夏にかけて刺毛数と刺毛長が明瞭に増加することに加えて、2 年連続で切除されない場合に、これらの形質値が逆に減少する方向に季節変化するためである。

夏の刺毛数と刺毛長については有意な年度間変化も認められた。茎頂切除の影響が顕著に認められた裏面の夏の刺毛数の年度間変化についてみると、対照と 1 回切除では 1 年目夏から 2 年目夏にかけて刺毛数が少なくなる傾向が認められたが、2 回切除では値は逆に増加した。このことは、1 回目よりも 2 回目の切除の後に刺毛数に現れる誘導防御の程度が大きくなることを示している。一方、裏面の夏の刺毛長の年度間変化についてみると、対照と 1 回切除では 1 年目夏から 2 年目夏にかけて刺毛長が短くなる傾向が認められたが、2 回切除では値はほとんど変化しなかった。この結果は、イラクサの刺毛長が対照の値よりも長い状態で維持されるためには、毎年連

続してシュートが切除される必要があり、切除されなくなると短くなることを示唆している。草食動物による採食圧が高い場所に生育している樹木 *Acacia drepanolobium* を対象に、草食動物を排除した区を設定して観察した研究事例によると、採食から解放された個体の刺が5年間で35～40%短くなったことが報告されている (Young *et al.* 2003)。本研究の結果は観察年数が2年間と短いものの、この先行研究の結果と矛盾しない。

イラクサの総葉重・茎重・根重に及ぼす茎頂切除の有意な影響は1年目・2年目ともに認められなかった。この結果は、春の茎頂切除がイラクサの成長に大きな影響を及ぼさなかったことを示している。この結果は、春の茎頂切除によって生じる誘導防御にかかるコストが成長量の減少として認められないことを示唆している。

2.5. まとめ

イラクサの当年生実生を用いて2年間にわたる茎頂切除を行い、1年目夏及び2年目春・夏の葉面積（個葉面積）と刺毛形質（葉の表・裏面の刺毛数、刺毛密度、刺毛長）に及ぼす切除（1年目と2年目の春の切除）の影響を検討した。葉面積に及ぼす切除の影響は2年目に認められ、切除によって2年目春の値が減少する一方で、2年目夏の値は増加した。刺毛形質のなかでは、2年目夏の裏面の刺毛数と刺毛長に切除の明瞭な影響が認められ、対照<1回切除（前年春切除）<2回切除（前年春と当年春の切除）の順に値が大きくなった。これらの形質の2年目夏の可塑性値についても前年切除の影響が認められ、1回切除<2回切除の順に大きな値となった。以上の結果は、切除に対する裏面の刺毛数と刺毛長の応答の程度が前年切除の影響を受けて大きくなることを示している。イラクサの刺毛はシカに対する防御機能を持つことから、裏面の刺毛数と刺毛長の切除後の増加は、被食後に現れる誘導防御とみなすことができる。さらに、イラクサの刺毛数と刺毛長が明瞭な季節変化を示すことも明らかとなった。対照個体の季節変化については、1年目は表面の刺毛数以外の形質値が春から夏へと増加したが、2年目は形質によって変化のパターンが異なり、春から夏へと増加する形質（刺毛密度と表面の刺毛長）、変化しない形質（裏面の刺毛長）、及び減少する形質（刺毛数）と様々であった。また、2年目の裏面の刺毛形質の季節

変化のパターンは切除の影響を受けて変化した。夏の刺毛数と刺毛長については明瞭な年度間変化も認められた。特に、刺毛長は、対照と1回切除で1年目夏から2年目夏にかけて短くなったが、2回切除ではほとんど変化しなかった。このことは、長い刺毛長が維持されるためには、毎年連続してシュートが切除される必要があり、切除されなくなると短くなることを示している。イラクサの総葉重・茎重・根重に及ぼす茎頂切除の有意な影響は1年目・2年目ともに認められず、春の茎頂切除とそれに伴う誘導防御はイラクサの成長に大きく影響しないものといえる。

第3章 親植物における被食応答が子植物の刺毛形質に及ぼす影響

3.1 はじめに

親に現れた誘導防御が子に伝わる現象が知られている。例えば、セイヨウダイコン *Raphanus raphanistrum* は、モンシロチョウの幼虫によって食害されると刺状毛状突起（トライコーム）とカラシ油配糖体の濃度を増加させるという誘導防御を示す（Agrawal 1999）。この誘導防御を示すセイヨウダイコンの子植物は、たとえ被食されていなくとも刺状毛状突起とカラシ油配糖体を増やすことから、親に現れた誘導防御が何らかのメカニズムによって子に伝わると考えられている（Agrawal 1999）。こうした誘導防御の子世代への伝達は「継代防衛誘導（transgenerational defense induction）」と呼ばれており（Holeski *et al.* 2012、田中 2017）、そのメカニズムとして有力視されているのは「世代間エピジェネティック遺伝（transgenerational epigenetic inheritance）」と呼ばれる遺伝的プロセスである（Rakyan & Whitelaw 2003、Jablonka & Raz 2008）。世代間エピジェネティック遺伝とは、親世代において生じたエピジェネティックな変化（すなわち、環境による遺伝子発現の変化を介して遺伝子型の変化を伴わずに表現型が変化すること）が、配偶子を通して子世代に伝わることである。植物の誘導防御についても、世代間エピジェネティック遺伝が生じることを示した研究事例がある。例えば、ミゾホオズキ属の一種（*Mimulus guttatus*）は、被食されると腺毛が増加するという誘導防御を示すが、その表現型が子世代に伝達される（Holeski 2007）。この植物における誘導防御の子世代への伝達が実際に世代間エピジェネティック遺伝によって生じていることは詳細な遺伝分析によって明らかにされている（Scoville *et al.* 2011）。以上のように、誘導防御の子世代への伝達とそのメカニズムは一部の植物について明らかにされているものの、いまだに知見は蓄積されていない。当年生の実生は発芽直後から食害される可能性があるが、植食者の密度や被食頻度などに関わる情報を得る機会が少ないため、親世代で現れた誘導防御が子世代に伝達されることは、実生ひいてはその親の適応度を高めることに貢献すると考えられる。したがって、植物の防御形質の表現型可塑性の適応的意義を明らかにするためには、親における被食応答が子の防御形質に及ぼす影響を評価する必要がある。本章では、以上の視点から、イラ

クサの親における被食が子の刺毛形質に及ぼす影響を明らかにするため、(1) 茎頂を切除した親の子を用いた栽培実験を行い、親における茎頂切除が子の刺毛形質に及ぼす影響を明らかにするとともに、(2) シカによる採食圧の高い場所に設定した防鹿柵内と柵外に生育する親の子を用いた栽培実験により、子の刺毛形質に及ぼすシカの採食の影響を推定する。

3.2 材料と方法

3.2.1 親植物における茎頂切除が子植物の刺毛形質に及ぼす影響

2章で述べた茎頂切除実験で用いたイラクサの子を対象とした栽培実験を2015年に行った。この実験では、奈良公園内春日大社境内の竹林内に生育するイラクサ当年生実生を対象に、2013年～2014年に1回切除（1年目5月のみの切除）、2回切除（2年連続で5月に切除）、対照（無切除）の3通りの処理を行った（図2.2.2）。2014年10月にこれらのイラクサから果実を採取し、14℃の冷蔵庫内で2015年3月まで保管した。2015年3月11日にガラス製シャーレ内に果実を播き、インキュベーター内で、初めに4℃低温湿層処理を10日間、次に25℃の高温湿層処理を10日間行い、発芽を促した。これらの期間中、明期14時間・暗期10時間の光周期を繰り返し与えた。同年4月5日、プラスチック製ポット（上面の直径12cm、下面の直径10cm、深さ12cm）に培養土（バーミキュライト2：鹿沼土1の比率で混合した土）を約1.2リットル入れ、各ポットに発芽した実生を2個体植栽し、1.6mMの硝酸イオン濃度を含む培養液（Koyama *et al.* 2001）を各ポットに1回100mlずつ、週2回与えた。ポットは奈良教育大学自然環境教育センター奈良実習園内の温室に設置した。栽培ポットのローテーションを週1回行った。植栽1カ月後に間引きを行い、1ポット1個体とした。栽培実験に用いた切除処理グループごとの親の個体数は、1回切除、2回切除、対照についてそれぞれ15個体、14個体、10個体である。1親につき2子孫（実生）を栽培実験に用いた。植栽した実生個体数は1回切除、2回切除、対照についてそれぞれ30個体(15×2)、28個体(14×2)、20個体(10×2)である。栽培実験を行った温室内の栽培期間中の気温、相対湿度、相対光量子束密度は、それぞれ21.2℃（平均値；最高39.2℃、最低3.7℃）、

30.2% (平均値 ; 最高 45.9%、最低 22.3%)、 $12.7\% \pm 0.3\%$ (平均値 \pm 標準偏差) であった。同年 7 月 1 日、各実生について上から 3 節目の個葉を 1 枚採取し、スキャナー (Epson GT-X900 Seiko) で解像度 800dpi の画像を得た。フリーソフト LIA 32 (Yamamoto 1997) を用いてこの画像から葉面積 (個葉面積) 及び葉の表面と裏面の刺毛数を測定した。測定を行った葉の枚数は、1 回切除、2 回切除、対照でそれぞれ 30 枚、20 枚、28 枚である。刺毛数を葉面積で徐することによって表面と裏面それぞれの刺毛密度も計算した。採取した葉の表面と裏面から刺毛を 5 本ずつ任意に選び、その刺毛長を画像を用いて測定した。測定を行った刺毛の本数は、表面、裏面両方ともに 1 回切除、2 回切除、対照でそれぞれ 150 本、140 本、100 本である。

さらに、子の 8 月の形質に親における茎頂切除がどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、2 章で述べた茎頂切除実験で用いたイラクサから採取した果実の一部 (すなわち、3.2.1 節で述べた栽培実験で用いた果実を差し引いた後に残ったもの) を用いて 2016 年に栽培・茎頂切除実験を行った。この果実を冷蔵庫内で 2016 年 2 月 10 日まで保管した後にシャーレ内に播き、インキュベーター内で低温湿層処理と高温湿層処理を行い、発芽を促した。発芽促進の方法は 2015 年の場合と同様である。4 月 5 日、培養土を入れたプラスチック製ポットに発芽した実生を 2 個体植栽し、奈良教育大学自然環境教育センター奈良実習園内の温室で栽培した。植栽 1 カ月後に間引きを行い、1 ポット 1 個体とした。栽培実験の方法は 3.2.1 節の場合と同様である。栽培実験に用いた切除処理グループごとの親の個体数は、1 回切除、2 回切除、対照についてそれぞれ 14 個体、12 個体、10 個体である。1 親につき 1 子孫 (実生) を栽培実験に用いた。植栽した実生個体数は 1 回切除、2 回切除、対照についてそれぞれ 14 個体、12 個体、10 個体である。同年 8 月 10 日にこれらの個体から葉を採取した。主軸の茎頂から葉を 1 枚採取した。葉のサンプリングの方法は 2 章で述べた方法と同様である (図 2.2.3C)。採取した葉についてスキャナーで画像を作成し、葉面積及び表面と裏面の刺毛数を測定するとともに、刺毛密度を計算した。測定と計算の方法は 3.2.1 節の場合と同様である。さらに、採取した葉の表面と裏面から刺毛を 5 本ずつ任意に選び、その刺毛長を測定した。測定した表面の刺毛数は 70 本、60 本、47 本である。また、裏面の刺毛数は、1 回切除、2 回切除、対照でそれぞれ 70 本、60 本、50 本である。

草丈に及ぼす親の茎頂切除の影響を検討するため、2016年に栽培を行った以上の子について6月29日と8月9日に草丈を測定した。

以上の栽培・切除実験を行った温室内の栽培期間中の気温と相対光量子束密度は、それぞれ23.2℃（平均値；最高38.8℃、最低4.6℃）、12.4%±3.3%（平均値±標準偏差）であった。

3.2.2 子植物の刺毛形質に及ぼすシカの採食の影響

子植物の刺毛形質に及ぼすシカの採食の影響を明らかにするため、シカの採食圧が高い場所に設定した防鹿柵内及びその近隣の柵外に生育する親植物から採取した果実を用いて栽培実験を行った。防鹿柵を設定した場所は奈良公園（図2.2.1）の北部である。この場所は、前節で述べた春日大社境内の竹林から直線距離で約1.1km離れている。この場所ではShikata *et al.* (2013) によってシカの糞塊密度が調べられている。Shikata *et al.* によると、近畿地方内に設定した19地点の調査地のなかで当該地点は3番目に糞塊密度が高い。このことは、この場所で採食行動をとるシカの個体密度が他地点に比べて高いことを示している。特に、この場所では10月以降になると90%以上のイラクサが部分的に被食されることが観察されている（40個体を対照とした継続観察に基づく結果；加藤禎孝 未発表）。この場所ではイラクサの刺毛形質の表現型可塑性を評価するための研究（加藤禎孝 未発表）が行われており、この研究の一環として2006年3月に底面積0.81m²の防鹿柵が4基設置され、これらの防鹿柵内にイラクサ当年生実生が合計36個体移植された（図3.2.1）。これらの当年生実生は移植前は防鹿柵内の近隣に生育していたが、移植時点で被食されていないことが確認されている。これらの防鹿柵内の13個体と柵外の15個体（防鹿柵の近隣に生育する自然個体群）については2013年10月に刺毛形質が測定されており、柵内の個体は柵外の個体よりも有意に刺毛数（葉の表・裏面の合計値）が少なく、刺毛密度（同）も低く、さらに刺毛長が短いことが明らかにされている（図3.2.2、図3.2.3、図3.2.4；加藤禎孝 未発表）。この柵内と柵外の刺毛形質の差違から、柵外の個体においてシカの採食による誘導防御が現れていると考えられている。なお、防鹿柵（柵の直上）と柵外の近隣のイラクサ群落とでは光環境が有意に異なり、防鹿柵の直上の方が周辺のイラクサ群落の直上よりも明るいことが示されている。

加藤（未発表）によると、8月下旬に測定された防鹿柵の直上（20測定点）と周辺のイラクサ直上（25測定点）のRPPFD（平均値±標準偏差）は、それぞれ34.1%±5.5%、28.2%±10.0%である。

以上の防鹿柵内の13個体と柵外の15個体から2013年10月に果実を採取して栽培を行い、子世代の刺毛形質を比較した。果実を採取した時点における防鹿柵内の個体は7年生である。柵外の個体は当年生もしくは2年生（満年齢1年以上）以上と推定された。栽培に供した子世代の個体数は1親あたり1~2個体であり、防鹿柵内個体由来と柵外個体由来でそれぞれ24個体、29個体である。果実の保管と発芽の方法は3.2.1節で述べたものとほぼ同じである。発芽のための湿層処理は、2014年3~4月に行った。発芽した実生の栽培の方法と場所も3.2.1節で述べたものと同一である。2014年7月17日に各個体の茎頂から3節目の個葉を1枚採取し、葉面積と刺毛形質を測定した。葉面積と刺毛形質の測定方法は3.2.1節で述べた方法と同一である。7月に採取した葉の枚数は、防鹿柵内（すなわち防鹿柵内個体の子）と柵外（柵外個体の子）でそれぞれ24枚、29枚である。また、刺毛長の測定に供した防鹿柵内と柵外の刺毛数は、表面でそれぞれ113本、135本、裏面でそれぞれ96本、114本である。さらに、9月11日に各個体の茎頂から3節目につく葉を採取して、葉面積と刺毛形質を測定した。採取した葉枚数は1枚であり、合計枚数は防鹿柵内で11枚、柵外で15枚である。刺毛長の測定に供した刺毛本数は、表面については防鹿柵内で55本、柵外75本であり、裏面については防鹿柵内で55本、柵外75本である。栽培実験を行った温室内の栽培期間中の気温、相対湿度、相対光量子束密度はそれぞれ23.4℃（平均気温；最高41.5℃、最低5.0℃）、77.4%（平均相対湿度；最高100.0%、最低22.5%）、14.0%±5.0%（平均値±標準偏差）であった。

3.2.3 分析方法

茎頂を切除した親の子を用いた2015年の栽培実験については、親における切除処理（1回切除、2回切除、対照（無切除））が子の葉面積と刺毛形質（表面・裏面の刺毛数・刺毛密度・刺毛

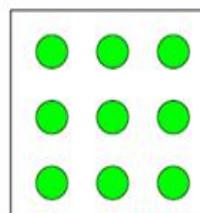
長)に及ぼす影響を nested ANOVA (切除処理の効果、及び切除にネストした親の効果进行分析する分散分析モデル)を用いて分析した。切除処理間の差の有意確率は多重比較 (Bonferroni 法)を用いて計算した。また、2016 年の栽培で用いた子を対象に、親における茎頂切除が 6 月と 8 月の草丈及び 8 月の葉面積と刺毛数・刺毛密度に及ぼす影響を ANOVA (親における切除処理の効果进行分析する分散分析モデル)を用いて分析した。親における茎頂切除が 8 月の刺毛長に及ぼす影響は nested ANOVA (切除処理の効果、及び切除にネストした子の効果进行分析する分散分析モデル)を用いて分析した。切除処理間の差の有意確率は多重比較 (Bonferroni 法)を用いて計算した。

防鹿柵内・柵外に生育する親の子を用いた栽培実験については、親の生育場所 (すなわち防鹿柵内と柵外) が子の 7 月における葉面積と刺毛形質 (表面・裏面の刺毛数・刺毛密度・刺毛長) に及ぼす影響を nested ANOVA (生育場所の効果、及び生育場所にネストした親の効果进行分析する分散分析モデル)を用いて分析した。子の 9 月における葉面積と刺毛数・刺毛密度に及ぼす親の生育場所の影響は ANOVA (生育場所の効果进行分析する分散分析モデル)を用いて分析した。また、同月の刺毛長に及ぼす親の生育場所の影響は nested ANOVA (生育場所の効果、及び生育場所にネストした子の効果进行分析する分散分析モデル)を用いて分析した。以上の nested ANOVA、ANOVA 及び多重比較は SPSS version 9.01J (SPSS 1999)を用いて行った。



縦・横・高さ 90cm

防鹿柵の数:4基



Seedling arrangement
in a deer-proof cage

2006年3月に設置

図 3.2.1 親植物が植栽されていた防鹿柵

この親は「防鹿柵内・柵外に生育する親の子を用いた栽培・切除実験」に用いた。

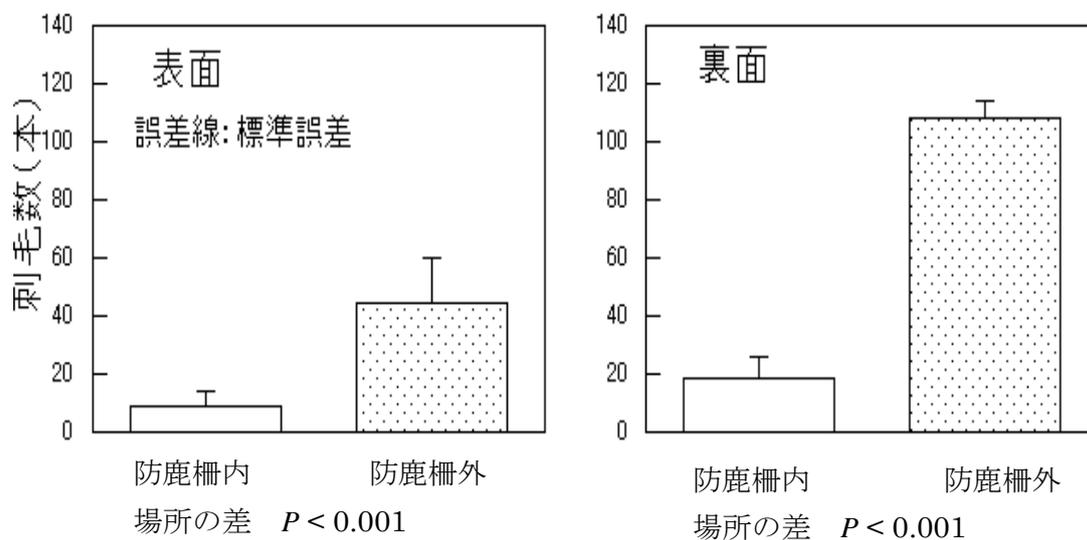


図 3.2.2 防鹿柵内・柵外の親植物の刺毛数 (加藤禎孝 未発表)

図中の誤差線は標準誤差を示す。これらの親は「防鹿柵内・柵外に生育する親の子を用いた栽培・切除実験」に用いた。

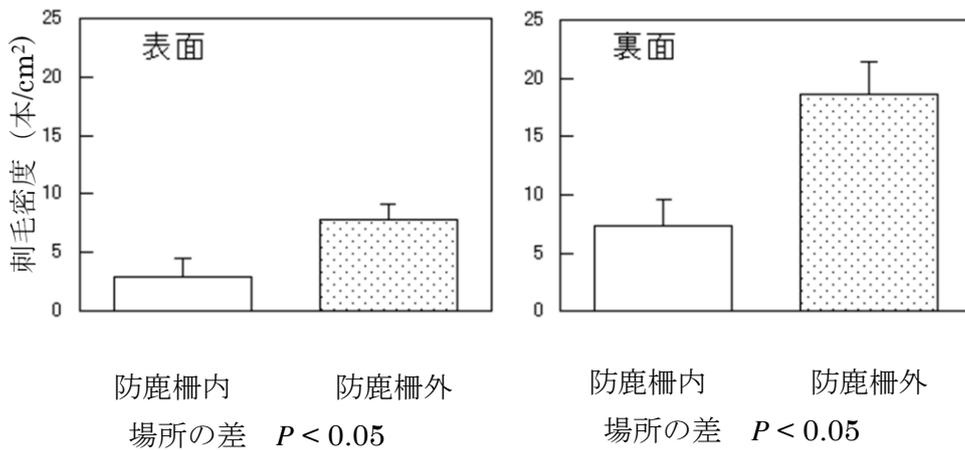


図 3.2.2.3 防鹿柵内・柵外の親植物の刺毛密度 (加藤禎孝 未発表)

図中の誤差線は標準誤差を示す。これらの親は「防鹿柵内・柵外に生育する親の子を用いた栽培・切除実験」に用いた。

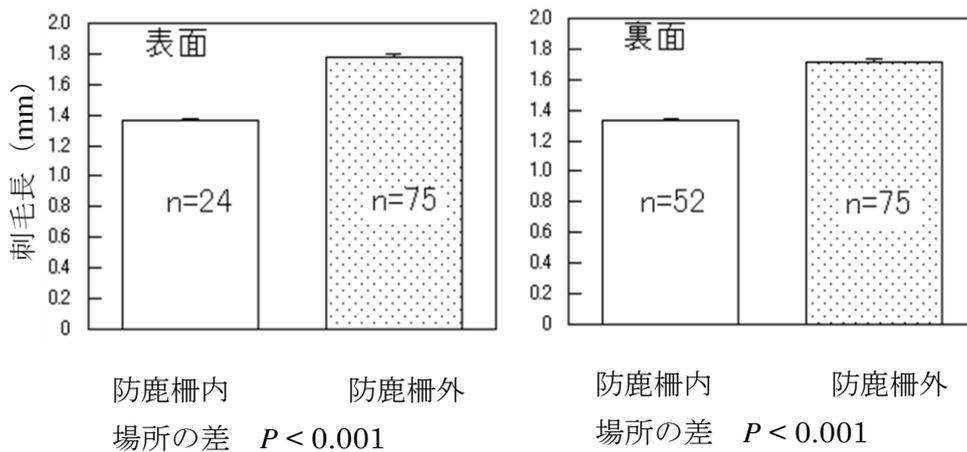


図 3.2.4 防鹿柵内・柵外の親植物の刺毛長 (加藤禎孝 未発表)

図中の誤差線は標準誤差を示す。これらの親は「防鹿柵内・柵外に生育する親の子を用いた栽培・切除実験」に用いた。

3.3 結果

3.3.1 親植物における茎頂切除が子植物の葉面積、刺毛形質、草丈に及ぼす影響

2015年7月の子植物の葉面積については、親植物の処理グループ間（1回切除、2回切除、対照）の有意な差は認められなかった（図 3.2.5）。同月の刺毛数と刺毛密度についても表面・裏面両方ともに処理グループ間の有意な差は認められなかった（図 3.2.5、図 3.2.6）。一方、同月の刺毛長については、葉の両面ともにいくつかの処理グループの組み合わせで有意な差が認められた（図 3.2.6）。表面の刺毛長については対照 < 1回切除 < 2回切除の順に長く、1回切除と2回切除、及び対照と2回切除の差は有意であった（いずれの組み合わせも $P < 0.001$ ）。この形質値の対照と1回切除の差は小さく、その差は有意でなかった。裏面の刺毛長も、対照 < 1回切除 < 2回切除の順に長く、処理グループ間の差はいずれも有意であった（1回切除と2回切除： $P < 0.001$ 、対照と2回切除： $P < 0.001$ 、対照と1回切除： $P < 0.01$ ）。

2016年8月の子植物の葉面積については親植物の処理グループ間で有意な差が認められ、2回切除が他のグループよりも大きな葉面積を示す傾向が認められた（図 3.2.7； $P < 0.05$ ）。同月の刺毛数と刺毛密度は、2015年の実験と同様に、表面・裏面両方ともに処理グループ間の有意な差は認められなかった（図 3.2.8、図 3.2.9）。表面と裏面の刺毛長については、2015年の実験結果と同様に、親植物における切除回数が多いグループほど刺毛長が長くなる傾向が認められた（図 3.2.10）。これらの形質値の処理グループ間の差はいずれも有意であった（いずれの組み合わせも $P < 0.001$ ）。

2016年6月の草丈については、親植物の切除の有意な効果は認められなかった（図 3.2.11）。8月の草丈についてみると、親植物の切除の有意な効果が認められ、親における切除回数が多いグループほど草丈が短くなる傾向が認められ、対照と2回切除の差が有意であった（ $P < 0.05$ ）。

3.3.2 子植物の葉面積と刺毛形質に及ぼすシカの採食の影響

子植物の7月の葉面積と刺毛形質のうち、親植物の生育場所（防鹿柵内と柵外）による有意な

差が認められた形質は、裏面の刺毛数及び表面・裏面の刺毛長であった（図 3.2.12、図 3.2.13、図 3.2.14、図 3.2.15）。有意差が認められたこれらの3形質値は、いずれも柵外（柵外の個体の子）の方が柵内（防鹿柵内の個体の子）よりも大きかった（裏面刺毛数： $P<0.05$ 、表面刺毛長および裏面刺毛長： $P<0.01$ ）。一方、9月の葉面積と刺毛形質については、裏面の刺毛長でのみ親の生育場所間の有意な差が認められた（図 3.2.16、図 3.2.17、図 3.2.18、図 3.2.19）。この裏面の刺毛長は柵内の方が柵外よりも長かった（ $P<0.05$ ）。

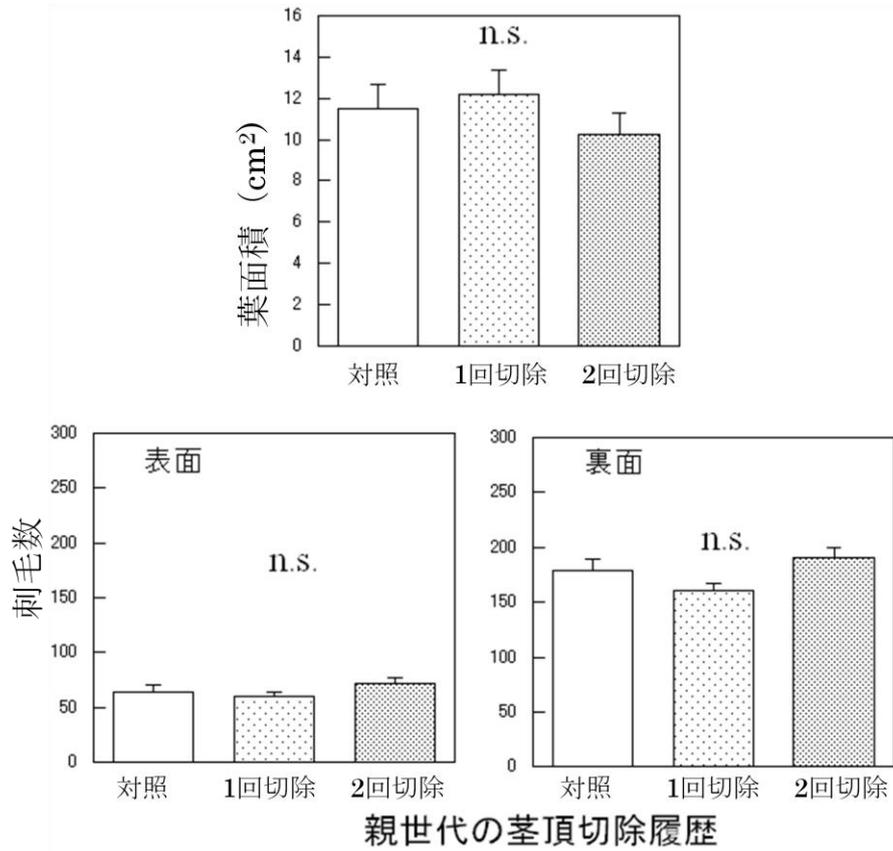


図 3.2.5 親植物の処理グループごとの葉面積（上）と刺毛数（下左、下右）（茎頂を切除した親の子の形質：2015年7月）n.s.は有意な差がないこと（ $P>0.05$ ）を示す。棒と誤差線は平均値と標準誤差を表す。

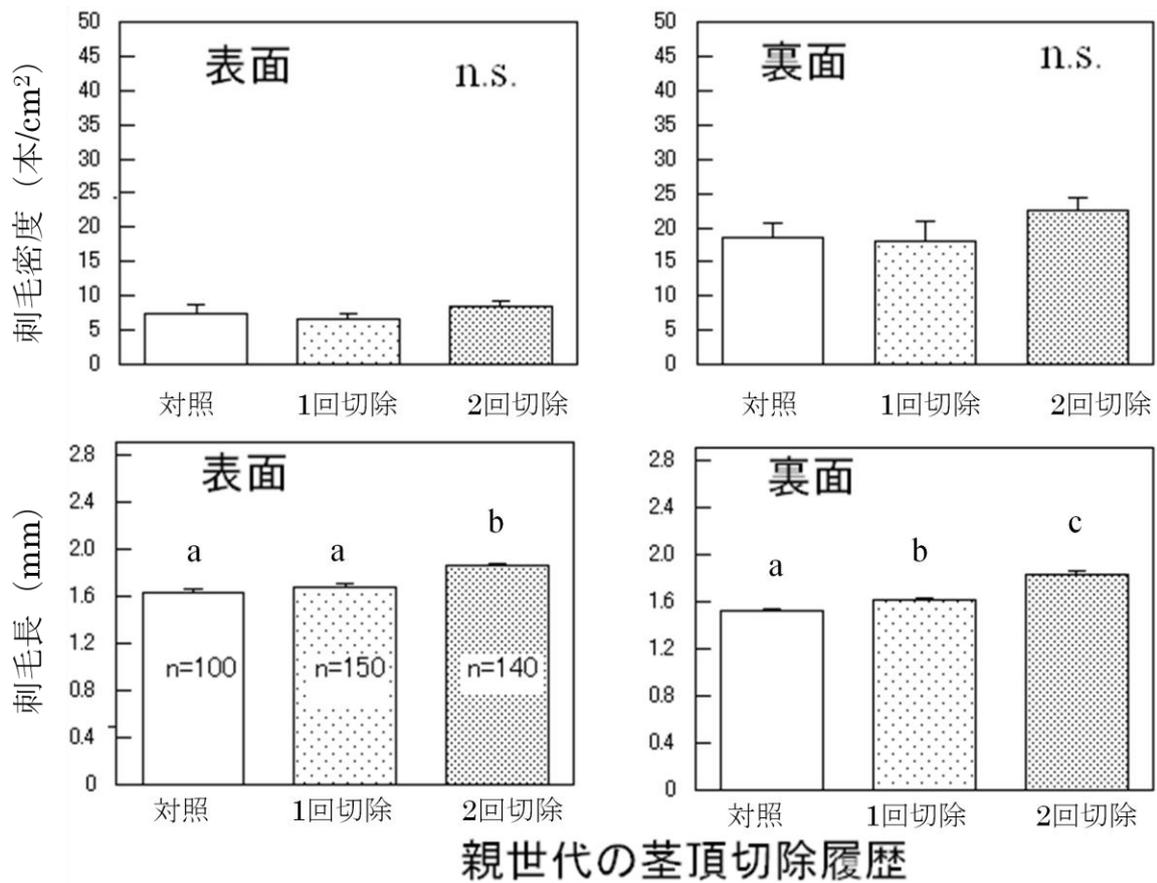


図 3.2.6 親植物の処理グループごとの刺毛密度（上左、上右）と刺毛長（下左、下右）（茎頂を切除した親の子の形質：2015年7月）棒と誤差線は平均値と標準誤差を表す。異なるアルファベットはグループ間に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

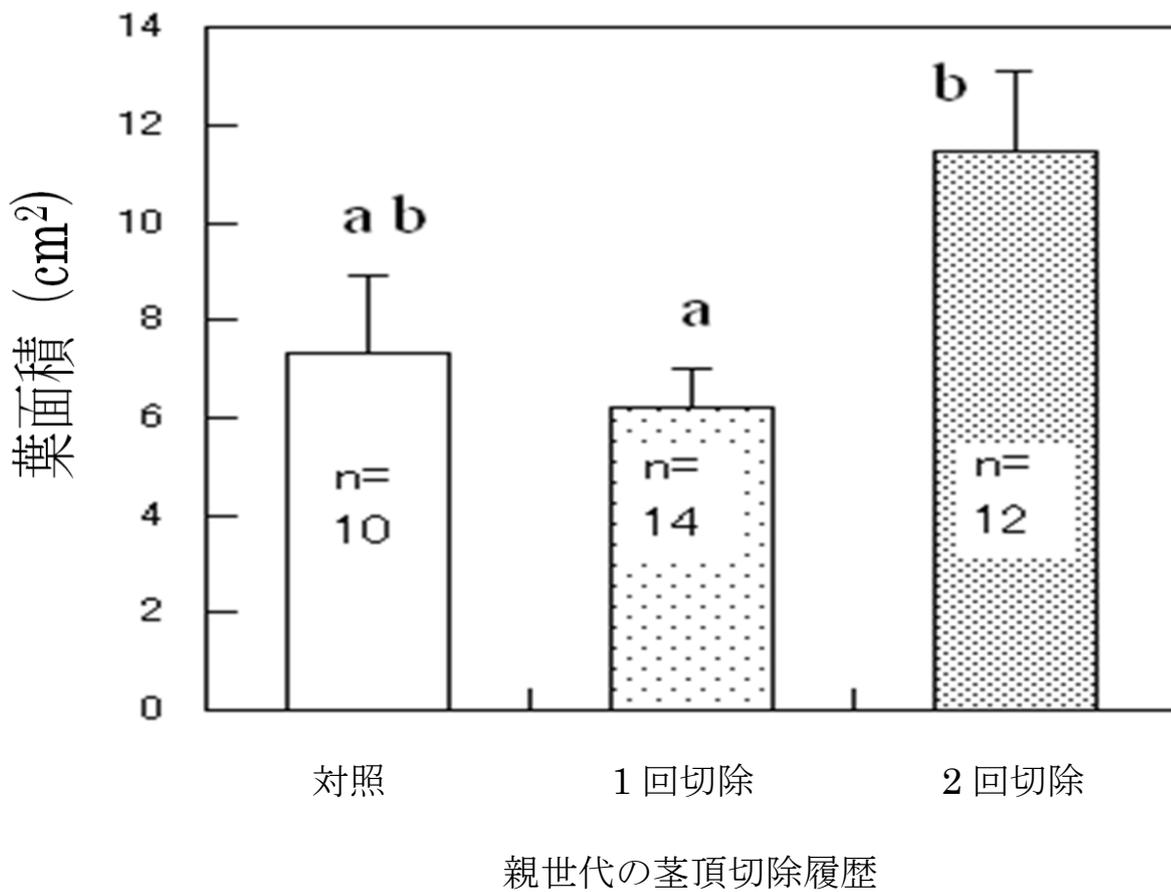


図 3.2.7 親植物の処理グループごとの葉面積（茎頂を切除した親の子の形質：2016年8月）

「対照」、「1回切除」、「2回切除」は親に対する茎頂切除の回数を表し、それぞれ無切除、1年目のみ切除、2年連続切除を示す（2章参照）。棒と誤差線は平均値と標準誤差を示す。異なるアルファベットはグループ間に有意差があることを示す（ $P < 0.05$ ）。

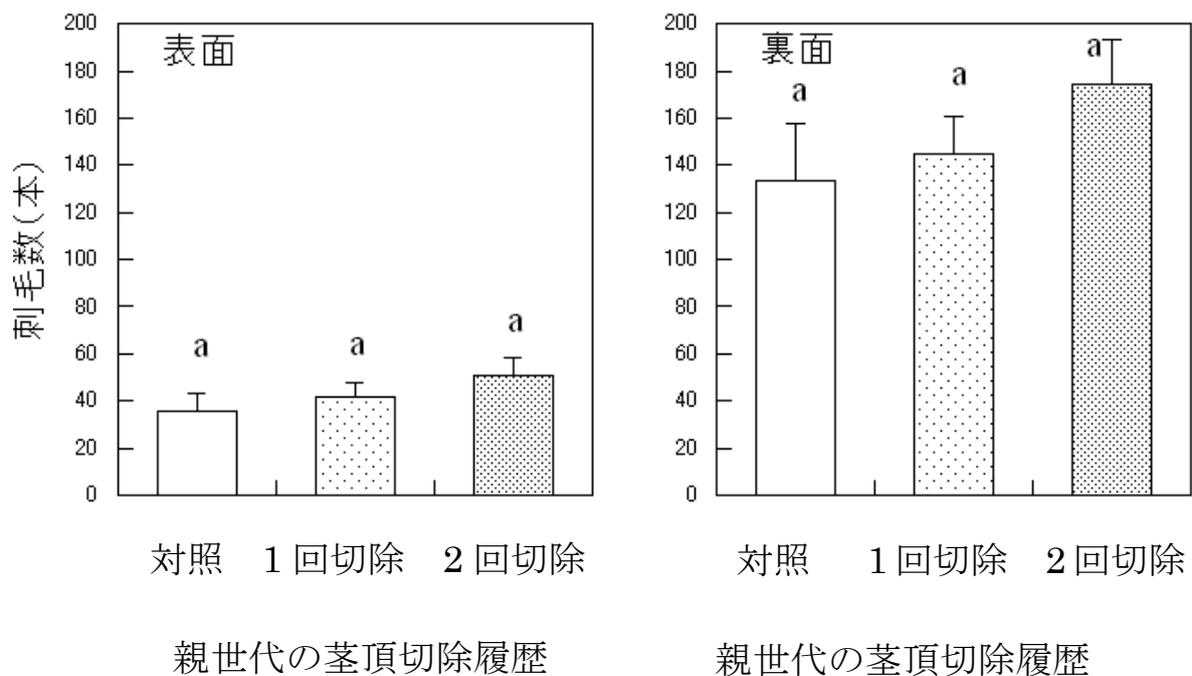


図 3.2.8 親の処理グループごとの刺毛数（茎頂を切除した親の子の形質：2016年8月）

「対照」、「1回切除」、「2回切除」は親に対する茎頂切除の回数を表し、それぞれ無切除、1年目のみ切除、2年連続切除を示す（2章参照）。棒と誤差線は平均値と標準誤差を示す。異なるアルファベットはグループ間に有意差があることを示す（ $P < 0.05$ ）。

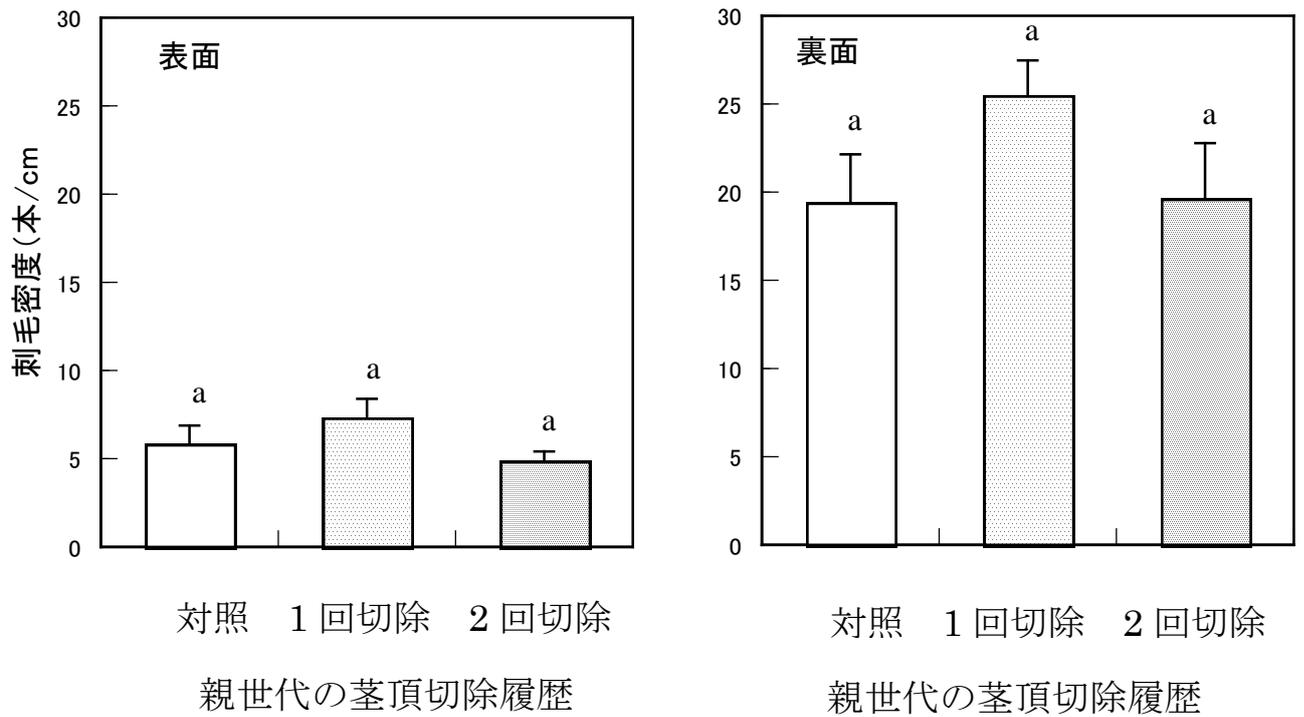


図 3.2.9 親の処理グループごとの刺毛密度（茎頂を切除した親の子の形質：2016年8月）

「対照」、「1回切除」、「2回切除」は親に対する茎頂切除の回数を表し、それぞれ無切除、1年目のみ切除、2年連続切除を示す（2章参照）。棒と誤差線は平均値と標準誤差を示す。異なるアルファベットはグループ間に有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

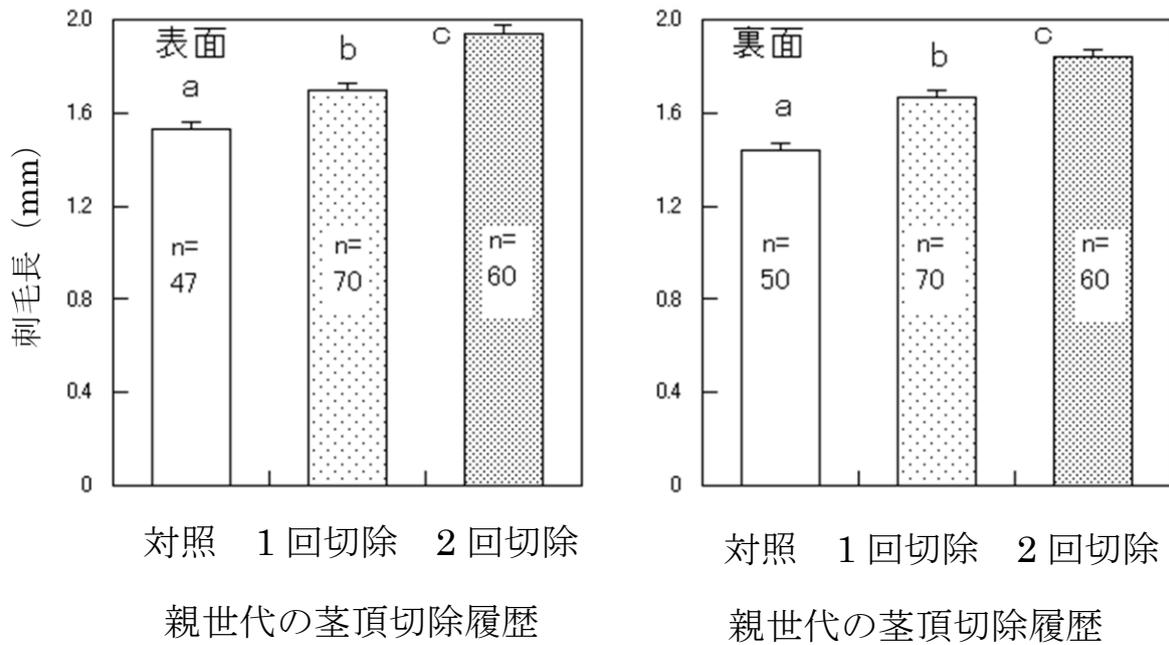


図 3.2.10 親の処理グループごとの刺毛長（茎頂を切除した親物の子の形質：2016年8月）

「対照」、「1回切除」、「2回切除」は親に対する茎頂切除の回数を表し、それぞれ無切除、1年目のみ切除、2年連続切除を示す（2章参照）。棒と誤差線は平均値と標準誤差を示す。異なるアルファベットはグループ間に有意差があることを示す（ $P < 0.05$ ）。

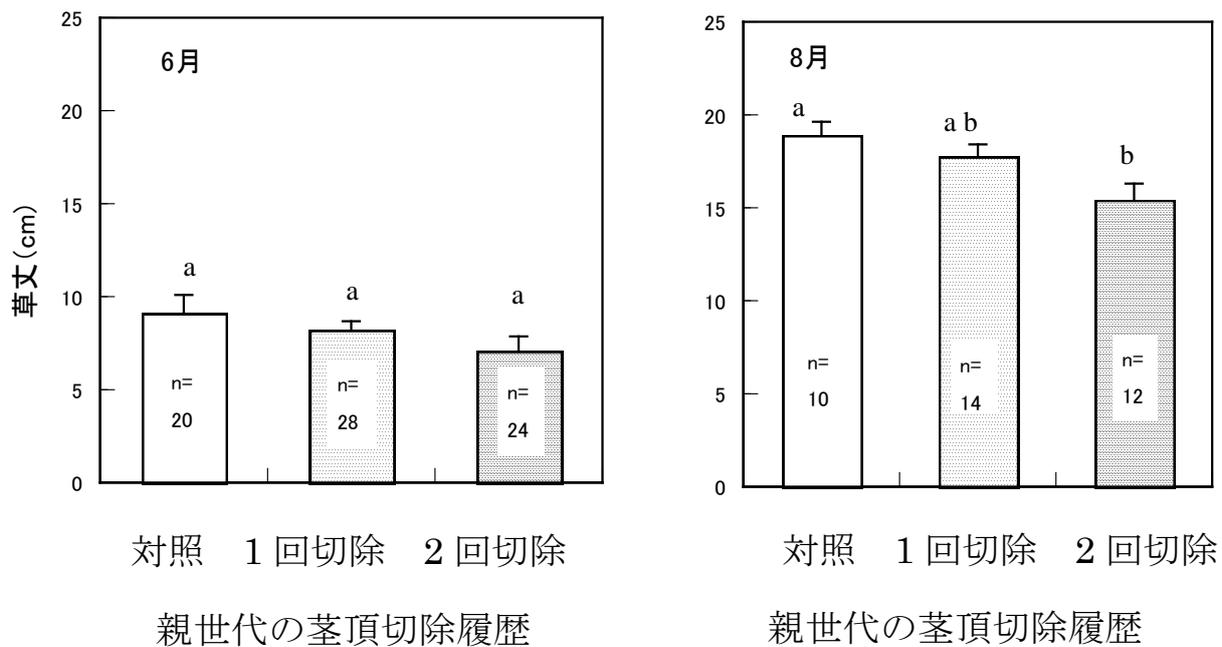


図 3.2.11 親の処理グループごとの草丈（茎頂を切除した親の子の形質：2016年8月）

「対照」、「1回切除」、「2回切除」は親に対する茎頂切除の回数を表し、それぞれ無切除、1年目のみ切除、2年連続切除を示す（2章参照）。棒と誤差線は平均値と標準誤差を示す。異なるアルファベットはグループ間に有意差があることを示す（ $P < 0.05$ ）。

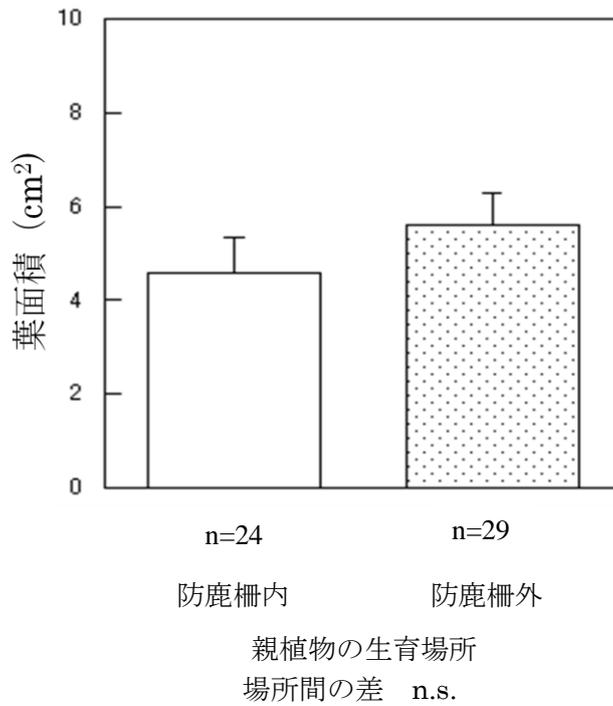


図 3.2.12 葉面積に及ぼす親の生育場所の影響（防鹿柵内・柵外に生育する親の子の形質：7月）

平均値と標準誤差を示す。「n.s.」は有意差がないことを示している（ $P>0.05$ ）。

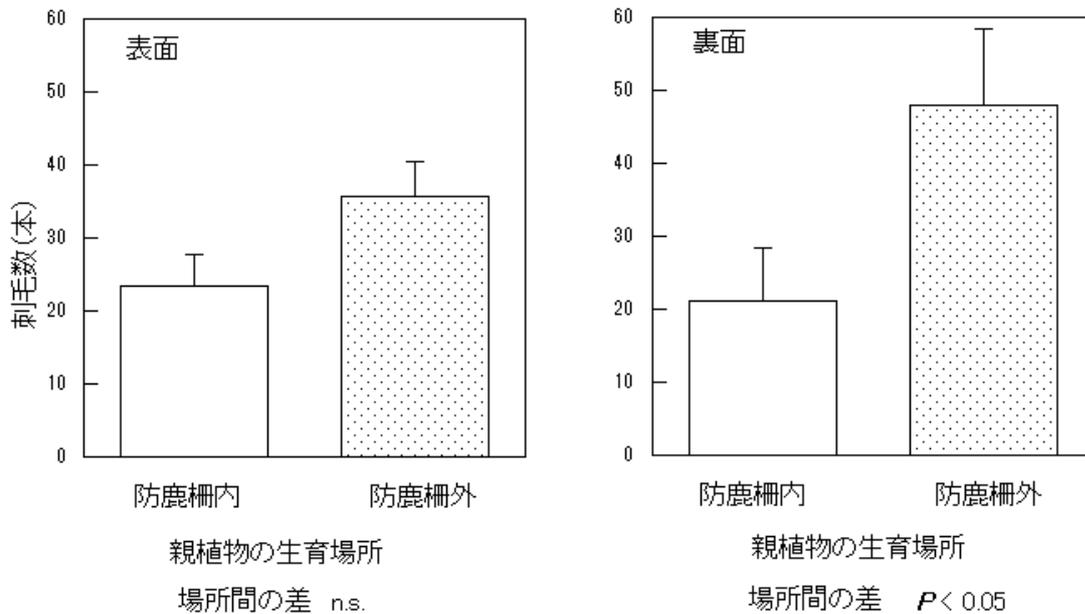


図 3.2.13 刺毛数に及ぼす親の生育場所の影響（防鹿柵内・柵外に生育する親の子の形質：7月）

平均値と標準誤差を示す。「n.s.」は有意差がないことを示している（ $P>0.05$ ）。

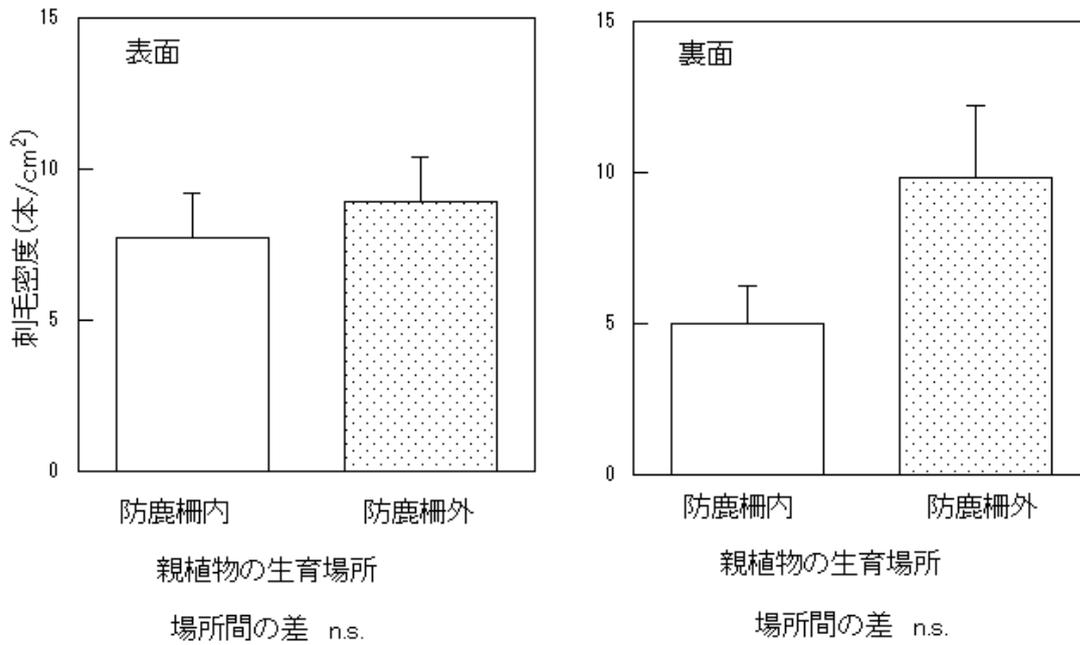


図 3.2.14 刺毛密度に及ぼす親の生育場所の影響（防鹿柵内・柵外に生育する親の子の形質：7月）平均値と標準誤差を示す。「n.s.」は有意差がないことを示している（ $P>0.05$ ）。

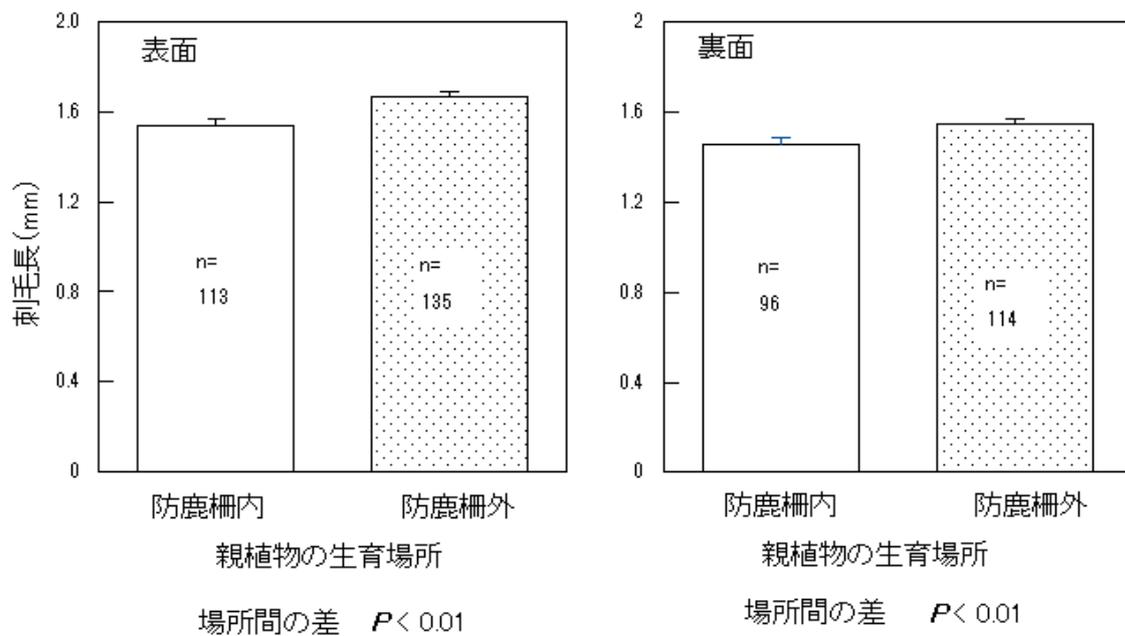


図 3.2.15 刺毛長に及ぼす親の生育場所の影響（防鹿柵内・柵外に生育する親の子の形質：7月）平均値と標準誤差を示す。「n.s.」は有意差がないことを示している（ $P>0.05$ ）。

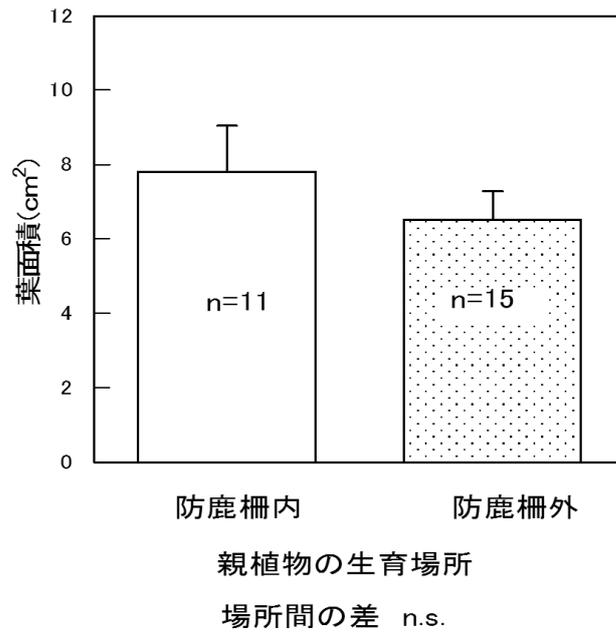


図 3.2.16 葉面積に及ぼす親の生育場所の影響（防鹿柵内・柵外に生育する親の子の形質：9月）
 平均値と標準誤差を示す。「n.s.」は有意差がないことを示している（ $P>0.05$ ）。

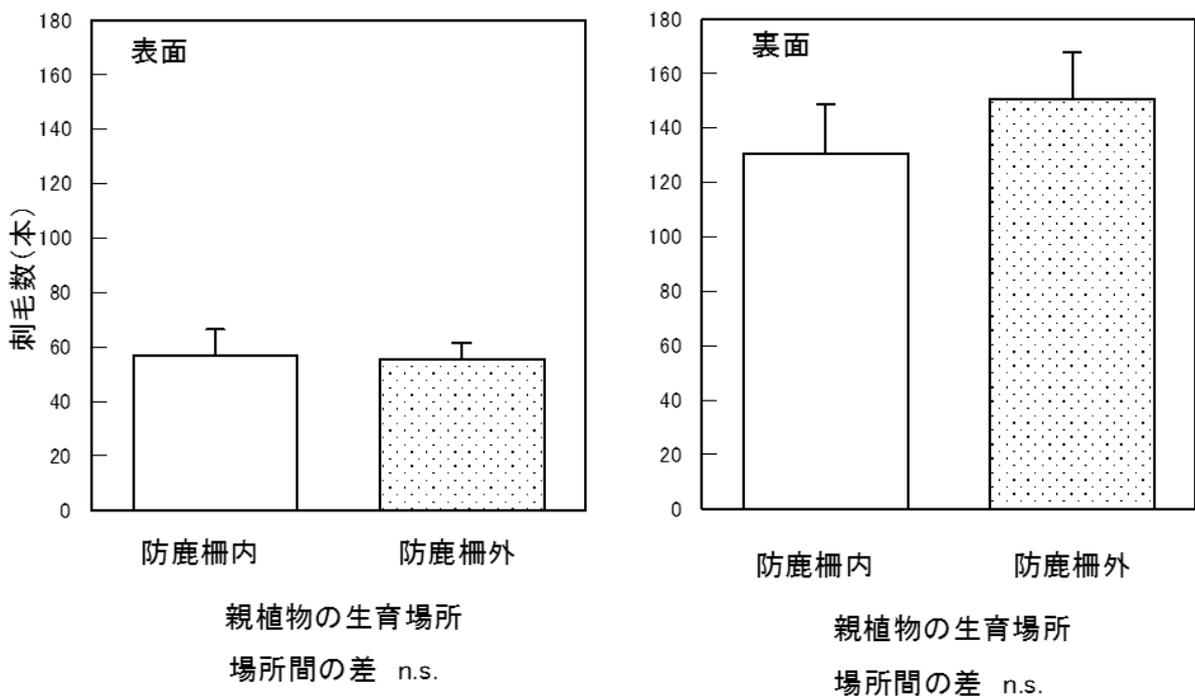


図 3.2.17 刺毛数に及ぼす親の生育場所の影響（防鹿柵内・柵外に生育する親の子の形質：9月）
 平均値と標準誤差を示す。「n.s.」は有意差がないことを示している（ $P>0.05$ ）。

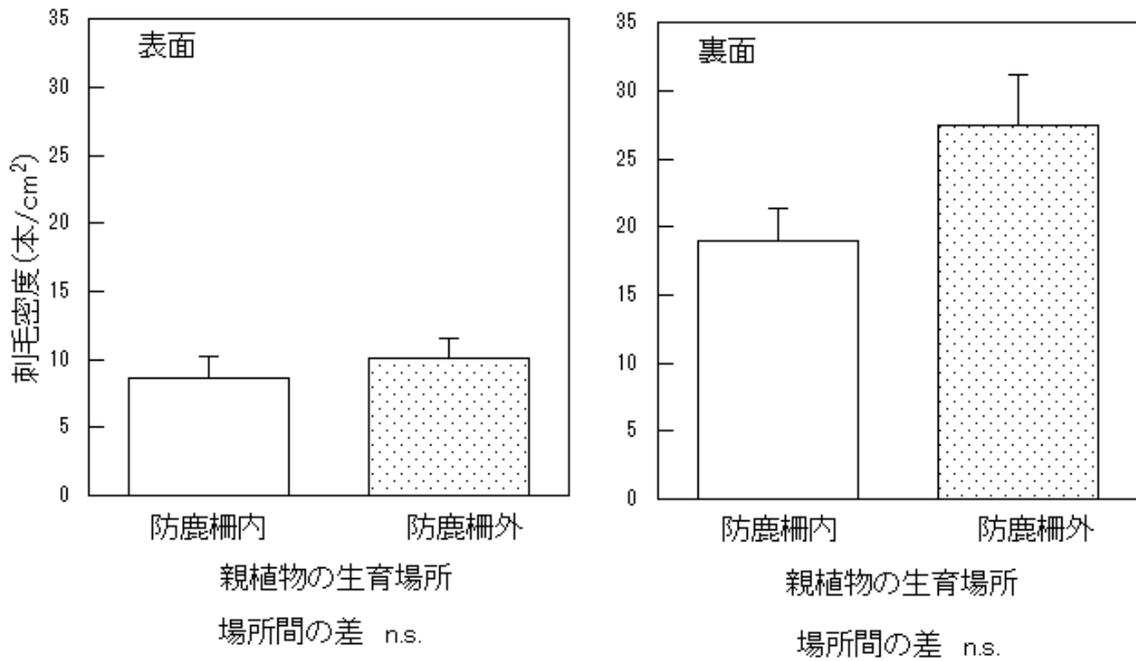


図 3.2.18 刺毛密度に及ぼす親の生育場所の影響（防鹿柵内・柵外に生育する親の子の形質：9月）平均値と標準誤差を示す。「n.s.」は有意差がないことを示している（ $P > 0.05$ ）。

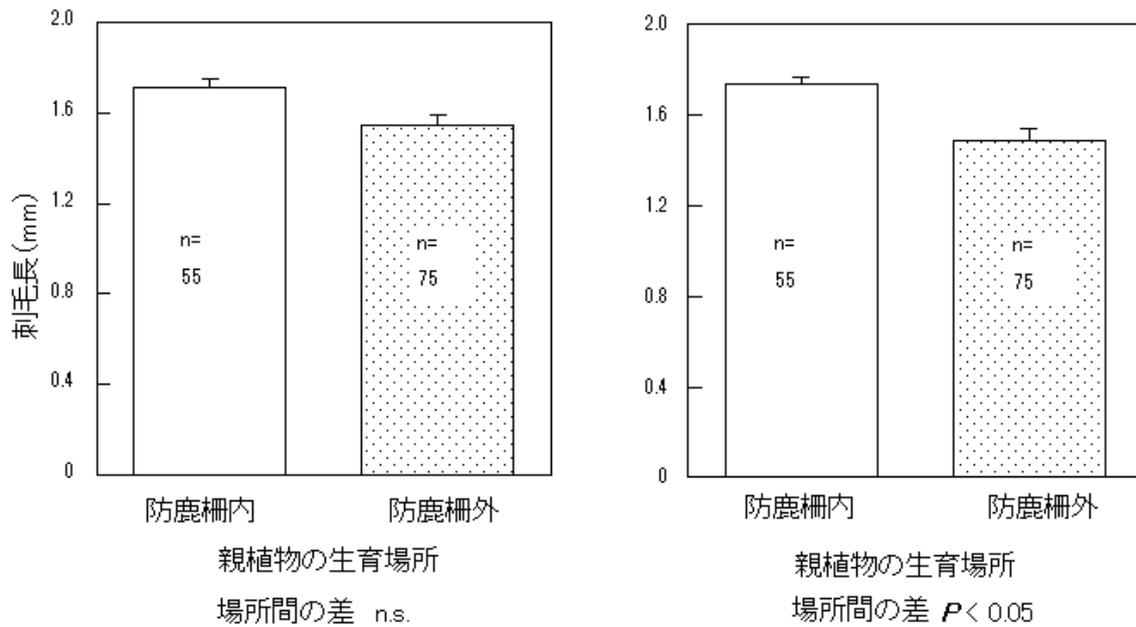


図 3.2.19 刺毛長に及ぼす親の生育場所の影響（防鹿柵内・柵外に生育する親の子の形質：9月）平均値と標準誤差を示す。「n.s.」は有意差がないことを示している（ $P > 0.05$ ）。

3.4 考察

3.4.1 親植物における茎頂切除が子植物の刺毛形質に及ぼす影響

本章 3.3.1 節では、奈良公園で行った茎頂切除実験（2章参照）に供したイラクサ、すなわち茎頂を切除した親植物の子を用いた栽培実験を行い、測定対象とした葉面積と刺毛形質（刺毛数、刺毛密度、刺毛長）のうち、葉面積と刺毛長で親世代の茎頂切除の有意な影響が現れることを明らかにした。刺毛長は表面・裏面両方ともに切除回数が多い親植物の子ほど長くなる傾向（すなわち、対照個体の子 < 1回切除個体の子 < 2回切除個体の子）が認められたことから、親世代における切除回数と子世代における刺毛長との間には正の相関があることが示唆される。奈良公園の自然個体群を対象に行った茎頂切除実験の結果から、親世代の刺毛長は茎頂切除に応答して増加することが示されている（2.3.1 節）。特に、裏面の刺毛長については、切除回数（発芽後2年間における切除回数）と2年目夏（発芽後2年目の夏）の刺毛長との間に明瞭な正の相関が認められ、この応答は誘導防御とみなされる（2.4.1 節）。このことから、本栽培実験で認められた子植物の裏面の刺毛長と親世代における切除回数との間の正の相関は、親において発現した誘導防御がなんらかのメカニズムで子植物に伝達されたことを示唆するものと考えられる。親植物において発現した誘導防御が被食の有無にかかわらず子植物に伝達されるメカニズムとしては世代間エピジェネティック遺伝が知られている（Scoville *et al.* 2011）。Scoville *et al.* は、多年生草本ミゾホオズキ属（*Mimulus guttatus*）において、親植物が被食されると子植物の腺毛も増加するという現象（Holeski, 2007）の原因が世代間エピジェネティック遺伝によって生じていることを詳細な遺伝分析実験によって明らかにしている。ただし、この植物の腺毛の長さや形態が変化しているかどうかは明らかにされていない。

奈良公園の自然個体群を対象に行った茎頂切除実験では、裏面の刺毛数についても切除回数（発芽後2年間における切除回数）と2年目夏（発芽後2年目の夏）の刺毛数との間に明瞭な正の相関が認められたことから（2.4.1 節参照）、この形質も裏面刺毛長と同様に、親世代における誘導防御が子植物に伝達される可能性がある。しかしながら、本章の栽培実験では、子の裏面の刺毛

数と親世代における切除回数との間に有意な関係が認められなかった。このことから、この形質については親植物において発現した誘導防御が子植物に伝達される程度が小さい、もしくは伝達されない可能性があるものと考えられる。

3.4.2 子世代の刺毛形質に及ぼすシカの採食の影響

シカによる採食圧が高い場所に設定した防鹿柵内と柵外に生育するイラクサの果実を用いた栽培実験の結果、子の夏（7月）と秋（9月）における葉面積と刺毛形質（刺毛数、刺毛密度、刺毛長）のうち、いくつかの形質値が柵内（防鹿柵内の個体の子植物）と柵外（防鹿柵外の個体の子植物）との間で異なることが明らかとなった（3.3.2 節）。親植物の生育場所による有意な差違が認められた形質は、裏面の刺毛数、表面・裏面の刺毛長の3形質であった（裏面刺毛数と表面刺毛長は、夏のみ有意な差違が認められた）。これらの3形質のうち、夏における裏面刺毛数と表面・裏面の刺毛長は柵内よりも柵外の方が大きかったが、秋の裏面刺毛長は逆に柵内の方が柵外よりも大きかった。このことから、刺毛数と刺毛長における柵内と柵外の差違の傾向は季節によって異なるものと考えられる。裏面刺毛長における柵内と柵外での差違の傾向が夏～秋の間にどのように逆転するのかは今後の検討課題である。

柵内の親植物は、果実採取を行う7年前に防鹿柵近隣に生育する自然個体群の中から柵内に移植した個体であり、平均値として見たときには遺伝的組成は柵外の個体とおおよそ同じと考えられる。それにもかかわらず、柵内と柵外で葉面積と刺毛形質に有意な差違が認められたことは、柵内と柵外の個体を取りまく光環境や土壌中の栄養塩濃度などの非生物的環境や採食圧などの生物的環境の差違、あるいは防鹿柵内と柵外の個体の齢の差違が次世代の形質に影響を及ぼしたことを示唆している。例えば、防鹿柵内と柵外の光環境には有意な差違があり、柵内の方が柵外よりもやや明るく（加藤禎孝未発表；3.2.2 節参照）、この違いが子植物の形質に影響を及ぼした可能性がある。草食動物による採食圧については、本調査地ではイラクサに対するシカの採食圧が柵外周辺でかなり高く（Shikata *et al.* 2013）、また、イラクサの結実期（10月）までに90%以上の個体が被食されることが示されている（加藤禎孝 未発表）。さらに、本実験で用いた果実の採

取日（2013年10月）における親植物の刺毛形質（刺毛数・刺毛密度・刺毛長）は、防鹿柵内と柵外で明瞭に異なっており、いずれの形質値についても柵外の方が柵内よりも大きかった（3.2.2節参照）。2章で述べたイラクサの茎頂切除に対する応答についての見方に従えば、この親の刺毛形質の柵内と柵外での差違は、柵外の個体でシカの採食による誘導防御反応が現れていることを示している。なお、3.2.2節で述べたように、柵外と柵内では光環境にも違いがあるが、柵内の方が柵外よりも明るいため、形成にコストがかかると考えられる刺毛についての差違（柵外の親の形質値>柵内の親の形質値）は光環境の違いでは説明できない可能性が高い。以上のことは、子植物の刺毛形質値と親世代における被食回数との間に関係がある可能性、すなわち、柵外でのシカによる親植物の被食が世代間エピジェネティック遺伝などのメカニズムを介して子世代の刺毛形質に影響を及ぼした可能性を示唆している。子植物の形質ごとにみると、柵内よりも柵外の方が大きな値を示した形質は夏における裏面の刺毛数と表面・裏面の刺毛長であった。この結果は、夏（7月～8月上旬）におけるイラクサの子植物の刺毛形質のなかでは刺毛長が親の茎頂切除の回数と正の相関を示すという前節で述べた栽培実験の結果（3.3.1節）と矛盾しない。また、裏面の刺毛長は誘導防御反応を示し、被食回数と正の相関を示すことが期待されるため（2章）、夏の裏面の刺毛長については、柵外の親植物に現れた誘導防御が何らかのメカニズムにより子植物に伝達された可能性がある。ただし、シカによる被食のみならず、親の物理的生育環境（光環境や土壌中の栄養塩濃度などの場所間差）や親植物の齢の違いも子植物の刺毛形質に影響しているかもしれない。一方、秋における表面・裏面の刺毛長は柵外よりも柵内の方が大きな値を示したことから、これらの形質は親世代での被食回数と負の相関を示す可能性がある。この結果は、秋の刺毛長については、親に現れた誘導防御が子に伝達されないこと、また、誘導防御の伝達以外の要因（例えば親植物の齢や親をとりまく物理的生育環境）が子植物の形質に影響した可能性を示唆している。

3.5 まとめ

茎頂を切除したイラクサについて、その子植物を用いた栽培実験を2回行い、子世代の葉面積

と刺毛形質（刺毛数、刺毛密度、刺毛長）に親世代での茎頂切除がどのような影響を及ぼすかを調べた。実験の結果、子植物の葉面積と刺毛長について、親植物での切除回数と子植物の形質値との間に正の相関が認められた。特に、刺毛長は2015年7月と2016年8月の両方で同様の傾向が認められたことから、この形質に認められた親世代の茎頂切除の影響は再現性が高いといえる。茎頂を切除されたイラクサの裏面刺毛長は切除回数との間に正の相関を示すことから（2章）、子植物の裏面刺毛長と親における切除回数との間の正の相関は、親世代において発現した誘導防御が世代間エピジェネティック遺伝などのメカニズムによって子世代に伝達されたことを示唆している。

さらに、シカによる採食圧が高い場所に設置した防鹿柵内と柵外に生育するイラクサの果実を用いた栽培実験を行い、夏（7月）と秋（9月）における子植物の葉面積と刺毛形質について、親の生育場所（柵外と柵内）による差の傾向を調べた。親の生育場所によって有意な差が認められた子植物の形質は、裏面の刺毛数と表面・裏面の刺毛長であった。この結果はシカによる被食が子世代の刺毛形質に影響した可能性を示唆している。ただし、親植物の生育環境や齢の違いも子植物の刺毛形質に影響した可能性がある。柵内よりも柵外の子植物の方が大きな値を示した形質は、夏における裏面刺毛数と表面・裏面の刺毛長であった。これらの形質については親世代における被食回数と子世代の形質値との間の正の相関がある可能性がある。一方、秋における子植物の裏面の刺毛長は柵内の方が柵外よりも長いことから、この形質の柵内と柵外との差の傾向は季節によって異なるものといえる。秋の刺毛長については、親世代に現れた誘導防御が子世代に伝達されないこと、また、世代間エピジェネティック遺伝などの誘導防御の伝達とは異なるメカニズムが子世代の形質に影響したことを示唆している。

第4章 被食頻度の異なる地域間での誘導防御の程度の差異

4.1 はじめに

進化理論では、捕食が時々あり、なおかつ捕食の前兆を示すシグナルがある環境下では、自然選択によって誘導防御が進化すると考えられている (Clark & Harvell 1992、Tollrian & Harvell 1999、Karban 2011)。この理論に基づいて、植物集団は、低頻度で不規則に被食されるハビタットでは誘導防御が進化する一方で、高頻度に絶え間なく被食されるハビタットでは恒常的防御が進化すると予測されている (Karban & Baldwin 1997)。この理論的予測に従うと、未被食の個体の防御形質値 (すなわち、採食される前の植物の防御の程度) と誘導防御の大きさ (すなわち、被食によって生じる防御形質の応答の大きさ) は、生育地の被食の様式 (頻度と強さ) によって遺伝的に異なるとする仮説をたてることができる。具体的には、「低頻度で不規則に被食される場所における未被食の個体の防御形質値 (防御の程度) は、高頻度で絶え間なく被食される場所におけるそれよりも小さい。その一方で誘導防御の大きさは逆に大きい」と予想される。しかしながら、この仮説に関連する知見は少ない (Zangerl & Berenbaum 1990、Mutikainen & Walls 1995、Wang *et al.* 2012)。

形態的防御形質については、未被食の個体の防御形質値及び誘導防御の大きさに集団間の遺伝的変異が見られることがある (Dalin *et al.* 2008)。例えば、栽培実験によって未被食の個体 (対照個体) の刺毛形質を調べた研究によると、キク科の多年生草本 *Borrichia aborescence* では、トライコーム (軟毛) を持つ個体の頻度が地域によって異なることが示されている (Morrison 2002)。ヨーロッパ産イラクサ属 (*Urtica dioica*) を用いた栽培実験についても、刺毛密度に集団間の遺伝的変異があることが示されている (Pollard & Briggs 1982)。さらに、イラクサ (*U. thunbergiana*) では、刺毛数や刺毛密度に集団間の遺伝的変異があり、被食頻度が低い場所に生育する集団が被食頻度の高い場所の集団よりも小さな形質値を示す傾向が認められている (Kato *et al.* 2008)。ただし、Kato *et al.*の研究では、刺毛形質 (刺毛数、刺毛密度、刺毛長) の分析において葉の表面と裏面を識別していないため (すなわち表面と裏面の合計値を分析)、誘導防御を示す裏面の刺毛数・

刺毛密度・刺毛長については検討されていない。一方、形態的防御形質における誘導防御についてみると、ヨーロッパ産イラクサ属 (*U. dioica*) では、刺毛密度に現れる誘導防御の大きさに2変種間 (*U. dioica* subsp. *dioica* と *U. dioica* subsp. *sondenii*) で差違があることが示されている (Mutikainen & Walls 1995)。このイラクサ属の刺毛密度に見られる種内変異は、食植者の違いを反映していると考えられている。化学的防御の集団間変異については、カナダのブリティッシュコロンビア州の本土と約 80km 離れた島に分布するアメリカネズコ (*Thuja plicata*) の2集団が、葉に含まれる diterpene の濃度に遺伝的な差違を示すこと、そしてその変異がシカの一種 (*Odocoileus hemionus sitkensis*) の採食圧の程度を反映していること (Vourc'h G. et al. 2001) など、いくつかの知見が集積されている。化学的防御における誘導防御の大きさの集団間変異は報告事例がない。

本章では、未被食の個体の防御形質値及び誘導防御の大きさの集団間変異についての以上の仮説を検討する。このため、シカの生息密度が高い奈良公園およびシカの生息密度が低い2地域を対象に、自然集団と栽培個体を用いて未被食個体の刺毛形質を調べた。また、奈良公園において、シカの採食頻度が異なる2地点に生育するイラクサ2集団の当年生実生を対象に、茎頂切除実験により刺毛形質に現れる誘導防御の大きさにどのような集団間変異が見られるかを検討した。

4.2 材料と方法

4.2.1 自然集団における未被食個体の刺毛形質の集団間変異

シカの生息密度が高い奈良公園とシカの生息密度が低い他地域で未被食個体の刺毛形質がどのように異なるかを明らかにするため、奈良公園の北部 (以下、「奈良公園」という; 図 4.2.1; 34°41'23"N、135°50'26"E、海拔高度 103m) に設置した防鹿柵 (底面積 0.81m²の防鹿柵 2基; 図 3.2.2) の中で生育するイラクサ及び奈良県桜井市箸中 (以下、「桜井」という; 34°32'30"N、135°51'38"E、海拔高度 150.9m) と同県高市郡高取町 (以下、「高取」という; 34°25'45"N、135°49'26"E、海拔高 486.8m) (図 4.2.2) に分布する自然集団を対象として未被食個体の刺毛形質の測定を行っ

た。奈良公園で調査対象とした防鹿柵内のイラクサは 2006 年に植栽したものであるが、防鹿柵の近隣に生育していた自然集団の個体である。なお、これらの植栽個体は 2006 年の時点で当年生実生であり、被食を経験していない個体である。

奈良公園の北部は、Shikata *et al.*(2013)によると、近畿地方内に設定した 19 地点の調査地のなかで当該地点は 3 番目に糞塊密度が高い。このことは、この場所で採食行動をとるシカの個体密度が他地点に比べて高いことを示している。特に、この場所では 10 月以降になると 90%以上のイラクサが部分的に被食されることが観察されている（40 個体を対象とした継続観察に基づく結果；加藤禎孝 未発表）。一方、桜井と高取ではシカの糞塊や採食痕は全く見られず、シカはほとんど生息していないと推定された。

奈良公園の調査地は、針葉樹（スギ、アカマツ、クロマツ）の植栽地であり、亜高木層にスタジイ、低木層にナンキンハゼ、サルスベリ植栽木、草本層にダンドボロギク、レモンエゴマ、イワヒメワラビ、ワラビなどが生育している。桜井はヒノキの植林地であり、低木層にヤブツバキとヒイラギ、草本層にササ類、イノデ類、フユイチゴなどが見られる。高取はスギの植林地であり、亜高木層にアラカシ、低木層にアオキ、ヤブツバキ、シラカシ、ヤブニッケイ、草本層にイノデ類、イタドリが見られる。奈良公園が位置する奈良市の気象条件（2015 年計測値）は、年平均気温・最高気温・最低気温でそれぞれ 15.5℃、36.9℃、−3.1℃であり、年降水量は 1510mm である（気象庁アメダス；北緯 34°41.6′、135°49.6′、海拔高度 104.4m）。桜井近隣の宇陀市（大宇陀）の気象条件（同年計測値）は、年平均気温・最高気温・最低気温でそれぞれ 13.4℃、34.7℃、最低−6.0℃であり、年降水量は 1640.5mm である（気象庁アメダス；北緯 34°29.3′、135°55.9′、海拔高度 349m）。高取近隣の五條市の気象条件は（同年計測値）は、年平均気温・最高気温・最低気温でそれぞれ 14.7℃、37.1℃、最低−4.6℃であり、年降水量は 1459mm である（気象庁アメダス；北緯 34°22.8′、135°43.8′、海拔高度 190m）。

2016 年 9 月 27 日に、以上の 3 地点について 1 地点あたりイラクサ 20 個体から葉を採取した（1 個体あたり 1 枚）。いずれの個体も採食痕の無い未被食個体であった。これらの葉について画像データを作成し、葉面積及び表面と裏面の刺毛数・刺毛密度を測定した。また、表面と裏面のそれ

それから最大で5本の刺毛を任意に選び、刺毛長を測定した(測定方法については2.2.3節参照)。さらに、イラクサ個体の生育状況を評価するため、葉を採取した日に各個体の草丈も測定した。

以上3地点の生育環境を評価するため、相対光量子量と土壌中の硝酸イオン濃度を測定した。相対光量子束密度(RPPFD)の測定は2016年6月17日に行い、曇天の日にイラクサ実生が生えている10地点の地上高約70cmの位置及び近隣の開放地の10地点で光量子束密度(PPFD)を同時に測定することによって相対光量子束密度を計算した(2.2.2節参照)。但し、奈良公園については、果実を採取した2基の防鹿柵について合計10回の測定で得たPPFD測定値の平均値を、近隣の開放地での10回の測定で得たPPFD測定値の平均値で除して求めた。硝酸イオン濃度測定のための土壌のサンプリングは桜井と高取では2016年3月3日、奈良公園では同年3月4日に行った。これらの日に各地点から5点ずつ土壌サンプルを採取し、各サンプル中の硝酸イオン濃度を高速液体クロマトグラフを用いて測定した(2.2.3節参照)。

4.2.2 栽培した未被食個体の刺毛形質の集団間変異

以上の奈良公園の防鹿柵内の個体及び桜井と高取の自然集団を対象に、2013年10月に果実を採取し、恒温器の中で発芽させた個体を2014年4月にポットに植栽し、温室内で栽培した。栽培に用いた親の個体数は1地点あたり15個体である。1親個体から得られた1子個体を栽培に用いた。測定した子の個体数は奈良公園、桜井、高取でそれぞれ11、14、15個体である。2014年9月13、15日に、これらの個体について茎頂から3節目につく葉を採取して葉面積と葉の表面・裏面の刺毛形質(刺毛数、刺毛密度、刺毛長)を測定した(測定方法は2.2.3節参照)。また、生育状況を評価するため、葉を採取した日に各個体の草丈も測定した。果実の保存、発芽処理方法、栽培用プラスチックポットの大きさ、栽培に用いた用土及び培養液については3.2.1節を参照。

以上の栽培実験を行った温室内の栽培期間中の気温、相対湿度、相対光量子束密度は、それぞれ24.4℃(平均値;最高40.6℃、最低6.2℃)、74.8%(平均値;最高100.0%、最低23.5%)、 $13.8\pm 2.5\%$ (平均値 \pm 標準偏差)であった。

4.2.3 刺毛形質における誘導防御の大きさの集団間変異

2013年2月28日、奈良公園においてシカによる採食圧が高い場所（海拔高度約110m）と低い場所（海拔高度約119m）のそれぞれに同じ大きさ(10m×20m)の調査区を設定した（図4.2.1）。ここでは、採食圧が高い場所に設定した調査区を「採食区」、低い場所に設定した調査区を「排除区」と呼ぶ。採食区は、一年を通してシカにより多様な分類群の植物が強度に採食されているスギ林の中に位置している。この区内の植物は、高頻度に被食を経験していると考えられる。一方、排除区は、春日大社境内の高さ約1.5mのフェンスで囲まれた竹林内に位置している。このフェンスは1950年代～1970年代に設置された。フェンス内の下層植生を管理するため、2011年までは1年に2日間程度フェンスの扉が開放されており、この期間のみフェンス内の植物はシカに採食されていたと推定される。2012年（茎頂切除実験を実施した年の前年）以降はフェンスの扉は開放されておらず、フェンス内の植物は採食されていなかった。両調査区ともに、茎頂切除実験の期間中は草刈りは行われていなかった。両調査区は約1.1km離れている。これら2調査区の間にもいくつかのイラクサ集団が分布しているが、生育不適地（暗い森林や広い草地）によって互いに隔離されている。

2013年5月上旬に両調査区内で互いに1～1.5m離れて生育するイラクサの当年生実生を任意に選び、それらを2グループに分け、一つのグループに対して茎頂切除を行い、他のグループは対照（無切除）とした。なお、奈良公園のイラクサは3月中旬頃に発芽する（加藤禎孝 未発表データ）。排除区では切除用と対照用としてそれぞれ80個体と40個体を用い、採食区では両グループともに25個体を用いた。排除区において切除用の個体数を対照用と比べて2倍にした理由は、これらの個体を使用する次年度の関連実験において、切除用の個体数が対照用個体の2倍必要であったためである。

2013年5月16日と6月7日に、シカによる被食に対するイラクサの応答の程度を推定するため、シカの採食を模倣した茎頂切除を切除用の個体に対して行った。シカは主にシュートの先端部を採食するため（加藤禎孝 未発表データ）、茎頂切除はシカの採食を模倣しているといえる。茎頂切除は、茎頂から3節目と4節目の間の茎を切断することによって行った（2.2.2節参照）。

対照個体についても測定用の葉を得るため、3 節目の葉を 1 枚採取した。その後、茎頂を切除した個体については、2013 年 8 月 20 日と 21 日に、切除後に伸長した 2 本の側枝のそれぞれから 3 節目の葉を 1 枚ずつ採取した。同日に対照個体についても主軸から同じ葉位の葉を採取した。両調査区とも、葉を採取する直前に、これらの個体が採食されていないことを確認した。スキャナーを用いて、葉の表面と裏面の画像を作成し、表面と裏面それぞれの刺毛数を数えるとともに、葉面積を測定した (2.2.2 節参照)。刺毛密度は、刺毛数を葉面積で除して求めた。さらに、葉の両面の刺毛をそれぞれ任意に 5 本選び、刺毛長を測定した。

両調査区の生育環境を評価するために、相対光量子束密度 (RPPFD) と土壤中の硝酸イオン濃度を測定した。相対光量子束密度は、曇天の日 (2013 年 4 月 15 日) にイラクサ実生が生えている 10 地点の地上高約 70cm の位置及び近隣の開放地の 10 地点で光量子束密度 (PPFD) を同時に測定することによって求めた (2.2.2 節参照)。土壤中の硝酸イオン濃度については、2016 年 3 月 4 日に各調査区から 5 点ずつ土壌サンプルを採取し、各サンプル中の硝酸イオン濃度を高速液体クロマトグラフを用いて測定した (2.2.3 節参照)。

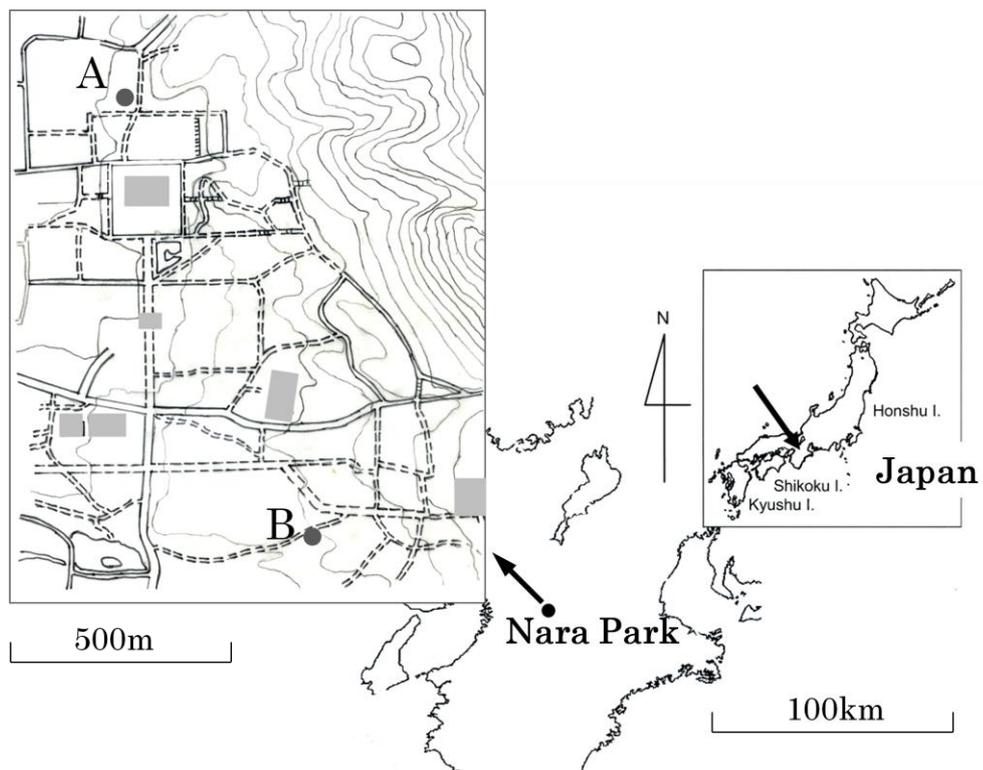


図 4.2.1 奈良公園における調査区の位置

図中の黒丸は調査区の位置を示す；A：防鹿柵を設置した場所（採食区）、B：排除区。

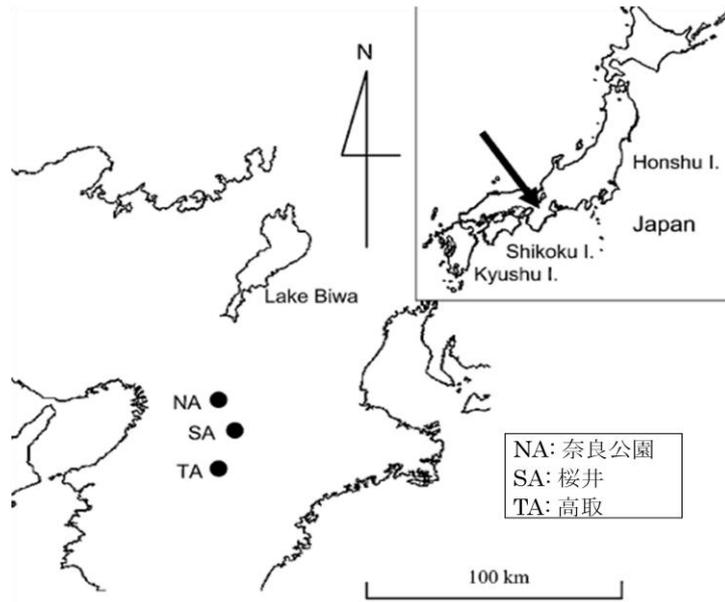


図 4.2.2 調査地の位置

図中の黒丸は調査地の位置を示す。

4.2.4 統計分析

(1) 未被食個体の刺毛形質の集団間変異

自然集団における未被食個体の葉面積、葉の表面・裏面の刺毛数及び刺毛密度、及び草丈については、一元分散分析（ANOVA）を用いて集団間に有意な差があるかどうかを検討した。刺毛長の集団間変異については nested ANOVA（「場所の効果」及び「場所にネストした個体の効果」を分析する分散分析モデル）を用いた分析を行った。これらの形質について 2 集団間の差の有意確率を計算するため、多重比較（Bonferroni 法による多重比較）による分析を行った。栽培個体の葉面積、刺毛形質、草丈における集団変異の分析についても、以上に述べた分析と同じ方法を用いて行った。

(2) 刺毛形質における誘導防御の大きさの集団間変異

まず、調査区間で光環境に差があるかどうかを検討するため、両区で得られた相対光量子束密度のデータを用いてウィルコクソンの符号付順位和検定（Wilcoxon's signed rank test）による分析を行った。次に、葉面積と刺毛形質（葉の表面・裏面の刺毛数、刺毛密度、刺毛長）について、茎頂切除の影響と集団（場所）による差を評価するため、nested ANOVA（「切除の効果」、「場所の効果」、「場所と切除の交互作用」、及び「切除と場所にネストした個体（実生）の効果」を分析する分散分析モデル）を用いた分析を行った。この nested ANOVA では、ある形質値について場所と切除の交互作用が有意（すなわち交互作用の F 値の P 値が 0.05 未満）ならば、当該形質についての応答のパターンもしくは程度に集団間で有意な差があると判断した。

葉面積および刺毛形質の茎頂切除に対する応答の程度とパターンを評価するため、切除個体の各形質値について可塑性値（value of plasticity ; Rozendaal *et al.* 2006）を計算した。可塑性値は、切除個体について 1 個体ごとに計算される値であり、次の手順で計算した：まず（1）各切除個体について当該形質の平均値を計算し（測定値が 1 つのみの場合はその値を使用）、次に（2）切除個体 1 個体ごとにこの値と対照個体の平均値（同じ調査区内の全対照個体の平均値）との差の絶対値を求め、さらに（3）この差の絶対値を対照個体の平均値で除して 100 倍した値が当該個

体についての可塑性値である。この各切除個体の可塑性値について、集団（調査区）による差違の有無を評価するため、ウィルコクソンの符号付順位和検定を用いた分析を行った。

以上の分析のうち nested ANOVA は SPSS version 9.01J (SPSS 1999)を用いて行った。また、ウィルコクソンの符号付順位和検定は統計ソフトウェア R (R Development Core Team 2010) を用いて行った。

4.3 結果

4.3.1 自然集団における未被食個体の刺毛形質の集団間変異

調査地の相対光量子量 (RPPFD) は、奈良公園 (防鹿柵)、桜井、高取でそれぞれ 55.8%、14.1%、20.1% (平均値)であった (図 4.3.1)。相対光量子量の集団間差は有意であり ($P < 0.001$)、奈良公園 (防鹿柵) は他の調査地よりも明るいといえる。土壌中の硝酸イオン濃度は奈良公園 (防鹿柵)、桜井、高取でそれぞれ 15.5Mol/g、4.7Mol/g、28.3Mol/g であった (図 4.3.2)。硝酸イオン濃度の集団間差も有意であり ($P < 0.01$)、高取は他の調査地よりも土壌中の硝酸イオン濃度が高いといえる。

奈良公園 (防鹿柵) のイラクサの葉面積は他地点の値よりも有意に小さく、平均値で見ると他地点の値の 1/2 以下であった ($P < 0.001$; 図 4.3.3)。刺毛数については、表面、裏面両方ともに有意な集団間差があり、奈良公園 (防鹿柵)、桜井、高取の順に値が小さくなる傾向が認められた (表面、裏面両方ともに $P < 0.001$; 図 4.3.4)。同様に、刺毛密度についても葉の両面ともに有意な集団間差があり、奈良公園 (防鹿柵)、桜井、高取の順に値が小さくなる傾向が認められた (表面、裏面両方ともに $P < 0.001$; 図 4.3.5)。刺毛長については表面、裏面両方ともに奈良公園 (防鹿柵) の値が他地点よりも有意に長かった (表面、裏面両方ともに $P < 0.001$; 図 4.3.6; 高取については表面の刺毛が無かったため、刺毛長のデータはない)。

草丈についても集団間差が認められ、高取の個体が他の 2 地点の個体よりも有意に長くなる傾向が認められた ($P < 0.001$; 図 4.3.7)。

4.3.2 栽培で得られた未被食個体の刺毛形質の集団間変異

各調査地から採取した果実由来のイラクサの葉面積には有意な集団間差が認められ、奈良公園（防鹿柵）、高取、桜井の順に葉面積が小さくなる傾向が認められた ($P < 0.05$; 図 4.3.8)。刺毛数についても集団間の差は有意であり、表面、裏面両方ともに奈良公園（防鹿柵）、桜井、高取の順に値が小さくなる傾向が認められた（表面、裏面両方ともに $P < 0.001$; 図 4.3.9）。同様に、刺毛密度についても葉の両面ともに有意な集団間差があり、奈良公園（防鹿柵）、桜井、高取の順に値が小さくなる傾向が認められた（表面、裏面両方ともに $P < 0.001$; 図 4.3.10）。刺毛長についても表面、裏面両方ともに刺毛数と同様の傾向が認められ、奈良公園（防鹿柵）、桜井、高取の順に値が小さくなる傾向が認められた（表面、裏面両方ともに $P < 0.001$; 図 4.3.11）。

草丈については、集団間の有意な差は認められなかった ($P > 0.05$; 図 4.3.12)。

4.3.3 刺毛形質における誘導防御の大きさの集団間変異

相対光量子束密度（RPPFD）は排除区の方が採食区よりも明るかった。排除区と採食区の相対光量子束密度はそれぞれ $16.3\% \pm 1.8\%$ と $12.1\% \pm 2.4\%$ （平均値±標準誤差）であり、その差は有意であった ($P < 0.05$)。土壌中の硝酸イオン濃度については排除区の方が採食区よりも低かった。排除区と採食区の硝酸イオン濃度はそれぞれ 6.9 Mol/g ($5.3\text{--}9.6 \text{ Mol/g}$) と 22.9 Mol/g ($19.4\text{--}27.1 \text{ Mol/g}$)（平均値、最小値—最大値）であり、排除区の値は採食区の値の 50%以下といえる。

葉面積については排除区の方が採食区よりも有意に大きかった（図 4.3.13 ; $P < 0.01$ ）。この形質についての切除の効果及び切除と場所の交互作用は有意でなかった。刺毛形質（刺毛数、刺毛密度、刺毛長）についてみると、全ての形質について葉の表面・裏面両方ともに排除区の個体の方が採食区の個体よりも有意に大きな値を示した（図 4.3.14 ; 表面の刺毛数 : $P < 0.01$ 、裏面の刺毛数 : $P < 0.05$ 、表面・裏面の刺毛密度 : $P < 0.001$ 、表面・裏面の刺毛長 : $P < 0.001$ ）。また、両調査区ともに、切除個体は対照個体よりも刺毛数が有意に多く（表面 : $P < 0.01$ 、裏面 : $P < 0.05$ ）、刺毛長も有意に長かった（表面・裏面 : $P < 0.001$ ）。一方、刺毛密度については切除の有意な効果

は認められなかった。

場所と切除の有意な交互作用は、表面の刺毛数と表面・裏面の刺毛長のみで認められた（図 4.3.14；表面の刺毛数： $P < 0.01$ 、表面・裏面の刺毛長： $P < 0.001$ ）。可塑性値についてみると、これらの3形質のうち2形質（表面の刺毛数と裏面の刺毛長）で排除区の方が採食区よりも有意に大きかった（図 4.3.15；表面の刺毛数： $P < 0.01$ 、裏面の刺毛長： $P < 0.01$ ）。交互作用と可塑性値についてのこれらの結果は、表面の刺毛数と裏面の刺毛長において、排除区の個体の方が採食区の個体よりも切除に対する応答の程度（すなわち、切除にともなう形質値の増加量）が大きいことを示している。

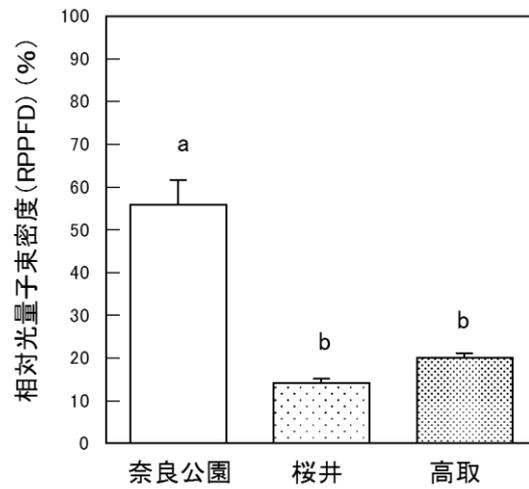


図 4.3.1 各調査地における相対光量子束密度

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内の光環境を表す。平均値（1地点あたり10測定値の平均値）と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

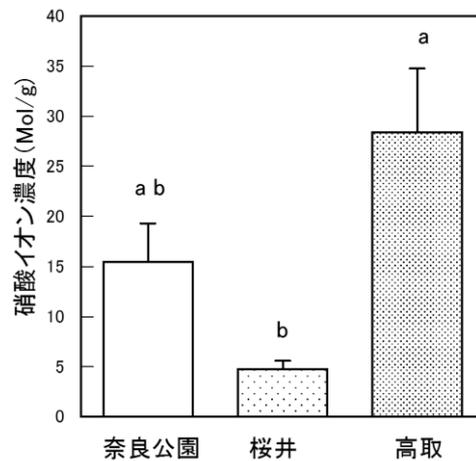


図 4.3.2 各調査地における土壌中の硝酸イオン濃度

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内の土壌環境を表す。平均値（1地点あたり5測定値の平均値）と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

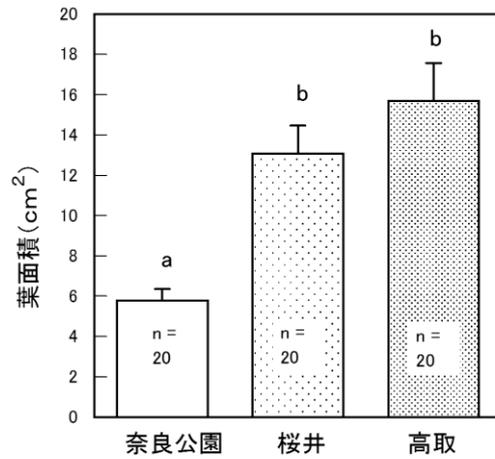


図 4.3.3 自然集団における未被食個体の葉面積

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内で生育する個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2 集団間で有意に異なることを示す (多重比較)。

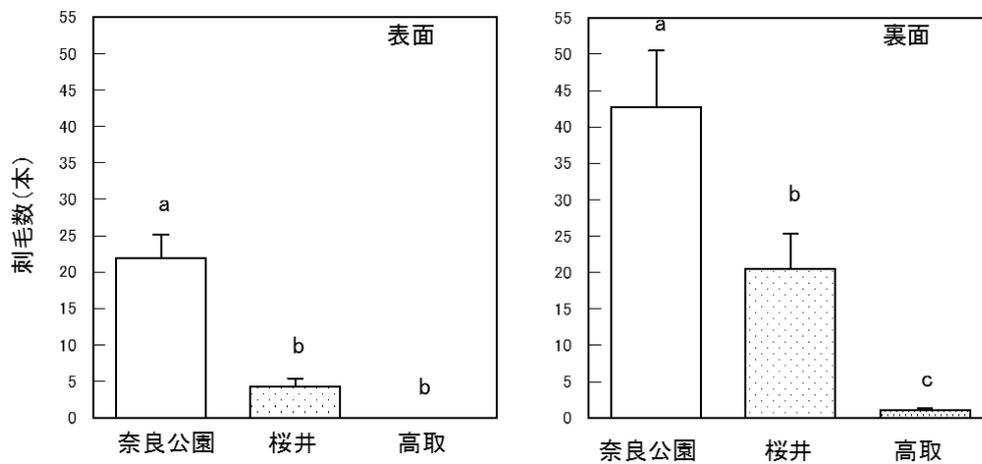


図 4.3.4 自然集団における未被食個体の刺毛数

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内で生育する個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2 集団間で有意に異なることを示す (多重比較)。

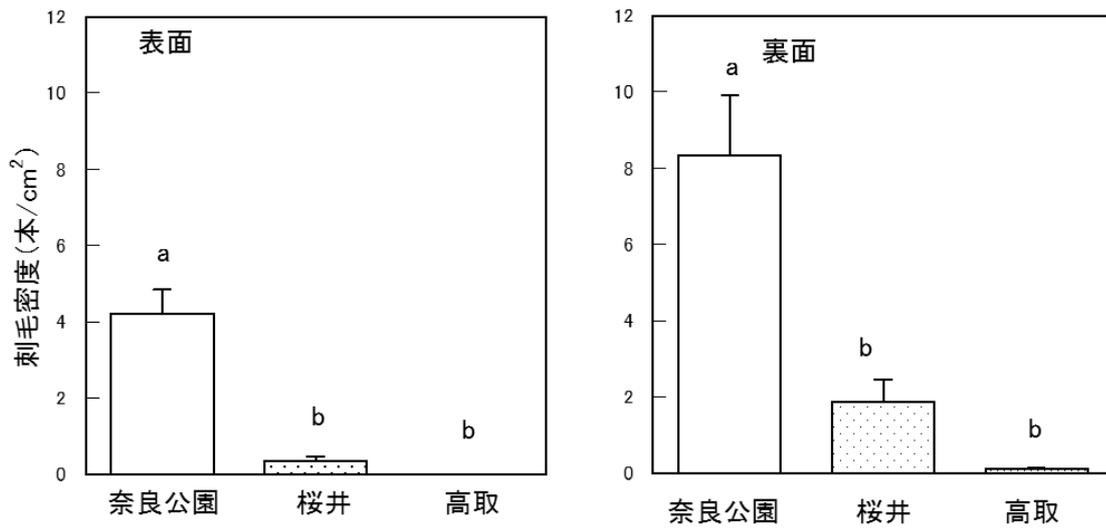


図 4.3.5 自然集団における未被食個体の刺毛密度

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内で生育する個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2 集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

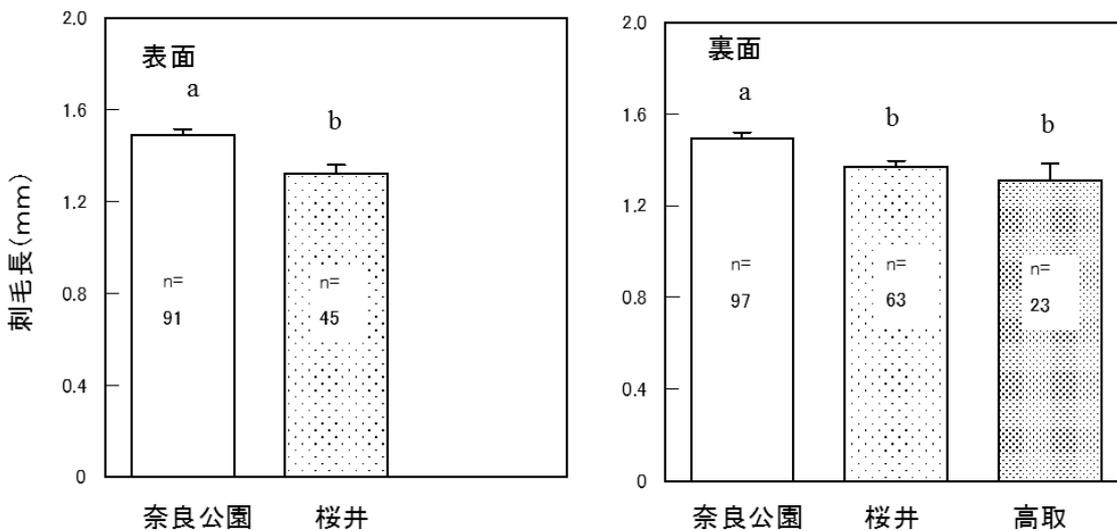


図 4.3.6 自然集団における未被食個体の刺毛長

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内で生育する個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2 集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

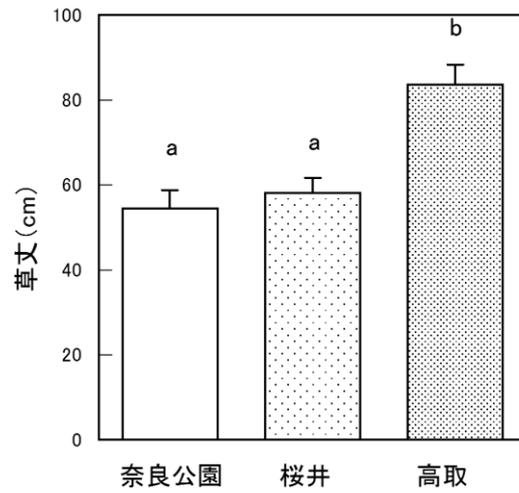


図 4.3.7 自然集団における未被食個体の草丈

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内で生育する個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2 集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

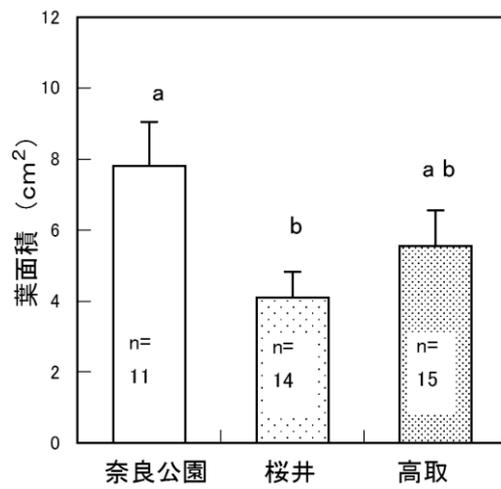


図 4.3.8 栽培個体の葉面積

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内の個体から採取した果実由来の子個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2 集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

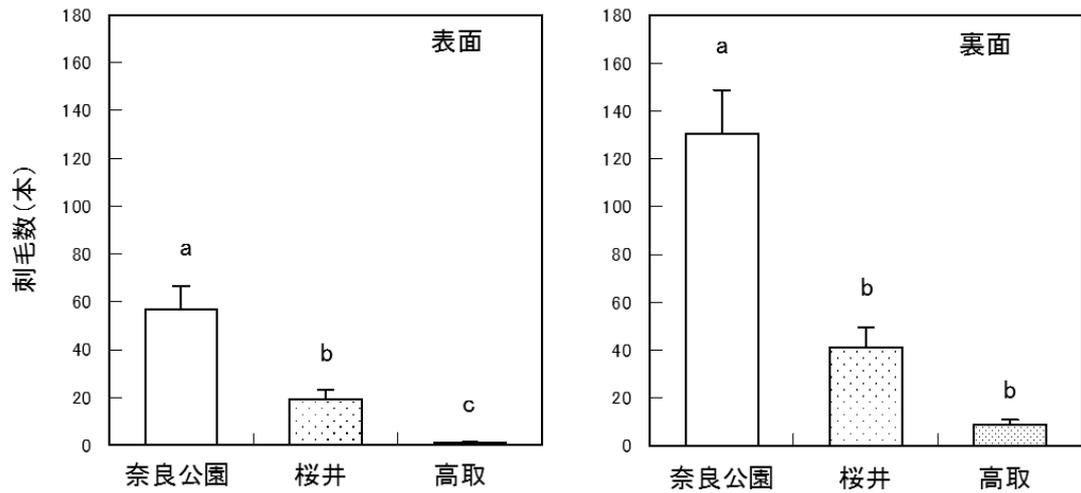


図 4.3.9 栽培個体の刺毛数

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内の個体から採取した果実由来の子個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

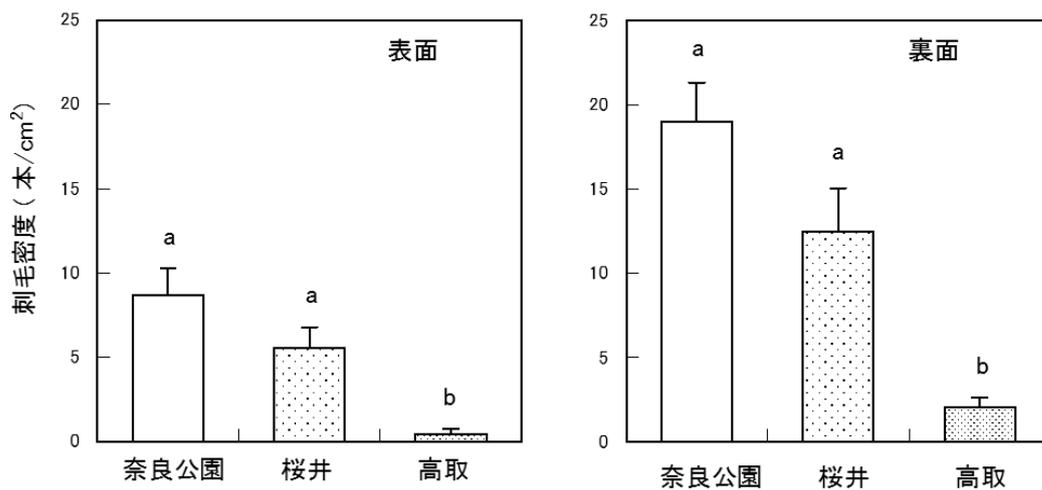


図 4.3.10 栽培個体の刺毛密度

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内の個体から採取した果実由来の子個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

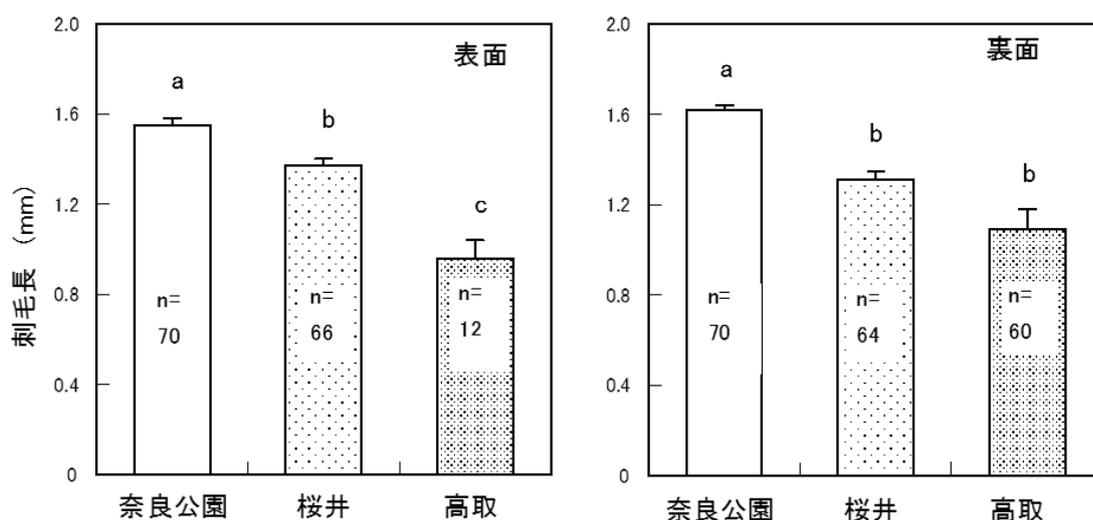


図 4.3.11 栽培個体の刺毛長

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内の個体から採取した果実由来の子個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

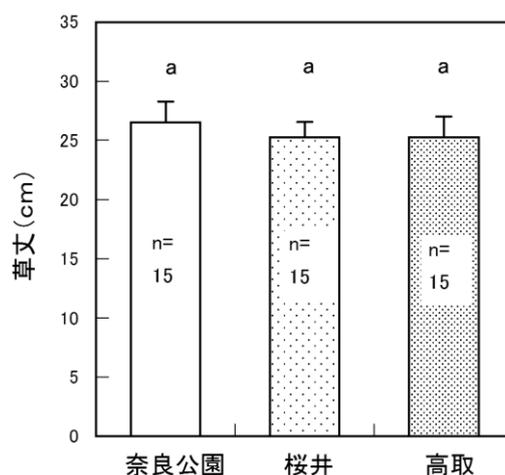


図 4.3.12 栽培個体の草丈

「奈良公園」は、奈良公園に設定した防鹿柵内の個体から採取した果実由来の子個体の値を表す。平均値と標準誤差を示す。同じアルファベットは、2集団間で有意に異なることを示す（多重比較）。

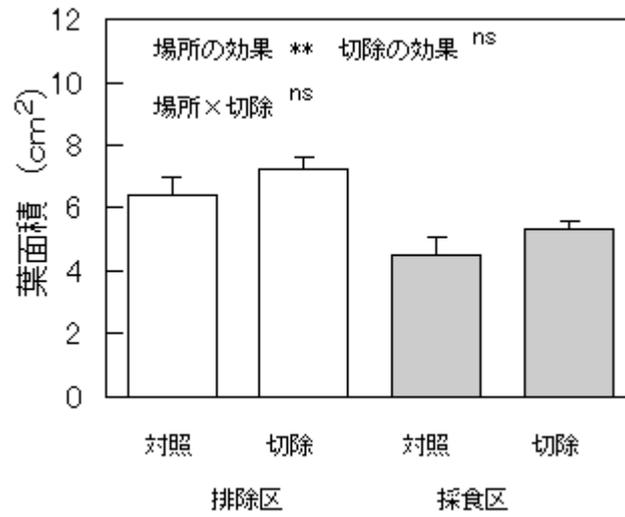


図 4.3.13 排除区と採食区におけるイラクサ実生の葉面積

平均値と標準誤差を示す。「対照」と「切除」はそれぞれ対照（無切除）個体と切除個体を表す。

図中の記号は場所の効果（集団間差）、切除の効果、場所と切除の交互作用についての有意確率を示す：* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、ns:有意差なし。

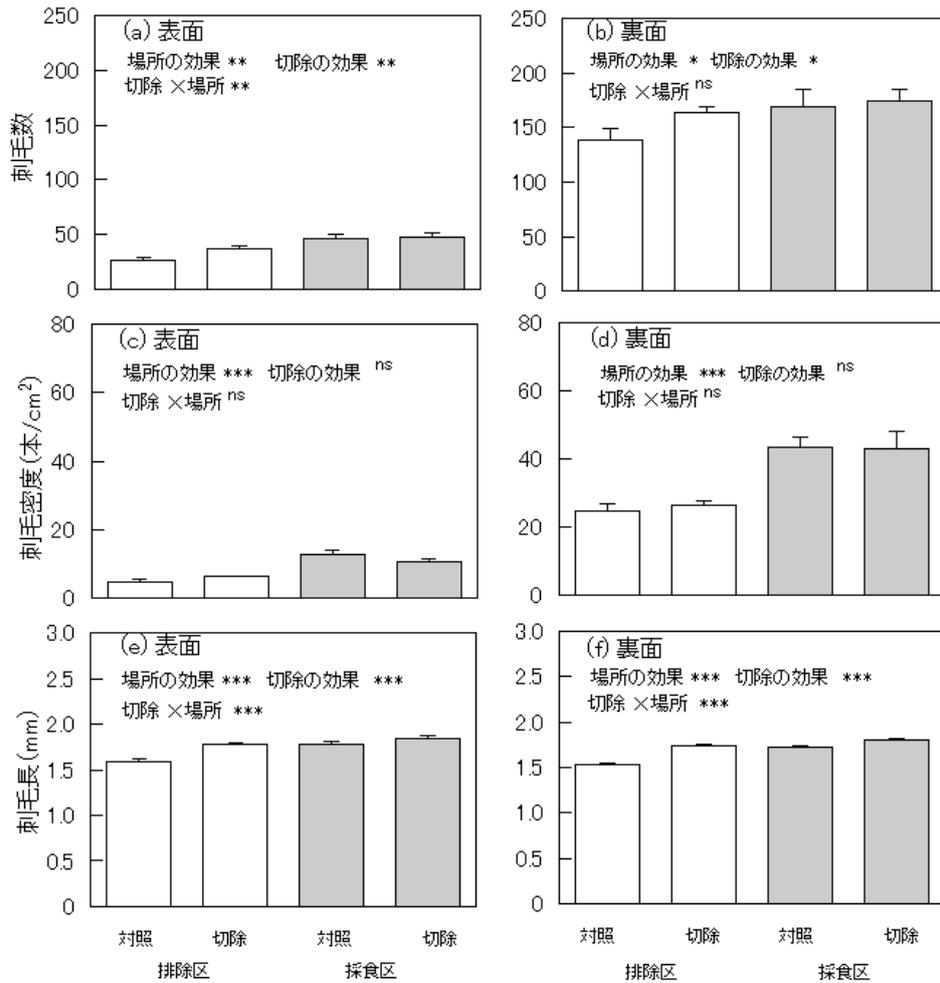


図 4.3.14 排除区と採食区におけるイラクサ実生の刺毛形質

葉の表面・裏面それぞれの刺毛数、刺毛密度、刺毛長についての平均値と標準誤差を示す。「対照」と「切除」はそれぞれ対照（無切除）個体と切除個体を表す。図中の記号は場所の効果（集団間差）、切除の効果、切除と場所の交互作用についての有意確率を示す： $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、ns:有意差なし。

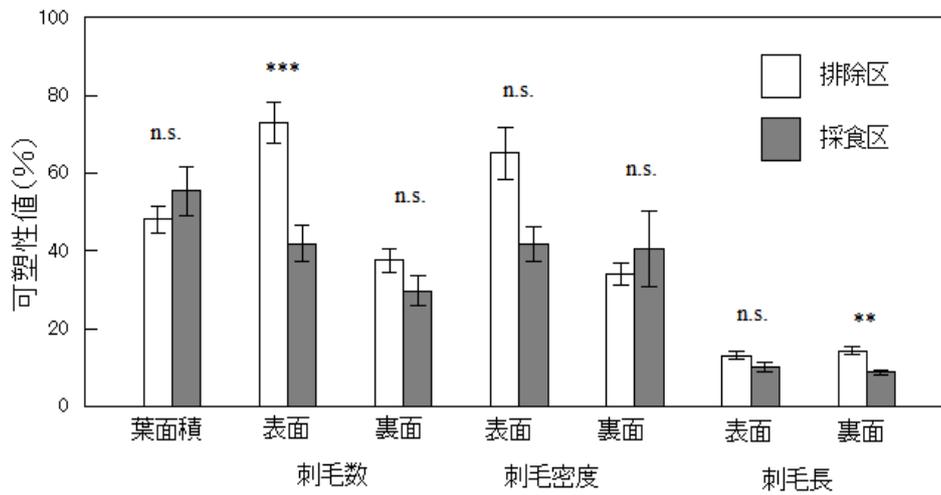


図 4.3.15 葉面積と刺毛形質の可塑性値

葉面積、表面・裏面それぞれの刺毛数、刺毛密度、刺毛長についての可塑性値の平均と標準誤差を示す。図中の記号は場所間の差(集団間差)についての有意確率を示す: * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ n.s.:有意差なし。

4.4 考察

4.4.1 未被食個体の刺毛形質の集団間変異

シカの採食圧（採食頻度と強度）が異なる3地域のイラクサ自然集団を対象とした未被食個体の刺毛形質の分析により、奈良公園（防鹿柵内の個体）、桜井、高取の順に刺毛形質値（葉の表面・裏面の刺毛数、刺毛密度、刺毛長）が小さくなる傾向が認められた。また、これらの3集団の果実を用いた栽培実験で得られた未被食個体についても同様の傾向が認められた。これらの結果は、これらの集団間で刺毛形質値が遺伝的に異なることを示している。奈良公園（防鹿柵の近隣）がシカの採食圧の高い場所である一方で（Shikata *et al.* 2013）、桜井・高取ではシカはほとんど見られないことから（加藤禎孝 未発表）、これらの結果は、未被食個体については、採食圧が高い奈良公園の方が、採食圧が低い2地域よりも大きな刺毛形質値を持つことを示している。以上の結果は、「未被食個体の防御形質値（すなわち、採食前の植物の防御の程度）は、生育地の被食の様式（頻度と強さ）によって遺伝的に異なる」とする本研究の予想に矛盾しないものといえる。

Kato *et al.* (2008)は、本研究で調査した3地点のうちの2地点（奈良公園と桜井）を含む4地域からイラクサの果実を採取して栽培実験を行い、刺毛形質を測定している。ただし、Kato *et al.* の栽培実験の刺毛形質の評価方法は、本研究の方法とは異なる。すなわち、本研究では、ヨーロッパ産イラクサ属 *U. dioica* を用いた先行研究（Pollard & Briggs 1982）と同様に、葉の表面と裏面それぞれの刺毛形質を調べて分析しているが、Kato *et al.* の栽培実験では表面と裏面の刺毛をこみにして刺毛形質を評価している（すなわち、「刺毛数」＝「表面刺毛数と裏面刺毛数の合計値」、「刺毛密度」＝刺毛数合計値/葉面積、「刺毛長」＝「任意に選んだ表面刺毛5本と裏面刺毛5本による10測定値の平均値」）。それにもかかわらず、Kato *et al.* の栽培実験では、奈良公園由来のイラクサの方が桜井由来のイラクサよりも大きな刺毛形質値（すなわち、刺毛数、刺毛密度、刺毛長が大）を示す傾向が認められており、本研究の結果と矛盾しない。ただし、Kato *et al.* の栽培実験では、刺毛長については、シカの生息密度が低い他地域（桜井以外の地域）と奈良公園との間では有意な差違が認められていない。

イラクサと同様に被食防御機能を持つ刺毛を形成する *U. dioica* についても、栽培実験によって刺毛密度の遺伝的変異が調べられており、未被食個体の刺毛密度に集団間で大きな遺伝的変異があること (Pollard & Briggs 1982)、さらに、大型草食獣による採食圧が低い場所の集団 (未被食個体) は採食圧が高い場所の集団に比べて低い刺毛密度を持つこと (Pollard & Briggs 1982, 1984) が明らかにされている。同様に、1年生集団と多年生集団の両方を含む草本 *Mimulus guttatus* では、昆虫による被食に対する防御形質とみなされているトライコーム (trichome) の密度に遺伝的な集団間変異があり、被食頻度の低い場所の集団は高い集団よりも低いトライコーム密度を示すことが栽培実験により明らかにされている (Holeski 2007)。以上の2種についての結果は、本研究で明らかにしたイラクサの未被食個体の刺毛形質の集団間変異についての傾向と類似しており、「未被食個体の防御形質値は、生育地の被食の様式 (頻度と強さ) によって遺伝的に異なる」とする本研究で示した予想に合致しているといえる。

4.4.2 刺毛形質における誘導防御の大きさの集団間変異

シカによる採食圧が異なるイラクサ2集団の当年生実生を用いた生息地内での茎頂切除実験により、イラクサの実生は茎頂を切除されると、その後に形成されるシュートに付く葉の刺毛数と刺毛長が増加すること、その一方で葉面積と刺毛密度は増加しないことが明らかとなった。この結果は、2年間にわたる茎頂切除実験 (2章) で認められた刺毛数と刺毛長についての応答の傾向、すなわち、対照 (無切除) < 1回切除 (1年目のみ切除) < 2回切除 (2年連続切除) の順に両形質値が増加する傾向と矛盾しない。さらに、本茎頂切除実験により、シカによって高頻度に絶え間なく被食される採食区の集団は、低頻度で断続的に被食される排除区の集団よりも、葉の表面の刺毛数と裏面の刺毛長に見られる誘導防御の程度 (すなわち、切除にともなう形質値の増加量) が小さいことが明らかとなった。この結果は、これらの刺毛形質における誘導防御の大きさは、シカによる採食頻度との間に負の相関を示すことを意味している。

集団間で誘導防御の大きさが異なるという本茎頂切除実験の結果は、低頻度で断続的に採食される集団は、高頻度で恒常的に採食される集団よりも大きな誘導防御を示すという本研究で示し

た予想と矛盾しない。今回観察された誘導防御の大きさについての集団間変異は、採食圧の場所間の差違に対応した局所的な適応進化の結果として生じる遺伝的分化として説明できるかもしれない。ただし、この見方の妥当性を検討するためには、遺伝的な差違を評価するための栽培実験を行う必要がある。さらに、高頻度に絶え間なく被食される採食区では、3章で示した継代防御誘導が当年生実生の刺毛形質に影響している可能性がある。そのような継代防御誘導が刺毛形質に現れる誘導防御の大きさに影響しているのかどうかについても今後検討する必要がある。

非生物学的ストレスは、最適な表現型の発現を制限することによって表現型可塑性の大きさを減少させることがある (Valladares *et al.* 2007)。したがって、本研究で測定された採食区における低い光強度は、ストレスを介して採食区のイラクサ実生の誘導反応の大きさを減少させるかもしれない。しかしながら、採食区の実生は対照個体・切除個体両方ともに排除区の実生よりも長い刺毛を多く形成していたことから、採食区的光強度は刺毛形成を制限していないと考えられる。つまり、採食区的光環境がストレスを介して刺毛形質における誘導防御の大きさを減少させている可能性は小さいといえる。さらに、本研究では採食区の土壌中の硝酸イオン濃度が排除区の値より高いことも示された。奈良公園内での生育環境とイラクサの刺毛形質との関係を分析した先行研究 (Shikata *et al.* 2013) によると、ハビタット間で硝酸濃度の大きな変異があるにも関わらず、奈良公園内のイラクサ集団については、刺毛数や刺毛密度と土壌中の硝酸濃度との間に相関が認められていない。このことから、硝酸イオン濃度の場所間変異が誘導防御の大きさの集団間変異をもたらす可能性は低いといえる。

植物は、しばしば損傷の後に補償成長を示す (Strauss & Agrawal 1999, Gavloski & Lamb 2000)。採食されたイラクサにおいても、損傷後に現れる補償成長が刺毛形成に配分する資源を増大させるかもしれない。しかしながら、排除区で行われた予備実験では、切除後の草丈や茎、根の現存量に有意な違いは認められなかった (加藤禎孝、未発表データ)。この予備実験の結果は、排除区の大いなる誘導防御が補償成長によるものではないことを示唆している。

4.5 まとめ

シカの採食圧が異なる3地域のイラクサ自然集団を対象とした未被食個体の刺毛形質の分析を行い、奈良公園（防鹿柵内の個体）、桜井、高取の順に刺毛形質値（刺毛数、刺毛密度、刺毛長）が小さくなることを明らかにした。これらの3集団の果実を用いた栽培実験でも同様の傾向が認められた。これらの結果は、これらの集団間で刺毛形質値が遺伝的に異なっていることを示している。また、未被食個体については、採食圧が高い奈良公園の方が、採食圧が低い2地域よりも大きな刺毛形質値を持つといえる。以上の結果は、「未被食個体の防御形質値（被食前の防御の程度）は、生育地の採食体制によって遺伝的に異なる」とする本研究の予想に矛盾しない。さらに、奈良公園において採食圧が異なるイラクサ2集団を対象にして自然条件下で生育する当年生実生を用いた茎頂切除実験を行った結果、シカによって高頻度に絶え間なく被食される場所（採食区）の集団は、低頻度で断続的に被食される場所（排除区）の集団よりも、葉の表面の刺毛数と裏面の刺毛長に見られる誘導防御の程度が小さいことが明らかとなった。この結果は、低頻度で断続的に採食される集団は、高頻度で恒常的に採食される集団よりも大きな誘導防御を示すという本研究で示した予想と矛盾しない。本研究で明らかにした誘導防御の大きさの集団間変異は、採食圧の場所間の差違に対応した局所的な適応進化の結果として生じた可能性がある。

第5章 総合考察

5.1 刺毛形質における誘導防御と時間的变化及びその適応的意義

本研究では、イラクサを対象として2年間にわたる茎頂切除実験を行い、切除によってイラクサの葉面にある刺毛の数と長さが増加することを明らかにした（表 2.3.1、図 2.3.3、図 2.3.4、図 2.3.5、図 2.3.9、図 2.3.10、図 2.3.11）。この傾向は実験2年目の夏の葉の裏面の刺毛数と刺毛長で顕著であり、切除回数が多くなるほど刺毛数と刺毛長が増加する傾向が認められた。この結果は、イラクサの刺毛数と刺毛長は、茎頂切除に応答して増加するという表現型可塑性を示すこと、また、その可塑性の程度が前年の茎頂切除の影響を受けることを示している。

イラクサ属の刺毛形質の表現型可塑性はヨーロッパ産イラクサ属 *Urtica dioica* で調べられており、シュート切除後に刺毛密度が増加することが示されている（Pullin & Gilbert 1989）。一方、イラクサ属の刺毛長が被食に応じて表現型可塑性を示すという報告はこれまでなく、本研究が最初の報告事例といえる。物理的防御に関わる突起状構造物であるトライコームについても、その長さが被食に応じて表現型可塑性を示すという研究事例はない。一方、広葉樹アカシア *Acacia drepanolobium* と灌木アリドオシ *Dammacanthus indicus* の刺については、草食動物による被食後に形成された刺が長くなる傾向が認められている（Young *et al.* 2003、Takada *et al.* 2001）。

イラクサ属の刺毛は草食動物に対して防御機能を持つ（Pollard & Briggs 1984）。例えば、刺毛数の異なる2系統のイラクサを植栽してシカによる被食頻度を比較した野外実験によると、刺毛が多いイラクサは少ないイラクサよりも被食されにくいことが示されている（Kato *et al.* 2008）。このことから、本茎頂切除実験で認められた2年目夏における裏面の刺毛数と切除回数との間の正の相関は、前年の被食によって誘導防御の程度が増加したことを示すと考えられる。また、イラクサの刺毛が内部に毒液を貯めること（Lenggenhager 1974、Fu *et al.* 2006）、さらに、刺毛の長さや直径との間に正の相関があること（すなわち、刺毛長と毒液量との間に正の相関があると推定される；加藤禎孝 未発表データ）から、本茎頂切除実験で認められた2年目夏における裏面の刺毛長と切除回数との間の正の相関も、イラクサの誘導防御の程度が前年の被食によって増加す

ることを示唆している。以上のように、イラクサの刺毛による誘導防御は、少なくとも翌年まで維持され、切除が繰り返される場合には、誘導防御の程度があたかも累積していくように増加するといえる。本茎頂切除実験で見出された被食頻度と誘導防御の程度との正の相関は、化学的誘導防御に関わるフェノール化合物などの二次代謝物で認められているが (Tuomi *et al.* 1990、Kamata *et al.* 1996)、物理的防御に関わるトライコームや刺に現れる誘導防御を調べた先行研究のなかでは見当たらず、最初の報告事例といえる。

初回の被食の後では大きな誘導防御を示さないにもかかわらず、複数回の被食の後に大きな誘導防御を示す事例がいくつかの植物の化学的誘導防御で報告されている (Engelberth *et al.* 2004, Heil & Silva Bueno 2007)。このような現象は *priming* と呼ばれ、誘導防御にかかるコストを抑制するという適応的意義を持つ性質と考えられている (Karban 2011)。本茎頂切除実験で誘導防御が認められたイラクサの刺毛数と刺毛長については、1年目 (1回目) から大きな誘導防御が現れる (刺毛数)、もしくは明瞭な年度間変化 (夏の形質値における年度間変化) が認められない (刺毛長) ことから、*priming* には相当しないと考えられる。

誘導防御は、採食される危険度が高い環境や時期においてのみ防御形質に多く配分することを可能にすることから、防御形質にコストがかかる (防御形質の発現によって成長量や繁殖量が減する) 場合に進化すると考えられている (Clark & Harvell 1992, Tollrian & Harvell 1999, Karban 2011)。すなわち、誘導防御は、採食圧が時空間的に変動する環境下において防御にかかるコストを減らすという適応的な意義を持つと考えられる。本茎頂切除実験で認められたイラクサの刺毛形質における誘導防御は、高い防御力 (多い刺毛数と長い刺毛長) の発現を食植者に採食される危険度が高い環境・時期に限定することから、刺毛形成と刺毛中の毒液の生成にコストがかかるならば、そのような誘導防御は適応度を上げることに貢献すると考えられる。さらに、採食圧が高い環境ほど被食回避に大きな防御力が必要となるならば、年度をまたぐシュートの損傷の繰り返しによって誘導防御の程度が増加するというイラクサの性質 (すなわち、刺毛数・刺毛長と茎頂切除の回数との間の正の相関) も、防御にかかるコストを抑えることに貢献するかもしれない。イラクサについては、刺毛の主成分がケイ酸質とカルシウムであること (Harberland 1886, Thurston 1969)、

また、刺毛中の毒液の主成分がヒスタミン、酒石酸、シュウ酸であること (Fu *et al.* 2006) から、刺毛形成にコストがかかる可能性が高い。実際に、ヨーロッパ産イラクサ属 *Urtica dioica* では刺毛形成にコストがかかることが示唆されている (Mutikainen & Walls 1995)。Mutikainen & Walls が行った研究では、*U. dioica* の亜種間において刺毛形質値と繁殖量との間に負の相関が認められており、この負の相関が刺毛形成にかかるコストを表していると考えられている。一方、本切除実験では、茎頂が切除されると個葉面積の増加と誘導防御（刺毛数と刺毛長の増加）が認められたが、茎頂切除個体における成長量（総葉重・茎重・根重）の減少は当年生実生、2年生実生ともに認められなかった。このように、イラクサの誘導防御に負の影響が認められなかったことは、茎頂切除にともなう個葉面積の増大によって光合成生産が増加し、その結果として刺毛数と刺毛長の増加によって生じるコストが相殺された可能性を示唆している。草食動物による被食後に光合成生産が増加し、その結果として器官重や成長量が増加するという現象は「補償成長」と呼ばれている (Gavloski & Lamb 2000)。イラクサで補償成長が実際に起こっているのか、また、補償成長が起こっているとすれば、刺毛形成にかかるコストを削減できる程度に光合成生産が増加しているのかどうかについては、栽培個体を用いた切除実験による評価が必要である。

本茎頂切除実験では、イラクサの刺毛形質に現れる誘導防御の時間的変化も認められた。特に、2年連続して切除されたイラクサの刺毛長が明瞭に変化しない一方で、シュートが切除されなかったイラクサの刺毛長（裏面の刺毛長）は翌年に短くなる傾向が認められた。このことは、イラクサの刺毛は、毎年連続してシュートが採食されると長い状態が維持されること、その一方で、採食されないと刺毛が次第に短くなることを示している。他の多年生植物についても、食害などで現れた誘導防御が翌年以降も維持されるが、引き続き食害がない場合には誘導防御が緩やかに減少し、やがて消失するという現象が観察されている。例えば、草食動物による採食圧が高い場所に生育している樹木 *Acacia drepanolobium* では、採食から解放されると5年間で刺が35~40%短くなる (Young *et al.* 2003)。以上のような「誘導防御の緩やかな減少」は、シュートの損傷によって現れる誘導防御と同様に、被食の危険度が低い環境や時期において刺毛形成にかかるコストを減らすことに貢献していると考えられる。

本茎頂切除実験では、イラクサの刺毛形質のうち、刺毛数と刺毛長に季節変化が認められ、当年生実生では春から夏へと形質値が増加する傾向が認められた。当年生実生の刺毛形質のこのような季節変化は、発芽後の栄養器官の成長に伴って刺毛に投資する栄養塩や同化産物の量が増加した可能性を示唆している。イラクサは発芽後急速に成長し、成長が良好であれば発芽当年に開花し結実する（加藤慎孝、未発表）。このため、発芽直後のイラクサ実生は、刺毛への栄養塩や同化産物の配分を抑制して葉や根に配分する量を多くし、光合成生産を増加させることによって適応度を高めているかもしれない。また、発芽直後のイラクサ実生はサイズが小さいため（最初の本葉の葉身長は3~4mm）、裸地でない限り目立たず、シカなどの草食動物による被食の危険度は低いと考えられる。このことも当年生実生の刺毛形質の季節変化に関係している可能性がある。以上のような防御形質の季節変化を調べた先行研究は少ない。例えば、6~9月の葉の裏面の刺毛密度の季節変化を調べたヨーロッパ産イラクサ属 *U. dioica* についての先行研究では、6月の刺毛密度が最も高く、その後も8月までは刺毛密度が維持されるか、もしくは季節の進行とともに低下していくことが示されている（Pollard 1992；刺毛密度が維持されるかどうかは集団によって異なる）。一方、本茎頂切除実験で認められた刺毛形質の季節変化の傾向は当年生実生と2年生実生で異なっていた。2年生実生では、当年生実生と同様に季節の進行とともに増加する場合（表面の刺毛密度と刺毛長）と、当年生実生の傾向とは逆の傾向を示す、すなわち季節の進行とともに減少する場合（表・裏両面の刺毛数）の両方が認められた。刺毛形質の季節変化が当年生実生と2年生実生で異なることには、春における2年生実生の貯蔵物質（前年の光合成による同化産物）の利用が関係している可能性がある。

5.2 親植物における被食が子植物の刺毛形質に及ぼす影響及びその適応的意義

本研究では、茎頂を切除したイラクサから得られた子植物を用いた栽培実験を行い、親世代における茎頂切除が子世代の葉面積と刺毛長に影響することを明らかにした（図 3.2.7、図 3.2.10）。特に、葉の裏面の刺毛長について、親植物における切除回数と子植物の形質値との間に正の相関があることを明らかにした。前節で述べたように、茎頂が切除されたイラクサの刺毛は誘導防御

の結果として長くなることから、親世代における切除回数と子世代の刺毛長との間の正の相関は、親植物において発現した誘導防御が子植物に伝達されたことを示している。イラクサの親世代における誘導防御が子世代の刺毛形質に影響するという現象は、他のイラクサ属では報告されておらず、本研究が最初の報告事例といえる。

親植物に現れた誘導防御が子に伝達される現象は「継代防衛誘導」と呼ばれており (Holeski *et al.* 2012、田中 2017)、突起状構造物については1～2年生草本セイヨウノダイコン *Raphanus raphanistrum* や多年生草本セイタカミゾホオズキ *Mimulus guttatus* のトライコームにおいてこの現象が認められている (Agrawal *et al.* 1999、Holeski *et al.* 2007)。親植物において発現した誘導防御が子に伝達されるメカニズムとしては、世代間エピジェネティック遺伝が知られている (Scoville *et al.* 2011)。Scoville *et al.* は、セイタカミゾホオズキ *M. guttatus* において親植物の葉が損傷すると子植物のトライコームが増加する現象の原因が MYB transcription factor のメチル化であり、この現象が厳密に世代間エピジェネティック遺伝に該当することを明らかにしている。一方、セイヨウノダイコンで認められた継代防衛誘導の事例 (Agrawal *et al.* 1999) については、誘導防御に関わる化学物質あるいはホルモンが母植物から種子に配分されることによって生じた可能性が示唆されている (Herman & Sultan 2011)。さらに、いくつかの植物では、果皮の変化によって種子の発芽特性が変化するという性質が知られており (Venable & Levin 1985、Silvertown & Charlesworth 2001)、この性質も親植物におけるシュートの損傷と子植物の形質との関係に関与しているかもしれない。例えば、親植物が食害されることによって果実の形態が変化し、なおかつ、その変化が種子の発芽時期や実生の成長に影響するならば、親植物の誘導防御と子植物の刺毛形質との間に見かけ上の正の相関が生じる可能性がある。本研究で認められた親植物における茎頂切除と子植物の刺毛形質との関係が、世代間エピジェネティック遺伝によるものなのか、それとも他のメカニズムによるものなのかは今後の検討課題である。

親世代における誘導防御が子世代に伝達されることにはどのような適応的意義があるのだろうか。継代防衛誘導が生物の適応進化に及ぼす影響に注目したいくつかの研究では、親植物と子植物で生育環境条件が相関するならば、親植物から子植物へと誘導防御が伝達されることによって

子植物の適応度が上がり、その結果として親植物の適応度も増加するという適応的意義があることが指摘されている (Herman & Sultan 2011、Holeski *et al.* 2012)。イラクサについても、刺毛による防御効果が認められているシカについては個体密度が大きく年変動しないため (奈良公園とその近隣での調査事例；立澤 2011)、親植物と子植物に対する採食圧が相関すると考えられる。このことから、イラクサで認められた継代防衛誘導についてもその適応的意義は大きい可能性がある。特に、発芽後の短い期間に食害される危険性がある環境下では、以下の点で、継代防衛誘導は当年生実生の生存率を高めることに貢献する可能性が高い。例えば、採食圧の高い奈良公園 (採食区) のような環境では、イラクサは春から被食される危険に曝されている (Kato *et al.* 2008)。このような環境下では当年生実生も春の発芽直後から食害される危険性が高いが、春に発芽したばかりの実生は被食頻度に関わる情報を自分自身で得ることができないため、通常の誘導防御 (すなわち、被食後に形成された葉における刺毛形質の変化) では夏以降にならないと防御力を高めることができない。ところが、このような状況であっても、継代防衛誘導が生じている場合であれば、採食された親植物の子植物は高い防御力を持つため、結果として採食される確率を下げることができると考えられる。一方、親世代が採食されない場所では継代防衛誘導も生じないため、子世代での刺毛形成にかかるコストが抑えられ、結果として子植物は多くの同化産物と栄養塩類を成長に配分できるであろう。以上のように、継代防衛誘導はイラクサの実生とその親の適応度を高めることに貢献すると考えられる。本研究では、親世代での茎頂切除が子世代において長い刺毛を誘導することを示し、その適応的意義について検討したが、子世代における誘導防御の程度 (刺毛形質におけるシュート損傷に対する応答の程度) についても親世代の茎頂切除が影響しているのかどうかを今後明らかにする必要がある。

本研究では、親世代におけるシカによる被食が子世代の刺毛形質に影響することも明らかにした (図 3.2.5~3.2.10)。すなわち、シカによる採食圧が高い場所に設定した防鹿柵の内外に生育する親植物の果実を用いた栽培実験を行い、親植物に対する採食圧が高い場所 (防鹿柵外) の方が低い場所 (防鹿柵内) よりも子植物の刺毛形質値 (裏面の刺毛数と表面の刺毛長) が大きくなる傾向を明らかにした。このような親世代における採食圧と子世代の刺毛形質との関係は、継代防

衛誘導が生じた可能性を示唆している。この結果は、茎頂を切除したイラクサの子植物を用いた栽培実験の結果と矛盾しないといえる。ただし、親植物の生育場所間（柵内と柵外）の環境条件の違いが果実のサイズや形態に影響し、その結果として子植物の刺毛形質に差が生じた可能性もある。本実験で認められた傾向が継代防衛誘導によるものなのかどうかについては今後の検討が必要である。

5.3 刺毛形質とその誘導防御の集団間変異

本研究では、誘導防御の進化についての理論（Clark & Harvell 1992、Tollrian & Harvell 1999、Karban 2011）に基づいて「未被食個体の防御の程度（恒常的に発現している防御の程度）は、各生育地での採食体制によって遺伝的に異なり、低頻度で不規則に採食される場所の方が高頻度で絶え間なく採食される場所よりも小さい」と予想した（4.1 節）。この予想を検証するため、シカの生息密度が異なる3地域のイラクサ自然集団を対象に、自然条件下で生育している未被食個体及び採取した果実由来の栽培個体の刺毛形質を測定し、これらの自然集団がこの予想と矛盾しない傾向を示すことを明らかにした（4.3 節、4.4 節）。すなわち、自然条件下で生育する未被食個体と栽培個体の両方ともに、採食圧が高い地域の集団の方が、採食圧が低い地域の集団よりも大きな刺毛形質値（葉の表面・裏面の刺毛数、刺毛密度、刺毛長）を持つことを明らかにした（図 4.3.4～6、図 4.3.9～11）。植物の刺毛形質の集団間変異を調べた先行研究についてみると、ヨーロッパ産イラクサ属 *U. dioica* を用いた栽培実験において、大型草食獣による採食圧が低い場所の集団は、採食圧が高い場所の集団に比べて低い刺毛密度を示すことが示されている（Pollard & Briggs 1982, 1984）。同様に、セイタカミゾホオズキ *Mimulus guttatus* を用いた栽培実験でも、被食頻度が低い集団は、高い集団よりも葉におけるトライコームの密度が低いことが示されている（Holeski 2007）。これらの結果も以上の予想と矛盾しない。

本研究では、誘導防御の大きさ（シュート損傷後の防御形質値の変化量）の集団間変異についても予想を立てた。すなわち、誘導防御の進化についての理論（Clark & Harvell 1992、Tollrian & Harvell 1999、Karban 2011）に基づいて「誘導防御の大きさは、生育地での採食体制によって遺伝

的に異なり、低頻度で不規則に採食される集団の値は、高頻度で絶え間なく採食される集団の値よりも大きい」という予想を設定した。この予想を検証するため、シカの採食圧が異なるイラクサ2集団を対象に、自然条件下で生育する未被食の当年生実生を用いた茎頂切除実験を行い、高頻度に採食される集団は、低頻度で不規則に採食される集団よりも、いくつかの刺毛形質（表面の刺毛数と裏面の刺毛長）に見られる誘導防御の程度が小さいことを明らかにした（図 4.3.14、図 4.3.15）。この結果は以上の予想と矛盾せず、各生育場所での採食体制に最適な誘導防御が集団ごとに進化したことを示唆している。ただし、本研究で明らかにした集団間の差違が、遺伝的変異を反映しているのかどうかについては未解明である。以上の予想を検証するためには、誘導防御の程度の遺伝的な変異を評価するための栽培実験が必要である。

他植物では、同一種内で採食圧と誘導防御の大きさとの関係を調べた事例は僅かしかない。例えば、ヨーロッパ産イラクサ属 *U. dioica* を用いて刺毛密度に現れる誘導防御を調べた Mutikainen & Walls (1995) は、植食者の違い（鱗翅目の幼虫とトナカイ）が、誘導反応における遺伝的な集団間変異をもたらした可能性を示唆している。一方、2年生草本 *Pastinaca sativa* の集団を対象にフラノクマリンに関わる誘導反応を調べた研究では、採食圧と誘導防御の大きさとの間の関係は認められていない (Zangerl & Berenbaum 1990)。また、草本 *Mimulus guttatus* については、昆虫による採食圧が異なる2集団の間でトライコーム密度に現れる誘導防御（葉の損傷に対する応答）の大きさが比較されている (Holeski 2007)。この研究では、本研究の予想とは逆に、採食圧の低い集団由来の個体の方が採食圧の高い集団由来の個体よりも小さな誘導防御を示すことが見出されている。ただし、この研究に供された2集団は採食圧のみならず生活史も異なっており、被食によって生じる自然選択の様式や作用についても集団間で異なる可能性がある。

誘導防御の大きさと採食頻度との関係について示した本研究の予想は、「(1) 被食のリスクが予測できない場合で、なおかつ (2) 植食者が存在する時に防御形質が適応度を増加させる一方で、植食者がいない時には逆にその形質がコストをもたらす場合には、恒常的防御よりも誘導防御の方が有利になる」という理論 (Tollrian & Harvell 1999) に基づいている。したがって、ヨーロッパ産イラクサ属2種において刺毛形成にコストがかかる（繁殖量が減少する）こと (Mutikainen

& Walls 1995) が示されているように、イラクサの実生に見られる長い刺毛についてもその形成にコストがかかるならば、そのようなコストがかかる環境下では誘導防御の程度が大きい個体が有利になると考えられる。この予想に従えば、断続的または僅かしか採食されないハビタットにおいては、長い刺毛を形成し、なおかつ表現型可塑性の小さいイラクサ実生は排除されるといえる。一方、長い刺毛が短い刺毛よりも大きな防御力を持つと仮定すれば、高頻度で恒常的に採食されるハビタットにおいては、長い刺毛を形成し、なおかつ表現型可塑性の小さい実生が誘導防御を示す実生よりも有利になると考えられる。

本研究では、イラクサの親植物の刺毛長において発現した誘導防御がなんらかのメカニズムにより子植物に伝達されることを示した(3章)。このような「継代防衛誘導」もイラクサの刺毛形質の集団間変異をもたらしているかもしれない。すなわち、採食された親植物の子植物の刺毛長が継代防衛誘導によって長くなるならば、高頻度で恒常的に採食される場所においては未被食の実生の刺毛長が長くなり、その結果として刺毛長に現れる誘導防御の大きさが減少する可能性がある。今後、イラクサの刺毛形質の誘導防御の大きさに認められる集団間変異が継代防衛誘導によってどの程度説明できるのかを検討する必要がある。

以上のように、本研究では、低頻度で断続的な被食を経験したイラクサ集団は、高頻度で恒常的な被食を経験した集団に比べて小さな形質値と大きな誘導防御を示すことを明らかにした。この結果は、採食体制と誘導防御の大きさとの間の進化的関係についての予想と一致している。また、誘導防御の大きさについてのこのような集団間変異は、採食体制に対して局所的に適応進化することによって生じた遺伝的変異を反映している可能性がある。継代防衛誘導も、恒常的な被食を経験した集団において誘導防御の程度が減少することに関与しているかもしれない。植物の誘導防御における集団間変異をもたらす至近要因と究極要因についての理解を深化させるため、更なる研究が必要である。

第6章 結論

多年生草本イラクサの実生を用いた茎頂切除実験により、春に茎頂が切除された個体において切除後に形成された葉の裏面の刺毛数と刺毛長が増加することを明らかにした。刺毛形質に見られるこのような表現型可塑性は誘導防御とみなすことができる。この誘導防御は少なくとも翌年まで維持され、切除が繰り返される場合には誘導防御の程度が累積していくように増加する傾向が認められた。このような年度をまたぐ誘導防御は、採食圧が時空間的に変動する環境下において効率良く防御力を高めるという適応的な意義を持つと考えられる。さらに、夏の刺毛長には年度間変化も認められ、損傷を受けないシュートでは刺毛が経年的に短くなることを明らかにした。長い刺毛が維持されるためには毎年連続してシュートが損傷を受ける必要があるといえる。このような年度をまたぐ刺毛長の減少は、被食頻度が低い環境下で刺毛形成にかかるコストを減らすことに貢献すると考えられる。

茎頂を切除したイラクサから得られた子植物を用いた栽培実験により、親植物での切除回数と子植物の葉の裏面の刺毛長との間に正の相関があることを明らかにした。この結果は、シュートが損傷したイラクサの刺毛形質に継代防衛誘導が生じること、すなわち、親世代において現れた誘導防御が世代間エピジェネティック遺伝などのメカニズムによって子世代に伝達されたことを示している。イラクサでは親植物と子植物で採食圧が相関する可能性が高いことから、継代防衛誘導は子植物の生存率を高める可能性が高い。特に、採食圧が高い場所では、採食された親植物の子は継代防衛誘導によって発芽後速やかに高い防御力を持つことが可能となるため、その適応的意義は大きいといえる。さらに、シカによる採食圧が高い場所に設置した防鹿柵内と柵外に生育するイラクサから得られた果実を用いた栽培実験を行い、夏の葉の裏面の刺毛数と表・裏両面の刺毛長について、柵内よりも柵外由来の子植物の方が大きな値を示すことも明らかにした。この結果も、シカによる被食によってこれらの刺毛形質に継代防衛誘導が現れることを示唆している。

シカの個体密度が異なる3地域のイラクサ集団を対象に、自然条件下と温室で未被食個体の刺毛形質を分析し、シカの個体密度が高い地域の集団の方が、低い地域の集団よりも大きな刺毛形

質値を持つことを明らかにした。この結果は、「未被食個体の防御形質値は、その生育地の採食体制に対する適応進化によって遺伝的に異なる」とする理論的予想と矛盾しない。さらに、シカの採食頻度が異なる2集団の当年生実生を対象に野外で茎頂切除実験を行い、高頻度に絶え間なく被食される場所の実生は、低頻度で断続的に被食される場所の実生よりも葉の表面の刺毛数と裏面の刺毛長に見られる誘導防御の程度（シュート損傷後の形質値の増分）が小さいことを明らかにした。この誘導防御の集団間変異についても「局所的な適応進化によって誘導防御の程度が採食頻度の異なる場所間で異なる」とする予想と矛盾しない。誘導防御の集団間変異は継代防衛誘導によって生じている可能性も考えられることから、今後の検討が必要である。

摘要

多年生草本イラクサ *Urtica thunbergiana* の被食応答における表現型可塑性の適応的意義を明らかにするため、刺毛形質における（１）年度をまたぐ誘導防御の継続、（２）世代をまたぐ誘導防御の継続（継代防衛誘導）、（３）採食体制が異なる集団間の誘導防御の差違、に注目して研究を行った。まず、年度をまたぐ誘導防御の実態を明らかにするため、奈良県奈良市に位置する奈良公園（排除区）において自然条件下で生育する当年生実生を対象に２年間にわたる茎頂切除実験を行い、切除回数と個葉面積・刺毛形質（葉の表面・裏面の刺毛数、刺毛密度、刺毛長）及び器官重（葉重、茎重、根重）との関係を調べた。その結果、春に茎頂を切除された個体において、切除後に形成された夏の葉の裏面の刺毛数と刺毛長が増加することを明らかにした。イラクサ属の刺毛は草食獣に対する防御機能を持つことから、このような刺毛形質の表現型可塑性は誘導防御とみなすことができる。切除にともなう刺毛形質のこのような変化は少なくとも翌年まで維持され、切除が２年間にわたって繰り返される場合には２年目の夏の葉における誘導防御の程度（切除にともなう形質値の増加量）がさらに増加する傾向が認められた。このような年度をまたぐ誘導防御の継続と増加は、採食圧が時空間的に変動する環境下において効率良く防御力を高めることを可能にすると考えられる。茎頂切除実験では、茎頂を切除されない個体の刺毛が経年的に短くなることも明らかとなった。この結果は、長い刺毛が維持されるためには毎年連続して切除される必要があることを示唆している。このような刺毛長の経年的な減少は、被食頻度が低い環境下で刺毛形成にかかるコストを減らすことに貢献すると考えられる。一方、茎頂切除実験に供したイラクサでは、器官重に及ぼす茎頂切除の明瞭な影響は認められなかった。茎頂を切除された個体において、切除に伴う補償成長によって誘導防御にかかるコストが相殺されているのかどうかを今後検討する必要がある。

次に、刺毛形質における継代防衛誘導の実態を明らかにするため、茎頂を切除したイラクサから得られた子植物を用いた栽培実験を温室で行い、親世代における茎頂切除が子世代の刺毛形質に及ぼす影響を調べた。その結果、親植物での切除回数と子植物の葉の裏面の刺毛長との間に正の相関があることを明らかにした。この結果は、シュートが損傷したイラクサの刺毛形質に継代

防衛誘導が生じること、すなわち、親世代において現れた誘導防御が世代間エピジェネティック遺伝などのメカニズムによって子世代に伝達されることを示している。イラクサでは親植物と子植物で採食圧が相関する可能性が高いことから、刺毛形質における継代防衛誘導は子植物の生存率を高めると考えられる。さらに、親世代におけるシカ（ニホンジカ）による被食が子世代の刺毛形質に及ぼす影響を明らかにするため、シカによる採食圧が高い奈良公園（採食区）に設置した防鹿柵内と防鹿柵外に生育するイラクサから得られた果実を用いた栽培実験を行った。その結果、夏の葉の裏面の刺毛数と表・裏両面の刺毛長について、防鹿柵外由来の子植物の方が防鹿柵内の子植物よりも大きな値を示すことが明らかとなった。この結果も、シカによる被食によってイラクサの刺毛形質に継代防衛誘導が現れることを示している。

さらに、シカによる採食体制が異なるイラクサ集団間の刺毛形質と誘導防御の差違を明らかにするため、シカの個体密度もしくは採食頻度が異なる集団間で（1）未被食個体の刺毛形質、及び（2）茎頂切除によって生じる誘導防御の程度を比較した。まず、奈良県内においてシカの個体密度が異なる3地域（奈良公園（採食区）、桜井市、高市郡高取町）の集団を対象に、自然条件下で生育する未被食個体と栽培個体の刺毛形質を分析し、個体密度が高い地域（奈良公園）の集団の方が、低い地域（桜井市と高取町）の集団よりも大きな刺毛形質値を持つことを明らかにした。この結果は、「未被食個体の防御形質値は、その生育地の採食体制への適応進化によって遺伝的に異なる」とする理論的予想と矛盾しない。さらに、奈良公園においてシカの採食頻度が異なる2地点の集団を対象に、自然条件下で生育する当年生実生を用いた茎頂切除実験を行い、高頻度に絶え間なく被食される場所の実生は、低頻度で断続的に被食される場所の実生よりも葉の表面の刺毛数と裏面の刺毛長に見られる誘導防御の程度（シュート損傷後の形質値の増加量）が小さいことを明らかにした。この誘導防御の集団間変異も「誘導防御の程度は採食頻度の異なる場所間で遺伝的に異なる」とする予想と矛盾しない。誘導防御の程度の集団間変異は継代防衛誘導によって生じている可能性も考えられることから、今後のさらなる検討が必要である。

Summary

I studied adaptive significance of phenotypic plasticity in response to browsing in stinging hair traits of a nettle (a perennial herbaceous plant, *Urtica thunbergiana*) with a focus on (1) induced defense retained longer than one growing season, (2) transgenerational defense induction, and (3) variations among populations with different browsing regimes. First, clipping experiment was conducted for successive two years using current-year nettle seedlings grown in Nara Park (“exclosure site”), central Japan, to investigate effects of clipping of shoot apex on stinging hair traits (the number, density, and length of stinging hairs per leaf) and growth increment (mass of leaf, stem, and root per plant). The experiment revealed that the clipping in the first spring increased the number and length of stinging hairs on the lower leaf surface in the subsequent summer for shoots produced after the clipping, indicating that the clipping causes phenotypic plasticity that can be regarded as induced defense for the stinging hair traits. These induced responses continued in the second grown season, and the magnitude of the induced defense in the second season increased with increasing the number of times of clipping in the two years. Such induced defense retained in the next season would effectively increase the magnitude of defense in environments with spatial-temporal heterogeneity of herbivory. On the other hand, the experiment revealed that the intact nettle seedlings produced shorter stinging hairs in the second summer than in the first summer, suggesting that maintenance of long stinging hairs requires continuous damages occurring more than one grown season. This decrease in the stinging hair length from the first year to the second year might decrease the cost of defense in environments without the risk of browsing. In addition, the growth increments of the nettle seedlings did not differ between treatments in the experiment, suggesting that the cost to produce more and longer stinging hairs in clipped nettle seedlings might be canceled by compensatory growth due to the clipping. Further studies are necessary to test this idea.

Second, progenies (i.e., nettle seedlings) from parents used for the aforementioned clipping experiment were cultivated in a green house to investigate whether browsed nettles and their progenies exhibit transgenerational defense induction in the stinging hair traits. This experiment revealed that stinging hairs

on lower leaf surface of the nettle seedlings became longer with increasing the number of times of clipping in their parents, indicating that progenies from clipped nettles exhibit transgenerational defense induction in the length of stinging hairs by some mechanisms such as transgenerational epigenetic inheritance. This transgenerational defense induction may increase the survival of progenies, since there would be positive correlation in the provability and magnitude of browsing between parents and their progenies in nettles. In addition, progenies from parents grown inside and outside deer enclosure in Nara Park (“browsed site”) with heavy browsing pressure by Sika deer (*Cervus nippon*) were cultivated in the green house to investigate transgenerational defense induction in stinging hair traits of a nettle population heavily browsed by Sika deer. This cultivation revealed that progenies from parents outside deer enclosure exhibited longer stinging hairs than those from parents inside deer enclosure, suggesting that nettle populations heavily browsed by Sika deer also exhibit transgenerational defense induction in the length of stinging hairs.

Finally, stinging hair traits of leaves and their magnitude of induced defense for nettle seedlings were compared among areas with different browsing regimes by Sika deer in Nara prefecture, central Japan, to test theoretical predictions about evolution of plant defensive traits as follows. First, analysis of stinging hair traits of unbrowsed seedlings in natural habitats and that of cultivated seedlings in a green house were conducted for three nettle populations (populations in Nara Park (browsed site), Sakurai, and Takatori) to test the prediction about the relationship between herbivory regime and defensive trait. Both analyses showed that unbrowsed nettle seedlings of a population with high density of Sika deer (Nara Park) exhibited more and longer stinging hairs than those of other populations with low Sika density. This result is consistent with the prediction that defensive traits of unbrowsed plants genetically differ between habitats with different herbivory regimes because of locally adaptive evolution. Then, clipping experiments (clipping of shoot apex) were conducted for nettle seedlings grown in two sites (browsed site and enclosure site) with different frequency of browsing by Sika deer in Nara Park, and the magnitude of induced response (i.e., the extent of increase for a trait value in response to the clipping) in their stinging hair traits were analyzed to test the prediction about the magnitude of induced defense. The analysis revealed that

nettle seedlings in a site (browsing site) with high frequency of browsing exhibited smaller magnitude of induced defense than those in a site (exclosure site) with low frequency of browsing for the number of stinging hairs on upper leaf surface and the length of stinging hairs on lower leaf surface. This result is consistent with the prediction that the magnitude of induced defense genetically differs between habitats with different frequency of herbivory because of locally adaptive evolution. On the other hand, it is likely that transgenerational defense induction is responsible for the difference in the magnitude of induced response between the sites. Further studies are necessary to test this idea.

引用文献

Agrawal A. A. (1999) Induced plant defense: Evolution of induction and adaptive phenotypic plasticity. In: Agrawal A. A., Tuzun S., & Bent E. (eds). Inducible plant defense against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture. American Physiological Society Press, St. Paul. MN. pp. 251-268.

Agrawal A. A., Laforsch C. & Tollrian R. (1999) Transgenerational induction of defenses in animals and plants. *Nature* **401**:60-62.

Agrawal A. A. (2001) Transgenerational consequences of plant responses to herbivory: An adaptive maternal effects? *The American Naturalist*. **5**:554-569.

Begon M., Townsend C. R. & Harper J. L. (2006) Ecology. from individuals to ecosystems. Fourth Edition Blackwell Main Street, Malden MA.

Brett C. & Waldron K. (1990) Physiology and Biochemistry of plant Cell Walls. Topics in plant physiology 2. London Unwin Hyman Ltd.

Clark C. W. & Harvell C. D. (1992) Inducible defenses and the allocation of resources: a animal model. *The American Naturalist*. **134**:521-539.

Darlin P., Ågren J., Björkman C., Huttunen P., & Kärkkäinen K.(2008) Leaf trichome formation and plant resistance to herbivory. In:Schaller A. Induced plant resistance to herbivory. Springer pp.89-105.

Engelberth J., Alborn H. T., Scherz E.A. & Tumlinson J. H. (2004) Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *The National Academy of Sciences of the USA* **6**:1781-1785.

Futuyma D. J. (1986) *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 進化生物学 (原書第2版) 岸由二 他訳 蒼樹書房 1991 東京

Fu H. Y., Chen S. J., Chen R. F., Ding W. H., Kuo-Huang L. L. & Huang R. N. (2006) Identification of Oxalic acid and Tartaric acid as major persistent pain-inducing toxins in the stinging hairs of the nettle, *Urtica thunbergiana*. *Annals of Botany* **98**:57-65.

Gavloski J. E. & Lamb R. J. (2000) Compensation for herbivory in cruciferous plants: specific responses in three defoliating insects. *Environmental Entomology* **29**:1258-1267.

Gilbert S.F. & Epel D. (2009) *Ecological Developmental Biology: Integrating Epigenetics, Medicine, and Evolution*. Sinauer Associates MA.

Gowa J. H. (1997) Physical and chemical response of juvenile *Acacia tortis* trees to browsing. Experimental evidence. *Functional Ecology* **11**:106-111.

Grubb P. J. (1992) A positive distrust in simplicity-lessons from plant defenses and from competition among plants and among animals. *Journal of Ecology* **83**:885-890.

Harberlandt G. (1886) *Zur Anatomie und Physiologie der pflanzlichen Brennhaare*.

Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften. Wien. **93**:123-145.

Haukioja E. (1990a) Induction of defenses in tree. *Annual Review of Entomology* **36**:25-42.

Haukioja E. (1990b). Positive and negative fieldbacks in insect-plant interactions. In *Population dynamics of forest insects*. ed. Watt. Andover, Hampshire: Intercept, pp. 113-122.

Heil M & Bueno C. S. (2007) With-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *The National Academy of Sciences of the USA* **13**:5467-5472.

Heil M. (2010) Plastic defense expression in plants. *Evolutionary Ecology* **24**:555-569.

Herman J.J. & Sultan S.E. (2011) Adaptive transgenerational plasticity in plants: case studies, mechanism, and implications for natural populations. *Frontiers in plant science* **2**.

Holeski L. M. (2007) Within and between generation phenotypic plasticity in trichome density of *Mimulus guttatus*. *Journal of Evolutionary Biology*. **20**:2092-2100.

Holeski L. M., Jander, G. & Agrawal A. A. (2012) Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends in Ecology and Evolution* **11**:618-626.

Jablonka E. & Lamb M. J. (2005) Evolution in four dimensions: genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life. MIT Press, Cambridge, MA.

Jablonka E. & Raz G. (2008) Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The quarterly review of biology* **84**:131-176.

Kamata N., Igarashi Y., & Ohara S. (1996) Induced response of the Siebold's Beech (*Fagus crenata* Blume) to Manual defoliation. *Journal Forestry Research* **1**:1-7.

Karban R. & Myers J. H. (1989). Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **20**:331-348.

Karban R. & Baldwin I. T. (1997) Induced responses to herbivory. The University of Chicago Press. Chicago. London.

Karban R. (2011) The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Functional Ecology* **25**:339-347.

北村四郎・村田源(1961) 原色日本植物図鑑草本編 [II] 離弁花類 保育社 大阪

加藤禎孝 (2001) 奈良公園に分布するイラクサ *奈良植物研究* **23**:11-14.

Kato T., Ishida K. & Sato H. (2008) The evolution of nettle resistance to heavy deer browsing. *Ecological Research* **23**:339-345.

Kopp M. & Tollrian R. (2003b) Reciprocal phenotypic plasticity in a predator-prey system: inducible offences against inducible defences? *Ecology Letters*. **6**:742-748.

Koyama L., Tokuchi N., Hirobe M., & Koba K. (2001) The potential of NO₃⁻ utilization by woody shrub species *Lindera triloba*: a cultivation test to estimate the saturation point of soil NO₃⁻ N for plants. Optimizing nitrogen management in food and energy production and environment protection: Proceedings of the 2nd international nitrogen conference on science and policy. pp. 514-519.

Lenggenhager K (1974) Neues über den Mechanismus der Nesselstiche. *Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft* **1**:73-80.

McNaughton S. J. (1984) Grazing lawns: animals in herds, plant form, and coevolution. *The American Naturalist* **124**:863-886.

Molisch H. & Dobat K. (1979) Botanische Versuche und Beobachtungen mit einfachen Mitteln: Ein Experimentierbuch für Schulen und Hochschulen. 5 Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Deutschland

Morrison.L.W. (2002) The geographic distribution of pubescence in the sea daisy, *Borrchia aborens*, on Bahamian Islands. *Global Ecology & Biogeography* **11**:247-252.

Mutikainen M. & Walls M. (1995) Growth, reproduction and defence in nettles: responses to herbivory modified by competition and fertilization. *Oecologia* **104**:487-495.

Okuda T. (1987) The phenotypic variation of *Glochidion obovatum* Sieb.et Zucc. in relation to the deer browsing. *Hikobia* **10**:13-19.

- Padilla D.K. (2001) Food and environmental cues trigger an inducible offence. *Evolutionary Ecology Research* **3**:15-25.
- Pigliucci M. (2001) Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Pollard A. J. & Briggs D. (1982) Genecological studies of *Urtica dioica* L. I . The nature of intraspecific variation in *U. dioica*. *New Phytologist* **92**:453-470.
- Pollard A. J. & Briggs D. (1984a) Genecological studies of *Urtica dioica* L. II. Patterns of variation at Wicken Fen, Cambridgeshire, England. *New Phytologist* **96**:483-499. Pollard A. J. & Briggs D. (1984) Genecological studies of *Urtica dioica* L. III. stinging hairs and plant-herbivore interactions. *New Phytologist* **97**:507-522.
- Pollard A. J. (1992) The Importance of Deterrence: Responses of Grazing Animals to Plant Variation. In Fritz R. S. and Simms E. L. (eds.) *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens Ecology, Evolution, and Genetics*. The University of Chicago Press , Chicago and London pp.216-239.
- Pullin A. S. & Gilbert J.E. (1989) The stinging nettle, *Urtica dioica*, increase trichome density after herbivore and mechanical damage. *Oikos* **54**:275-280.
- Rakyan V. & Whitelaw E. (2003) Transgenerational epigenetic inheritance *Current Biology*

R development core team (2010) R. A language and Environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna Austria URL: <http://www.R-project.org/>

Rozendaal D. M. A., Hurtado V.H. & Poorter L. (2006) Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light relationships with light demand and adult stature. *Functional Ecology* **20**:207-216.

Shikata M., Kato T., Shibata E. & Sato H. (2013) Among-population variation in resistance traits of a nettle and its relationship with deer habitat use frequency. *Ecological Research* **28**:207-216.

Silvertown J. & Charlesworth D. (2001) Introduction to plant Biology. Blackwell. Main Street, Malden MA.

Scoville A. G., Barnett L. L., Bodby-Roels S., Kelly J. K. & Hilema L.C. (2011) Differential regulation of a MYB transcription factor in *Mimulus guttatus*. *New Phytologist* **191**:251-263.

Sowers A. E. & Thurston E. L. (1979) Ultra structural evidence for uptake of silicon containing silicic acid analogs by *Urtica pilulifera* and incorporation into wall silica. *Protoplasma*. **101**:11-21.

SPSS (1999) SPSS base 9.0.J. syntax reference guide SPSS. Chicago

Strauss S. Y. & Agrawal A.A. (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* **14**:179-185.

Takada M., Asada M. & Miyashita T. (2001) Regional differences in the morphology of a shrub *Damnacanthus indicus*: An induced resistance to deer herbivory? *Ecological Research* **16**:809-813.

立澤史郎 (2013) 「奈良のシカ」の生態と管理 ―野生―と馴致―は両立するか― 前迫ゆり (編) 世界遺産 春日山原始林―照葉樹林とシカをめぐる生態と文化― ナカニシヤ出版 pp. 194-212.

田中健太 (2017) 進化学を照らす新しい光? : エピジェネティクスによる適応的継代効果. エピジェネティクスの生態学 環境に応答して遺伝子を調節するしくみ 種生物学会 責任編集 荒木希和子 pp.155-164.

Thurston E.L. (1969). An anatomical and fine structure study of stinging hairs in some members of the Urticaceae, Euphorbiaceae and Loasaceae. Ph.D. Diss. Iowa State University.

Tollrian R. & Harvell C. (1999) The evolution of inducible defenses: current ideas. Princeton University Press. Princeton, NJ. pp. 306-321.

塚谷裕一 (2007) 植物の表現型可塑性とその進化 細胞工学シリーズ 23 植物の進化 秀潤社 東京 pp.116-123.

Tuomi J., Niemelä P. & Sirén, S. (1990). The Panglossian paradigm and delayed inducible accumulation of phenolics in mountain birch. *Oikos* **59**:399-410.

- Valladares F., Gianoli E. & Gómez J. M. (2007) Ecological limits to plant phenotypic Plasticity. *New Phytologist* **176**:749-763.
- Venable D. L. & Levin D. A. (1983) Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the *Compositae*. *Plant Systematics and Evolution* **1**:1-16.
- Vourc'h G., Martin J., Duncan P., Escarré J. & Clausen T. P. (2001) Defensive adaptations of *Thuja plicata* to ungulate browsing: a comparative study between mainland and island populations. *Oecologia* **126**:84-93.
- Wang Y., Siemann E., Wheeler G. S., Zhu L., Gu. X. & Ding J. (2012) Genetic variation in anti-herbivore chemical defenses in an invasive plant. *Journal of Ecology*. **4**:894-904.
- Yamamoto K. (1997) *LIA 32 for Windows 95. Ver.0.373*. [http:// hp.vector.co.jp/authors/VA008416/index.html/](http://hp.vector.co.jp/authors/VA008416/index.html/)
- Young T. P., Stanton M. L & Christian C. E. (2003) Effects of natural and simulated herbivory on spine length of *Acacia drepanolobium* in Kenya. *Oikos* **101**: 171-179.
- Zangerl A. R. & Berenbaum M. R. (1990) Furanocoumarin in wild parsnip: Genetics and population variation. *Ecology* **5**:1933-1940.

謝辞

本研究は、岩手大学大学院連合農学研究科石田清准教授(弘前大学)・杉山修一教授(弘前大学)・森茂太教授(山形大学)・東淳樹講師(岩手大学)のご指導の下でとりまとめることができた。期間中、先生方から、多くの有益なご指導を賜った。主指導教員の石田清先生には、終始一貫、懇切丁寧かつ的確なご指導をいただき、研究を続けることができた。先生のご指導に深く感謝申し上げます。

調査地の使用をご許可いただいた、東大寺長老 筒井寛昭師、春日大社宮司 花山院弘匡氏・権禰宜 當嶋一平氏、奈良の鹿愛護会長 大川靖則氏・同事務局長 小西涼治氏・同職員 甲斐義明氏・石川周氏、及び桜井市の瀬村サダ子氏には、心より感謝申し上げます。

奈良教育大学自然環境教育センター 鳥居春己教授よりニホンジカの生態について、同大学教育学部 菊地淳一准教授よりイラクサの栽培実験方法を、藤井智康准教授より調査地の土壌成分の分析についてご指導いただいた。同大学松井淳教授・石田正樹教授より温室、実験装置や器具の使用のご許可いただいた。同大学自然環境教育センター奈良実習園職員 角本一彦氏・浦崎淳氏には、温室の管理等栽培実験にご協力いただいた。野外調査では、妻の加藤耀子より野外調査で、データの記録等の援助を受けた。広島大学教授 出口博則先生、奈良女子大学准教授 佐藤宏明先生始め、これまでにお世話になった多くの方々のご理解とご協力に、感謝申し上げます。イラクサ研究の糸口を与えていただいた、元奈良教育大学教授故北川尚史先生より、研究について多くのことをご教示賜った。先生のご指導に心からお礼申し上る。